



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

Desarrollo de un prototipo de vacuna contra el virus Andes basado en la tecnología de ARN mensajero

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

CARLOS ALEXIS VILLACÍS AGUIRRE
CONCEPCIÓN-CHILE
2026

Profesor Guía: Jorge Toledo Alonso, Ph.D.
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

DERECHO DE AUTOR

© 2026

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Soraya Gutiérrez Gallegos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ángel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Nelson Santiago Vispo
Profesor Evaluador Externo
Clinical Biotec S.L.

Dra. Raquel Montesino Seguí
Directora
Programa Doctorado en Biotecnología
Molecular

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, como en todo, debo darle gracias a mi Dios, pues Él me trajo a este mundo con un propósito, que espero cumplir todos los días de mi vida. Todos mis conocimientos, habilidades y talentos son por y para mi Papá.

Mi eterna gratitud a mis padres, Verónica y Gustavo, por su amor, apoyo, sacrificio, y por la educación y los valores que me han inculcado. A la Dra. Karen, por su soporte incondicional y los consejos que me ha brindado como hermana mayor.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Thelvia Ramos, mi segunda madre, por apoyarme durante toda mi formación profesional y personal.

Extiendo mi estima y agradecimiento al Dr. Jorge Toledo, mi guía de tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio, y depositar su confianza en mi trabajo. Este proyecto se concretó gracias a su excepcional mentoría.

Un sentido agradecimiento a la Dra. Raquel Montesino, Directora del Programa de Doctorado, por su ayuda y dedicación.

Un merecido agradecimiento a los doctores Oliberto Sánchez, Emilio Lamazares, Natalie Parra, Frank Camacho, Fátima Reyes y Viana Manrique, por su tiempo, paciencia y asesoría técnica en la fase experimental de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de doctorado, y a los miembros del Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, y del Laboratorio de Biofármacos Recombinantes. Un reconocimiento especial a Felipe Sandoval, y a la Dra. Carolina Gómez por sus contribuciones.

Un especial agradecimiento a la Dra. María Angélica Contreras, quien me apoyó y acompañó durante todo este camino. Asimismo, agradezco al Dr. Nelson Santiago, por su orientación constante durante la realización de este trabajo.

El oportuno agradecimiento a mis tesisistas Nicole, Cristy y Daria, por su esfuerzo y dedicación en las tesis de pregrado que se originaron de este proyecto.

Mis francos agradecimientos a Cristian y Jocelyn, mis líderes espirituales, a mi amigo Thiago, y a todas las personas que conforman el Ministerio de la ICT Chile.

Aprovecho para agradecer a José Crisóstomo, Carolina Sepúlveda y demás integrantes de la Sección de Registro de Productos Biológicos del Instituto de Salud Pública de Chile, por abrirme las puertas y compartirme sus conocimientos durante mi breve pasantía.

Finalmente, el correspondiente agradecimiento a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, por ser la fuente de financiamiento que permitió la ejecución de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Virus Andes.	1
1.1.1. Tropismo celular.	3
1.1.2. Replicación viral.	4
1.1.3. Evasión de la respuesta antiviral.	7
1.1.4. Transmisión persona a persona.	7
1.2. Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus.	9
1.2.1. Fisiopatología de la infección.	10
1.2.2. Cuadro clínico de la enfermedad.	12
1.2.3. Alternativas terapéuticas para el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus.	14
1.2.3.1. Tratamiento con antivirales.	15
1.2.3.2. Terapia de anticuerpos.	15
1.2.4. Desarrollo de prototipos de vacunas contra el virus Andes.	18
1.2.4.1. Candidato de ADN plasmídico.	20
1.2.4.2. Candidato de vectores adenovirales.	21
1.2.4.3. Candidato basado en el virus de estomatitis vesicular.	22
1.2.4.4. Candidato de subunidades proteicas.	22
1.2.4.5. Candidatos de ARN mensajero.	23
1.3. Tecnología de ARN mensajero.	24
1.3.1. Vacunas de ARN mensajero contra enfermedades infecciosas.	27
1.3.2. Desarrollo de prototipos de vacunas de ARN mensajero.	30
1.4. Problema/solución propuesta.	33
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	35
III. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1. Materiales.	38
4.1.1. Sistemas biológicos <i>in vitro</i> .	38

4.1.2. Medios de cultivo. _____	39
4.1.3. Plásmidos. _____	40
4.1.4. Otros ácidos nucleicos _____	41
4.1.5. Enzimas y anticuerpos. _____	41
4.1.6. Reactivos químicos. _____	42
4.1.7. Soluciones y suspensiones. _____	42
4.1.8. Kits comerciales. _____	45
4.1.9. Otros materiales. _____	46
4.1.10. Animales. _____	46
4.2. Metodología. _____	48
4.2.1. Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis <i>in vitro</i> . _____	48
4.2.2. Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión <i>in vitro</i> de la formulación vacunal. _____	58
4.2.2.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero. _____	58
4.2.2.2. Caracterización biológica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero. _____	60
4.2.2.3. Análisis estadístico. _____	62
4.2.3. Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio. _____	63
4.2.3.1. Diseño y ejecución del experimento en el modelo animal de hámster sirio. _____	63
4.2.3.2. Caracterización de la respuesta humoral estimulada por la formulación vacunal. _____	65
4.2.3.3. Caracterización de la respuesta celular estimulada por la formulación vacunal. _____	69
4.2.3.4. Análisis Estadístico. _____	70
V. RESULTADOS _____	73
5.1. Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis <i>in vitro</i> . _____	73
5.1.1. Diseño y producción del vector plasmídico que contenía el ADN molde. _____	73
5.1.2. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc en células de mamífero a partir del ADN molde. _____	76
5.1.3. Producción del ARN mensajero que codificaba los antígenos de superficie Gn/Gc del virus Andes. _____	82
5.1.3.1. Transcripción <i>in vitro</i> del ARN. _____	82
5.1.3.2. Adición de la caperuza en el extremo 5'. _____	84
5.1.3.3. Evaluación de la integridad del ARN mensajero bajo estrés térmico agudo. _____	85
5.1.3.4. Determinación de la funcionalidad del ARN mensajero. _____	86
5.1.3.5. Modificación del ARN mensajero con N1-metilpseudouridina. _____	87
5.1.4. Encapsulación del ARN mensajero en nanopartículas lipídicas. _____	90

5.2. Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión <i>in vitro</i> de la formulación vacunal.	91
5.2.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.	91
5.2.1.1. Determinación de la distribución de tamaño y carga superficial mediante dispersión dinámica y electroforética de luz.	91
5.2.1.2. Identificación de la morfología a través de microscopía electrónica de transmisión.	93
5.2.1.3. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARN mensajero.	94
5.2.2. Caracterización biológica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.	96
5.2.2.1. Estimación del perfil de seguridad <i>in vitro</i> de la formulación vacunal.	96
5.2.2.2. Evaluación de la actividad relativa de expresión <i>in vitro</i> de la formulación vacunal.	100
5.3. Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio.	102
5.3.1. Monitoreo del peso corporal y la temperatura durante el experimento.	102
5.3.2. Caracterización de la respuesta humoral estimulada por la formulación vacunal.	108
5.3.2.1. Evaluación del curso temporal de la producción de anticuerpos anti-Gn/Gc.	108
5.3.2.2. Determinación del título de anticuerpos totales.	109
5.3.2.3. Cuantificación del título de anticuerpos neutralizantes.	111
5.3.3. Caracterización de la respuesta celular estimulada por la formulación vacunal.	112
VI. DISCUSIÓN	116
VII. CONCLUSIONES	146
VIII. RECOMENDACIONES	147
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
X. ANEXOS	177
Anexo 1. Aprobación del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.	177
Anexo 2. Determinación del diámetro, dispersidad y potencial zeta de las nanopartículas lipídicas.	179
Anexo 3. Listado de Reactivos.	180

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de candidatos vacunales contra el ANDV.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Enzimas.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 3. Anticuerpos primarios.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 4. Anticuerpos secundarios.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 5. Componentes lipídicos de las nanopartículas lipídicas.</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 6. Partidores empleados en la evaluación de expresión de citocinas en esplenocitos de hámster sirio.</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 7. Resumen de la producción de ARNm GPC modificado con N1-metilpseudouridina.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 8. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 9. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARNm en LNPs.</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 10. Cuantificación de la expresión relativa de las LNPs-ARNm.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 11. Ensayo en hámster sirio. Peso absoluto en gramos de cada grupo al inicio y final.</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 12. Ensayo en hámster sirio. Peso corporal relativo al valor basal por grupo.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabla 13. Ensayo en hámster sirio. Comparación de la temperatura entre días.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla 14. Ensayo en hámster sirio. Comparación de la temperatura entre grupos.</i>	<i>107</i>
<i>Tabla 15. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs-ARNm.</i>	<i>179</i>
<i>Tabla 16. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs vacías.....</i>	<i>179</i>

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Arquitectura del virión, organización genómica y determinantes moleculares de las glicoproteínas del ANDV.	2
Figura 2. Dinámica del ciclo de replicación del ANDV y señalización de evasión antiviral.	6
Figura 3. Fisiopatología del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus, inducido por el virus Andes.	12
Figura 4. Estructura básica de la molécula de ARN mensajero.	26
Figura 5. Resumen de la respuesta inmune estimulada por las vacunas de ARN mensajero.	28
Figura 6. Diagrama del proceso productivo de vacunas de ARN mensajero.	33
Figura 7. Diagrama de objetivos del trabajo doctoral.	37
Figura 8. Esquema del régimen de inmunización y grupos experimentales en hámster sirio.	65
Figura 9. Representación gráfica de la estructura del molde de ADN.	74
Figura 10. Clonación del ADN molde en el vector pUC-MinusMCS-GnGc.	74
Figura 11. Identificación de ADN plasmídico obtenido a partir de clones positivos para pUC-MinusMCS-GnGc.	75
Figura 12. Análisis de restricción del vector pUC-MinusMCS-GnGc.	76
Figura 13. Mapa del vector pEGFP-N1.	77
Figura 14. Estrategia de clonación para el análisis de la expresión del molde de ADN.	77
Figura 15. Digestión de los vectores pEGFP-N1 y pUCMinusMCS-Gn/Gc.	78
Figura 16. Visualización de ADN plasmídico aislado de los clones positivos.	79
Figura 17. Identificación del ADN plasmídico obtenido de los clones positivos.	80
Figura 18. Análisis de restricción del vector pGPC aislado del clon seleccionado.	81
Figura 19. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del vector pGPC.	82
Figura 20. Linealización del vector pUCMinusMCS-Gn/Gc.	83
Figura 21. Visualización del ARN GPC producido mediante transcripción in vitro.	84
Figura 22. Visualización del ARNm GPC con caperuza 5' purificado.	85
Figura 23. Visualización del ARNm GPC sometido a estrés térmico.	86
Figura 24. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del ARNm GPC.	87
Figura 25. Comparación de la identidad, integridad y estabilidad del ARNm GPC modificado y no modificado. ..	88
Figura 26. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del ARNm GPC modificado.	90
Figura 27. Determinación por dispersión dinámica de la luz de la distribución de tamaños de las nanoformulaciones.	93
Figura 28. Observación de las LNPs mediante microscopía electrónica de transmisión.	94
Figura 29. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARNm en LNPs.	95
Figura 30. Determinación de la citotoxicidad in vitro de la formulación en células HeLa.	97
Figura 31. Comparación de las concentraciones entre tratamientos en células HeLa.	98
Figura 32. Determinación de la citotoxicidad in vitro de la formulación en células HFF.	98
Figura 33. Comparación de las concentraciones entre tratamientos en células HFF.	99
Figura 34. Evaluación de la expresión relativa in vitro de LNPs-ARNm.	101
Figura 35. Ensayo en hámster sirio. Curso del peso absoluto en gramos.	103
Figura 36. Ensayo en hámster sirio. Peso corporal relativo al basal en función del tiempo.	104
Figura 37. Ensayo en hámster sirio. Dinámica de la temperatura corporal.	106
Figura 38. Curso temporal de los niveles de IgG anti-Gn/Gc estimulados por el prototipo vacunal.	109
Figura 39. Título de anticuerpos anti-Gn/Gc totales estimulados por el prototipo vacunal.	110
Figura 40. Título de anticuerpos neutralizantes anti-Gn/Gc estimulados por el prototipo vacunal.	111

Figura 41. Expresión relativa de citocinas en esplenocitos estimulados con el antígeno rGnGc..... 114

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNc: ARN complementario.

ARNdc: ARN de doble cadena.

ARNg: ARN genómico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNrep: ARN autorreplicante.

ANDV: Virus Andes.

DMEM: Medio *Dulbecco's Modified Eagle*.

DLS: Dispersión dinámica de la luz.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima.

ELS: Dispersión electroforética de la luz.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos.

eVLP: Partículas similares a virus modificadas.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

Gn/Gc: Glicoproteínas de superficie del virus Andes.

GPC: Precursor de las glicoproteínas de superficie Gn/Gc.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL-4: Interleucina 4.

IL-6: Interleucina 6.

IL-12: Interleucina 12.

IgG: Inmunoglobulina G.

IVT: Transcripción *in vitro*.

LB: Medio Luria Bertani.

LNPs: Nanopartículas lipídicas.

LNPs-ARNm: Nanopartículas lipídicas que encapsulan ARN mensajero.

MEM: Medio esencial mínimo.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio.

ORF: Marco de Lectura Abierto.

Opti-MEM: MEM optimizado para transfección.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PCDH1: Protocadherina-1.

PDI: Índice de polidispersidad.

PEI: Polietilenimina.

p/v: Peso/volumen.

RdRp: ARN Polimerasa dependiente de ARN.

RNP: Complejos ribonucleoproteicos.

RPMI: Medio *Roswell Park Memorial Institute*.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa.

SCPH: Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

SFB: Suero fetal bovino.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TBS: Tampón Tris Salino.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

USP: Farmacopea de los Estados Unidos.

UTR: Regiones no traducidas.

v/v: Volumen/volumen.

RESUMEN

El virus Andes es el principal agente etiológico del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus en Chile, una enfermedad infecciosa grave que puede progresar hacia falla cardiorrespiratoria y presentar alta letalidad. Además, este virus mantiene relevancia epidemiológica por su condición endémica en Sudamérica y por la evidencia de transmisión persona a persona. A pesar de ello, no existen vacunas aprobadas para uso humano ni tratamientos antivirales específicos frente a este virus. Esta brecha sanitaria refuerza la necesidad de desarrollar nuevas estrategias vacunales dirigidas a blancos antigénicos relevantes, como las glicoproteínas Gn/Gc, que participan en la entrada viral y representan blancos importantes para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar y evaluar un prototipo vacunal basado en ARN mensajero encapsulado en nanopartículas lipídicas, codificante de Gn/Gc del virus Andes.

El ARNm se produjo mediante transcripción *in vitro*, se incorporó una caperuza 5' tipo Cap-1 y se formuló en nanopartículas lipídicas empleando el método de nanoprecipitación. El proceso de síntesis del transcrito presentó rendimientos consistentes, recuperación eficiente después del proceso de adición de caperuza, e integridad compatible con su uso en la formulación. La nanoformulación obtenida mostró una alta eficiencia de encapsulación, tamaño nanométrico homogéneo, baja dispersión y potencial zeta ligeramente negativo. Además, el prototipo mantuvo viabilidad celular por encima del umbral predefinido y no mostró reducción relevante a la concentración de trabajo en las líneas HeLa y HFF, y mostró actividad biológica *in vitro*, evidenciada por la expresión detectable de la glicoproteína Gc en células HEK-293A y por una expresión relativa superior al comparador interno bajo las condiciones del ensayo.

La prueba de concepto en hámster sirio integró el monitoreo de peso corporal y temperatura como indicadores fisiológicos, junto con la evaluación de inmunogenicidad humoral y celular. El seguimiento aportó una lectura inicial de la tolerancia de las formulaciones durante el ensayo, mientras que la evaluación inmunológica mostró que las dosis de 10 µg y 20 µg indujeron anticuerpos totales, actividad neutralizante y una respuesta celular detectable compatible con orientación Th1 frente a Gn/Gc. Sin embargo, la respuesta humoral disminuyó hacia el final del seguimiento, lo que indicó la necesidad de optimizar variables asociadas con la magnitud y persistencia de la respuesta. Además, la dosis de 20 µg no mostró una ventaja inmunológica clara sobre 10 µg, así que esta última se definió como la alternativa más adecuada para la formulación inicial.

Estos resultados demostraron la factibilidad técnica e inmunológica del desarrollo de un prototipo vacunal de ARNm frente al virus Andes, desde la producción del ácido nucleico hasta su formulación, caracterización y evaluación funcional. El presente trabajo aporta una base experimental para optimizar el diseño molecular, la formulación y el esquema de inmunización de candidatos vacunales de ARNm frente al virus Andes, y establece un punto de partida para futuros estudios orientados a evaluar su capacidad protectora.

ABSTRACT

Andes virus is the main etiological agent of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Chile, a severe infectious disease that can progress to cardiorespiratory failure and is associated with high lethality. In addition, this virus remains epidemiologically relevant due to its endemicity in South America and the evidence of person-to-person transmission. Despite this, there are no approved vaccines for human use or specific antiviral treatments against this virus. This public health gap reinforces the need to develop new vaccine strategies targeting relevant antigenic targets, such as the Gn/Gc glycoproteins, which participate in viral entry and represent important targets for the induction of neutralizing antibodies. This study aimed to develop and evaluate a vaccine prototype based on messenger RNA encapsulated in lipid nanoparticles, encoding Andes virus Gn/Gc.

The mRNA was produced by *in vitro* transcription, incorporated a 5' Cap-1 structure, and was formulated into lipid nanoparticles using the nanoprecipitation method. The transcript synthesis process showed consistent yields, efficient recovery after the capping process, and integrity compatible with its use in the formulation. The resulting nanoformulation showed high encapsulation efficiency, homogeneous nanoscale size, low dispersion, and a slightly negative zeta potential. In addition, the prototype maintained cell viability above the predefined threshold and showed no significant reduction at the test concentration in the HeLa and HFF cell lines, and exhibited *in vitro* biological activity, evidenced by detectable expression of the Gc glycoprotein in HEK-293A cells and by an expression greater than the internal comparator under the test conditions.

The proof-of-concept study in Syrian hamsters integrated body weight and temperature monitoring as physiological indicators, together with the evaluation of humoral and cellular immunogenicity. This follow-up provided an initial assessment of the tolerability of the formulations during the assay, while the immunological evaluation showed that the 10 µg and 20 µg doses induced total antibodies, neutralizing activity, and a detectable cellular response compatible with Th1 orientation against Gn/Gc. However, the humoral response decreased toward the end of the follow-up, indicating the need to optimize variables associated with the magnitude and persistence of the response. In addition, the 20 µg dose did not show a clear immunological advantage over 10 µg; therefore, the latter was defined as the most suitable alternative for the initial formulation.

These results demonstrated the technical and immunological feasibility of developing an mRNA vaccine prototype against Andes virus, from nucleic acid production to its formulation, characterization, and functional evaluation. This work provides an experimental basis for optimizing the molecular design, formulation, and immunization schedule of mRNA vaccine candidates against Andes virus and establishes a starting point for future studies aimed at evaluating its protective capacity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus Andes.

El virus Andes (ANDV) es un virus zoonótico emergente de ARN monocatenario de polaridad negativa, perteneciente al género *Orthohantavirus*, de la familia *Hantaviridae*, orden *Elliovirales*, y clase *Bunyaviricetes* (Whitmer et al., 2024). De acuerdo con el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), ANDV es uno de los cuatro linajes de la especie *Orthohantavirus andesense*; junto con el virus Castelo dos Sonhos (CASV), y los virus Lechiguana (LECHV) y Orán (ORNV) (Bradford et al., 2024). Los viriones de ANDV son partículas envueltas, esféricas o pleomórficas, con un diámetro de 80-120 nm, y poseen glicoproteínas de membrana que median su entrada celular (Figura 1A). El genoma vírico se compone de tres segmentos de ARN, denominados según su longitud: pequeño (S, 2 kb), mediano (M, 3.7 kb) y grande (L, 6.5 kb) (Barker et al., 2023). Cada segmento de ARN viral está flanqueado por regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', que presentan secuencias complementarias y forman una estructura denominada *panhandle*, esencial para la transcripción viral y la replicación del genoma en el citoplasma de la célula hospedante (Royster et al., 2024). Estos segmentos de ARN genómico se encapsulan en complejos ribonucleoproteicos (RNP) helicoidales individuales, ensamblados funcionalmente por la nucleoproteína viral (N) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El segmento S codifica la nucleoproteína de ~50 kDa; el segmento M codifica el precursor de la poliproteína GPC, de unos 130 kDa, que sufre un proceso de escisión en el retículo endoplásmico para generar las glicoproteínas de membrana N-terminal (Gn, unos 70 kDa) y C-terminal (Gc, unos 55 kDa), las cuales se ensamblan en heterodímeros de superficie; y el segmento L codifica la enzima RdRp, de unos 250 kDa (R.-X. Chen et al., 2023). El segmento S del ANDV también codifica una proteína no estructural (NSs, 9 kDa), que funciona como un inmunosupresor de la vía de inducción del interferón tipo I, facilitando así la progresión de la infección (Figura 1B) (Duboeuf et al., 2025).

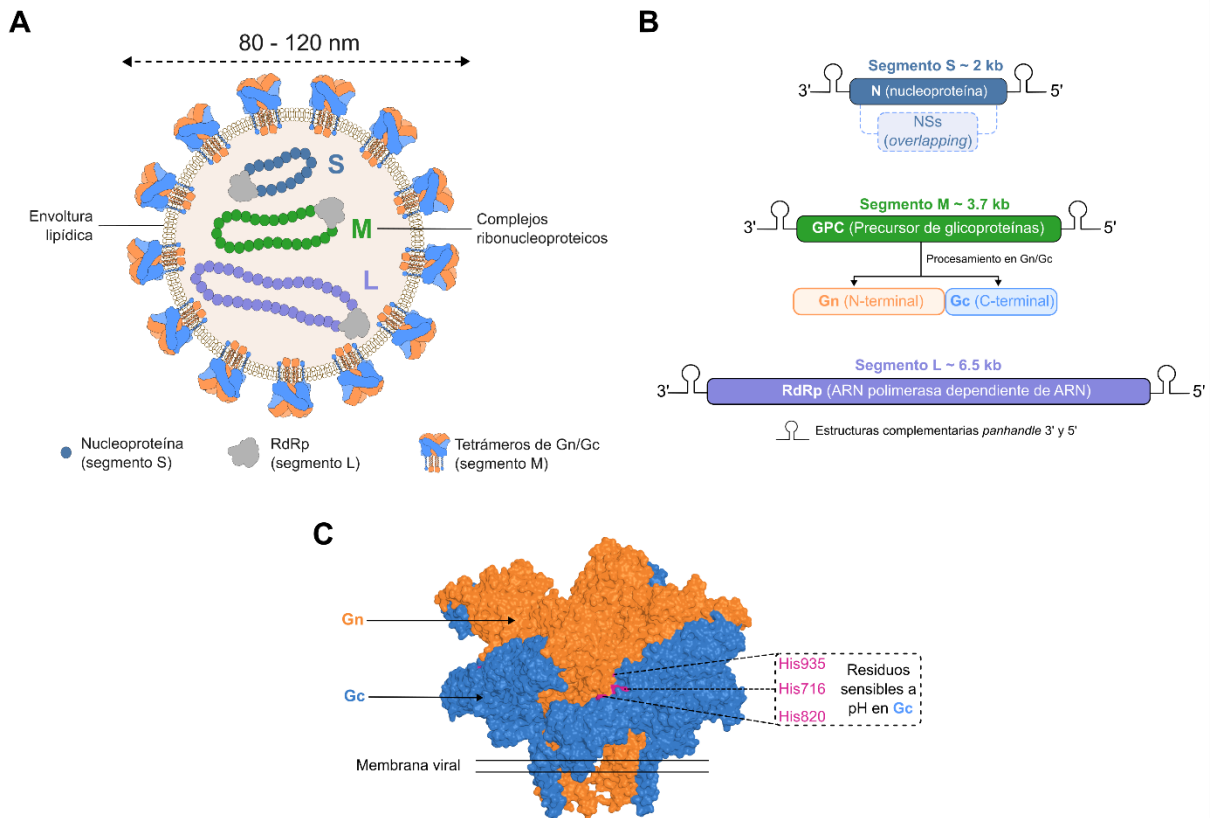


Figura 1. Arquitectura del virión, organización genómica y determinantes moleculares de las glicoproteínas del ANDV.

A. Arquitectura del virión: el ANDV es un virus envuelto que se caracteriza por una superficie densamente poblada con espículas tetraméricas de las glicoproteínas Gn y Gc. El interior contiene tres RNP, donde la proteína N encapsula el genoma de ARN segmentado. **B.** Organización del genoma: el genoma de ARN monocatenario de sentido negativo del ANDV se divide en tres segmentos. Las secuencias complementarias terminales de cada segmento forman estructuras en forma de mango de sartén, fundamentales para la unión de la polimerasa y el empaquetamiento del genoma. **C.** Representación de Gn/Gc: las glicoproteínas Gn y Gc del ANDV se ensamblan en un complejo tetramérico: la protonación endosómica de las histidinas conservadas en la glicoproteína Gc (His716, His820 e His935) desencadena la reorganización conformacional que impulsa la inserción del bucle de fusión y la liberación del genoma viral. *Fuente: elaboración propia.*

El virus es endémico de Sudamérica, distribuyéndose principalmente en Chile y Argentina (Padula et al., 2000). El ser humano se contagia a través del contacto con aerosoles de heces, orina y saliva del principal portador del ANDV, el ratón de cola larga (*Oligoryzomys longicaudatus*) (Juan et al., 2019). Se han descrito otras vías de inoculación, como contacto de material contaminado con virus a mucosas, por vía sanguínea, y la transmisión de persona a persona. En el reservorio animal, la infección por ANDV es asintomática y persistente, pero en el caso de los humanos, desencadena

el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH), que provoca congestión pulmonar e insuficiencia respiratoria y cardíaca en la fase grave (Moore y Griffen, 2022). Esta enfermedad es estacional, concentrándose alrededor de 70 % de los casos de cada año en primavera-verano (Ministerio de Salud de Chile, 2026), y presenta una letalidad que puede alcanzar aproximadamente de hasta el 40 % debido al edema pulmonar y shock cardiogénico que pueden desarrollar los pacientes infectados (Durieux Trouillette et al., 2023).

1.1.1. Tropismo celular.

Las glicoproteínas de superficie Gn y Gc del ANDV son reconocidas por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ (Lapointe et al., 2023), y utilizan la protocadherina-1 (PCDH1) para la adhesión y entrada de las partículas virales en las células (Dieterle et al., 2021; Jangra et al., 2018). PCDH1 constituye un factor crítico para la entrada de ANDV, mientras que las integrinas $\alpha_v\beta_3$ están implicadas en procesos de interacción y señalización asociados con la infección (Martínez-Valdebenito et al., 2019; Slough et al., 2023).

Se ha reportado que existe correlación entre los receptores de entrada celular y la patogenicidad del ANDV, y aunque los factores que influyen en su tropismo específico aún no se esclarecen por completo (Noack et al., 2020), la clave de esta correlación podría estar en el segmento M del virus, a pesar de que las glicoproteínas de superficie de los *Orthohantavirus* tienen una alta identidad y homología estructural (Mittler et al., 2023). Las cepas asociadas con una eficiente transmisión persona a persona poseen un polimorfismo de un solo nucleótido en el segmento M que resulta en una sustitución aminoacídica en Gc, lo que modula la dinámica de la infección y le permite utilizar receptores alternativos para infectar otras células además del endotelio vascular pulmonar (Bellomo et al., 2023; Mittler et al., 2019).

La afinidad de Gn/Gc del ANDV por el receptor PCDH1 facilita la infección del epitelio respiratorio, lo que favorece la transmisión persona a persona por esta vía (Slough et al., 2023). Un estudio demostró que el virus ingresa y se replica en las células epiteliales alveolares y en macrófagos pulmonares. Esto ocasiona que las partículas virales puedan descargarse en el lumen alveolar y en los segmentos conductores de las vías respiratorias, y ser expulsadas por expectoración. La investigación también describió la

infección de las células secretoras de las glándulas salivales, que resulta en una vía de salida de los viriones a través de la saliva (Pizarro et al., 2020). De forma complementaria, un análisis de muestras clínicas de 131 pacientes infectados con ANDV en Chile durante 2008-2022 encontró partículas virales en varios fluidos corporales como la capa leucocitaria, la saliva y el líquido crevicular gingival, y confirmó que los viriones aislados de estos fluidos mantenían su infectividad *in vitro* (Ferrés et al., 2024). Estos hallazgos permitieron esclarecer los mecanismos de transmisión respiratoria del ANDV en contactos domésticos, pero aún resta definir con más precisión su dinámica, estudiando un mayor número de pacientes (Markotić, 2024).

En general, el contacto directo con fluidos corporales parece ser el principal mecanismo de propagación entre personas, pues además de la vía respiratoria, se ha sugerido la posibilidad de transmisión vertical y sexual (Ferrés et al., 2020; Ferrés et al., 2024; Züst et al., 2023).

1.1.2. Replicación viral.

El ANDV infecta células endoteliales pulmonares, células epiteliales, células dendríticas foliculares y linfocitos mediante la unión de las glicoproteínas virales con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y PCDH1 de la superficie celular del hospedante (Figura 2) (Jeyachandran et al., 2025). Las partículas virales se internalizan en las células diana mediante endocitosis, proceso en el que la glicoproteína Gc actúa como proteína de fusión de clase II. Los residuos de histidina conservados (His716, His820 y His935) son sensores moleculares de pH; su protonación en el entorno ácido del endosoma desencadena la reorganización conformacional necesaria para la inserción del bucle de fusión en la membrana del hospedante y la liberación del contenido del virión en el citoplasma (Figura 1C, Figura 2) (Guo et al., 2026).

La generación de nuevas partículas virales en las células infectadas inicia con la replicación del genoma viral, llevada a cabo por la RdRp. La polimerasa alinea un trifosfato de guanosina en el extremo 3' de la molécula de ARN genómico (ARNg), y sintetiza el ARN complementario (ARNc), después utilizado como molde para producir más ARNg (Lapointe et al., 2023). La RdRp también se encarga de la transcripción de cada segmento del ARNg en ARN mensajeros (ARNm) pequeños, medianos y grandes

(Vera-Otarola et al., 2020). La síntesis de ARNm utiliza como cebador una molécula de ARN cap 5' de 10-14 nucleótidos (nt) proveniente del hospedante. Durante la transcripción, la RdRp utiliza fragmentos 5' caperuzados derivados de ARN celulares como cebadores mediante un mecanismo de *cap-snatching*, realizado por las proteínas N y L: N secuestra moléculas de ARN sinsentido del hospedante y se asocia con L, cuya actividad endonucleasa escinde los extremos 5' para generar cebadores de 10-14 nt (Rowan-Nash et al., 2019). Una vez sintetizados los transcritos, la traducción de los segmentos S y L ocurre en los ribosomas libres, siendo la proteína N la que se expresa al inicio de la infección, pues es la más abundante (Avizinién et al., 2023). La traducción del ARNm de M ocurre en el retículo endoplasmático rugoso, ya que la proteína debe atravesar un proceso de maduración postraducciona. El precursor GPC es escindido en el sitio de corte proteolítico conservado WAASA, generando las proteínas Gc y Gn, que posteriormente son glicosiladas en el retículo endoplasmático (Serris et al., 2020). Durante la traducción, Gn interactúa con Gc, manteniéndola en una conformación metaestable de pre-fusión dentro de un heterodímero Gn/Gc. Más adelante, los protómeros Gn/Gc se asocian en estructuras tetraméricas (Gn/Gc)₄, las cuales son conducidas a la membrana plasmática (Cifuentes-Muñoz et al., 2014).

Tras la síntesis de los componentes del virión, el proceso de empaquetamiento comienza con la formación de RNP, impulsada por la oligomerización de la proteína N a lo largo de los segmentos del ARNg y por el posterior reclutamiento de la RdRp en complejos helicoidales funcionales. A continuación, las RNP son transportadas a través de la dineína microtubular hasta la membrana plasmática (Spiropoulou et al., 2003). Las glicoproteínas de superficie contribuyen al ensamblaje y a la maduración del virus, ya que las interacciones laterales entre tetrámeros adyacentes inducen la curvatura de la membrana necesaria para la gemación de los viriones nacientes (Figura 2) (Guo et al., 2026).

La replicación viral avanza durante la fase inicial de la infección, en la que el individuo presenta síntomas indistinguibles de otras infecciones virales respiratorias comunes, como la gripe (Oloris et al., 2024). Debido a estas manifestaciones inespecíficas, la infección por el virus ANDV se confunde con frecuencia con enfermedades respiratorias menos graves, lo que retrasa el diagnóstico precoz hasta que el pico repentino de la

carga viral desencadena una insuficiencia cardiopulmonar grave (Chandy y Mathai, 2017; Sundström et al., 2016). Durante este periodo, las personas infectadas pueden transmitir el virus a sus contactos cercanos; en particular, los contactos domésticos presentan un riesgo global de enfermedad del 3.4 %, que se eleva significativamente hasta el 17.6 % entre las parejas sexuales (Ferrés et al., 2007). Durante el pico viral, se activa la respuesta antiviral, pero el ANDV posee mecanismos de evasión que dan lugar a un bloqueo incompleto de la replicación y al retraso de la eliminación del virus (Iglesias et al., 2022).

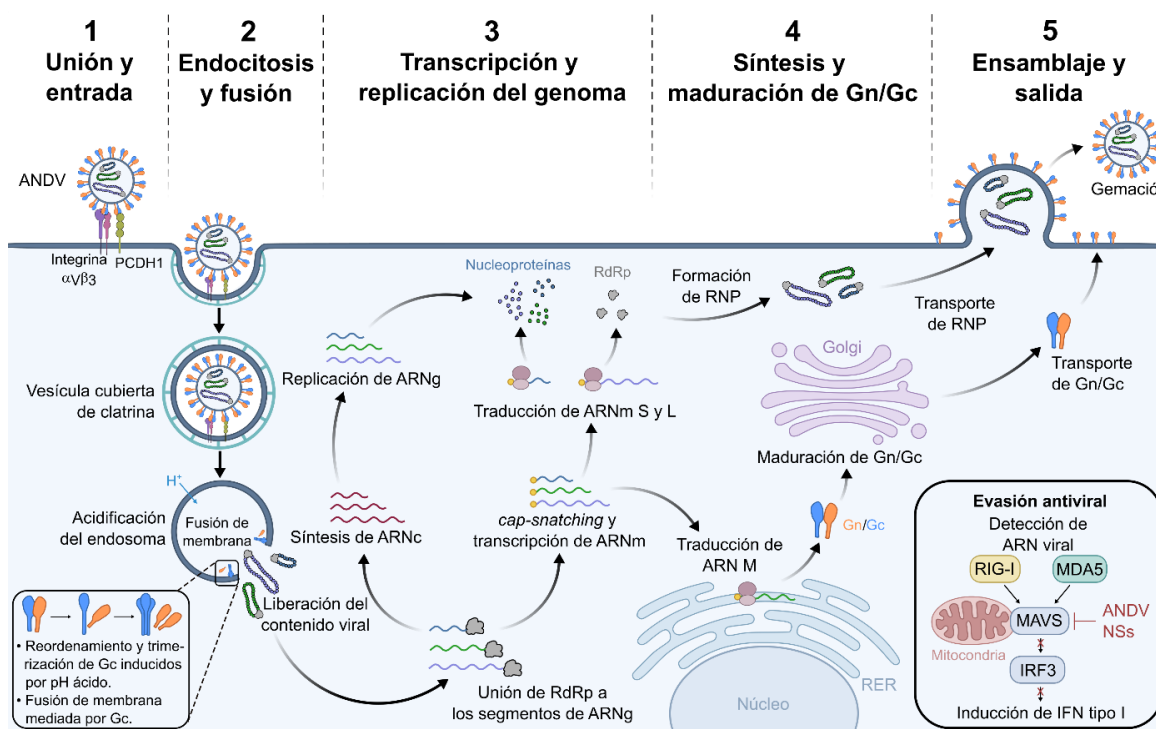


Figura 2. Dinámica del ciclo de replicación del ANDV y señalización de evasión antiviral.

1. Unión y entrada: El virión del ANDV se une a los receptores de la superficie de la célula huésped, concretamente al dominio extracelular de la protocadherina-1 (PCDH1) y de las integrinas $\alpha v \beta 3$. **2. Endocitosis y fusión:** Tras la endocitosis mediada por clatrina, el entorno ácido del endosoma desencadena cambios conformacionales en las glicoproteínas, lo que da lugar a la fusión de membranas y a la posterior liberación de los tres segmentos de RNP viral (S, M, L) al citoplasma. **3. Transcripción y replicación del genoma:** La RdRp viral inicia la transcripción del ARNm mediante un mecanismo de *cap-snatching* y replica el ARN genómico a través de un intermediario de ARNc. **4. Síntesis y maduración de Gn/Gc:** La poliproteína codificada por el segmento M se traduce y se escinde en el retículo endoplásmico rugoso, donde Gn y Gc sufren glicosilación postraduccional antes de ser transportadas a la membrana plasmática. **5. Ensamblaje y salida:** Las interacciones entre las glicoproteínas de superficie y las RNP impulsan la curvatura de la membrana, lo que conduce a la gemación y liberación de viriones nacientes y maduros. **Evasión antiviral:** El ARN viral es detectado por RIG-I/MDA5, lo que desencadena la cascada de señalización MAVS-TBK1-IRF3. La NSs del ANDV inhibe la agregación de MAVS, bloqueando la activación de IRF3 y la consiguiente respuesta de IFN tipo I. *Fuente: elaboración propia.*

1.1.3. Evasión de la respuesta antiviral.

Las respuestas antivirales e inflamatorias tempranas inducidas por interferones (IFNs) de tipo I permiten suprimir la propagación viral (Paludan et al., 2024). Si estas defensas son deficientes y la eliminación del virus es escasa, la inflamación prolongada puede alterar la función de las células endoteliales y causar la interrupción de las barreras de fluidos (Noack et al., 2020). El ANDV posee varios mecanismos que retrasan la respuesta antiviral mediada por IFNs tipo I mientras persiste la inflamación prolongada, provocando una disfunción pulmonar (Saavedra et al., 2021). La proteína N inhibe la producción de IFNs tipo I inducido por RIG-I y MDA-5 al bloquear la autofosforilación y activación de la quinasa serina/treonina (TBK1). Esto suprime la fosforilación de IRF3, la expresión de ISGs, y la activación de NF- κ B (Cimica et al., 2014). La proteína N también interfiere con la actividad biológica de la PKR, pues se une al factor P58^{IPK}, un inhibidor endógeno de PKR, para interrumpir la dimerización y activación de la quinasa (Wang et al., 2021). En consecuencia, el factor de iniciación de la traducción eIF2 α no se fosforila y permanece activo (Wang y Mir, 2015). La proteína NSs se une a la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) para reducir su ubiquitinación, y así suprime la activación de IRF3 y la expresión de IFNs tipo I estimulada por RIG-I y MDA5 (Figura 2) (Vera-Otarola et al., 2020). Incluso, se ha descrito que la cola citoplasmática de la glicoproteína Gn tiene la capacidad de impedir la unión de TBK1 al factor asociado al receptor TNF (TRAF3), y desestabilizar el complejo formado por el estimulador de genes de interferón (STING) y TBK1, para inhibir IRF3 y NF- κ B (Zhang et al., 2021). En conjunto, el bloqueo de la vía del IFN tipo I permite que el patógeno continúe replicándose (Zhang et al., 2021), mientras promueve el desarrollo del SCPH, debido a que los IFNs tipo I mantienen la función de barrera de las células endoteliales mediante la regulación del antígeno de diferenciación 73 (CD73) (Kiss et al., 2007).

1.1.4. Transmisión persona a persona.

El ANDV se mantiene bajo vigilancia sanitaria, en particular en el Cono Sur sudamericano, porque es el único miembro de todo el género *Orthohantavirus* con la capacidad de transmitirse de persona a persona (Alonso et al., 2020), y su diseminación

en la población puede suceder mientras las personas atraviesan largos períodos asintomáticos o con síntomas leves (Moore y Griffen, 2022).

Las primeras evidencias de transmisión persona a persona se reportaron en el año 1998, en un análisis del aumento de casos de SCPH de 1996 en Chile y Argentina, encontrando vínculos epidemiológicos y 100 % de identidad de las secuencias genómicas de los virus aislados de pacientes de ambos países (Padula et al., 1998). En el mismo año, Toro y colaboradores sugirieron la capacidad de ANDV de transmitirse persona a persona después de realizar estudios epidemiológicos en familias infectadas durante el brote de SCPH de Chile de 1997-1998 (Toro et al., 1998). Una investigación similar de los casos del brote ocurrido en Argentina en el año 2002 identificó que varias personas que tuvieron contacto con un paciente índice estaban infectadas con el mismo linaje viral (Martinez et al., 2005). Asimismo, los resultados de una investigación epidemiológica y el análisis de la secuencia de los virus aislados durante el brote de SCPH en Chile en 2011 indicaron que existió transmisión persona a persona en 4 pacientes secundarios que desarrollaron la enfermedad tras la exposición a un paciente índice, 2 contactos domésticos y 2 por infecciones nosocomiales en trabajadores sanitarios (Martinez-Valdebenito et al., 2014).

Las primeras evidencias indicaban que el ANDV se propagaba entre personas en casos puntuales y con baja frecuencia. Sin embargo, durante un brote ocurrido en Argentina en 2018 – 2019, el virus se transmitió a lo largo de cuatro generaciones de humanos, dando lugar a 34 casos positivos y 11 muertes (letalidad del 32 %). Mediante tecnologías de secuenciación de nueva generación, se detectó un posible evento de *super spreading* que habría iniciado las posteriores cadenas de transmisión, lo que apuntó a la inhalación de gotas o aerosoles con viriones como las probables vías de propagación (Martínez et al., 2020). Estudios posteriores confirmaron la capacidad del ANDV de replicarse en células del tracto respiratorio y en glándulas salivales, así como la presencia de partículas virales infectivas en varios fluidos corporales (capa leucocitaria, saliva y el líquido crevicular gingival), y la transmisión horizontal en modelos animales (Ferrés et al., 2024; Pizarro et al., 2020; Riesle-Sbarbaro et al., 2023).

El reciente brote sospechoso a bordo del crucero *Hondius* es de especial importancia, ya que podría constituir el primer clúster documentado con transmisión transfronteriza.

Hasta la fecha, se ha logrado interrumpir eficazmente la transmisión y contener el brote, con 13 casos y tres fallecimientos notificados, lo que corresponde a una tasa de letalidad del 23 % (World Health Organization, 2026). La Organización Mundial de la Salud (OMS) postuló que el paciente índice se infectó antes de embarcar, produciéndose una posterior transmisión persona a persona entre los contactos estrechos (Kupferschmidt, 2026). Esta hipótesis se complementó con el análisis del Ministerio de Salud de Sudáfrica, que confirmó el ANDV como agente etiológico, mientras se determina el número definitivo de los contagios interpersonales (South African Parliamentary Communication Services, 2026).

Las características de este último brote reflejan el comportamiento habitual de la enfermedad, pues los eventos de transmisión persona a persona relacionados al ANDV ocurren en situaciones de exposición cercana y prolongada, en el ámbito doméstico o durante los extensos períodos presintomáticos del caso índice (Pan American Health Organization, 2025). Con todo, no se descarta la emergencia de variantes virales con mayor transmisibilidad y virulencia (Khan et al., 2021), sobre todo con la reciente identificación de una nueva variante altamente patogénica en Argentina, que, según su análisis filogenético, pertenecería a la especie *Orthohantavirus andesense* (Bellomo et al., 2025).

1.2. Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus.

La compleja interacción entre el virus y el ser humano resulta en el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus, una patología de rápida progresión clínica hacia el distrés respiratorio agudo y el colapso cardiovascular (Vial et al., 2023). Debido a las limitaciones inherentes al estudio de la enfermedad en humanos, los modelos animales han sido fundamentales para comprender su progresión e investigar potenciales estrategias terapéuticas (Riesle-Sbarbaro et al., 2023). El desarrollo reciente de modelos murinos, como el xenoinjerto pulmonar humano en ratones inmunodeficientes, ha ampliado las herramientas disponibles para estudiar la infección temprana y el tropismo viral en tejido pulmonar humano (Rissmann et al., 2025). No obstante, el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) continúa siendo el modelo estándar para el estudio de la patogénesis y la evaluación de contramedidas profilácticas y terapéuticas, dado

que representa el único sistema biológico capaz de reproducir la enfermedad letal (Safronetz et al., 2012). Tras la inoculación viral, este roedor manifiesta periodos de incubación, curso clínico y tasas de letalidad análogos a los observados en la infección humana. En consecuencia, el empleo de este modelo ha facilitado la descripción de los cambios histológicos característicos del síndrome, así como la evaluación de diversos candidatos antivirales y vacunales (Riesle-Sbarbaro et al., 2023). La caracterización de estos modelos resulta crucial para esclarecer los mecanismos celulares de la enfermedad y su reflejo en el paciente.

1.2.1. Fisiopatología de la infección.

El rasgo patológico característico del SCPH es el aumento de la permeabilidad capilar en los pulmones y la depresión de la función cardíaca en pacientes infectados, lo que conlleva a disfunciones pulmonares y cardíacas (López et al., 2019). Debido a que ANDV no es citopático (Lapointe et al., 2023), el daño a la integridad de la barrera endotelial es un proceso multifactorial complejo que incluye respuestas inmunitarias (innata y adaptativa) excesivas, disfunción plaquetaria e hipoxia celular (Figura 3) (Avšič-Županc et al., 2019; Munir et al., 2021; Vaheri et al., 2013). Las respuestas antivirales e inflamatorias tempranas para eliminar el virus son intensas debido a los mecanismos de evasión del ANDV, afectando la función de las células endoteliales al incrementarse la secreción de mediadores proinflamatorios (Saavedra et al., 2020). Estudios clínicos han demostrado la generación de una tormenta de citocinas en los pacientes con SCPH (Mori et al., 1999), por activación de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y las interleucinas 1 β (IL-1 β), IL-2 e IL-6 (Noack et al., 2020). La sobreexpresión de otras citocinas, como IL-18 e IFN- γ , indica una activación robusta y temprana de la respuesta inmunitaria de tipo Th1, lo que resulta en daño tisular (Khaiboullina et al., 2017). La IL-18 es una citocina promotora de reacciones inflamatorias graves e induce la producción de IFN- γ (Yasuda et al., 2019). A su vez, el IFN- γ está asociado a la activación de respuestas inmunitarias de tipo Th1 y es producido por linfocitos T CD4⁺ cooperadores activados, linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y células *natural killer* (NK) (Gocher et al., 2022). Otra citocina que se encuentra elevada en el SCPH es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), que tiene una

fuerte actividad proinflamatoria que aumenta la permeabilidad vascular y la migración tisular de células efectoras inmunitarias. MIF induce la producción de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular, y facilita la migración transendotelial de leucocitos mediante la estimulación de las moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1) en células endoteliales y monocitos (Sumaiya et al., 2022). La IL-15 también se encuentra elevada, lo que sugiere la activación y proliferación tempranas de linfocitos T CD8⁺ y NK, así como la diferenciación y supervivencia sostenidas de monocitos y macrófagos (Khaiboullina et al., 2017). Los pacientes con SCPH manifiestan un fenotipo mixto de células efectoras inmunitarias producto de la sobreexpresión de varias quimiocinas (CCL) y ligandos de quimiocinas (CXCL) que promueven la migración de leucocitos (Khaiboullina et al., 2014), como CXCL9, CXCL10 y CXCL12 que son quimioatrayentes de leucocitos mononucleares; IL-16 que promueve la migración de linfocitos T CD4⁺ activados; CCL2, CCL7 y CXCL1 que atraen monocitos, células T de memoria, células dendríticas, y también neutrófilos para el caso de CXCL1 (Khaiboullina et al., 2017).

Respecto a las anomalías en la coagulación, el reclutamiento de plaquetas quiescentes es provocado por el agrupamiento de las partículas de ANDV en la superficie de las células endoteliales (Figura 3) (Gavrilovskaya et al., 2010). Esta desregulación dependiente de integrinas $\beta 3$ puede estar involucrada en el desarrollo de la trombocitopenia aguda observada, ya que provoca el desgaste o la pérdida de plaquetas, adheridas a las células endoteliales infectadas (Goeijenbier et al., 2015). En paralelo, la desregulación aumenta la fosforilación del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) y la internalización de la cadherina vasoendotelial (VE) de las uniones adherentes, lo que contribuye al deterioro de la función de barrera y al edema pulmonar (Noack et al., 2020). En esta misma línea, factores de coagulación como el factor XII activan el sistema calicreína-cinina, cuyo resultado es la liberación de bradicinina, y en consecuencia, el aumento de la permeabilidad vascular (Taylor et al., 2013).

La desregulación en las funciones de barrera provocada por la tormenta de citocinas y la disfunción plaquetaria resulta en hipoxia celular, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad por la modulación del citoesqueleto de actina y las proteínas

contráctiles (An et al., 2005). Las condiciones hipóxicas también dan lugar a niveles elevados del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los fluidos del edema pulmonar (Gavrilovskaya et al., 2013). El VEGF secretado se une a sus receptores en las células endoteliales, actuando de forma local para desensamblar las uniones adherentes e inducir una permeabilidad elevada (Gavard, 2014). Durante la infección inicial, los aumentos localizados de VEGF contribuyen a la patogénesis a través de una mayor permeabilidad endotelial al causar una mayor producción de óxido nítrico (NO), la internalización de cadherina VE y la redistribución de las uniones estrechas (Dalrymple y Mackow, 2014).

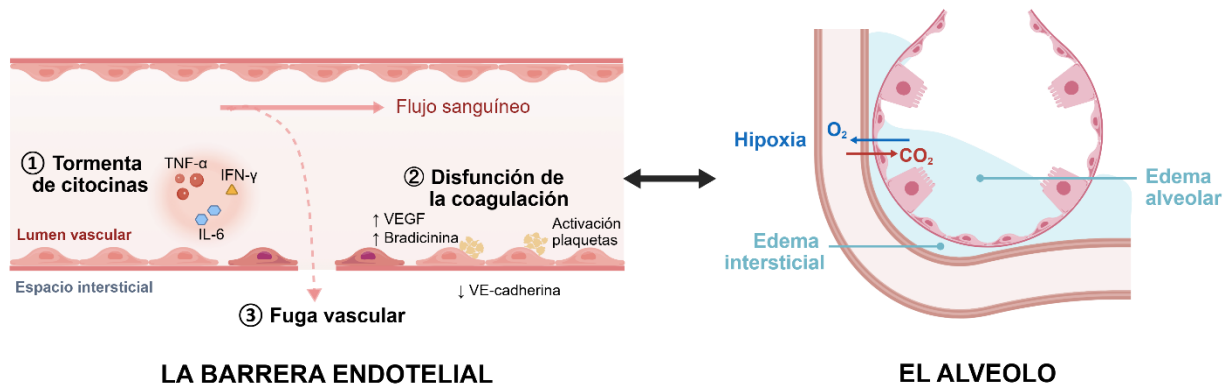


Figura 3. Fisiopatología del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus, inducido por el virus Andes.

El diagrama ilustra la naturaleza multifactorial de la permeabilidad vascular. Los mecanismos clave incluyen: Tormenta de citocinas: liberación masiva de mediadores proinflamatorios (TNF-α, IL-6, IFN-γ) por parte de las células infectadas y las células inmunitarias reclutadas. Permeabilidad vascular: activación del sistema calicreína-quinina que conduce a la liberación de bradicinina, y regulación a la baja de la VE-cadherina mediada por el VEGF, lo que provoca la ruptura de las uniones adherentes endoteliales. Disfunción plaquetaria: la unión del ANDV a la integrina $\alpha_v\beta_3$ desencadena la activación y el consumo de plaquetas (trombocitopenia). La consiguiente fuga de plasma al espacio alveolar conduce a un edema pulmonar grave y a un shock cardiogénico. *Fuente: imagen creada con BioGDP.com.*

1.2.2. Cuadro clínico de la enfermedad.

El SCPH progresa en tres fases: prodrómica, cardiopulmonar y convalecencia (Llah et al., 2018). El período de incubación puede prolongarse durante varias semanas. Una vez iniciados los síntomas, la fase prodrómica suele durar entre uno a seis días, y se caracteriza por síntomas inespecíficos como fiebre, malestar, cefalea y mialgias. También pueden aparecer síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos, diarrea o incluso dolor abdominal (Chang et al., 2007; Mertz et al., 2006), mientras que uno de

los hallazgos de laboratorio tempranos más característicos es la trombocitopenia (Llah et al., 2018). A medida que empeoran los síntomas respiratorios, en el 67 % de los casos la enfermedad progresa a la fase cardiopulmonar, caracterizada por dificultad respiratoria, mientras que el 33 % no manifiesta esta condición y pasa directamente a la fase de convalecencia (Chang et al., 2007). De 8-24 h, los pacientes se vuelven hipotensos y desarrollan taquicardia, lo que puede conducir a un síndrome de distrés respiratorio agudo (SRDA) y shock cardiovascular (Khaiboullina et al., 2017). La aparición repentina de tos, disnea e hipoxia va acompañada de un edema pulmonar derivado del aumento de la permeabilidad capilar (Figura 3) (Hamid et al., 2021). También pueden existir síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva aguda debido a una reducción del gasto cardíaco, con la consiguiente disminución en la fracción de eyección. Cuando esto ocurre, la presión capilar pulmonar aumenta, lo que agrava la fuga pulmonar. En algunos casos, el índice cardíaco puede disminuir y provocar un shock cardiogénico (Llah et al., 2018). La fase cardiopulmonar se caracteriza por un aumento del hematocrito y de la hemoglobina debido a la hemoconcentración, entre otras anormalidades de laboratorio como hipoalbuminemia, elevación leve de transaminasas, proteinuria leve y elevación de creatinina quinasa, amilasa sérica y creatinina (Hamid et al., 2021). Los pacientes que se recuperan de la fase cardiopulmonar normalizan su fracción de eyección e índice cardíaco, aunque la disnea de esfuerzo puede persistir durante 1-2 años tras la infección aguda (Essex et al., 2023). Esta fase de convalecencia puede durar meses, especialmente si requirieron ventilación mecánica. Si bien la recuperación es lenta y con manifestaciones de debilidad, fatiga, y tolerancia al ejercicio reducida, es generalmente completa y sin secuelas (Avšič-Županc et al., 2019).

El SCPH es altamente letal porque en la fase cardiopulmonar la infección induce una disfunción endotelial inmunomediada que provoca una fuga capilar pulmonar masiva, edema alveolar, hipovolemia y shock cardiogénico funcional surgen trastornos graves como la hemorragia pulmonar y la coagulación intravascular diseminada (CID) (Vial et al., 2023). El aumento en la permeabilidad vascular del endotelio pulmonar provoca interrupción del intercambio gaseoso, hemorragia alveolar difusa, hipovolemia y shock con depresión miocárdica (López et al., 2019). La miocarditis manifestada durante la

viremia también contribuye a la disfunción cardíaca (Saggioro et al., 2007). El reclutamiento de plaquetas dependiente de integrinas $\beta 3$ deriva en un aumento en los niveles del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y del factor tisular en los macrófagos alveolares, así como un tiempo de protrombina elevado, lo que indica el desarrollo de la CID (Tatsumi et al., 2019). El consumo de los factores de coagulación puede desencadenar sangrado excesivo y, en consecuencia, un fallo multiorgánico (Costello et al., 2024). Todos estos eventos en conjunto producen el deceso del paciente, y las autopsias no muestran evidencia de necrosis, hemorragia ni cardiomiopatía en el corazón, lo que indica que la disminución de la función cardíaca conduce al desarrollo de la insuficiencia no congestiva (Llah et al., 2018).

El SCPH es una grave amenaza para la salud humana no solo por su elevada tasa de letalidad, sino también por el carácter imprevisible de su aparición en adultos sanos (Afzal et al., 2023). El riesgo de transmisión aumenta cuando el diagnóstico se retrasa tras la aparición de los primeros síntomas. En la fase prodrómica de la enfermedad, difícil de distinguir de otras enfermedades febriles y puede existir viremia durante períodos presintomáticos o tempranos de la enfermedad, todos los pacientes son virémicos y pueden contagiar a más personas antes del diagnóstico (Ferrés et al., 2024).

1.2.3. Alternativas terapéuticas para el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus.

Actualmente no existen tratamientos específicos aprobados para esta patología, por ende la estrategia más efectiva por el momento es la prevención (Akram et al., 2022). Las instituciones de salud gubernamentales de los países más afectados por ANDV organizan campañas enfocadas en esta alternativa, dirigidas principalmente a quienes viven o trabajan en el campo y a quienes van de *camping* o paseo al aire libre en zonas habitadas por roedores. A pesar de estas medidas preventivas, continúan registrándose casos y fallecimientos, lo que evidencia que las estrategias conductuales no eliminan completamente el riesgo de exposición. (Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de Argentina, 2023; Instituto de Salud Pública, 2025). La terapia clínica aplicada a los pacientes con SCPH por el momento es de soporte, y consiste en intervenciones

como la ventilación mecánica, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) y equilibrio de líquidos (Williamson et al., 2021).

1.2.3.1. Tratamiento con antivirales.

Actualmente no existen antivirales específicos aprobados para el tratamiento del SCPH (Akram et al., 2022). La ribavirina se consideró para la terapia de la infección por ANDV por ser un fármaco de amplio espectro, pero los ensayos realizados en pacientes con SCPH no mostraron beneficios clínicos significativos (Chapman et al., 1999; Mertz et al., 2004). Otra opción evaluada es la terapia con metilprednisolona bajo la hipótesis de que el uso de corticosteroides puede controlar la tormenta de citocinas. Los primeros resultados clínicos indicaron que el tratamiento temprano permitió evitar el desarrollo de síndrome de distrés respiratorio agudo y reducir la mortalidad de 54 % a 18 % (Tapia et al., 2000). No obstante, este ensayo no estuvo controlado por placebo ni ciego, así que se realizó un estudio adicional para confirmar la eficacia terapéutica del corticosteroide. Dicha investigación no encontró diferencias significativas en la proporción de fallecidos entre los individuos tratados con metilprednisolona y los no tratados, y concluyó que el corticosteroide no representa beneficios clínicos para pacientes con SCPH (Vial et al., 2013).

En vista de la falta de éxito de las alternativas propuestas, es fundamental continuar con la exploración y desarrollo de antivirales que combatan a ANDV (Vergote et al., 2021). Varias moléculas de diversa naturaleza se encuentran en evaluación preclínica, entre las que se encuentran la proteína Griffithsin (Shrivastava-Ranjan et al., 2020), el ácido baloxavir (BXA) (Ye et al., 2019), y el vandetanib (Bird et al., 2016). Aunque la aprobación de alguno de estos fármacos puede tomar décadas (Govender y Chuturgoon, 2022), estos estudios son alentadores para mejorar los resultados clínicos de futuros casos de infecciones por ANDV (Jacob et al., 2023).

1.2.3.2. Terapia de anticuerpos.

Desde la aprobación de muromonab-CD3 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1986, el primer anticuerpo monoclonal para uso en humanos en el tratamiento del rechazo agudo de trasplantes, la terapia con

anticuerpos ha crecido exponencialmente debido a su alta especificidad y gran afinidad por los antígenos; son excelentes agentes terapéuticos (Malik y Ghatol, 2024; Z. Wang et al., 2022). En el caso del tratamiento del SCPH, se emplean anticuerpos a partir del plasma de convalecientes, o mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAbs) mejorados mediante la biología molecular (Sharma et al., 2023).

Plasma de convalecientes.

El tratamiento con plasma de convalecientes consiste en la infusión pasiva de plasma inmune de convalecientes a pacientes con SCPH. Este plasma contiene anticuerpos protectores anti-ANDV, lo que permite reducir la mortalidad hasta un 14 % (Steininger et al., 2023; Vial et al., 2015). Con este antecedente, diversos investigadores trabajaron en el aislamiento de anticuerpos con alta capacidad de reconocimiento y neutralización del virus a partir del suero de pacientes previamente recuperados de la infección.

En 2018 se aislaron dos anticuerpos monoclonales del suero de un paciente convaleciente, denominados JL16 y MIB 22, con capacidad de reconocer y neutralizar con alta afinidad las glicoproteínas de superficie Gn/Gc. En el desafío en el modelo de hámster sirio, ambos anticuerpos protegieron al 100 % a los animales infectados con la dosis letal de ANDV. Los resultados sugirieron que el uso de estos anticuerpos ya sea como monoterapia o como cóctel de ambos, es efectivo para el tratamiento del SCPH (Garrido et al., 2018). Engdahl y colaboradores (2021) aislaron 16 anticuerpos monoclonales de una persona previamente infectada por ANDV y encontraron que la mayoría era específica contra Gn, actividad neutralizante frente al virus. Dos mAb, denominados ANDV-5 y ANDV-34, reconocieron y neutralizaron a dos epítomos no superpuestos en el ectodominio de Gn del ANDV, mientras que otro mAb, designado como ANDV-44, se unió a la interfaz de Gn/Gc (Engdahl et al., 2021). Durante ensayos *in vivo* en hámster sirio, los anticuerpos ANDV-5 y ANDV-44 demostraron una eficacia terapéutica a dosis bajas (5 mg/kg), a la vez que se reportó que los mAbs ANDV-5 y ANDV-34 son estructuralmente similares a MIB22 y JL16 (Engdahl et al., 2023).

En ambos casos, la eficacia terapéutica observada sugiere una posible utilidad como agentes terapéuticos, aunque la transferencia pasiva de esta naturaleza puede no ser sostenible debido al suministro limitado de suero de convalecencia y por razones de

seguridad (Samad et al., 2020). Otras alternativas consisten en la producción específica de las IgG monoclonales identificadas, o el uso de anticuerpos policlonales (Sroga et al., 2021).

Anticuerpos policlonales.

La producción de anticuerpos policlonales contra el ANDV se ha estudiado en modelos animales de aves y camélidos. En particular, Brocato y colaboradores desarrollaron IgY a partir de huevos de patos Khaki Campbell (*Anas platyrhynchos*), con capacidad protectora durante los primeros 8 días de infección en el modelo de hámster sirio a una dosis de 12 000 unidades por kg (Brocato et al., 2012). Respecto al modelo de camélidos, Sroga y colaboradores investigaron la producción de anticuerpos policlonales anti-ANDV en alpacas, e identificaron IgG3 con capacidad de neutralización *in vitro* a una concentración efectiva media (EC₅₀) de 0.83 µg/mL, y protección de la enfermedad letal en hámster sirio (Sroga et al., 2021). Pese a las ventajas de esta terapia respecto al uso de plasma de convalecientes, la caracterización de anticuerpos policlonales terapéuticos constituye un desafío por ser una mezcla de anticuerpos con distintas especificidades para cada epítipo del antígeno (Castelli et al., 2019). Esto sugiere una baja actividad específica y en consecuencia una mayor dosis terapéutica (Parray et al., 2020). De esta manera, el uso de anticuerpos monoclonales con alta sensibilidad y especificidad constituye la opción más robusta para el desarrollo de tratamientos homogéneos (Mitra y Tomar, 2021), por su alta especificidad y capacidad de estimular respuestas inmunitarias robustas, que incluso puede ser mejorada a través de herramientas como la ingeniería de anticuerpos y la biología estructural (Pantaleo et al., 2022).

Anticuerpos monoclonales.

Los mAbs son ampliamente utilizados como herramientas de diagnóstico, en estudios epidemiológicos, y en estudios de replicación y patogénesis del virus (Avižinienė et al., 2023). Los mAbs obtenidos de células B murinas, y del plasma de humanos supervivientes de SCPH han demostrado eficacia terapéutica *in vivo* en el modelo animal de hámster sirio (Duehr et al., 2020; Garrido et al., 2018). Además de los mAbs

aislados del plasma de pacientes convalecientes (Engdahl et al., 2023; Engdahl et al., 2021; Garrido et al., 2018), varias investigaciones se centraron en producir IgGs utilizando hibridomas murinos. Los mAbs desarrollados a la fecha están dirigidos contra la nucleoproteína y las glicoproteínas de superficie de ANDV (Duehr et al., 2020; Kucinskaite-Kodze et al., 2011). En particular, cuatro anticuerpos anti-Gn/Gc demostraron actividad neutralizante, 100 % de protección frente al desafío letal y aclaramiento viral completa a los 42 días, en ensayos *in vivo* en hámster sirio a una dosis de 25 mg/kg (Duehr et al., 2020).

Las terapias de anticuerpos representan un gran avance de tratamiento del SCPH en una etapa post-infección. Esta terapia ha demostrado un claro efecto terapéutico mediante el uso de anticuerpos convalecientes en pacientes hospitalizados, y mediante anticuerpos mono- y poli- clonales mediante ensayos *in vivo* (Duehr et al., 2020; Garrido et al., 2018; Sroga et al., 2021). Además, su estudio ha permitido determinar y caracterizar las estructuras virales objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos (Stass et al., 2023). Sin embargo, ninguno de los anticuerpos identificados cuenta con la aprobación para su uso en humanos, así que el único tratamiento disponible en el ámbito clínico continúa siendo la inmunoterapia experimental con el plasma de convalecientes (Ulloa-Morrison et al., 2024). Adicionalmente, esta terapia supone ser antiviral, y que para un mejor tratamiento post-infección también sería necesario desarrollar un tratamiento anti-citocinas (Afzal et al., 2023).

1.2.4. Desarrollo de prototipos de vacunas contra el virus Andes.

La vacunación es la estrategia más efectiva de salud pública para evitar la propagación de enfermedades infecciosas como el SCPH (Afzal et al., 2023; Dheeraseskara et al., 2020), sobre todo considerando su rápida evolución, la estrecha ventana de tiempo que se dispone para administrar terapias específicas, y que la respuesta inmunitaria es suficiente para controlar la infección por ANDV (Beltrán-Ortiz et al., 2017). Hasta el momento, no existen vacunas aprobadas por la FDA ni la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento del SCPH (F. Wang et al., 2024), y las vacunas de virus inactivados (virus Hantaan y Seoul) solo están autorizadas para su uso en China y la República de Corea (Liu et al., 2020). Estas formulaciones ofrecen una

protección moderada contra virus causantes de la fiebre hemorrágica con síndrome renal, pero no confieren protección frente al ANDV (Brocato y Hooper, 2019), de modo que es necesario desarrollar nuevas estrategias vacunales específicas contra este virus (Dheerasekara et al., 2020). Los candidatos propuestos hasta la fecha utilizan como inmunógenos a las glicoproteínas de superficie y a la proteína N del ANDV, en diferentes plataformas vacunales, como ADN plasmídico (ANDV-M/pWRG707), vectores adenovirales (Ad5) que expresan proteínas de ANDV, virus de la estomatitis vesicular recombinantes (VSV) que codifican Gn/Gc, subunidades proteicas (rGnGc), ARN mensajero (ARNm) y partículas similares a virus modificadas (eVLP) basadas en ARN autorreplicante (ARNrep) (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de candidatos vacunales contra el ANDV.

Nombre	Plataforma vacunal	Vía de administración	Estado de desarrollo	Referencias
ANDV-M/pWRG707	ADN plasmídico (segmento M clonado en pWRG707)	Intramuscular (sistema de inyección libre de aguja)	Fase I (Ensayo clínico NCT03682107)	(Custer et al., 2003; Hooper et al., 2006; Kwilas et al., 2014; Paulsen et al., 2024)
Ad5-ANDV	Ad5 que expresa N y Gn/Gc	Intramuscular	Preclínico – protección en modelo animal	(Safronetz et al., 2009)
VSVΔG/ANDVGPC	VSV recombinante con GPC	Intraperitoneal	Preclínico – protección en modelo animal	(Brown et al., 2011; Warner et al., 2019)
VSVΔG/Ebola/ANDV (bivalente)	VSV recombinante bivalente (Ebola/ANDV)	Intraperitoneal	Preclínico – protección en modelo animal	(Marceau et al., 2024; Tsuda et al., 2011)
rGnGc	Subunidades proteicas recombinantes	Subcutáneo	Preclínico – inmunogenicidad demostrada	(Sánchez Ramos et al., 2018; Starck-Mendez, 2020)
ARNm-GPC	ARNm codificante del precursor GPC	Intramuscular	Preclínico – protección en modelo animal	(Kuzmin et al., 2024; Meyer et al., 2026)
LION/ARNrep ANDV eVLP (ARNrep/eVLP)	ARNrep que codifica GPC y genera eVLP	Intramuscular	Preclínico – inmunogenicidad demostrada	(Guo et al., 2026)

Fuente: elaboración propia.

En el desarrollo de vacunas contra virus envueltos como el ANDV, las glicoproteínas de superficie representan los principales blancos inmunogénicos, ya que se encuentran expuestas al espacio extracelular y, por ende, accesibles al reconocimiento por parte de los receptores de los linfocitos B en su conformación nativa (Ebel et al., 2022). Estas proteínas no solo actúan como determinantes antigénicos críticos, sino que también median los pasos iniciales del ciclo infeccioso: el acoplamiento al receptor

de la célula hospedante y la posterior fusión de las membranas viral y celular. En consecuencia, el bloqueo de estas glicoproteínas mediante anticuerpos específicos interrumpe directamente la entrada del virus, neutralizando su capacidad infectiva antes del inicio de la replicación (Negi et al., 2022). En conjunto, este marco conceptual sustenta la selección de las glicoproteínas Gn y Gc como los principales candidatos antígenicos para el desarrollo de estrategias vacunales contra el ANDV.

1.2.4.1. Candidato de ADN plasmídico.

Esta plataforma emplea segmentos de genes que codifican al antígeno de interés en un vector circular, y al ingresar en las células del hospedante emplea su maquinaria para producir proteínas inmunogénicas (Kayser y Ramzan, 2021; Kozak y Hu, 2023; Wang y Yuan, 2024). El Ejército de los Estados Unidos desarrolló un candidato vacunal contra el SCPH con esta tecnología, clonando el ADN complementario (ADNc) del segmento M del virus Andes en el vector pWRG707 (Paulsen et al., 2024). En el año 2003, Custer y colaboradores evaluaron la capacidad protectora del prototipo mediante desafío letal con ANDV en macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), encontrando que el vector estimuló la producción de anticuerpos neutralizantes específicos al administrarse más de una dosis (Custer et al., 2003). Estudios posteriores concluyeron que este candidato vacunal de ADN indujo una potente respuesta de memoria con una fuerte inclinación hacia Th1 en macacos Rhesus (Hooper et al., 2006). Estas respuestas se asociaron a la activación de la inmunidad celular y humoral, evidenciada por la producción de anticuerpos neutralizantes contra el ANDV y otros hantavirus causantes del SCPH (Pagliari et al., 2023). En 2014, Kwilas y colaboradores optimizaron la secuencia del vector plasmídico, y observaron que la inmunización de conejos con un sistema de inyección por chorro de jeringa desechable (DSJI) indujo una mayor producción de anticuerpos neutralizantes que la administración con aguja/jeringa (Kwilas et al., 2014). Estos resultados permitieron que el candidato pueda ser evaluado en un ensayo clínico fase I, en el que se observó que la administración con un sistema de inyección a chorro sin aguja (NFIS) producía eventos adversos locales y sistemáticos de gravedad leve a moderada. En este estudio se utilizaron dos dosis de 2 o 4 mg, siguiendo dos esquemas de vacunación, y se evidenció que el candidato vacunal era seguro e inducía una

respuesta inmunológica robusta y duradera, de hasta 337 días en los grupos que recibieron la dosis más alta (Paulsen et al., 2024). Estos hallazgos proporcionan una base sólida para la optimización del candidato vacunal mediante la inclusión de adyuvantes y el aumento de su capacidad de estimular el sistema inmune, así como la confirmación del riesgo mínimo de integración al genoma del individuo a través de estudios de genotoxicidad, antes de avanzar a otras fases clínicas (Pagliari et al., 2023; Stass et al., 2023). Hasta la fecha, no se han reportado ensayos clínicos fase II de este prototipo.

1.2.4.2. Candidato de vectores adenovirales.

Las vacunas de vectores adenovirales no replicantes utilizan un adenovirus modificado, generado a partir de la eliminación de los genes E1 y E3 para bloquear su replicación, y del reemplazo de su genoma con el transgén de interés (Mendonça et al., 2021). Safronetz y colaboradores (2009) utilizaron esta tecnología para desarrollar un candidato vacunal basado en vectores adenovirales de tipo 5 (Ad5) que expresan las glicoproteínas de superficie y la nucleoproteína de ANDV. La inmunización de hámsteres sirios con estos vectores indujo respuestas inmunitarias humorales y celulares robustas tanto del tipo Th1 como Th2, así como una baja replicación viral, mientras que en el desafío letal se observó una protección completa (Safronetz et al., 2009). No se dispone de información sobre el progreso de este candidato a ensayos preclínicos. Un desafío importante en el uso de vectores adenovirales radica en la inmunidad preexistente contra los adenovirus humanos, como Ad5, que es frecuente en la población, complicando el desarrollo de vacunas basadas en este sistema (Salaudinn et al., 2024; Tatsis y Ertl, 2004). La producción de vectores adenovirales requiere un proceso técnicamente exigente y laborioso, ya que depende de sistemas de empaquetamiento específicos y de alta capacidad para una producción eficiente. Estrategias alternativas, como la modificación de los vectores o enfoques de vacunación combinada, son soluciones de alto potencial para superar esta limitación (Salaudinn et al., 2024).

1.2.4.3. Candidato basado en el virus de estomatitis vesicular.

Las vacunas de virus de estomatitis vesicular (VSV) se basan en vesiculavirus, virus de ARN monocatenario con sentido negativo, a los cuales se incorporan unidades transcripcionales adicionales mediante ingeniería genética inversa (Liu et al., 2021). El vector más empleado es el VSVΔG, un pseudotipo basado en el VSV, en el que el gen de la glicoproteína G es eliminado y reemplazado por la secuencia del antígeno de interés, de manera que la partícula viral exprese en su superficie al inmunógeno (Beitari et al., 2023). Este tipo de vector recombinante tiene la capacidad de inducir respuestas inmunes humorales y celulares robustas *in vivo* (Liu et al., 2021). En el año 2011 se utilizó esta estrategia para producir el vector VSVΔG/ANDVGPC, que reemplaza el gen de la glicoproteína G por el gen del precursor GPC del ANDV. La administración de este prototipo en el modelo animal hámster sirio protegió al 100 % de los animales frente al desafío letal (Brown et al., 2011), y también se observó una protección cruzada contra el virus Sin Nombre, agente etiológico del SCPH en Norteamérica (Warner et al., 2019). Tsuda y colaboradores (2011) propusieron el uso de un vector VSV bivalente, conformado por las glicoproteínas del virus Ébola y del ANDV, que confirió una protección completa frente al desafío letal de ambas infecciones en el modelo de hámster sirio (Tsuda et al., 2011). Marceau y colaboradores (2024) utilizaron el mismo enfoque y diseñaron un vector similar, que también proporcionó una protección completa en el modelo de hámster sirio cuando se inmunizó antes y durante la exposición al virus, así como en etapas tempranas postexposición. Sin embargo, la capacidad protectora disminuyó al ser administrado en fases tardías, lo que indica que a mayor progresión de la enfermedad se requeriría un tratamiento combinado de vacunación y anticuerpos monoclonales (Marceau et al., 2024). No se ha reportado el avance en ensayos preclínicos de los candidatos vacunales basados en VSV, además que su implementación puede ser limitada, debido a su compleja producción, y necesidad de tiempo y personal especializado (Xiang et al., 2022).

1.2.4.4. Candidato de subunidades proteicas.

Este tipo de vacunas emplean a componentes antigénicos definidos, como proteínas purificadas del patógeno de interés, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, y

son formuladas con un adyuvante (Bill, 2015). Starck-Mendez (2020) desarrolló el candidato vacunal rGnGc, compuesto por los ectodominios de las glicoproteínas de superficie del ANDV producidos de forma recombinante en *Pichia pastoris*. La inmunización del modelo animal de hámster sirio con la formulación rGnGc + Alhydrogel® (adyuvante) indujo una respuesta temprana de anticuerpos neutralizantes desde la segunda semana postvacunación, a la vez que incrementó los niveles de IFN- γ , IL-12 e IL-6, lo que indica una respuesta de tipo Th1. Estos resultados mostraron el potencial de los antígenos rGnGc como base para una vacuna de subunidades, aunque no se evaluó su capacidad protectora frente a un desafío letal.

1.2.4.5. Candidatos de ARN mensajero.

Las vacunas de ARN mensajero poseen varias ventajas respecto a las convencionales, incluyendo su proceso de fabricación genérico y de bajo costo, la rapidez de su desarrollo clínico y escalabilidad, y la posibilidad de modificar las vacunas en respuesta a infecciones emergentes y variantes virales (Leong et al., 2025). En el año 2024, Kuzmin y colaboradores utilizaron esta tecnología para desarrollar un prototipo de ARNm codificante del precursor GPC, y evaluaron su capacidad protectora en el modelo de hámster sirio. Los resultados indicaron que la formulación estimuló hipermutaciones somáticas y cambio de clase de las células B, con la consecuente inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes, y además protegió al 100 % de los animales desafiados con la enfermedad letal (Kuzmin et al., 2024).

Dentro de la tecnología de ARNm, se han desarrollado alternativas para mejorar las dosis y estabilidad de la molécula. Una de estas variantes es el ARNrep, que incluye las secuencias codificantes de un sistema de replicasa derivado del genoma de los alfavirus (Nitika et al., 2021). Mediante esta modificación, la célula produce más copias de ARNm, lo que permite reducir la dosis inicial de inmunización (Cao et al., 2025). Guo y colaboradores formularon un prototipo de ARNrep que codifica eVLPs con Gn/Gc en su superficie. Los análisis preliminares de respuesta inmune demostraron que este prototipo es capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes anti-Gn/Gc en ratones (Guo et al., 2026).

A la fecha no se dispone de información adicional sobre el progreso de este u otros candidatos de ARNm en fases preclínicas. No obstante, el ARNm es la plataforma más adecuada en comparación con las clásicas formulaciones proteicas para el desarrollo de vacunas contra virus emergentes con potencial pandémico como el ANDV (Žak y Zangi, 2025). El rápido proceso de diseño y fabricación del ARNm conlleva a un oportuno desarrollo de vacunas en situaciones de brotes epidémicos y pandémicos, así como a eventuales actualizaciones antigénicas ante la aparición de distintas variantes virales (Saxena et al., 2025; Zheng y Feng, 2025).

1.3. Tecnología de ARN mensajero.

La tecnología de ARNm es una plataforma basada en la administración de la información genética de una proteína (antigénica o no antigénica) para que sea producida por la maquinaria celular del individuo (Kulkarni et al., 2021). La información genética está codificada por la molécula de ARN mensajero, que está estructurada esencialmente por cinco dominios funcionales fundamentales (Figura 4): la caperuza 5', la región no traducida 5' (5'-UTR), la secuencia codificante del antígeno, la región no traducida 3' (3'-UTR), y una cola de poli(A) de 100-250 nucleótidos de longitud (Kwon et al., 2022). Esta tecnología posee varias ventajas sobre las estrategias convencionales: el contenido genético no se integra en el genoma, lo cual disminuye las preocupaciones acerca de mutagénesis insercional (Pardi et al., 2018); pueden fabricarse directamente a partir de la secuencia genética de la proteína deseada, mediante un proceso enzimático libre de células, lo que garantiza a una producción rápida, escalable y rentable (Kis et al., 2020); un solo producto de ARNm puede codificar varias proteínas, lo que refuerza la respuesta inmunitaria contra patógenos resistentes y permite dirigirse a diferentes cepas o variantes virales con una sola formulación (Wu et al., 2021); y, a diferencia de las plataformas de ADN que requieren ingresar al núcleo durante el estado mitótico celular, el antígeno se expresa en el citoplasma de células en división y quiescentes (To y Cho, 2021). A esta base mecánica se suma la evidencia clínica acumulada tras el uso masivo de vacunas de ARNm aprobadas, que respalda un perfil de seguridad favorable, con eventos adversos graves poco frecuentes y seguimiento mediante vigilancia post autorización continua (Blakney et al., 2026).

Aunque hace más de tres décadas se demostró la funcionalidad de la tecnología mediante una prueba de concepto en un modelo murino (Borah et al., 2021), la investigación estuvo limitada durante varios años debido a las dudas acerca de la estabilidad, eficacia reducida, y excesiva inmunoestimulación de la molécula de ARNm (Chaudhary et al., 2021). El uso de ARNm convencional está asociado con una baja estabilidad y alta inmunogenicidad, que limita su aplicación clínica (Liu y Wang, 2022). Por este motivo, la plataforma se optimizó para incrementar la traducción de la proteína codificada y modular la inmunogenicidad innata y adaptativa (Whitley et al., 2022). Diversas investigaciones en este campo desarrollaron estrategias para mejorar la producción, estabilidad, traducción, y farmacocinética de la molécula. Una de ellas es la correcta adición de la caperuza en el extremo 5' con una estructura Cap-1 o Cap-2 metilada que no estimule la respuesta inmunitaria innata del hospedante, y evite la degradación del ARNm por exoribonucleasas (Picard-Jean et al., 2018) (Figura 4A). Otra solución consiste en el uso de nucleótidos modificados como pseudouridina o 5'-metilcitidina, lo que permite incrementar la expresión proteica a la vez que reduce la inmunogenicidad provocada por el ARNm exógeno (Liu y Wang, 2022) (Figura 4B). Además, la cola de poli(A) en el extremo 3' debe ser de una longitud de al menos 100 nucleótidos para alcanzar una traducción eficiente y un aumento en la estabilidad de la molécula (Tang y Passmore, 2019) (Figura 4C).

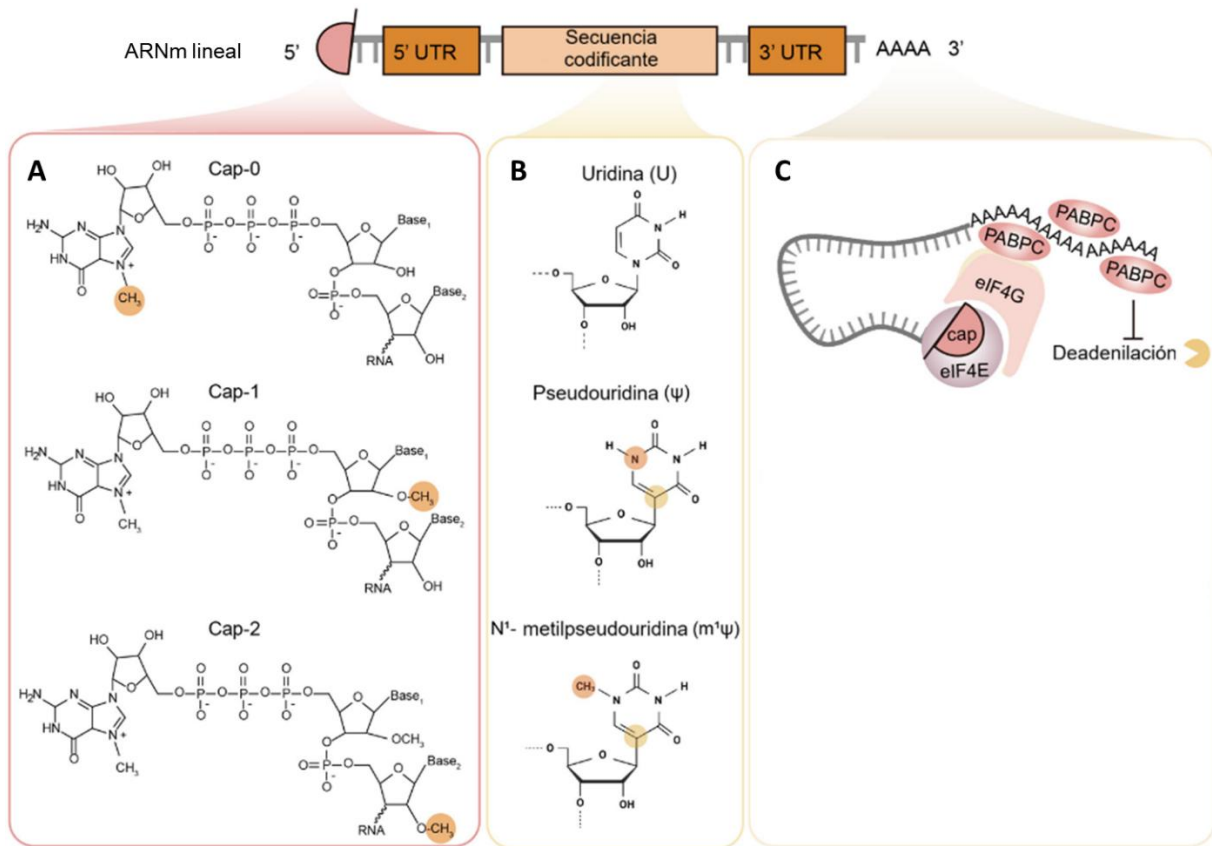


Figura 4. Estructura básica de la molécula de ARN mensajero.

El ARNm vacunal lineal está compuesto por los siguientes dominios: caperuza 5', 5'-UTR, secuencia codificante del antígeno, 3'-UTR, y cola de poli(A). **A.** La caperuza 5' puede tener una estructura Cap-0, Cap-1 o Cap-2, según el número de metilaciones en los primeros residuos del ARNm. **B.** Los nucleótidos modificados, como la pseudouridina, la N¹-metilpseudouridina, entre otros, se utilizan para reducir la respuesta inmune innata inducida por el ARNm. **C.** La cola de poli(A) es fundamental en la eficiencia de traducción porque es reconocida por las PABP que forman el complejo de iniciación de traducción junto con eIF4. *Fuente: modificado de Cao et al. (2025).*

Debido a que el ARNm es susceptible a la degradación por nucleasas endógenas, y requiere atravesar varias barreras celulares antes de alcanzar el compartimento en el que ejerce su actividad (Ho et al., 2021), la molécula debe administrarse mediante un sistema de transporte que la proteja de la degradación y la conduzca al sitio de acción (Kulkarni et al., 2021). Las nanopartículas lipídicas (LNPs) son el mejor vehículo para la entrega exitosa de ARNm dada la versatilidad de su formulación, su capacidad de protección, la carga simultánea y el potencial de entrega de múltiples moléculas de ARNm, y por ello son las que se emplean en varios productos aprobados para su uso clínico (Hou et al., 2021).

1.3.1. Vacunas de ARN mensajero contra enfermedades infecciosas.

El objetivo de las vacunas de ARNm es introducir la molécula en las células para que produzca antígenos específicos de la enfermedad (Bouazzaoui et al., 2021). Tras la inyección intramuscular, las vacunas de ARNm activan el sistema inmunitario adaptativo a través de varias vías: la transfección de las células musculares y cutáneas, la interacción con las células inmunitarias residentes en el lugar de la inyección, y la posterior migración a los órganos linfoides secundarios, lo que inicia y potencia las respuestas celulares y humorales (Kim et al., 2021).

En el caso particular de las vacunas contra enfermedades infecciosas, el ARNm codifica uno o varios antígenos de un patógeno en particular, el cual es producido por la maquinaria celular del hospedante, e induce una potente respuesta inmune que protege al individuo contra la enfermedad (Nitika et al., 2021). Al ser administrado, las LNPs ingresan a las células presentadoras de antígenos (APCs) por endocitosis, para después escapar del endosoma y entrar en el citosol (Chaudhary et al., 2021). Mediante la maquinaria de traducción de las células hospedantes, el ARNm se traduce en proteínas. Estas proteínas se modifican a nivel postraduccional y pueden anclarse en la membrana, o secretarse al medio extracelular (Rijkers et al., 2021). Por tanto, estimulan el sistema inmunitario de varias maneras: el antígeno intracelular es descompuesto en fragmentos más pequeños por el proteasoma, los cuales son mostrados en la superficie celular por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Entonces, las células T activadas eliminan las células infectadas mediante la secreción de moléculas citolíticas, como la perforina y la granzima (Chaudhary et al., 2021). Además, los antígenos secretados pueden ser captados por las células, degradados en los endosomas y presentados en la superficie celular a los linfocitos T CD4⁺ cooperadores por MHC de clase II. Estas células facilitan la eliminación de los patógenos circulantes estimulando a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos neutralizantes y activando los fagocitos, como los macrófagos, mediante citocinas proinflamatorias (Wadhwa et al., 2020). Finalmente, el receptor de los linfocitos B (inmunoglobulina de membrana) reconoce e interactúa con antígenos extracelulares o expresados en la superficie de las células, sin requerir la presentación de antígenos en MHC de clase I o II (Anderson et al., 2020). Sin embargo, la respuesta

de anticuerpos de los linfocitos B a los antígenos proteicos depende de los linfocitos T $CD4^+$ cooperadores, en particular de los foliculares (Song y Craft, 2019). Adicionalmente, los lípidos de las LNPs pueden activar TLR2 y TLR4, mientras que el ARN liberado se puede unir a TLR7 y TLR8 en el endosoma para activar las respuestas inmunitarias innatas mediadas por ISGs, en un mecanismo conocido como efecto autoadyuvante de la formulación (Fang et al., 2022). En el caso de los patógenos que pueden ocultarse dentro de las células hospedantes y permanecer inmunotolerantes, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* y *B. melitensis*, la inducción de respuestas de células T $CD8^+$ es fundamental para la eliminación microbiana y la protección a largo plazo. Las respuestas de las células T $CD8^+$ también son esenciales para una rápida recuperación tras la infección (Zhou et al., 2023).

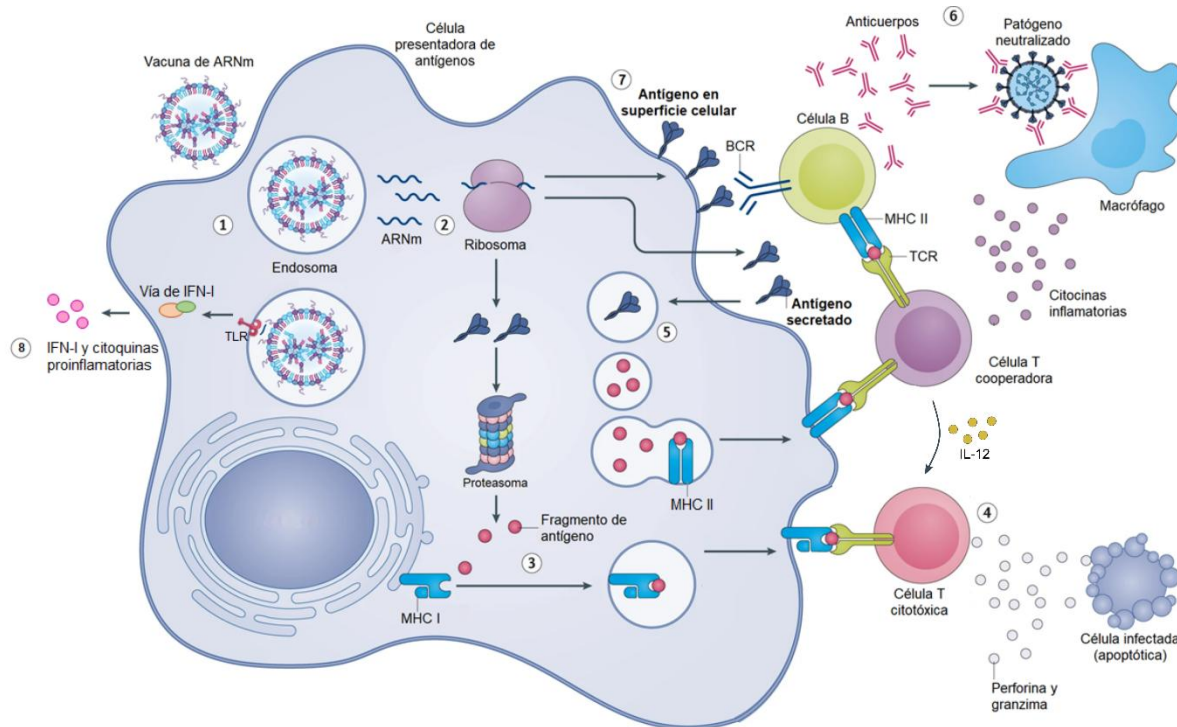


Figura 5. Resumen de la respuesta inmune estimulada por las vacunas de ARN mensajero.

1. Entrada a la célula. 2. Traducción del ARNm en la proteína antigénica. 3. Presentación por MHC I de los fragmentos generados por el proteasoma a partir del antígeno intracelular. 4. Eliminación de células infectadas. 5. Endocitosis y procesamiento de antígeno secretado para su presentación mediante MHC II. 6. Estimulación de células B y macrófagos. 7. Reconocimiento de antígeno de membrana por el receptor de células B. 8. Activación de las vías antiviral e inflamatoria inducidas por la partícula lipídica (efecto autoadyuvante). Fuente: modificado de Chaudhary et al. (2021).

Los primeros productos de ARNm en ser aprobados fueron las vacunas contra la COVID-19, desarrolladas por Pfizer/BioNTech (BNT162b2) y Moderna (mRNA-1273) en 2020. En primera instancia, y debido a la situación sanitaria global, ambos productos fueron autorizados de emergencia, pero recibieron la aprobación definitiva una vez completados los ensayos clínicos correspondientes (Lu et al., 2024). La relativa sencillez de la producción de vacunas de ARNm en comparación con las clásicas vacunas proteicas supuso una enorme ventaja en un escenario de pandemia mundial (Žak y Zangi, 2025). Las vacunas de Pfizer-BioNTech y Moderna fueron fundamentales en la reducción de la transmisión viral y la gravedad de la infección, lo que se tradujo en una reducción de hasta el 63 % de las muertes a nivel mundial durante el primer año de vacunación (Hogan y Pardi, 2022; Watson et al., 2022). Desde entonces, se han desarrollado muchos candidatos de ARNm dirigidos a una gran cantidad de infecciones, y en la actualidad se encuentran en validación preclínica y ensayos clínicos (Matarazzo y Bettencourt, 2023). Uno de estos productos es mRESVIA[®], una vacuna de ARNm para prevenir la enfermedad provocada por el virus sincitial respiratorio, que recibió la aprobación de la FDA para su aplicación en humanos en 2024, y hasta el momento es el único producto aprobado con una diana diferente al SARS-CoV-2 (Alandijany y Qashqari, 2025).

Las vacunas antivirales representan la categoría más consolidada dentro de los candidatos basados en ARNm, constituyendo más del 50 % del total de fármacos en investigación (Žak y Zangi, 2025). De acuerdo con *clinicaltrials.gov*, existen más de 500 ensayos clínicos de productos de ARNm registrados a la fecha, de los cuales 363 corresponden a estudios activos. Estos ensayos están orientados a evaluar la seguridad y eficacia de candidatos vacunales contra la influenza (NCT06125691, NCT06436703), herpes simple (NCT05432583), viruela del mono (NCT05988203), virus varicela-zóster (NCT05703607), citomegalovirus (NCT05575492), virus Epstein-Barr (NCT05831111), virus de inmunodeficiencia humana (NCT05001373), norovirus (NCT05992935), y otras infecciones no virales como la tuberculosis (NCT05547464) y la malaria (NCT05581641).

1.3.2. Desarrollo de prototipos de vacunas de ARN mensajero.

El ARNm que constituye el principio activo de estas vacunas es de origen sintético y se produce mediante transcripción *in vitro* (IVT), empleando una polimerasa de ARN (T7, SP6 o T3) y un molde de ADN. El primer paso en su fabricación consiste en el diseño de la secuencia del ADN molde, el cual debe contener los siguientes dominios: (1) un promotor para la ARN polimerasa; (2) una 5'-UTR; (3) la secuencia optimizada que codifica el antígeno; y (4) una 3'-UTR (Szabó et al., 2022). La secuencia codificante del antígeno es el elemento central del diseño, ya que condiciona la especificidad de la proteína expresada y su procesamiento intracelular. La expresión endógena del antígeno en las células del hospedante favorece su presentación en un contexto fisiológico, contribuyendo a la inducción de respuestas humores y celulares efectivas (S. C. Kim et al., 2022). De forma integrada, las regiones no traducidas actúan como módulos regulatorios que modulan la interacción del ARNm con la maquinaria ribosomal, así como su estabilidad y susceptibilidad a degradación (Yang et al., 2022). En particular, la región 5' participa en la iniciación de la traducción mediante la optimización del escaneo ribosomal, mientras que la región 3' contribuye principalmente a la estabilización del transcrito y a la prolongación de su vida media funcional. En conjunto, las UTRs optimizadas, incluyendo diseños derivados de globina y secuencias sintéticas enriquecidas, se han establecido como estándar ampliamente utilizado en plataformas de ARNm debido a su impacto reproducible en la expresión proteica (Zhang et al., 2025). La arquitectura del sistema se completa mediante la incorporación de la caperuza 5' y la cola de poli(A), que favorecen la estabilidad de los ARNm eucariotas y promueven el inicio de la traducción mediante el reclutamiento de factores necesarios para este proceso (S. C. Kim et al., 2022). La introducción de estos elementos depende de la estrategia de síntesis empleada: en esquemas cotranscripcionales, la cola de poli(A) se codifica en el molde de ADN, mientras que la caperuza 5' se incorpora durante la IVT mediante análogos de nucleótidos o de cap que permiten su adición cotranscripcional por la ARN polimerasa. En estrategias postranscripcionales, ambas modificaciones se añaden enzimáticamente tras la IVT, mientras que los enfoques híbridos combinan ambas aproximaciones según el diseño del sistema de expresión (Deng et al., 2022).

A nivel productivo, estas estrategias se implementan durante la IVT, etapa en la que una ARN polimerasa dependiente de ADN, generalmente T7, sintetiza transcritos a partir de un molde de ADN lineal con secuencia definida para su traducción en el citoplasma. La reacción requiere como componentes esenciales, el ADN molde linealizado, la ARN polimerasa correspondiente, ribonucleótidos trifosfato (NTPs), cofactores iónicos y condiciones tampón adecuadas que aseguren la eficiencia de la transcripción (Kim et al., 2026). Además, el proceso permite la incorporación de nucleósidos modificados y la adición cotranscripcional de la caperuza, lo que contribuye a modular la estabilidad del transcrito, su reconocimiento por sensores de inmunidad innata y su eficiencia de expresión (Liu y Wang, 2022).

El ARNm producido por IVT contiene remanentes de ADN molde, nucleótidos libres, enzimas y sales, que constituyen contaminantes que deben ser eliminados. La purificación del principio activo a nivel de laboratorio se realiza mediante una digestión enzimática con DNasa para degradar el molde de ADN, seguida de la precipitación química con cloruro de litio (LiCl) o el uso de columnas de centrifugación por afinidad (Leong et al., 2025). A nivel de escalado e industrial, el ARNm se purifica a través de filtración por flujo tangencial (TFF) o cromatografía líquida de alta resolución (Feng et al., 2023). El análisis de integridad, pureza y estabilidad del transcrito purificado constituye un pilar fundamental en el desarrollo, dada la susceptibilidad inherente de estas macromoléculas a la degradación. La espectrofotometría UV-Vis proporciona una primera estimación de la concentración y de la pureza preliminar mediante relaciones de absorbancia, mientras que la electroforesis en gel de agarosa ofrece una confirmación visual cualitativa del tamaño del transcrito (Guimaraes et al., 2024). Estas técnicas se complementan a nivel industrial con técnicas cromatográficas y electroforesis capilar en gel, las cuales permiten cuantificar con precisión el porcentaje de moléculas de longitud completa frente a las especies fragmentadas. La evaluación de la pureza se centra en la detección de impurezas críticas derivadas de la IVT, tales como el ADN molde residual, las enzimas remanentes y, el ARN de doble cadena (ARNdc), un subproducto que puede desencadenar respuestas inmunitarias innatas no deseadas (Camperi et al., 2024). Finalmente, los estudios de estabilidad monitorean las vías de degradación mediante exposición del transcrito a condiciones de estrés térmico,

químico o mecánico para evaluar su cinética de hidrólisis, permitiendo modelar la vida útil de la formulación (Oude Blenke et al., 2023).

El principio activo purificado es posteriormente formulado en LNPs utilizando el método de nanoprecipitación empleando un medio acuoso ácido. Esta técnica se basa en la introducción rápida de una fase orgánica con soluto hidrofóbico (como lípidos) en un mayor volumen de fase acuosa, donde la difusión instantánea del disolvente orgánico reduce la solubilidad del material y provoca una sobresaturación homogénea que desencadena la nucleación y el autoensamblaje espontáneo de las nanopartículas (Xenakis et al., 2026). Las LNPs utilizadas como vehículo de ARNm están compuestas esencialmente por cuatro lípidos: un lípido ionizable, que se protona en medio ácido y dirige el atrapamiento del principio activo por interacción electrostática; el colesterol, empleado para aportar rigidez, integridad estructural y modular la fluidez de la partícula; un lípido auxiliador o neutro, que estabiliza la estructura lipídica exterior y la consistencia de la matriz; y un lípido PEGilado, encargado de controlar el tamaño de la nanopartícula y evitar su agregación coloidal (Hald Albertsen et al., 2022).

Tras formular las LNPs, el proceso continúa con la etapa de acondicionamiento y la posterior caracterización fisicoquímica y biológica orientadas a la validación del producto. El solvente orgánico remanente y el exceso de lípidos se eliminan mediante diálisis pasiva contra un tampón fisiológico, proceso que a la vez neutraliza el pH del medio para estabilizar la carga superficial de las partículas (Cameau et al., 2022). Una vez acondicionado, el producto se evalúa utilizando herramientas analíticas como microscopía electrónica, dispersión dinámica de la luz (DLS) y dispersión electroforética de la luz (ELS), las cuales permiten determinar la morfología, distribución de tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y carga superficial de la nanoformulación (Malburet et al., 2022). Asimismo, se implementan ensayos celulares destinados a evaluar la viabilidad celular y los niveles de expresión proteica como indicadores de seguridad y potencia biológica (Muzard et al., 2025). La integración de estos bloques analíticos proporciona los criterios finales necesarios para establecer la calidad del producto (Hong Hoang et al., 2026).

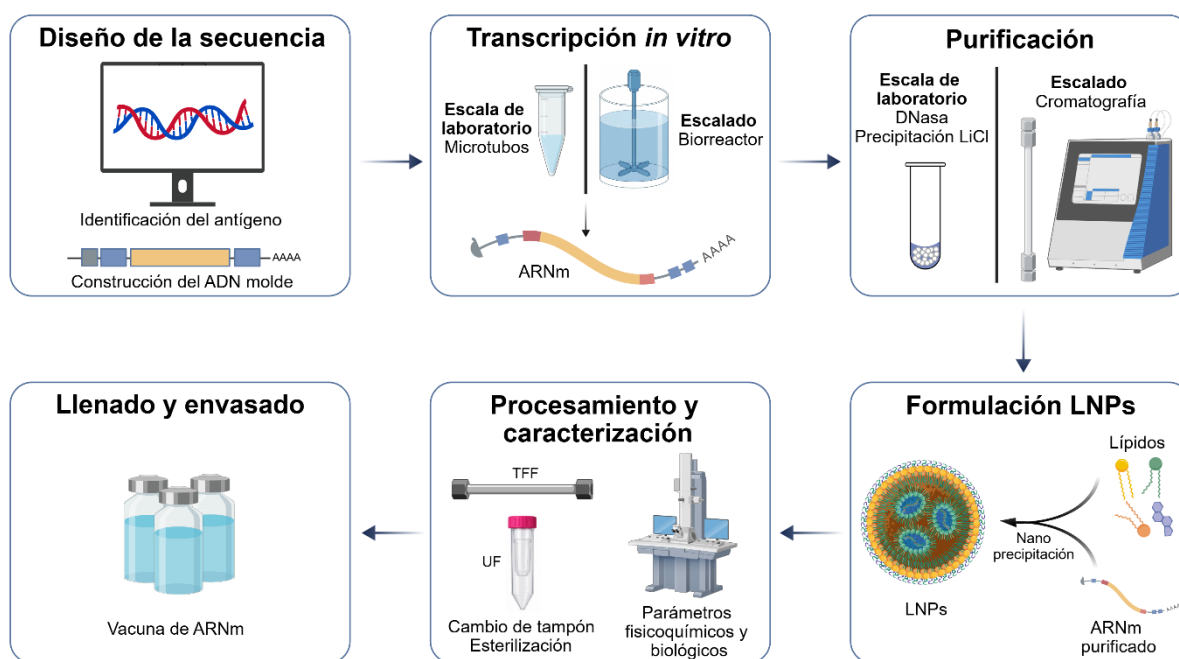


Figura 6. Diagrama del proceso productivo de vacunas de ARN mensajero.

El diseño de la secuencia del ADN molde constituye el primer paso de la producción, etapa en la cual se definen el marco de lectura abierto del antígeno, las UTRs y otros elementos. Este molde linealizado sirve como base para la transcripción *in vitro*, realizada en microtubos a escala de laboratorio, o en biorreactores en procesos de escalado. La caperuza de 5', la cola de poli(A) o ambas pueden añadirse durante la IVT (estrategia cotranscripcional) o en reacciones enzimáticas posteriores (postranscripcional). El ARNm sintetizado es purificado a escala de laboratorio mediante digestión con DNasa y precipitación con cloruro de litio, mientras que en el escalado se utilizan métodos cromatográficos. El ARNm purificado se formula en nanopartículas lipídicas a través de la técnica de nanoprecipitación, y la suspensión se acondiciona mediante ultrafiltración para concentración e intercambio de tampón. Finalmente, se emplean diferentes ensayos analíticos para medir las características físico-químicas y biológicas de la nanoformulación, lo que permite determinar su calidad antes de rellenar y envasar. *Fuente: elaboración propia mediante BioGDP.com.*

1.4. Problema/solución propuesta.

Este prototipo vacunal se desarrolló con el objetivo de proponer un candidato de ARN mensajero capaz de estimular una respuesta inmune humoral y celular contra el virus Andes. La reciente aplicación masiva de esta tecnología en la inmunización mundial contra la COVID-19, demostró la seguridad, eficacia, versatilidad y rápida implementación de las vacunas de ARN mensajero. En este escenario, los brotes de virus Andes en Chile, Argentina y el sur de Brasil, constituyen un problema sanitario recurrente para el cual aún no se dispone de soluciones viables. El desarrollo de nuevas vacunas dirigidas a esta infección es urgente a nivel regional debido a la alta letalidad del Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus; asimismo, el riesgo continuo de aparición

de nuevas variantes mutadas con mayor patogenicidad permanece como una amenaza latente.

Aunque se han reportado candidatos de ARNm que codifican el precursor GPC del ANDV y formulaciones de ARN autorreplicante que expresan Gn/Gc, la información disponible sobre el desarrollo integral de estas plataformas continúa siendo limitada, especialmente respecto de la producción y modificación del ARNm, su encapsulación y caracterización en LNPs, la actividad biológica *in vitro* y la comparación de dosis mediante la evaluación de respuestas humorales, neutralizantes y celulares en hámster sirio (Guo et al., 2026; Kuzmin et al., 2024). A partir de esta brecha, el presente trabajo abordó el desarrollo integral de una formulación LNPs-ARNm y su evaluación fisicoquímica, biológica e inmunológica en hámster sirio. La contribución original de esta tesis radicó en integrar estas etapas dentro de un mismo proceso experimental y comparar dosis de 10 y 20 µg para seleccionar la alternativa más adecuada bajo el esquema evaluado.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis: Un prototipo vacunal contra el virus Andes, basado en la tecnología de inmunización con ARN mensajero y obtenido mediante un proceso de síntesis de rápida implementación y libre de células, presentará un perfil de tolerabilidad compatible con su evaluación preclínica de respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas en hámster sirio.

III. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo general: Desarrollar un prototipo vacunal contra el virus Andes, basado en ARN mensajero codificante de las proteínas virales Gn/Gc.

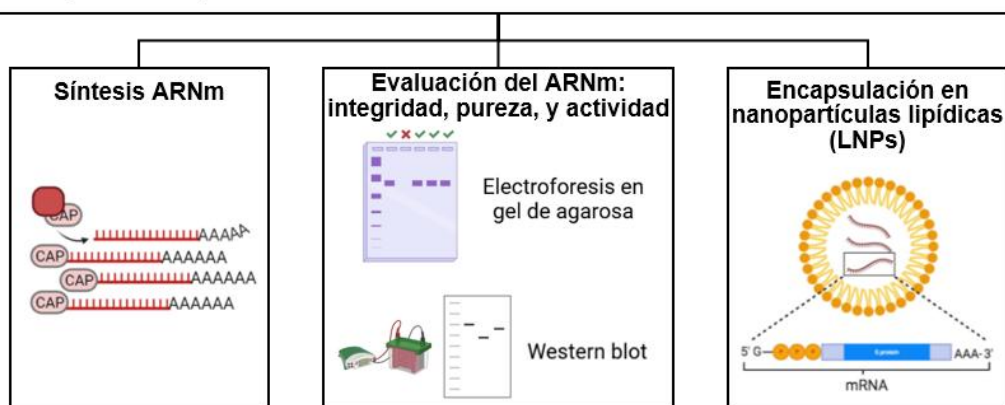
Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis *in vitro*.

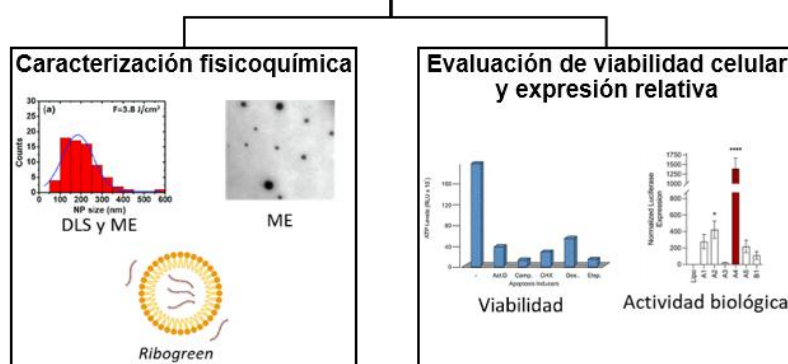
Objetivo específico 2: Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

Objetivo específico 3: Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio.

1. Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis *in vitro*.



2. Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.



3. Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de Hámster Sirio.

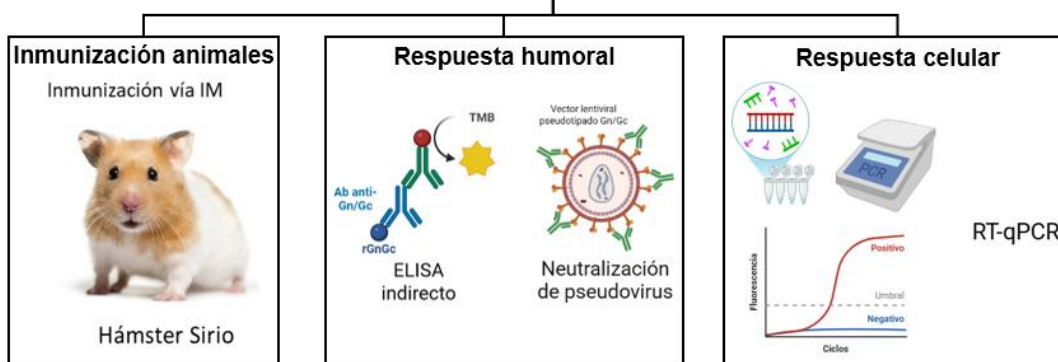


Figura 7. Diagrama de objetivos del trabajo doctoral.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales.

4.1.1. Sistemas biológicos *in vitro*.

Todos los procedimientos y protocolos que involucraron líneas celulares fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, mediante informe del 30 de abril de 2025. (Anexo 1).

4.1.1.1. Cepas bacterianas

***Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.)**

Genotipo: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* λ -.

Cepa de *E. coli* empleada para la replicación de vectores plasmídicos por su alta eficiencia de transformación.

***Escherichia coli* Stbl3 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.)**

Genotipo: F⁻ *mcrB* *mrr* *hsdS20*(r_B⁻, m_B⁻) *recA13* *supE44* *ara-14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL20*(Str^R) *xyl-5* λ - *leu* *mtl-1* *endA1*+

Cepa de *E. coli* que contiene la mutación *recA13*, que minimiza la probabilidad de recombinación entre repeticiones terminales largas y, por ello, se utiliza en la producción de plásmidos de transferencia lentivirales.

4.1.1.2. Células eucariotas

HEK-293 (células de riñón embrionario humano, ATCC® CRL-1573)

Células aisladas del riñón de un embrión humano. Se empleó la variante FT para la producción de vectores lentivirales, y la variante A para ensayos de transfección. En el experimento de neutralización se utilizó una línea celular estable que expresa la integrina beta 3 en su superficie (HEK-293-iβ3), donada por el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes.

HeLa (células derivadas de carcinoma cervical de origen humano, ATCC® CCL-2).

Las células HeLa son las primeras células humanas inmortales cultivadas. Tipo de célula epitelial, tejido Útero; Cérvix, Adenocarcinoma.

HFF (fibroblastos de prepucio humano, SCRC-1041).

Células derivadas de prepucio humano normal. La línea celular fue establecida por ATCC en 2003.

Hibridoma productor de anticuerpos monoclonales anti Gn/Gc (código 20C1F10).

Células donadas por el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología de la Universidad de Concepción; son el producto de la fusión de un linfocito B murino productor de anticuerpos monoclonales anti Gn/Gc con una célula de mieloma.

4.1.2. Medios de cultivo.

4.1.2.1. Medios de cultivo de bacterias.

Agar Luria Bertani (Agar-LB): (MoBio, Estados Unidos), antibiótico 1 X.

Medio Luria Bertani (LB): Triptona 1.0 % (p/v) (BD Biosciences, Estados Unidos), Extracto de levadura 0.5 % (p/v) (BD Biosciences, Estados Unidos), cloruro de sodio (NaCl) 1.0 % (p/v) (Merck, Alemania), pH 7.5, antibiótico 1 X.

Antibióticos: Ampicilina 1000 X (100 mg/mL) (US Biological Life Sciences, Estados Unidos), Estreptomicina 1000 X (50 mg/mL) (Merck, Alemania), Kanamicina 1000 X (50 mg/mL) (Merck, Alemania).

4.1.2.2. Medios de cultivo de células eucariotas.

Medio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM): suplementado con 0.3 mg/mL de L-glutamina (25-005-CI, Corning, Estados Unidos), solución de penicilina/estreptomicina 1 X (30-002-CI, Corning, Estados Unidos), y 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB).

Medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI): (31800-089, Gibco, Estados Unidos), suplementado con 0.3 mg/mL de L-glutamina (25-005-CI, Corning, Estados Unidos).

Unidos), solución de penicilina/estreptomicina 1 X (30-002-CI, Corning, Estados Unidos), y 10 % o 2 % SFB (v/v).

Medio de congelación: DMEM o RPMI (según corresponda) suplementado con 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (Sigma, Estados Unidos) y 30 % (v/v) de SFB.

Opti-MEM™: (31985070, Gibco, E.E.U.U.) Medio esencial mínimo (MEM) de suero reducido, optimizado para la transfección de lípidos catiónicos.

4.1.3. Plásmidos.

pUC-MinusMCS-GnGc: Vector que contiene el ADN molde para la transcripción *in vitro*, bajo el control del promotor T7, del ARN mensajero que codifica las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes.

pEGFP-N1: Vector que codifica la proteína fluorescente verde (GFP), utilizado como control positivo en los ensayos de transfección con polietilenimina (PEI), y como vector de expresión en el clonación del ADN molde.

pENTRY-GPC: Vector que permite la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc del virus Andes en la superficie de células de mamíferos, bajo el control del promotor de Citomegalovirus (CMV). Contiene la secuencia optimizada para codones humanos del segmento M de la cepa de virus Andes Chile-9717869 (GenBank: AF291703.2), que codifica el precursor de las glicoproteínas de superficie Gn/Gc (GPC) de virus Andes. Plásmido empleado como control positivo en la evaluación de la expresión de los antígenos a partir del ADN molde, y como vector de envoltura en la generación de vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas de superficie de virus Andes.

pLGW: Vector de transferencia de los vectores lentivirales que contiene el transgén reportero GFP bajo control del promotor de CMV en las células transducidas.

pLP1: Vector de empaquetamiento de los vectores lentivirales, perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Estados Unidos). Contiene los genes *Gag* y *Pol*.

pLP2: Vector de regulación del empaquetamiento de los vectores lentivirales, perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Estados Unidos). Contiene el gen *Rev*.

pLP/VSVG: Vector de envoltura de los vectores lentivirales control, perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Estados Unidos). Permite la expresión de la proteína G del virus de la Estomatitis Vesicular en la superficie de los vectores lentivirales.

4.1.4. Otros ácidos nucleicos

ARN mensajero de eGFP: (Genscript, Estados Unidos). Constructo que codifica eGFP, optimizado para aumentar la traducción. Usado como control positivo en la transfección de ARN mensajero.

4.1.5. Enzimas y anticuerpos.

Tabla 2. Enzimas.

Nombre	Proveedor	Actividad	Concentración	No. Catálogo
ARNasa A	Invitrogen	Ribonucleasa A	20 mg/mL	12091021
ARNm Cap 2'-O-Metiltransferasa	New England Biolabs	Metiltransferasa	50 U/μL	M0366
BamHI-HF	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3136
BspQI	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIS	10 U/μL	R0712
DNasa I	New England Biolabs	Endonucleasa de ADN	2 U/μL	M0303
EcoRI-HF	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3101
Fosfatasa antártica	New England Biolabs	Fosfatasa alcalina	5 U/μL	M0289
KpnI-HF	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3142
MfeI-HF	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3589
NcoI-HF	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3193
NgoMIV	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	10 U/μL	R0564
SacI	New England Biolabs	Endonucleasa de restricción tipo IIP	20 U/μL	R3156
T4	Thermo Fisher	Ligasa de ADN T4	5 U/μL	EL0011

Fuente: elaboración propia.

Tabla 3. Anticuerpos primarios.

Especificidad	Proveedor	Dilución	Especie	No. Catálogo
Anti-Gn/Gc	Laboratorio Biofármacos Recombinantes (hibridoma)	-	ratón	20C1F10

Fuente: elaboración propia.

Tabla 4. Anticuerpos secundarios.

Especificidad	Proveedor	Dilución	Especie	No Catálogo
Anti-IgG de ratón (H+L) conjugado a Alexa Fluor® 680	Jackson Immuno Research	1:5000	Cabra	A28183
Anti-IgG de hámster sirio (H+L) conjugado a HRP	Rockland Immunochemicals	1:5000	Cabra	620-103-440

Fuente: elaboración propia.

4.1.6. Reactivos químicos.

Los reactivos químicos se describen en la metodología (Anexo 3).

4.1.7. Soluciones y suspensiones.

Cloruro de litio (LiCl) 7.5 M: Solución de precipitación de ARN (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

DPBS: Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Tripsina-EDTA: 2.5 g/L tripsina, 1.099 g/L glucosa, 1 % rojo fenol, 0.1 g/L EDTA, (Sigma, Estados Unidos).

Solución acuosa de acetato de sodio 3 M pH 5.2: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Solución de descontaminación de ARNasa RNaseZap™: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Solución de dilución para muestras de plasma sanguíneo: PBS 1 X (Gibco, Estados Unidos), leche descremada 1 %, tween 0,05 % (Sigma, Estados Unidos).

Solución de tinción de proteínas: azul de Coomassie 0.5 g/L (Serva, Estados Unidos.), metanol 10 % (Caledon, Canadá), ácido acético 10 % (Merck, Alemania).

Alhydrogel® 2 %: suspensión de oxihidróxido de aluminio (Croda Pharma, Dinamarca).

Soluciones para extracción y purificación de ADN.

- Solución I: Glucosa 50 mM (Merck, Alemania), Tris-HCl 25 mM pH 8.0 (Calbiochem, Inglaterra), EDTA disódico 10 mM, pH 8.0 (Calbiochem, Inglaterra), ARNasa A 20 mg/mL (Invitrogen, Estados Unidos).
- Solución II: NaOH 0.2 M (Merck, Alemania), SDS 1 % (p/v) (Merck, Alemania).
- Solución III: Acetato de potasio 5 M (Merck, Alemania), Ácido acético glacial (Merck, Alemania).

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa de ácidos nucleicos.

- Tampón de carga de ADN 6 X: (New England Biolabs, Estados Unidos).
- Tampón de carga de ARN 2 X: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).
- Tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1 X: 40 mM Tris (Calbiochem, Inglaterra), 1 mM EDTA (Calbiochem, Inglaterra), 20 mM ácido acético (Merck, Alemania).
- Bromuro de etidio: (Merck, Alemania).
- Patrón de peso molecular de ADN *GeneRuler* 1 kb: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).
- Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range*: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Soluciones de cultivo celular.

- Azul de tripán: azul de tripán 5 g/L (Sigma, Estados Unidos), NaCl 8.5 g/L (Merck, Alemania) en agua grado biología molecular (Corning, Estados Unidos).
- Reactivo de transfección de ARNm *Lipofectamine™ MessengerMAX™*: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).
- Solución de transfección de ADN: Polietilenimina (PEI) ramificada 25 kDa (Sigma, Estados Unidos) 0.81 mg/mL pH 7.0 en agua grado biología molecular (Corning, Estados Unidos).
- Tampón de lisis de eritrocitos: Cloruro de amonio 150 mM, bicarbonato de sodio 10 mM, EDTA disódico 0.1 mM en agua destilada.
- Tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA): NaCl 150 mM (Merck, Alemania), Tritón X-100 1 % (v/v) (Merck, Alemania), deoxicolato de sodio 0.5 % (p/v) (Merck, Alemania), SDS 0.1 % (p/v) (Calbiochem, Inglaterra), Tris 50 mM pH 8.0

(Calbiochem, Inglaterra), cóctel inhibidor de proteasas 1 X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

- Tripsina-EDTA 0.25 %: (Corning, Estados Unidos).
- Reactivo TRIzol™: (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de proteínas.

- Acrilamida (Merck, Alemania) 30 % (p/v), 0.8 % (p/v) bisacrilamida (Merck, Alemania).
- 1.5 M Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), pH 8.8.
- 0.5 M Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), pH 6.8.
- 10 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania).
- 10 % (p/v) Persulfato de amonio (Calbiochem, Alemania).
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Merck, Alemania).
- Tampón de corrida: 25 mM Tris-HCl (Calbiochem, Alemania), 192 mM Glicina (Calbiochem, Alemania), 0.1 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania).
- Tampón de carga 6 X para condición denaturante y reductora: 10 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania), 0.6 % (v/v) β-Mercaptoetanol (Sigma, Alemania), 0.012 % (p/v) azul de bromofenol (Sigma, Estados Unidos.), 0.35 M Tris (Calbiochem, Alemania), 30 % (v/v) glicerol (Calbiochem, Alemania).
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus 250 kDa (Maestrogen, Estados Unidos).
- Solución de tinción Azul de Coomassie: 0.25 % (p/v) Azul de Coomassie brillante R250 (Merck, Alemania), 10 % (v/v) ácido acético (Merck, Alemania), 45 % (v/v) Metanol (Merck, Alemania).
- Solución de destinción: 5 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) ácido acético.
- Tris-Glicina: Tampón de corrida de proteínas, 144 g/L glicina (Merck, Alemania), 30 g/L Tris base (Merck, Alemania), Dodecil sulfato sal sódica (SDS) 0.1 % (Calderon, Canadá), pH 8.3.

Soluciones para Western blot.

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris (Calbiochem, Alemania), 39 mM glicina (Calbiochem, Alemania), 0.037 % (p/v) SDS (Calbiochem, Alemania), 20 % (v/v) Metanol (Merck, Alemania).
- Tampón tris salino (TBS): 3.0 g/L Tris, 8.0 g/L NaCl, pH 7.6.
- Solución de bloqueo: 5 % (p/v) leche descremada en TBS.
- TBS-Tween: TBS con 0.1 % (v/v) Tween-20 (*Sigma, Estados Unidos*).

Soluciones para ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).

- Solución de recubrimiento: Tampón Carbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 50 mM, pH 9,4-9,6 (Merck, Alemania).
- PBS: tampón fosfato-salino, NaCl 8 g/L (Merck, Alemania), KCl 0.2 g/L (Merck, Alemania), Na_2HPO_4 1.09 g/L (Caledon, Canadá), pH 7.2.
- Solución de bloqueo: 4 % (p/v) leche descremada en PBS.
- Solución de lavado: 0.1 % (v/v) Tween-20 (Calbiochem, Estados Unidos) en PBS.
- Solución de dilución: 1 % (p/v) leche descremada, 0.1 % (v/v) Tween-20 (Calbiochem, Estados Unidos) en PBS.
- Solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para ELISA *1-Step™ Ultra TMB* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).
- Solución de detención de la reacción: Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2.5 M (Merck, Alemania).

4.1.8. Kits comerciales.

E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit (Omega Bio-Tek, Estados Unidos): Purificación de ADN plasmídico a escala masiva.

E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, Estados Unidos): Purificación de ADN linealizado.

HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Estados Unidos): Transcripción *in vitro* de ARN.

KAPA SYBR® FAST (Merck, Alemania): Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

RediPlate™ 96 RiboGreen™ RNA Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos): Cuantificación de la concentración de ARN encapsulado, y la eficiencia de encapsulación en las nanopartículas lipídicas.

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos): Sistema completo para la transcripción inversa (RT) de la primera cadena de ADNc a partir de ARN.

Vaccinia Capping System (New England Biolabs, Estados Unidos): Adición de la caperuza 5' al ARN sintetizado.

ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen, Estados Unidos): Producción de vectores lentivirales.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Estados Unidos): Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.

4.1.9. Otros materiales.

Agujas hipodérmicas (27G x 1/2).

Balanza analítica. Rango de pesada de 0 a 210 g, resolución 0.001 g.

Balanza técnica. Rango de pesada de 0 a 4200 g, resolución 0.01 g.

Jaulas para la experimentación animal. Altura: 19 cm, Ancho: 13 cm, Largo: 30 cm.

Jeringuillas hipodérmicas (1, 5, 10, y 20 mL).

Microscopio FLoid™ Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Termómetro rectal digital, con una resolución de $\pm 0.1^\circ \text{C}$.

4.1.10. Animales.

Todos los estudios *in vivo* requirieron de la aprobación del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (30 de abril de 2025) para la investigación en animales (Anexo 1).

Se utilizaron 24 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) de ambos sexos, procedentes del Departamento de Farmacología de la Universidad de Concepción, con un peso inicial de 117–164 g. Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro por jaula y tuvieron un periodo de aclimatación de cinco días antes del inicio del experimento. El alojamiento se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (18 – 22 °C), y un

ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con acceso *ad libitum* a alimento y agua. El material de cama, compuesto por viruta de álamo, se esterilizó antes de su uso y se reemplazó cada siete días.

4.2. Metodología.

El presente proyecto se planteó como objetivo el desarrollo de un prototipo vacunal basado en la tecnología de ARN mensajero que codifique las glicoproteínas de superficie Gn y Gc del virus Andes. Para ello, primero se obtuvo la molécula de ARNm mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. Este principio activo, optimizado para incrementar la traducción y disminuir la inmunoestimulación indeseada, fue encapsulado en nanopartículas lipídicas. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de la formulación, así como sus parámetros biológicos (toxicidad y expresión relativa *in vitro*). A continuación, se determinó el perfil de respuesta inmune en el modelo animal de hámster sirio, mediante la cuantificación del título de anticuerpos totales y neutralizantes en el suero de animales inmunizados, y de los niveles de citocinas inducidos por el prototipo. Estos resultados permitieron precisar la capacidad del prototipo para estimular una respuesta inmune humoral y celular contra los antígenos Gn y Gc.

4.2.1. Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis *in vitro*.

4.2.1.1. Construcción y caracterización del ADN molde a utilizar en la transcripción *in vitro*.

Diseño del vector plasmídico que contenía el ADN molde.

El ADN molde se diseñó de modo que incorpore todos los elementos regulatorios y estructurales requeridos para la síntesis de una molécula de ARNm funcional (Kwon et al., 2022). La construcción estuvo constituida, en orden 5' a 3', por las siguientes secuencias: promotor T7; 5'-UTR sintética de Moderna Tx (Stewart-Jones, 2021); secuencia optimizada para codones humanos del segmento M de la cepa del virus Andes Chile-9717869 (GenBank: AF291703.2), que codifica el precursor poliproteico GPC del virus Andes, (Starck-Mendez, 2020); 3'-UTR sintética de Moderna Tx (Stewart-Jones, 2021); cola de poli(A) de 100 nucleótidos; y sitio de restricción de la endonucleasa BspQI. Adicionalmente, se incluyeron los sitios de restricción de la enzima BamHI en el extremo 5', y de la enzima MfeI entre la 3'-UTR y la cola de poli(A).

El ADN molde fue sintetizado por la empresa Blue Heron Biotech, LLC (Estados Unidos), que lo clonó en el vector pUC-MinusMCS con resistencia a ampicilina, generando así el vector denominado pUC-MinusMCS-GnGc.

Producción del vector plasmídico que contenía el ADN molde.

El vector pUC-MinusMCS-GnGc sintetizado se amplificó en la cepa bacteriana *E. coli* TOP10® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Primero, las bacterias se transformaron con el vector por medio de choque térmico, mezclando 10^7 células competentes con 100 ng de ADN plasmídico e incubando a 4 °C por 10 min. A continuación, la mezcla se sometió a choque térmico a 42 °C por 2 min, y se volvió a incubar a 4 °C por 10 min. Las células fueron recuperadas mediante incubación a 37 °C por una hora, se sembraron en agar LB suplementado con ampicilina y se incubaron durante 20 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de cuatro colonias bacterianas y se inocularon en tubos con medio LB e incubar a 37 °C por 14 h. Los plásmidos contenidos en cada colonia se purificaron por lisis alcalina y se resuspendieron en agua grado biología molecular.

Muestras de los plásmidos recuperados se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, a 100 V por 30 min, con el fin de comprobar cuáles correspondían al vector pUC-MinusMCS-GnGc. La muestra que mostró mayor intensidad de bandas fue seleccionada para verificar su identidad a través de un análisis de restricción (Su et al., 2019). Se realizó una digestión *in silico* del vector pUC-MinusMCS-GnGc en el *software* SnapGene (Domatics, Estados Unidos) para predecir su patrón de restricción con las endonucleasas SacI, EcoRV y KpnI. En paralelo, se prepararon las reacciones de digestión del plásmido con estas enzimas, y se incubaron a 37 °C durante 14 h. Después, se observaron los fragmentos de ADN producidos en cada reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, a 100 V por 30 min, y se compararon con los patrones obtenidos *in silico*.

Una vez confirmada la identidad, el vector se amplificó cultivando la colonia correspondiente durante 15 h a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina. El plásmido fue posteriormente recuperado por lisis alcalina y purificado con el kit *E.Z.N.A. Cycle Pure* (Omega Bio-Tek, Estados Unidos), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. El ADN obtenido fue resuspendido en agua grado biología molecular, y su concentración se determinó por espectrofotometría a 260 nm en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos).

Clonamiento del ADN molde para su expresión en células de mamífero.

La correcta expresión de los antígenos en células de mamífero a partir del ADN molde se comprobó mediante la construcción y transfección de un nuevo vector, denominado pGPC. La clonación se efectuó extrayendo el ADN molde del vector pUC-MinusMCS-GnGc, e insertándolo corriente abajo del promotor de citomegalovirus (CMV) del vector pEGFP-N1. El primer paso de este procedimiento fue la digestión de ambos plásmidos con las enzimas de restricción BamHI y MfeI, durante 14 h a 37 °C. Los fragmentos de utilidad tanto del vector (pEGFP-N1) como de la banda a clonar (pUC-MinusMCS-GnGc) se identificaron según su tamaño por medio de una digestión *in silico* en el *software Snapgene* (Domatics, Estados Unidos). Los productos de la reacción enzimática se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 60 V por 1 h. A continuación, se recuperaron las porciones del gel correspondientes al vector y la banda, el ADN de cada una se purificó con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Estados Unidos), y se cuantificó su concentración por espectrofotometría a 260 nm en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos). Los extremos del fragmento del vector se desfosforilaron con la enzima fosfatasa antártica, para después establecer la reacción de ligazón con la enzima ligasa de ADN T4 de acuerdo con el protocolo del fabricante, y a una proporción construcción a vector de 3:1. La reacción se incubó a 22 °C por una hora, y los productos se utilizaron para transformar por electroporación células de *E. coli* TOP10®. Posteriormente, las bacterias fueron sembradas en agar LB suplementada con kanamicina y se incubaron a 37 °C por 20 h.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se tomaron muestras de ocho colonias bacterianas transformadas con el vector pGPC, para inocular tubos con medio LB suplementados con kanamicina, e incubar a 37 °C durante 14 h. Los plásmidos contenidos en cada una de las colonias se purificaron por lisis alcalina para identificar cuáles contenían el vector pGPC. Para ello, se verificó el tamaño de los vectores

mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se evaluó su perfil de restricción al incubar con la enzima NcoI y compararse con la digestión *in silico* obtenida con el *software Snapgene* (Domatics, Estados Unidos). Una vez determinado el clon bacteriano transformado con pGPC, se procedió a corroborar la identidad del vector a través de su perfil de restricción (Su et al., 2019), utilizando las siguientes enzimas: BamHI, SacI y NgoMIV. Primero se predijo el perfil en el *software Snapgene* (Domatics, Estados Unidos), y a continuación se montaron las reacciones de digestión. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 14 h. Después se observaron los fragmentos de ADN producidos en cada una por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se compararon con los patrones obtenidos *in silico*. Una vez confirmada la identidad, el vector fue producido a gran escala, recuperado de las células bacterianas por lisis alcalina, y purificado con el kit *E.Z.N.A. Cycle Pure* (Omega Bio-Tek, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc en células de mamífero a partir del ADN molde.

Células HEK-293A (ATCC® CRL-1573) fueron sembradas en placas de 100 mm (Corning, Estados Unidos), a una concentración de 2×10^6 células/mL, en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, y penicilina/estreptomicina 1 X. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 70 %. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo por DMEM sin SFB y se incubó por cuatro h a 37 °C, 5 % CO₂. Transcurrido este tiempo, las células se transfectaron con el vector pGPC mediante el método de la polietilenimina (PEI) (Toledo et al., 2009), empleando 20 µg de ADN plasmídico por placa, y una relación de 2.5 µL de PEI por cada µg de ADN. Se establecieron los siguientes controles: vector pENTRY-GPC como control positivo (C(+)), vector pEGFP se empleó como control de transfección (CT), y células sin transfectar como control negativo (C(-)).

Después de añadir el complejo PEI-ADN a la placa respectiva, las células se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 6 h, se retiró el medio de cultivo sin SFB y se reemplazó por DMEM + SFB 10 %. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ por 72 h, y pasado este tiempo se verificó la expresión del reportero (CT) en un microscopio

FLoid™ Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, el contenido proteico celular de cada placa se cosechó por lisis química con tampón RIPA (Riisom et al., 2023). Primero se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con PBS. A continuación, se añadió tampón RIPA suplementado con inhibidor de proteasa, la placa se incubó a 4 °C por 10 min, y las células se separaron y rompieron con un *cell scraper*. Una vez solubilizado el contenido celular en el tampón, todo el volumen se transfirió a un microtubo estéril y se incubó de hielo durante 5 min. Después, se centrifugó a 19 000 x g por 5 min a 4 °C en una centrífuga MIKRO 220R (Andreas Hettich GmbH, Alemania), se recuperó el sobrenadante en un microtubo limpio, y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Las muestras de proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras. Las muestras se mezclaron con tampón de carga y se incubaron durante 5 min a 95 °C antes de ser cargadas en el gel. La corrida electroforética se realizó en una cámara Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Estados Unidos) utilizando una solución tampón de corrida Tris-Glicina en los compartimentos catódico y anódico. La separación de las muestras se practicó a una corriente constante de 100 V durante 1.5 h. Posteriormente, las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en el equipo *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Estados Unidos) a 250 mA durante 30 min. La efectividad de la transferencia de proteínas se comprobó mediante tinción con solución de Rojo Ponceau al 1 % durante 5 min. La membrana se bloqueó con leche en solución al 5% en TBS, se incubó durante 12 h, se lavó con tampón TBS-tween y se incubó por 12 h a 4 °C con el anticuerpo anti-Gc obtenido del hibridoma 20C1F10. A continuación, la membrana se lavó con tampón TBS-tween, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 a una dilución 1:5000 (Jackson ImmunoResearch, Estados Unidos), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, se reveló la membrana en el sistema de imagen *Odyssey CLx* (LICORbio, Estados Unidos).

4.2.1.2. Establecimiento de la producción de ARN mensajero que expresa los antígenos Gn/Gc.

Transcripción *in vitro* del ARN.

El primer paso de la producción de ARNm que codificaba las glicoproteínas de superficie Gn/Gc del virus Andes (ARN-GPC) fue la transcripción *in vitro* de ARN (Shi et al., 2026). Esta síntesis requirió un molde de ADN lineal para garantizar que los transcritos sintetizados tuvieran la longitud correcta (Martínez et al., 2023). Por esta razón, el vector pUC-MinusMCS-GnGc se linealizó corriente abajo del ADN molde, por medio de una digestión con la enzima de restricción BspQI, durante 14 h a 37 °C. A continuación, el producto linealizado fue purificado con el kit *E.Z.N.A. Cycle Pure* (Omega Bio-Tek, Estados Unidos) y cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm. Después, se montó la reacción de transcripción utilizando el kit comercial *HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit* (New England Biolabs, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante. Este kit contenía la ARN polimerasa T7 con su respectivo tampón y los cuatro nucleósidos trifosfato (NTPs: adenosina, citidina, guanosina y uridina) requeridos para la síntesis de ARN. A estos componentes se añadió el vector linealizado, y se incubó a 37 °C por dos h en un termociclador *Biometra TProfessional* (Analytik Jena GmbH, Alemania). El ARN sintetizado se diluyó en agua libre de RNasas, se trató con DNasa I durante 15 min a 37 °C para eliminar el ADN molde, y se precipitó con cloruro de litio 7.5 M. El *pellet* de ARN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua libre de RNasas. La identidad e integridad de la molécula se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, a 100 V por 30 min en una cámara Mini ReadySub-Cell GT (Bio-Rad, Estados Unidos). La concentración de ARN producido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos).

Adición de la caperuza en el extremo 5' del ARN mensajero.

Después de la transcripción, el ARN purificado se sometió a una reacción de *capping* para obtener el ARNm maduro con una caperuza 5' de tipo Cap-1 (McKenzie et al., 2023). En este procedimiento se empleó el kit *Vaccinia Capping System* (New England Biolabs, Estados Unidos) junto con la enzima cap 2'-O-metiltransferasa (New England

Biolabs, Estados Unidos), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El ARN, previamente calentado a 65 °C por 5 min para eliminar las estructuras secundarias, se mezcló con los otros componentes de la reacción: enzima de *capping* del virus vaccinia con su respectivo tampón, cap 2'-O-metiltransferasa, guanosina trifosfato, y S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. La reacción se incubó por una hora a 37 °C en un termociclador *Biometra TProfessional* (Analytik Jena GmbH, Alemania). Después, el ARNm con caperuza 5' se precipitó con cloruro de litio 7.5 M, se lavó con etanol al 70 %, y se resuspendió en agua libre de RNasas. La identidad e integridad del producto se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, a 100 V por 30 min. La concentración de ARN producido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos).

Evaluación de la integridad del ARN mensajero bajo estrés térmico agudo.

El ARNm producido se sometió a estrés térmico para evaluar su integridad temporal (Chheda et al., 2024). Se prepararon alícuotas del ARNm en microtubos estériles y se incubaron a 37 °C durante 0,30, y 60 min. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, a 100 V por 30 min en una cámara Mini ReadySub-Cell GT (Bio-Rad, Estados Unidos). Se identificó la integridad y/o la degradación de cada tratamiento mediante la observación de las bandas.

Determinación de la funcionalidad del ARN mensajero.

La actividad biológica del ARNm se determinó mediante la verificación de la correcta expresión de las glicoproteínas Gn/Gc en células de mamífero transfectadas con el ácido nucleico, mediante un análisis de *Western blot* (Deo et al., 2023). Se sembraron células HEK-293A en placas de 12 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos) a una concentración de 10⁵ células/mL, en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, y penicilina/estreptomicina 1 X, y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70 %. Después, se descartó el medio, las células se lavaron una vez con PBS, se añadió medio fresco suplementado con 10 % de SFB, y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. En paralelo, el ARNm se mezcló con el reactivo de transfección *Lipofectamine™ MessengerMAX™* (Thermo Fisher

Scientific, Estados Unidos), según el protocolo de la casa comercial. En concreto, para cada pocillo se utilizó la dilución más baja recomendada del reactivo (1.5 μ L en medio Opti-MEM™), junto con diferentes cantidades (0.5, 1 y 2 μ g) del ARNm diluido en medio Opti-MEM™. El complejo de transfección se añadió por goteo a las células, que posteriormente se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Como control de transfección se empleó el ARNm comercial que expresaba eGFP (GenScript, Estados Unidos), y como control negativo se utilizaron células sin tratamiento. La expresión del reportero se verificó pasadas las 24 h, observando las células en un microscopio FLoid™ Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). A continuación, se descartó el medio, las células se lavaron una vez con PBS, y se recuperó el contenido proteico celular total con tampón RIPA.

Las proteínas totales de las células tratadas con el ARNm, del control de transfección, y del control negativo se separaron por su tamaño mediante SDS-PAGE al 10 %. Se utilizó como control positivo la muestra de proteínas totales obtenida en la evaluación de expresión del ADN molde. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó por 12 h a 4 °C con leche descremada al 5 % en TBS, se incubó por 6 h a 4 °C con anticuerpo primario anti-Gc, y posteriormente por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 diluido 1:5000 (Jackson ImmunoResearch, Estados Unidos). La membrana se escaneó en el sistema de imagen Odyssey CLx (LICORbio, Estados Unidos) y se verificó la presencia del antígeno a la altura correspondiente.

Modificación del ARN mensajero con N1-metilpseudouridina.

Una vez comprobada la funcionalidad del ARNm sin modificar, se procedió a reemplazar el nucleótido de uridina convencional (UTP) por el nucleótido modificado N1-metilpseudouridina (N1- Ψ TP), en función de incrementar la estabilidad y capacidad de traducción del ARNm (Monroe et al., 2024). La modificación se realizó reemplazando la UTP convencional por N1-metilpseudouridina trifosfato (N1-m Ψ , MedChemExpress, Estados Unidos) en la reacción de transcripción *in vitro*. El NTP modificado se utilizó a la misma concentración del NTP sustituido, mientras que los demás parámetros se mantuvieron iguales. La mezcla se incubó a 37 °C durante dos h en un termociclador

Biometra TProfessional (Analytik Jena GmbH, Alemania). Posteriormente, el producto de la reacción se diluyó en agua libre de RNasas, se trató con DNasa I durante una 15 min a 37 °C para eliminar el ADN molde, y se precipitó con cloruro de litio 7.5 M. El *pellet* de ARN se lavó con etanol al 70 %, se resuspendió en agua libre de RNasas, se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm, y su identidad e integridad se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 V por 30 min).

La incorporación de la caperuza 5' al ARN modificado se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado para el ARN no modificado. Después de incubar durante una hora a 37 °C, el ARNm modificado con caperuza 5' se precipitó con cloruro de litio 7.5 M, se lavó con etanol al 70 %, se resuspendió en agua libre de RNasas, y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. A continuación, muestras del ARNm modificado fueron sometidas a estrés térmico, a 37 °C por 30 y 60 min, para posteriormente identificar la estabilidad de la molécula mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (100 V, 30 min).

La funcionalidad del ARNm modificado también se determinó según su capacidad de expresión de los antígenos Gn/Gc en células de mamífero. Para este ensayo se sembraron células HEK-293A en una placa de 12 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos) a una concentración de 10^5 células/mL, y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 70 %. En este punto, se refrescó el medio y se prepararon los complejos de transfección para cada pocillo, mezclando 500 ng de ARNm con el reactivo *Lipofectamine™ MessengerMAX™* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), ambos diluidos en medio Opti-MEM™. Se usó como control positivo el ARNm sin modificar, como control de transfección el ARNm comercial que expresaba eGFP (GenScript, Estados Unidos), y como control negativo a células sin tratamiento. Los complejos se añadieron por goteo a los pocillos respectivos, y las células se incubaron por 24 h a 37 °C, 5 % CO₂. Se verificó la expresión del reportero, y a continuación se recuperó el contenido proteico celular con el tampón RIPA. Las proteínas totales de cada tratamiento se separaron por tamaño mediante SDS-PAGE al 10 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y la membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % en TBS durante 12 h a 4 °C. Se incubó por 6 h a 4 °C con anticuerpo primario anti-Gc, y posteriormente por una hora con el anticuerpo

secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 (dilución 1:5000). Finalmente, se comprobó la presencia del antígeno en los tratamientos respectivos escaneando la membrana en el sistema de imagen Odyssey CLx (LICORbio, Estados Unidos).

4.2.1.3. Encapsulación del ARN mensajero en nanopartículas lipídicas.

El ARNm funcional fue encapsulado en LNPs mediante el método de nanoprecipitación (Ahl, 2025). Se utilizó una mezcla de cuatro lípidos en la formulación de las partículas: SM-102 (Cayman Chemical, Estados Unidos), colesterol (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos), 1,2-distearoil-rac-glicero-3-fosfocolina (DSPC, Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) y 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli-etilenglicol-2000 (DMG-PEG 2000, MedChemExpress, Estados Unidos) como lípidos ionizable, estructural, auxiliador y PEGilado, respectivamente. Primero se prepararon soluciones stock de cada lípido a una concentración de 10 mg/mL en etanol, y después se mezclaron los cuatro componentes según las proporciones molares indicadas en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes lipídicos de las nanopartículas lipídicas.

Nombre	Tipo	Proporción molar	Peso molecular (g/mol)
SM-102	Ionizable	50.0	710.2
Colesterol	Estructural	38.5	386.7
DSPC	Auxiliador	10.0	790.1
DMG-PEG 2000	PEGilado	1.5	2509.2

Fuente: elaboración propia.

A continuación, el ARNm se equilibró a temperatura ambiente, y se diluyó con acetato de sodio 100 mM pH 5.2. Los volúmenes de la mezcla de lípidos (solución orgánica) y del ARNm (solución acuosa) se ajustaron según los siguientes criterios: relación nitrógeno/fosfato (N/P) de 6, y relación volumétrica acuosa/orgánica de 3. Una vez preparadas las soluciones, se efectuó el método de nanoprecipitación mediante mezcla manual (Echelon Biosciences Inc., 2023). La solución orgánica se añadió a la solución acuosa, se mezcló rápidamente con una micropipeta durante 20 segundos, y la suspensión resultante se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Las LNPs fueron transferidas a un concentrador Amicon Ultra-15 30 000 MWCO (Merck, Alemania) con DPBS, para después concentrar hasta el volumen inicial de la

suspensión, realizando tres ciclos de centrifugación a 1 500 x g, 20 min, 4 °C. Las LNPs que encapsulaban ARNm (LNPs-ARNm) se almacenaron a 4 °C en microtubos libres de RNAsas.

También se formularon LNPs vacías, mezclando la solución orgánica con acetato de sodio 100 mM pH 5.2, a una relación volumétrica acuosa/orgánica de 3. Estas partículas se almacenaron en microtubos libres de RNAsas a 4 °C.

4.2.2. Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

4.2.2.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.

Determinación de la distribución de tamaño y carga superficial mediante dispersión dinámica y electroforética de luz.

La distribución de tamaño y PDI se determinaron por DLS, y la carga superficial se cuantificó de forma indirecta como el potencial zeta, mediante ELS. Ambos métodos se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Reino Unido), provisto con un láser de He-Ne 633 nm (Ma et al., 2025). Las nanopartículas se diluyeron 1/50 en DPBS, y las dispersiones se transfirieron a cubetas de poliestireno desechable DTS0012 (Malvern Panalytical, Reino Unido) para la estimación de tamaño, y a cubetas DTS1060C (Malvern Panalytical, Reino Unido) para el cálculo del potencial zeta. Las mediciones de cada característica se efectuaron por triplicado en el *software Zetasizer Nano* (Malvern Panalytical, Reino Unido), bajo los siguientes parámetros: índice de refracción del dispersante = 1.330, viscosidad del dispersante = 0.8872 cP, índice de refracción del material = 1.45, constante dieléctrica del dispersante = 78.5, y tiempo de equilibrio = 120 s.

Identificación de la morfología a través de microscopía electrónica de transmisión.

La morfología de las LNPs-ARNm fue evaluada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), que permite la visualización directa de estructuras a escala nanométrica con alta resolución (W. Liu et al., 2025). Para ello, se utilizaron rejillas de cobre de 300 mallas cubiertas con una película continua de carbono. Se colocó una alícuota de una dilución 1/50 de LNPs-ARNm sobre la rejilla y se dejó secar por 15 min a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo, se aplicó un contraste negativo con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2 % pH 7.0. Se depositó sobre la muestra una gota de PTA, se dejó secar por 60 segundos y después se retiró el exceso. Las rejillas se secaron por completo antes del análisis. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución JEOL/JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Japón), operado a un voltaje de aceleración de 200 kV. Las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital acoplada al sistema y se procesaron para su documentación y análisis.

Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARN mensajero.

La eficiencia de encapsulación del ARNm en las LNPs se determinó con el ensayo de fluorescencia *Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Este método indirecto permitió cuantificar, mediante el colorante fluorescente RiboGreen®, la concentración de ARNm no encapsulado y ARNm total, y a partir de estos datos se calculó la concentración de ARNm encapsulado y la eficiencia de encapsulación (Schultz et al., 2024). La concentración del ARNm no encapsulado se precisó desde una muestra de LNPs-ARNm diluida en tampón Tris-EDTA (TE) pH 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), mientras que la concentración de ARNm total se valoró con una muestra de LNPs-ARNm tratada con tampón surfactante (TE + Tritón X-100 al 1 % (Sigma, Estados Unidos)), para romper las LNPs y liberar el ARNm encapsulado. La curva de calibración del ensayo se estableció con diluciones en tampón surfactante del ARNm eGFP comercial (GenScript, Estados Unidos), a las siguientes concentraciones: 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, y 0 ng/mL. Posteriormente, se reconstituyó el colorante precargado en los pocillos, y se añadieron las muestras y los puntos de la curva de

calibración. La placa se incubó durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente, y la fluorescencia se midió en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos), a una longitud de onda de excitación de 485 nm, y una longitud de onda de emisión de 528 nm.

Se realizó una regresión lineal con los valores de la curva de calibración, y se cuantificaron las concentraciones de ARNm de los pocillos con la ecuación de aproximación obtenida. La concentración de cada muestra se corrigió considerando el factor de dilución respectivo, de acuerdo con la ecuación 1.

$$\text{Concentración de la muestra} = \text{Concentración del pocillo} * FD \quad (1),$$

donde FD correspondió al factor de dilución total aplicado a la muestra antes de la lectura, cuyo valor fue de 250, en función de los volúmenes de muestra y de tampón empleados. A continuación, se calculó la concentración de ARNm encapsulado con la ecuación 2

$$ARNm \text{ encapsulado} = ARNm \text{ total} - ARNm \text{ no encapsulado} \quad (2),$$

y la eficiencia de encapsulación con la ecuación 3

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \left(\frac{ARNm \text{ total} - ARNm \text{ no encapsulado}}{ARNm \text{ total}} \right) * 100 \quad (3).$$

4.2.2.2. Caracterización biológica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.

Estimación del perfil de seguridad *in vitro* de la formulación vacunal.

El efecto de las LNPs-ARNm sobre la viabilidad celular se evaluó por medio del ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Duran et al., 2025), en dos líneas celulares (HeLa y HFF) incubadas a diferentes concentraciones de ARNm. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos) a una concentración de 2.5×10^4 células/mL, en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, y penicilina/ estreptomicina 1 X, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ por 24 h. Posteriormente, se dispersaron las LNPs-ARNm en DMEM con 2 % de SFB a las siguientes concentraciones de ARNm encapsulado: 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL. También se prepararon diluciones de ARNm libre a las mismas concentraciones, y

suspensiones de LNPs vacías a las concentraciones equivalentes de LNPs-ARNm según el número de partículas. La concentración más alta fue 10 veces mayor a la usada en el ensayo de transfección. Se utilizó como control positivo a células sin tratamiento en medio fresco, y como control negativo a células tratadas con peróxido de hidrogeno al 10 %. Se colocaron los tratamientos por triplicado en los pocillos correspondientes y se incubó la placa durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Una vez finalizado este tiempo, a cada pocillo se agregó medio con 2 % SFB y MTT 0.5 mg/mL, y se incubó a 37 °C durante tres h. Después, el medio se reemplazó con isopropanol, se incubó por 15 min a 37 °C para disolver los cristales de formazán, y se midió la absorbancia a 560 nm en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos). Los datos se analizaron y graficaron en el software *Prism v9.0* (GraphPad, Estados Unidos).

Evaluación de la actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

El ensayo de expresión relativa para los prototipos de vacuna de ARNm se basa en la medición de la expresión del antígeno proteico en células eucariotas tras su transfección con la formulación (Sanyal, 2022). Para ello, se sembraron células HEK-293A en placas de 12 pocillos a una concentración de 10⁵ células por pocillo y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70 %. Pasado este tiempo, se lavaron las células una vez con PBS, se añadió medio fresco suplementado con 10 % de SFB, y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂. A continuación, una suspensión de LNPs-ARNm que contenía 500 ng de ARNm encapsulado se diluyó en medio Opti-MEM™ y se colocó por goteo directamente en los pocillos correspondientes. Se definió como estándar de referencia interno al ARNm transfectado con *Lipofectamine™ MessengerMAX™ Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (Ly et al., 2022). Además, se empleó el ARNm eGFP comercial (GenScript, Estados Unidos) como control de transfección, y el control negativo correspondió a células sin tratamiento. La placa se incubó durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO₂, y se verificó la expresión del reportero. A continuación, se descartó el medio y se recuperó el contenido proteico celular total con tampón RIPA. Las proteínas

celulares de cada tratamiento se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE al 10 %.

Tras la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, que fue bloqueada con leche descremada al 5 % en tampón TBS durante 12 h a 4 °C. La membrana se tiñó con solución de Rojo Ponceau al 1 % durante 5 min, se escaneó en el sistema de imagen Odyssey CLx (LICORbio, Estados Unidos) y se lavó con agua destilada hasta retirar todo el colorante. Después, se incubó con el anticuerpo primario anti-Gc durante 12 h a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 a una dilución 1:5000 (Jackson ImmunoResearch, Estados Unidos) durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se reveló en el sistema Odyssey CLx (LICORbio, Estados Unidos), y se recuperaron las imágenes para analizarlas por densitometría. Utilizando el *software* ImageJ v1.54, se calculó la fracción de antígeno detectado respecto al valor de la intensidad total de proteínas en cada muestra, y se determinó la razón de expresión relativa con la ecuación 4

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Fracción de antígeno en LNPs-ARNm}}{\text{Fracción de antígeno en el estándar de referencia interno}} \quad (4).$$

4.2.2.3. Análisis estadístico.

Caracterización fisicoquímica de las LNPs.

Los datos obtenidos de la estimación del tamaño de partícula (nm), PDI y potencial zeta de las formulaciones se expresaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar (SD). Las concentraciones de ARNm total, no encapsulado y encapsulado, así como la eficiencia de encapsulación, también se representaron según la media aritmética $\pm$ SD de los valores cuantificados. Todas las variables fueron procesadas con el *software Prism v9.0* (GraphPad, Estados Unidos).

Evaluación de la seguridad y actividad relativa de la expresión *in vitro* de las LNPs.

En el ensayo de viabilidad celular, primero se normalizaron los datos definiendo como control de viabilidad (100 %) a las células sin tratamiento, y como control de muerte a las células tratadas con H₂O₂ (0 %). A continuación, se comprobó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Después, se aplicó un ANOVA de

una vía de muestras independientes y se ejecutó el procedimiento de comparación múltiple de Dunnett para identificar diferencias significativas en las concentraciones comparadas contra el control, y la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos en cada concentración. El nivel de significación fijado fue de 0.05.

Para la evaluación de la expresión relativa, en primer lugar, se verificó que los datos se ajustaran a una distribución normal por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se examinaron las diferencias entre los lotes de la formulación comparadas contra el estándar de referencia interno con un ANOVA de una vía para muestras independientes, seguido de una prueba de Dunnett. Se empleó un nivel de significación de 0.05.

Todas las variables fueron procesadas con el software *Prism v9.0* (GraphPad, Estados Unidos).

4.2.3. Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio.

El estudio de determinación de la respuesta inmune estimulada por la formulación LNPs-ARNm se realizó según la guía de la OMS para la evaluación de vacunas de ARN mensajero contra enfermedades infecciosas (Organización Mundial de la Salud, 2022). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, mediante el informe del 30 de abril de 2025, presentado en el Anexo 1.

4.2.3.1. Diseño y ejecución del experimento en el modelo animal de hámster sirio.

El experimento se realizó en el modelo animal de hámster sirio. Se utilizaron 24 animales distribuidos en seis grupos experimentales (Figura 8), con cuatro animales por grupo ($n = 4$), tomando como referencia el tamaño muestral empleado en estudios de evaluación inicial de la inmunogenicidad publicados en la literatura y considerando el principio de reducción de las 3R en el uso de animales de experimentación (Aceil et

al., 2022; Ko y Lim, 2021; Tscherne et al., 2021). Las formulaciones se administraron por vía intramuscular los días 0 y 14, se realizó una recolección de sangre semanal hasta el día 35. En este punto, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital (vía intraperitoneal) más dislocación cervical, y se extrajeron sus bazo para los análisis posteriores. Los grupos incluyeron controles negativos (sin tratamiento, placebo y vehículo), dos dosis de LNPs-ARNm (10 y 20 µg de ARNm encapsulado) y un control positivo correspondiente a 20 µg de Gn/Gc recombinante (rGnGc) combinado en una proporción 70:30 con Alhydrogel® (Croda Pharma, Dinamarca) como adyuvante. Las proteínas antigénicas rGnGc, donadas por el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción (Starck-Mendez, 2020), se expresaron en el sistema *P. pastoris*, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.

Durante el experimento, el peso corporal se registró semanalmente y la temperatura se midió a diario, como indicadores fisiológicos para identificar posibles efectos de los tratamientos y obtener una primera aproximación a la tolerabilidad inicial del prototipo (Zhugunissov et al., 2021).

El estado general de los animales también se supervisó a diario, con especial atención después de las inmunizaciones y las extracciones sanguíneas. La evaluación incluyó apariencia, consumo de alimento y agua, consistencia de las heces, comportamiento espontáneo y respuesta frente a estímulos. De acuerdo con el protocolo de supervisión, una puntuación total ≥ 13 se consideró criterio de retiro del estudio y eutanasia humanitaria. Ningún animal alcanzó este criterio durante el experimento.

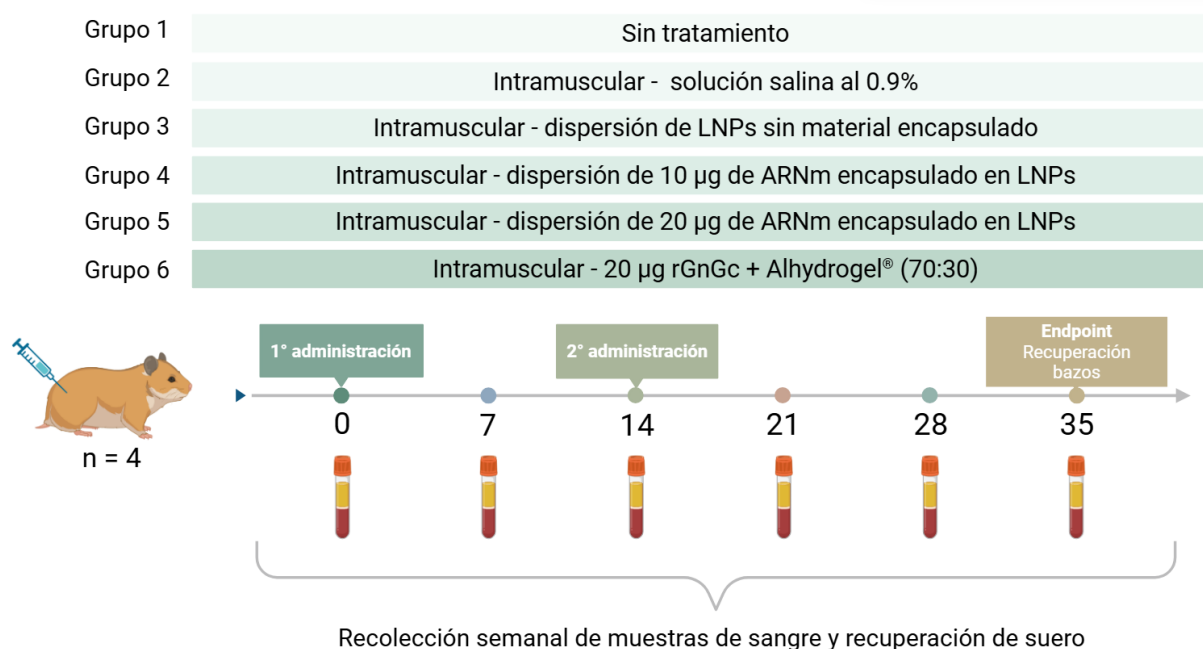


Figura 8. Esquema del régimen de inmunización y grupos experimentales en hámster sirio. Representación cronológica del ensayo experimental ($n = 4$ animales por grupo), especificando los intervalos de dosificación y los puntos temporales para la recolección de muestras biológicas destinadas al análisis de la respuesta inmune humoral y celular. *Fuente: elaboración propia mediante Biorender.com.*

4.2.3.2. Caracterización de la respuesta humoral estimulada por la formulación vacunal.

Obtención de muestras de plasma sanguíneo.

La toma de muestras sanguíneas se realizó una vez por semana mediante punción retroorbital en los animales anestesiados por vía intraperitoneal con ketamina 100 mg/kg y xilacina 5 mg/kg (Braun et al., 2023; Xue et al., 2022). Para evitar la coincidencia entre la recolección sanguínea y las inmunizaciones, las muestras fueron obtenidas un día antes de cada punto semanal nominal del esquema experimental. Se recolectaron 300-500 µL de sangre por animal empleando capilares heparinizados y microtubos estériles. La sangre recolectada se centrifugó a 3000 rpm por 15 min en una centrífuga MIKRO 220R (Andreas Hettich GmbH, Alemania). El plasma separado se transfirió a microtubos estériles y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Evaluación del curso temporal de la producción de anticuerpos anti-Gn/Gc.

La evolución temporal de los niveles de anticuerpos IgG anti-Gn/Gc en plasma sanguíneo se evaluó mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) indirecto (Luo et al., 2022). Placas de 96 pocillos *High binding* (Corning, Estados Unidos) se recubrieron con las glicoproteínas Gn/Gc recombinantes, diluidas en tampón de recubrimiento a una concentración de 10 µg/mL, y se incubó durante 12 h a 4 °C. Pasado este tiempo, la placa se lavó tres veces con solución de lavado, y se trató con solución de bloqueo durante 1 h a 37 °C (100 µL/pocillo). Posteriormente, se realizaron tres lavados, se prepararon diluciones 1:10 en solución de dilución de los sueros de cada animal en los diferentes tiempos, y se incubó durante 2 h a 37 °C. Después, se lavó tres veces, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de hámster sirio conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Rockland Immunochemicals, Estados Unidos) a una dilución de 1:5000, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después, se realizaron cuatro lavados, se agregó el sustrato *1-Step™ Ultra TMB* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. Finalmente, se registró la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos). Debido al ajuste realizado en el calendario de recolección sanguínea, los resultados de la cinética humoral se presentaron según el calendario nominal de seguimiento: días 0, 7, 14, 21, 28 y 35.

Determinación del título de anticuerpos totales.

El título de anticuerpos totales anti Gn/Gc se calculó para los días nominales 21 y 35, mediante un ELISA indirecto con las diferentes muestras de los animales inmunizados. El título se definió como el recíproco de la última dilución cuya absorbancia fue mayor que el doble del fondo (Chen et al., 2022). Se consideró como fondo a la absorbancia producida por el plasma del control negativo (Grupo placebo), a la dilución correspondiente.

Placas de 96 pocillos *High binding* (Corning, Estados Unidos) se recubrieron con las glicoproteínas Gn/Gc recombinantes, diluidas en tampón de recubrimiento a una concentración de 10 µg/mL, y se incubó durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con solución de lavado, y se bloqueó por 1 h a 37 °C (100 µL/pocillo).

Durante esta incubación se prepararon diluciones seriadas en base 2 de cada muestra de los grupos 2, 4, 5 y 6, a los días correspondientes, partiendo de una dilución 1:10. Después, se realizaron tres lavados, se añadieron las diluciones, y se incubó durante 2 h a 37 °C. A continuación, la placa se lavó tres veces, se agregó una dilución de 1:5000 del anticuerpo secundario anti-IgG de hámster sirio conjugado a HRP (Rockland Immunochemicals, Estados Unidos), y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después, se realizaron cuatro lavados, se agregó el sustrato *1-Step™ Ultra TMB* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. Finalmente, se registró la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos).

Producción del vector lentiviral empleado en el ensayo de neutralización.

Los vectores lentivirales pseudotipados con los antígenos Gn/Gc fueron producidos con el kit comercial *ViraPower™ Lentiviral Expression System* (Invitrogen, Estados Unidos) según las instrucciones descritas en el manual del fabricante. Los vectores pLP1, pLP2, pENTRY-GPC y pLP/VSVG se amplificaron en bacterias *E. coli* TOP10 a 37 °C, mientras que el vector pLGW se produjo en bacterias *E. coli* Stbl3 a 30 °C.

Se sembraron 10 placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro con células HEK293-FT, a una concentración de 2×10^6 células/mL, en DMEM suplementado con 10 % (v/v) de SFB. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 70 %. En ese punto, se cambió el medio de cultivo por DMEM sin SFB y se incubó por cuatro h a 37 °C, 5 % CO₂. A continuación, se realizó la transfección para la generación de los vectores en cinco placas con los siguientes plásmidos: pLP1, pLP2, pLGW y pENTRY-GPC; utilizando el método de PEI previamente descrito. Las cinco placas restantes se utilizaron para la producción de vectores lentivirales control, pseudotipados con la proteína G del virus de estomatitis vesicular, transfectando los mismos plásmidos excepto pENTRY-GPC, que fue reemplazado con el plásmido pLP/VSVG. Para cada placa se utilizaron 6 µg de pLP1 y pLP2, 12 µg de pLGW y 6 µg de pENTRY-GPC o pLP/VSVG, según corresponda. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 6 h, y después se reemplazó el medio de cultivo sin SFB por DMEM

+ SFB 10 %. Se incubó durante 48 h a 37 °C, 5 % CO₂, y posteriormente se colectó el sobrenadante de cultivo que contenía los vectores lentivirales.

La siguiente etapa de la producción fue la concentración de los vectores lentivirales (Keyer et al., 2024). El medio de cultivo recolectado se centrifugó a 3.000 rpm por 20 min para precipitar restos celulares. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de polifluoruro de vinilideno con tamaño de poro de 0,45 µm. Este filtrado fue centrifugado a 100 000 x g durante 90 min en una ultracentrífuga *Sorvall Ultra WX 80* (Thermo Fisher Scientific, E.E.U.U.). Finalmente, el sobrenadante de la ultracentrifugación fue cuidadosamente aspirado y eliminado. El precipitado conteniendo los vectores lentivirales fue resuspendido en 300 µL de DMEM, incubándolo a 4 °C durante 16 h. Finalmente, los vectores lentivirales pseudotipados fueron titulados en células HEK293-iβ3, definiendo una partícula viral o unidad formadora de color (UFC) a cada célula fluorescente. Se consideró tanto el número de células como las diluciones y el volumen inicial para expresar el título viral en UFC/mL. Se utilizó como control negativo células no infectadas. Los vectores lentivirales se almacenaron en alícuotas de 2.5×10^4 UFC/mL, a -80 °C hasta su uso.

Cuantificación del título de anticuerpos neutralizantes.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN) en los días nominales 21 y 35 fueron determinados mediante un ensayo de neutralización de pseudovirus (S. Wang et al., 2022), empleando el vector lentiviral pseudotipado con las proteínas Gn/Gc del virus Andes. Para ello, las muestras de plasma fueron inactivadas a 56 °C por 25 min, y posteriormente se prepararon diluciones seriadas en base 2, por triplicado. Cada dilución se mezcló con 10^2 partículas infectivas del vector lentiviral, y se incubó a 37 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, se adicionaron a un cultivo de células HEK293-iβ3 sembradas 24 h antes, en una placa de 96 pocillos a una densidad de 2.5×10^5 células/mL. La placa fue incubada a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 h. Después de este período, la placa fue observada en un microscopio FLoid™ Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), y se cuantificó el número de células fluorescentes. El título de anticuerpos neutralizantes fue definido como la última dilución

de plasma que neutralizó las 10^2 partículas infectivas del vector lentiviral pseudotipado con Gn/Gc.

4.2.3.3. Caracterización de la respuesta celular estimulada por la formulación vacunal.

Extracción de esplenocitos desde los bazos recuperados.

Los bazos de los animales fueron inmediatamente colocados en placas de 6 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos) con RPMI + 10 % (v/v) SFB. A continuación, se disgregaron en un filtro celular de 70 μm (Falcon®, Corning, Estados Unidos) con un émbolo de jeringa de 10 mL (Nipro, Bélgica), y el filtrado se depositó en placas de 6 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos) con medio RPMI + 10 % (v/v) SFB. Las células disgregadas se centrifugaron a 2000 rpm por 2 min en una microcentrífuga D2012 Plus (DLAB Scientific, China), se eliminó el sobrenadante, las células se resuspendieron en tampón de lisis de eritrocitos, y se incubó por 5 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. Esta suspensión se centrifugó a 2000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante, y el *pellet* celular se resuspendió en medio RPMI + 10 % (v/v) SFB.

Evaluación de la expresión de citocinas en los esplenocitos de los animales inmunizados.

Los esplenocitos obtenidos de cada animal se dividieron y sembraron en dos pocillos en placas de 24 pocillos (Costar®, Corning, Estados Unidos), a una concentración de 2×10^6 células/mL. Uno de los pocillo fue estimulado por 24 h con las glicoproteínas Gn/Gc recombinantes a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el otro pocillo no recibió estimulación. Pasadas la 24 h, las células fueron recuperadas y resuspendidas en el reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), para después extraer el ARN celular según las indicaciones del fabricante. El ARN de las muestras de cada animal se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75 % y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La concentración y pureza de las muestras de ARN se cuantificaron por espectrofotometría en el equipo *Synergy HTX Multi-Mode Reader* (BioTek, Estados Unidos).

Posteriormente, el ARN purificado fue empleado para evaluar la expresión relativa de citocinas involucradas en la diferenciación de linfocitos T auxiliares (Th), por medio de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) de dos pasos (da Costa et al., 2023). Primero se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN con el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Después, el ADNc se cuantificó por espectrofotometría y se utilizó en la amplificación, que se llevó a cabo con el kit *KAPA SYBR® FAST* (Merck, Alemania). Fueron empleados oligonucleótidos específicos para los genes IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-12 (Tabla 6), y como normalizador se usó la proteína ribosomal L18 (Rib18). Las reacciones se realizaron en un equipo *AriaMx 96 Real-Time PCR System* (Agilent Technologies, Estados Unidos). Las diferencias relativas entre los niveles de ARN de cada citocina en los esplenocitos estimulados, con respecto a los no estimulados, fueron determinadas con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Q. Liu et al., 2025).

Tabla 6. Partidores empleados en la evaluación de expresión de citocinas en esplenocitos de hámster sirio.

Gen	Nombre	Secuencia	Cadena
IFN-	IFNg-F	CATCAAGGCAGACCTGTTTGCTAAC	Forward
	IFNg-R	CGCTGAACCTGAAGGTCATTTACC	Reverse
IL-4	IL4-F	ACCCTGTGCTTGAAGAACAATTCCAG	Forward
	IL4-R	TGGACTCATTACATTGCAGCTCTTC	Reverse
IL-6	IL6-F	CAAAGCCAGAGTCATTGAGAGCAC	Forward
	IL6-R	CAGGATGGCCTTGAGGTTGG	Reverse
IL-12	IL12-F	CTGGACGAGCCCATGCTGAC	Forward
	IL12-R	GTAGGGATCCGCTTCTGCCAG	Reverse
Proteína ribosomal L18	Rib18-F	TGACGTGAGGATTCTCGAAGTGC	Forward
	Rib18-R	CTGGTCAAAGGTGAGGATCTTGC	Reverse

Fuente: elaboración propia.

4.2.3.4. Análisis Estadístico.

Evaluación de las variables peso y temperatura de los animales durante el experimento.

Los pesos absolutos iniciales y finales de cada animal por grupo se compararon mediante una prueba t de *Student* para datos pareados, previa comprobación de normalidad con Shapiro-Wilk, con el fin de verificar diferencias significativas entre el

inicio y el final del experimento. Posteriormente, se calculó el peso relativo al basal de cada animal utilizando la ecuación 5.

$$\text{Peso relativo al basal (\%)} = \frac{P_t}{P_0} * 100 \quad (5),$$

donde P_t corresponde al peso corporal en la medición correspondiente y P_0 al peso corporal basal del mismo animal. Los porcentajes de cambio fueron comparados entre grupos mediante ANOVA de una vía para cada punto temporal, seguido de la prueba post hoc de Tukey en los casos en que se cumplió el supuesto de homocedasticidad, o de Dunnett T3 ante el incumplimiento de dicho supuesto. Este análisis permitió determinar posibles diferencias entre grupos durante el ensayo.

En el caso de la temperatura corporal, se examinó la presencia de fluctuaciones entre el inicio y el final del estudio, así como en torno a las inmunizaciones. Primero se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para confirmar que los datos se ajustaban a una distribución normal, y después se establecieron las comparaciones por grupo entre los días 1 y 35, 1 y 2, y 14 y 15 mediante pruebas t de *Student*. Además, las diferencias entre grupos en esos puntos temporales se evaluaron con ANOVA de una vía y análisis *post hoc* de Tukey.

Las variables peso absoluto, peso relativo al basal y temperatura se presentaron como la media $\pm$ SD, y se analizaron en el *software* Prism v9.0 (GraphPad Software, Estados Unidos), con un nivel de significación de 0.05.

Caracterización de la respuesta humoral estimulada por el prototipo vacunal.

Los datos correspondientes a los distintos puntos temporales de la cinética de anticuerpos se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se representaron como media aritmética $\pm$ SD. Los efectos del grupo y el tiempo se analizaron de forma exploratoria mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett para comparar cada grupo experimental frente al control PBS.

Los títulos de anticuerpos totales y neutralizantes se expresaron como títulos medios geométricos (GMT) $\pm$ intervalo de confianza (IC) del 95 %. Tras su transformación a logaritmo en base 2 ($\log_2$), la normalidad se examinó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y las diferencias se analizaron mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas,

considerando como factores el grupo experimental y el tiempo. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para contrastar los grupos en cada punto temporal y los cambios a través del tiempo dentro de cada grupo. En todos los análisis se consideró un valor de significación de $p < 0.05$.

Los análisis estadísticos se realizaron en el *software* Prism v9.0 (GraphPad Software, Estados Unidos).

Caracterización de la respuesta celular inducida por el prototipo vacunal.

Los datos de respuesta celular fueron expresados de forma relativa tras la normalización frente a Rib18 como gen de referencia. En los esplenocitos expuestos al antígeno, la expresión de citocinas fue calibrada utilizando la condición sin estimular como referencia basal interna, a la que se le asignó el valor de 1. La normalidad de estos datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y los resultados se graficaron como media aritmética $\pm$ SD. Los valores estimulados de cada grupo se compararon frente al valor basal teórico de 1 mediante prueba *t* de una muestra. Además, las respuestas de los grupos estimulados fueron analizadas mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett para comparar cada grupo experimental frente al grupo PBS estimulado, empleado como control negativo del procedimiento. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el *software* Prism v9.0 (GraphPad Software, Estados Unidos).

V. RESULTADOS

5.1. Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis *in vitro*.

5.1.1. Diseño y producción del vector plasmídico que contenía el ADN molde.

El desarrollo del prototipo vacunal inició con el diseño del molde de ADN para la transcripción *in vitro*. Esta construcción genética incorporó las secuencias reguladoras y codificantes necesarias para generar un transcrito funcional, capaz de ser traducido de forma eficiente en las proteínas antigénicas de interés. Para la adición de los elementos estructurales al ARN, se optó por una estrategia híbrida: una vía cotranscripcional para la cola de poli(A) y una postranscripcional para la adición de la caperuza 5'. Por consiguiente, el ADN molde diseñado contempló los siguientes componentes esenciales, ordenados en sentido 5' a 3':

- Promotor de la ARN polimerasa T7;
- 5'-UTR sintética, optimizada con un elemento rico en GC y con la secuencia extendida de Kozak para aumentar la eficiencia de traducción;
- ORF del antígeno, correspondiente a la secuencia codificante del precursor poliproteico GPC, obtenido del segmento M del virus Andes cepa Chile-9717869 (GenBank: AF291703.2), y optimizado para codones humanos;
- 3'-UTR derivada de la β -globina humana, para incrementar la estabilidad del ARNm;
- Secuencia de 100 residuos de adenina, para conformar la cola de poli(A) en la transcripción.

Además de los componentes descritos, se incluyeron sitios de reconocimiento de varias endonucleasas de restricción: BamHI en el extremo 5', MfeI entre la 3'-UTR y la secuencia de poliadenina, y BspQI en el extremo 3'. La representación gráfica del molde de ADN diseñado se muestra en la figura 9.



Figura 9. Representación gráfica de la estructura del molde de ADN.

El molde de ADN se diseñó con todos los dominios funcionales necesarios para producir el ARN mensajero maduro mediante transcripción *in vitro*. Las dimensiones de los componentes no representan la longitud de las secuencias. *Fuente: elaboración propia, creado en biorender.com.*

La síntesis *de novo* de la construcción, así como su clonación en un vector plasmídico para su amplificación, se encargaron a la empresa Blue Heron Biotech, LLC (Estados Unidos). Se seleccionó el vector pUC-MinusMCS con resistencia a ampicilina, y de la clonación resultó el vector denominado pUC-MinusMCS-GnGc, con una longitud de 6.9 kb (Figura 10A). La identidad del ADN plasmídico fue confirmada mediante secuenciación automatizada, realizada por la misma empresa (Figura 10B).

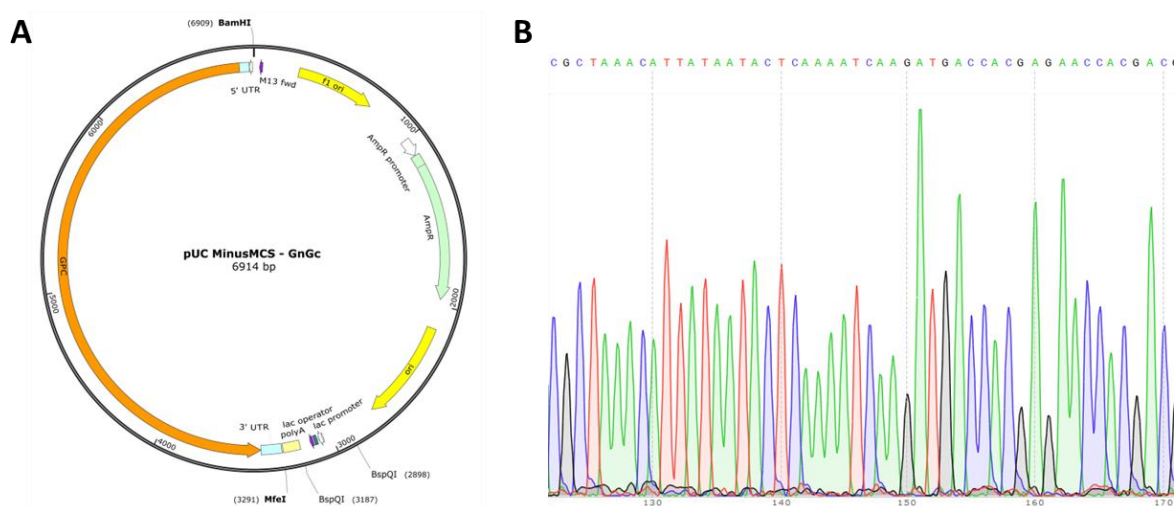


Figura 10. Clonación del ADN molde en el vector pUC-MinusMCS-GnGc.

A. Mapa del vector pUC-MinusMCS-GnGc, que contiene el molde de ADN para la síntesis de ARNm. Se indican los sitios de restricción que flanquean la construcción. **B.** Electroferograma de la secuenciación del vector, que confirmó su identidad. *Fuente: elaboración propia, visualización en Snapgene.*

El plásmido pUC-MinusMCS-GnGc recibido se utilizó para transformar bacterias *E. coli* TOP10 por choque térmico, que posteriormente se sembraron en agar LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 20 h. Se escogieron ocho colonias positivas, se sembraron en medio LB con ampicilina y se incubaron por 14 h a 37 °C. El ADN plasmídico de las ocho colonias fue recuperado por lisis química, purificado por

precipitación con isopropanol, y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se confirmó la presencia de ADN plasmídico aislado de las ocho colonias, al observar en cada muestra dos bandas que correspondieron a las conformaciones circular superenrollada (banda inferior) y circular relajada (banda superior) del plásmido (Figura 11). Se seleccionó la colonia 4 para la posterior amplificación y purificación a escala masiva del vector pUC-MinusMCS-GnGc.

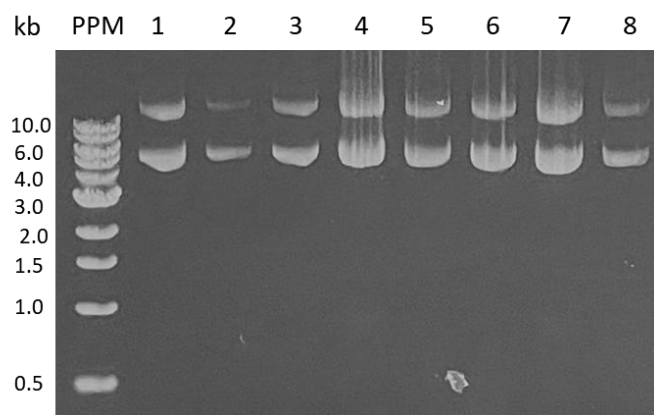


Figura 11. Identificación de ADN plasmídico obtenido a partir de clones positivos para pUC-MinusMCS-GnGc.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plasmídico purificado desde los clones transformados con el vector pUC-MinusMCS-GnGc. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1-8: Muestras de cada clon. *Fuente: elaboración propia.*

Previo a la producción masiva, se verificó que el perfil de restricción del plásmido transformado sea compatible con el constructo esperado mediante digestiones enzimáticas con las endonucleasas de restricción *SacI*, *EcoRV* y *KpnI*. Para ello, se prepararon varias reacciones, considerando que cada una debía resultar en un patrón de bandas particular en dependencia de los sitios de restricción y de la consecuente longitud de los fragmentos de ADN obtenidos. Se definieron las siguientes reacciones: *SacI* + *EcoRV*, *SacI* + *KpnI*, y *SacI* (plásmido linealizado).

La predicción de los patrones de restricción de cada reacción se realizó con el software *Snapgene* (Domatics, Estados Unidos) (Figura 12A). Estos mismos patrones fueron identificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 12B). El análisis confirmó que el clon 4 expresaba el vector pUCMinusMCS-Gn/Gc. Posteriormente, se produjo el plásmido a escala masiva, obteniéndose, a partir de un matraz con 250 mL de medio LB + ampicilina, una cantidad total de 570 µg de vector.

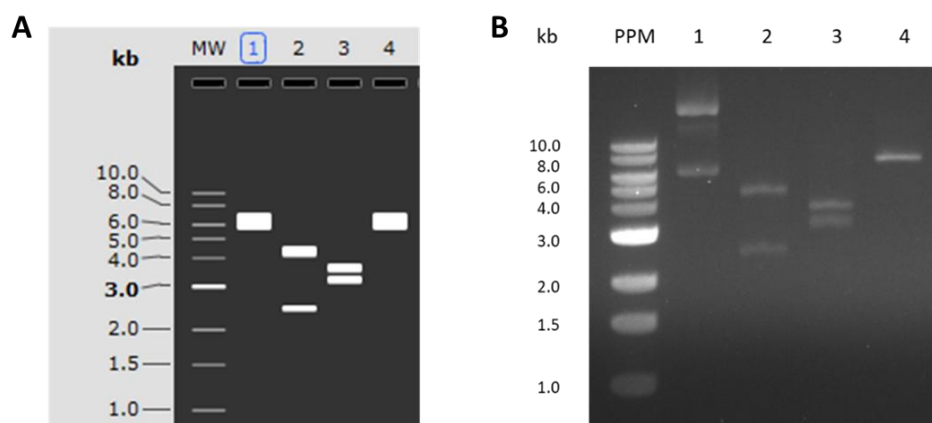


Figura 12. Análisis de restricción del vector pUC-MinusMCS-GnGc.

A. Predicción de los perfiles de restricción, realizada en el *software Snapgene*. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plasmídico purificado de los clones transformados con el vector pUC-MinusMCS-GnGc. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1: Vector sin digerir. 2: Reacción con *Sacl* + *EcoRV*. 3: Reacción con *Sacl* + *KpnI*. 4: Reacción con *Sacl* (vector linealizado). *Fuente: elaboración propia.*

5.1.2. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc en células de mamífero a partir del ADN molde.

Una vez obtenido el plásmido purificado, se verificó que la construcción codificara los antígenos Gn/Gc, antes de utilizarlo como molde de ADN en la transcripción *in vitro* de ARNm. El vector pUC-MinusMCS-GnGc poseía los elementos necesarios para su amplificación en bacterias, pero carecía de un promotor que impulsara la expresión de los antígenos Gn/Gc en células eucariotas, de modo que no se empleó en esta evaluación. En su lugar, la construcción fue clonada en un vector que tenga esta característica, además de un marcador de selección distinto al de pUC-MinusMCS-GnGc. La clonación se realizó en el vector pEGFP-N1, con resistencia a kanamicina como marcador de selección, insertando el molde de ADN (sin la secuencia de poliadenina) corriente abajo del promotor del citomegalovirus (figura 13).

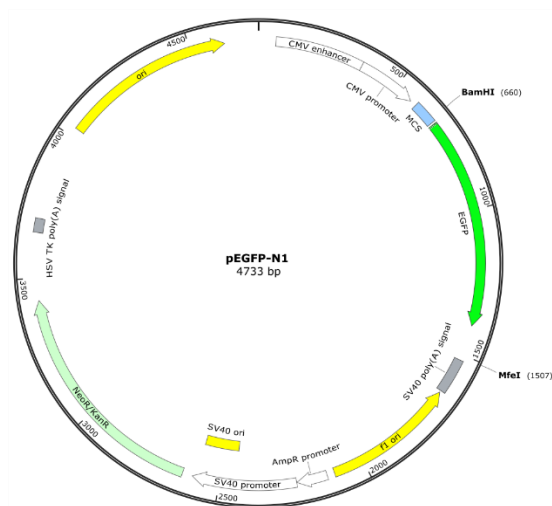


Figura 13. Mapa del vector pEGFP-N1.

El vector pEGFP-N1 se utilizó para clonar el ADN molde y evaluar su capacidad de expresar los antígenos Gn/Gc en células eucariotas. El mapa indica los sitios de restricción de las enzimas BamHI y MfeI, que flanqueaban la región en la que la construcción fue insertada. *Fuente: elaboración propia, visualización en Snapgene.*

La estrategia de clonación consistió en la digestión de los vectores pEGFP-N1 y pUCMinusMCS-Gn/Gc con las endonucleasas BamHI y MfeI, para obtener los fragmentos correspondientes al vector (3.9 kb) y la banda (3.6 kb), respectivamente (Figura 14). Después, los dos fragmentos se ligaron para generar un nuevo plásmido de 7.5 kb, que permitiera la expresión de los antígenos Gn/Gc en células eucariotas, y que se denominó pGPC (Figura 14). Como resultado de la combinación, el vector pGPC debió adquirir el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección.

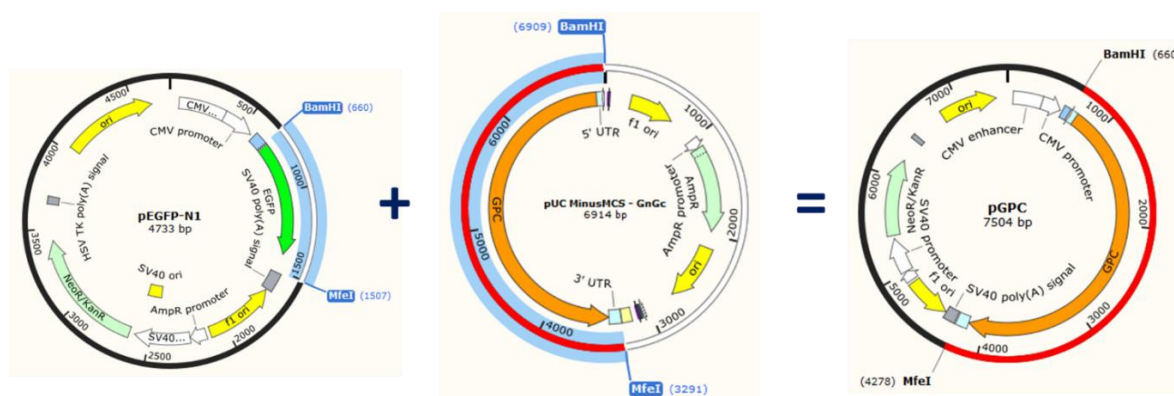


Figura 14. Estrategia de clonación para el análisis de la expresión del molde de ADN.

Representación gráfica del proceso de clonación que generó el vector pGPC. El fragmento correspondiente al ADN molde fue extraído del vector pUCMinusMCS-Gn/Gc con las endonucleasas BamHI y MfeI, e insertado en el vector pEGFP-N1 previamente digerido con las mismas enzimas. *Fuente: elaboración propia, visualización en Snapgene.*

La digestión del vector pEGFP-N1 originó tres fragmentos (Figura 15A), de acuerdo con la predicción obtenida en el *software* *Snappgene* (Domatics, Estados Unidos). Estos productos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y posteriormente se extrajo el fragmento superior de 3.9 kb. La digestión del vector pUCMinusMCS-Gn/Gc resultó en dos bandas (Figura 15B), tal como mostró la predicción *in silico* de *Snappgene* (Domatics, Estados Unidos). En este caso, los productos de la reacción tenían un tamaño similar, así que se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para mejorar la resolución de migración. Después, la banda superior de 3.6 kb fue extraída del gel, y los dos fragmentos recuperados se purificaron a partir de los trozos de gel extraídos.

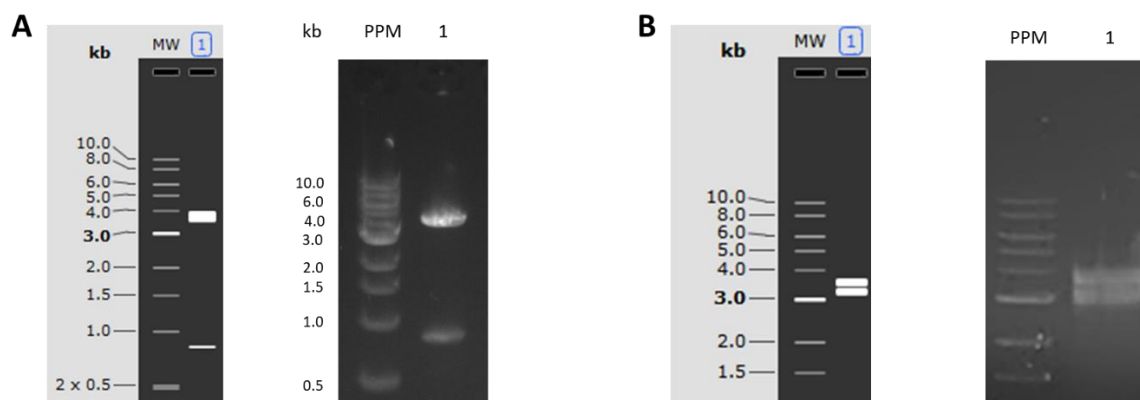


Figura 15. Digestión de los vectores pEGFP-N1 y pUCMinusMCS-Gn/Gc.

Perfiles de restricción predichos en el *software* *Snappgene* y electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión de los plásmidos con las enzimas BamHI y MfeI. **A.** Digestión de pEGFP-N1. El fragmento superior de 3.9 kb fue recuperado del gel de agarosa al 1 % y purificado para emplearse en la ligazón. **B.** Digestión de pUCMinusMCS-Gn/Gc. El fragmento superior de 3.6 kb se recuperó y purificó del gel de agarosa al 0.8 % para usarse en la ligazón. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1: Plásmido digerido (A. pEGFP-N1, B. pUCMinusMCS-Gn/Gc). Fuente: elaboración propia.

La reacción de ligazón se estableció con los fragmentos del vector (3.9 kb) y de la banda (3.6 kb), junto con una unidad de enzima ligasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El producto de esta reacción se utilizó para transformar células *E. coli* TOP10 mediante electroporación y cultivarlas en medio LB + kanamicina. El ADN plasmídico de ocho colonias positivas se aisló y purificó para analizarlo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se observó la recuperación de plásmidos desde

las ocho colonias, observándose un tamaño aparente similar en todas las muestras (figura 16).

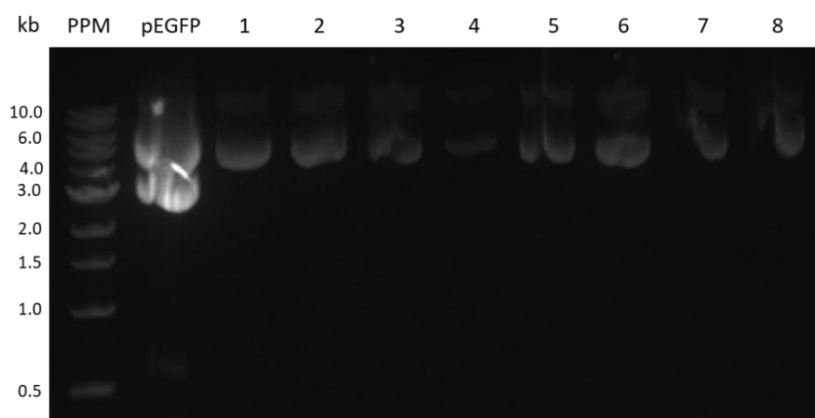


Figura 16. Visualización de ADN plasmídico aislado de los clones positivos.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plasmídico purificado desde los clones transformados con el vector pGPC. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). pEGFP: Vector pEGFP-N1. 1-8: Muestras de cada clon. *Fuente: elaboración propia.*

A continuación, se comprobó que el perfil de restricción de los vectores de cada clon sea compatible con el constructo esperado, pues se identificó que en la reacción de ligación podía generarse un plásmido no deseado con el fragmento incorrecto del vector pUC MinusMCS-Gn/Gc. Dicho fragmento fue un residuo de la purificación de la banda, debido a la escasa separación entre los productos de digestión en la electroforesis, atribuible a la similitud de sus tamaños (Figura 15B). La identidad de los plásmidos se verificó mediante un análisis de restricción con la endonucleasa NcoI. El uso de esta enzima permitió generar distintos perfiles de restricción con una sola digestión, debido a su particular sitio de reconocimiento que incluye el codón de inicio (ATG). Al comparar los fragmentos resultantes de las digestiones con los patrones predichos en el *software Snapgene* (Domatics, Estados Unidos) (Figura 17A, carril 2), se identificó que los plásmidos de los clones 1, 2 y 6 correspondían con el perfil de pGPC (Figura 17B). Los perfiles de restricción de los otros clones concordaron con los del plásmido no deseado (Figura 17A, carril 3).

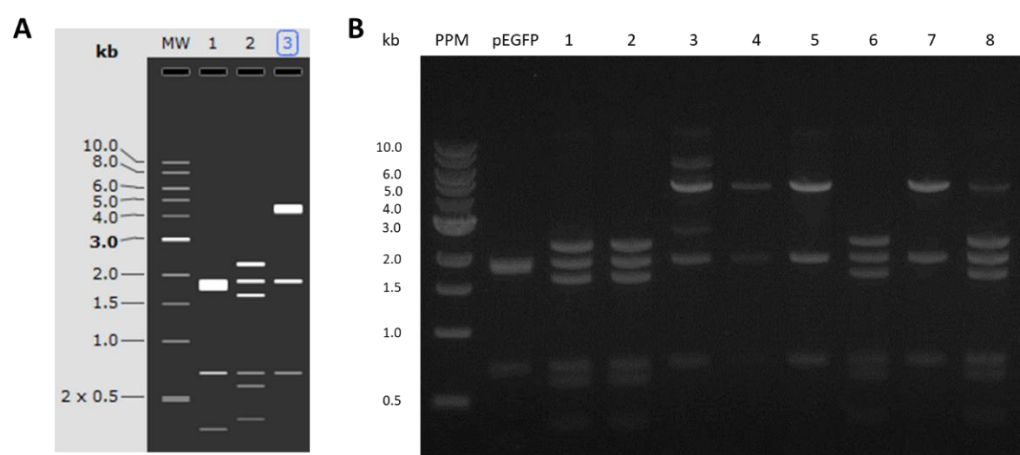


Figura 17. Identificación del ADN plasmídico obtenido de los clones positivos.

A. Predicción de los perfiles de restricción, realizada en el *software Snapgene*. 1: Vector pEGFP-N1 digerido con NcoI. 2: Vector pGPC digerido con NcoI. 3: Plásmido no deseado digerido con NcoI. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plasmídico purificado desde los clones transformados con el vector pGPC. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). pEGFP: Vector pEGFP-N1 digerido con NcoI. 1-8: Muestras de cada clon digeridas con NcoI. *Fuente: elaboración propia.*

Tras la identificación de los clones transformados con el vector pGPC, se seleccionó el clon 6 para corroborar la identidad del vector mediante una nueva digestión de restricción, con las enzimas BamHI, SacI, y NgoMIV. Tal como en los análisis previos, primero se predijo el perfil de restricción en el *software Snapgene* (Domatics, Estados Unidos) (Figura 18A), y después se comparó con los patrones de las digestiones observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 18B). Las reacciones empleadas fueron las siguientes: BamHI, SacI, BamHI + NgoMIV. Se verificó que el perfil de restricción observado coincidió con el predicho, lo que confirmó la compatibilidad del perfil de restricción del vector pGPC procedente del clon 6. Con ello, se continuó con la amplificación y purificación a escala masiva del plásmido.

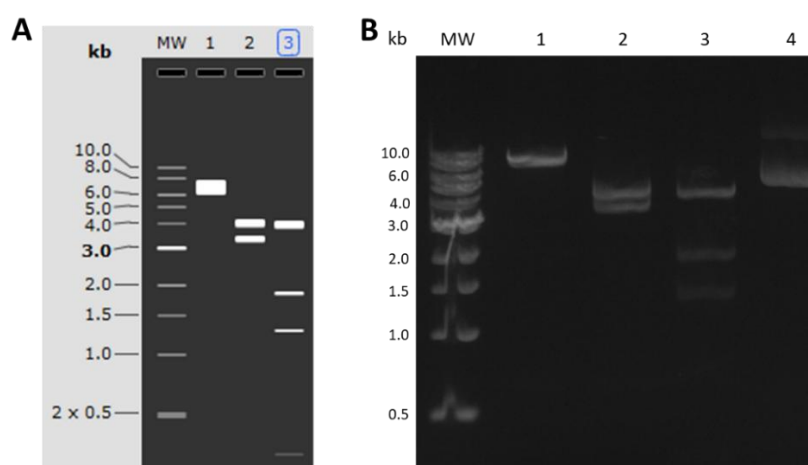


Figura 18. Análisis de restricción del vector pGPC aislado del clon seleccionado.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ADN plasmídico purificado desde los clones transformados con el vector pGPC. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1: Reacción con BamHI. 2: Reacción con SacI (vector linealizado). 3: Reacción con BamHI + NgoMIV. 4: Vector sin digerir. *Fuente: elaboración propia.*

El análisis de la expresión de las glicoproteínas Gn/Gc en células eucariotas a partir del ADN molde se realizó con el vector pGPC purificado. Células HEK-293A se transfectaron por el método de PEI con el vector pGPC, y con el vector pENTRY-GPC (que expresaba los mismos antígenos) como control positivo (Figura 19A). La efectividad de transfección se comprobó con células tratadas con el vector pEGFP-N1, que expresaba la proteína reportera GFP (Figura 19B). La expresión específica de las glicoproteínas Gn/Gc se identificó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 19C) y *Western blot* (Figura 19D), empleando el anticuerpo anti-Gn/Gc obtenido del hibridoma 20C1F10. En la inmunodetección del contenido proteico de las células transfectadas con pGPC y del control positivo, se observó la presencia de una banda de entre 63 kDa y 48 kDa de tamaño (Figura 19D). Esta banda coincidió con el peso molecular aparente de 55 kDa de la glicoproteína Gc del virus Andes, con lo cual se confirmó que el vector pGPC, y por ende el ADN molde, codificaba los antígenos Gn/Gc en células de mamífero.

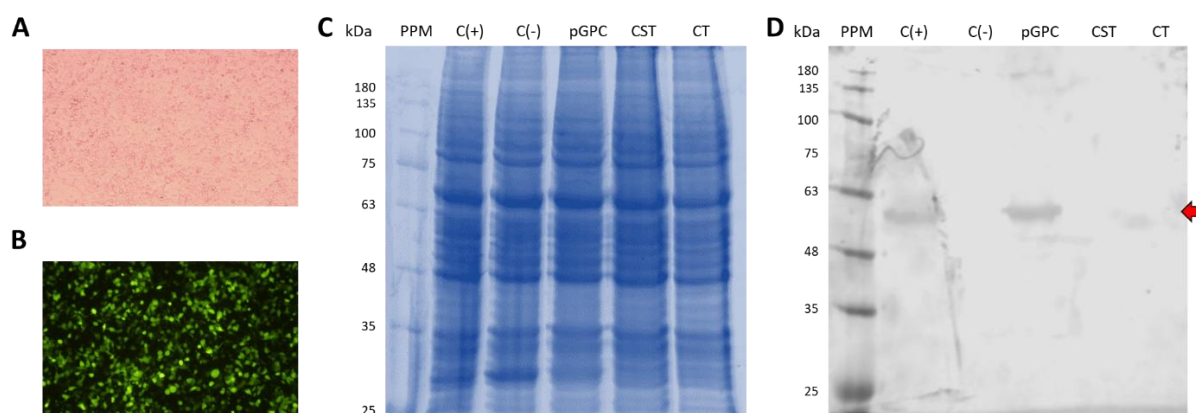


Figura 19. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del vector pGPC.

Las células transfectadas con el vector pGPC, cuya unidad transcripcional fue el ADN molde, expresaron los antígenos Gn/Gc, detectados mediante *Western blot*. **A.** Micrografía de las células HEK-293A observadas con luz visible. **B.** Micrografía de las células HEK-293^a transfectadas con el vector pEGFP-N1, observadas con luz ultravioleta. **C.** SDS-PAGE al 10 % del contenido proteico de las células tratadas. **D.** Inmunodetección por *Western blot* de los antígenos Gn/Gc con el anticuerpo anti-Gc del hibridoma 20C1F10. La flecha roja indica la glicoproteína Gc detectada a los ~55 kDa. PPM: Patrón de peso molecular de proteínas AccuRuler RGB Plus 250 kDa (Maestrogen, Estados Unidos). C(+): Control positivo. C(-): Control negativo. pGPC: Lisado de células transfectadas con pGPC. CST: Control sin transfección. CT: Control de transfección. *Fuente: elaboración propia.*

5.1.3. Producción del ARN mensajero que codificaba los antígenos de superficie Gn/Gc del virus Andes.

5.1.3.1. Transcripción *in vitro* del ARN.

Después de confirmar la funcionalidad del molde de ADN, se continuó con la producción del ARN mensajero mediante transcripción *in vitro*. Este proceso requirió que el ADN molde sea lineal para generar moléculas de ARNm con la longitud correcta. Por esta razón, el vector pUCMinusMCS-Gn/Gc fue linealizado con la enzima BspQI antes de utilizarse como molde en la transcripción. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa se encontró corriente abajo del sitio de corte, y la digestión resultó en un ADN lineal con un extremo cohesivo 3' (Figura 20A), que correspondió al final de la secuencia de poliadenina de 100 nucleótidos. Se verificó la digestión completa del vector mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, apreciándose la banda de 6.6 kb, consistente con la longitud del ADN linealizado (Figura 20B).

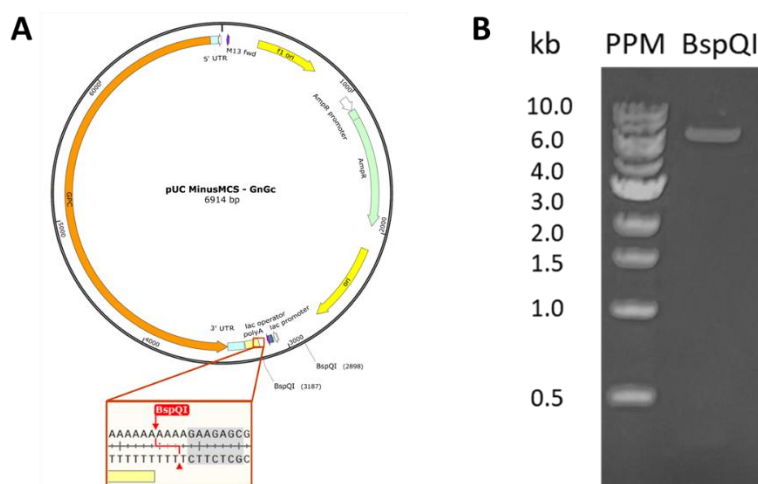


Figura 20. Linealización del vector pUCMinusMCS-Gn/Gc.

A. Representación gráfica del vector pUCMinusMCS-Gn/Gc, que muestra el sitio de corte de la endonucleasa BspQI. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del producto de la digestión. PPM: Patrón de peso molecular de ADN 1 kb *GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). BspQI: Vector linealizado. *Fuente: elaboración propia.*

El vector linealizado se purificó y cuantificó por espectrofotometría, para después emplearse como molde de ADN en la síntesis de ARNm que codificaba las glicoproteínas de superficie Gn/Gc del virus Andes (ARN GPC). Considerando que la construcción fue diseñada con un promotor T7, la producción de ARN se llevó a cabo con el kit *HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit* (New England Biolabs, Estados Unidos), que incluyó la ARN polimerasa T7, junto con el tampón de la enzima, y los nucleósidos trifosfato de adenosina, guanosina, citidina y uridina. La reacción se suplementó con ditioneitol (DTT) 5 mM, y se incubó por 2 h a 37 °C. Después, se trató con DNasa I para eliminar el ADN molde, y el ARN producido se purificó a través de precipitación con cloruro de litio y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Una muestra del producto purificado se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % para identificar la identidad e integridad del ARN sintetizado. Se determinó una producción total de 170 µg de ARN por µg de ADN molde, con un rendimiento de 8.5 g/L. En la electroforesis se apreció una banda bien definida, sin evidencia de degradación, de aproximadamente 3.7 kb (Figura 21), coherente con la longitud esperada de la construcción diseñada (Figura 9). También se apreció la presencia de

bandas adicionales de mayor tamaño, lo que sugirió la formación de asociaciones intermoleculares de ARN favorecidas por estructuras secundarias.

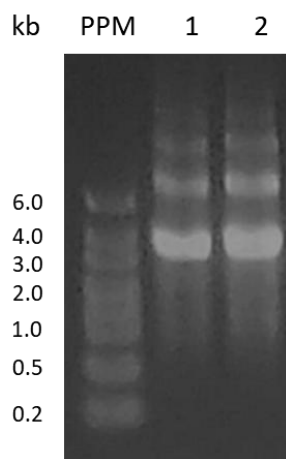


Figura 21. Visualización del ARN GPC producido mediante transcripción *in vitro*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ARN GPC transcrito y purificado. PPM: Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1-2: Muestras de ARN GPC. Fuente: elaboración propia.

5.1.3.2. Adición de la caperuza en el extremo 5'.

El ARN GPC generado en la transcripción *in vitro* estaba compuesto por los dominios funcionales derivados del ADN molde, que consistieron en las UTRs 5' y 3', la secuencia codificante de los antígenos Gn/Gc, y la cola de poli(A) de 100 nucleótidos. En el contexto de su aplicación como prototipo vacunal, el ARN requirió la adición de la caperuza en el extremo 5', para garantizar su estabilidad y su traducción en células eucariotas. La caperuza se añadió mediante un proceso enzimático postranscripcional, empleando el sistema del virus vaccinia y la cap 2'-O-metiltransferasa, con el fin de obtener una estructura de tipo Cap-1 que redujera la respuesta inmune innata estimulada por ARN. Se partió de 150 µg de ARN transcrito, que se calentó a 65 °C por 5 min para eliminar las estructuras secundarias que podían bloquear el acceso al extremo 5'. Después, se incubó por una hora a 37 °C con los siguientes componentes: enzima de *capping* del virus vaccinia, nucleósido de guanosina, S-adenosil metionina, cap 2'-O-metiltransferasa, y tampón de reacción. El ARNm con caperuza 5' resultante se purificó por precipitación con cloruro de litio, se cuantificó por espectrofotometría, y una muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % para verificar la identidad e integridad del producto. Se obtuvieron alrededor de 140 µg de ARNm con

caperuza 5' purificado, indicando un rendimiento de recuperación del 93 %. En la electroforesis se apreció una banda nítida de aproximadamente 3.7 kb, lo que evidenció que el ARNm no se degradó durante el proceso (Figura 22A). No se observaron bandas adicionales de mayor tamaño pues las interacciones intermoleculares del ARN se eliminaron al calentarlo a 65 °C. A partir de este punto, el ARNm producido se consideró estructuralmente maduro y con funcionalidad potencial, al estar compuesto por todos los elementos necesarios para su traducción (Figura 22B).

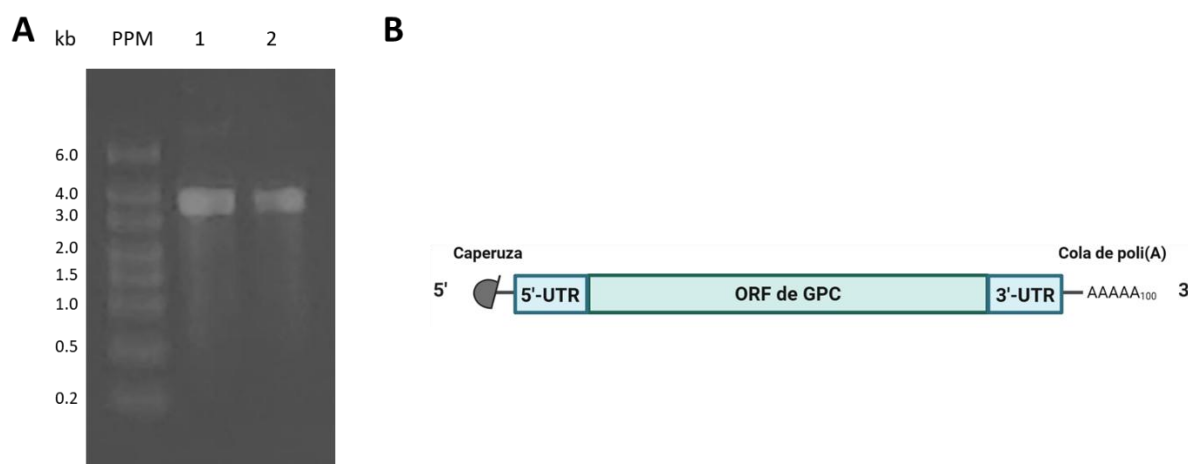


Figura 22. Visualización del ARNm GPC con caperuza 5' purificado.

A. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ARNm GPC con caperuza en el extremo 5'. PPM: Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1-2: Muestras de ARNm GPC con la caperuza 5' con estructura Cap-1. **B.** Representación gráfica de la estructura del ARNm GPC producido. Las dimensiones de los componentes no representan la longitud de las secuencias. *Fuente: elaboración propia.*

5.1.3.3. Evaluación de la integridad del ARN mensajero bajo estrés térmico agudo.

El ARNm es susceptible a degradación por acción de las ribonucleasas y por su inestabilidad química, de manera que las condiciones de producción y almacenamiento de la molécula deben garantizar la ausencia de agentes enzimáticos y ambientes de estrés que favorezcan la degradación del principio activo. La evaluación de la integridad bajo condiciones de estrés agudo es una estrategia que permite verificar la integridad del ARNm y respaldar la consistencia del proceso productivo en un entorno libre de factores que favorecen su degradación. El ARNm GPC purificado se sometió a estrés térmico, incubándolo durante 30 y 60 min a 37 °C, y después se comprobó su integridad

mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En la evaluación no se apreciaron cambios significativos en el patrón de migración ni en la nitidez de las bandas entre los distintos tiempos (Figura 23), evidenciando la robustez del proceso y la integridad del ARNm en el tiempo.

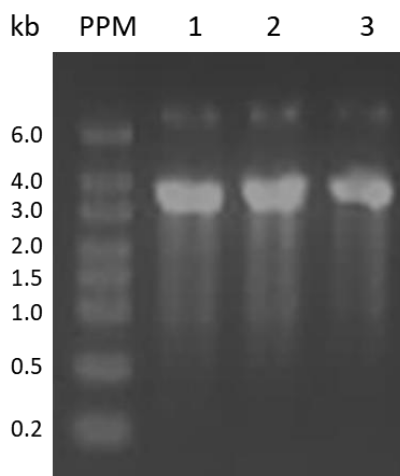


Figura 23. Visualización del ARNm GPC sometido a estrés térmico.

Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ARNm GPC incubado a 37 °C durante 1: 0 min, 2: 30 min, y 3: 60 min. PPM: Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Fuente: elaboración propia.

5.1.3.4. Determinación de la funcionalidad del ARN mensajero.

La funcionalidad del ARNm está delimitada por su capacidad de ser reconocido por la maquinaria celular, mantener su integridad estructural y traducirse de manera eficiente en la proteína antigénica codificada. La facultad del ARNm GPC de expresar las glicoproteínas Gn/Gc en células eucariotas definió su actividad biológica, y se determinó por medio de un ensayo de transfección en la línea celular HEK-293^a (Figura 24A), seguido de un análisis por *Western blot*. La transfección se realizó con el reactivo *Lipofectamine™ MessengerMAX™* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), optimizado para la entrega de ARN mensajero. En este experimento, el vector pGPC no se consideró como control positivo pues la cinética de expresión de proteínas difiere entre ADN y ARN. Por tanto, las células se trataron con distintas cantidades de ARNm, como parte de la estandarización inicial del método. La eficiencia de transfección se supervisó mediante la expresión del reportero GFP en células tratadas con un ARNm comercial que codificaba esta proteína (GenScript, Estados Unidos) (Figura 24B). La

expresión de los antígenos se determinó 24 h después de la transfección con el ARNm. Primero se separaron los componentes del contenido proteico celular según su tamaño mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 24C) y posteriormente se detectaron las glicoproteínas Gn/Gc a través de *Western blot*, empleando el anticuerpo anti-Gn/Gc del hibridoma 20C1F10 (Figura 24D). En la inmunodetección se identificó una banda de entre 63 kDa y 48 kDa de tamaño, en la fracción proteica de las células tratadas con las diferentes cantidades de ARNm (Figura 24D). Esta banda correspondió a la glicoproteína Gc del virus Andes, con un peso molecular de 55 kDa, lo que confirmó la funcionalidad del ARNm GPC al demostrar su reconocimiento por la maquinaria celular y su traducción en los antígenos Gn/Gc. La intensidad de las bandas fue similar para los tres tratamientos de ARNm, por tanto, se estableció la cantidad de 0.5 µg para los ensayos de transfección posteriores.

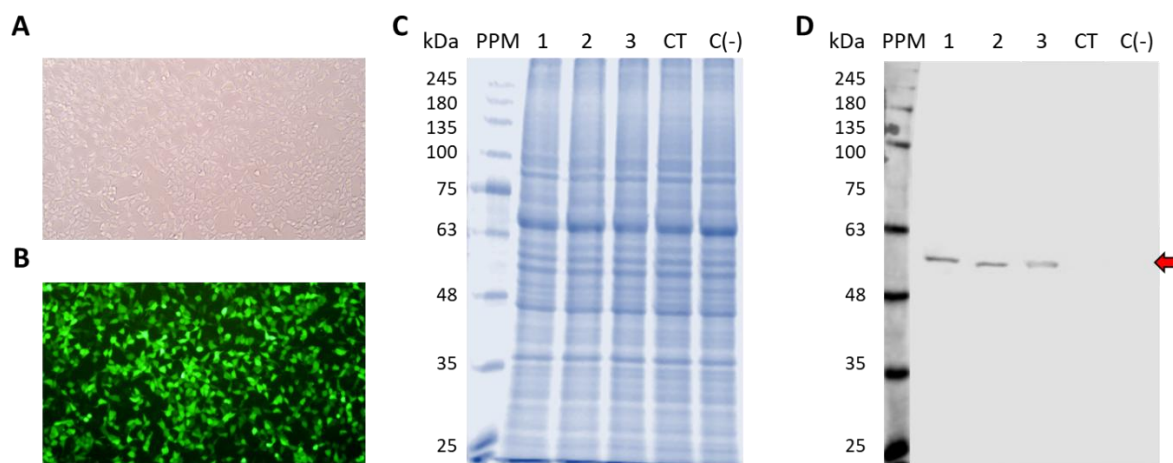


Figura 24. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del ARNm GPC.

Las células transfectadas con las distintas cantidades de ARNm GPC expresaron los antígenos Gn/Gc, detectados mediante *Western blot*. **A.** Micrografía de las células HEK-293A observadas con luz visible. **B.** Micrografía de las células HEK-293A transfectadas con el ARNm GFP, observadas con luz ultravioleta. **C.** SDS-PAGE al 10 % del contenido proteico de las células tratadas. **D.** Inmunodetección por *Western blot* de los antígenos Gn/Gc con el anticuerpo anti-Gc del hibridoma 20C1F10. La flecha roja indica la glicoproteína Gc detectada a los ~55 kDa. PPM: Patrón de peso molecular de proteínas AccuRuler RGB Plus 250 kDa (Maestrogen, Estados Unidos). 1: Lisado de células transfectadas con 0.5 µg de ARNm GPC. 2: Lisado de células transfectadas con 1 µg de ARNm GPC. 3: Lisado de células transfectadas con 2 µg de ARNm GPC. CT: Control de transfección. C(-): Control negativo. *Fuente: elaboración propia.*

5.1.3.5. Modificación del ARN mensajero con N1-metilpseudouridina.

En función de optimizar las propiedades del ARNm GPC, se llevó a cabo la incorporación de N1-metilpseudouridina durante la transcripción *in vitro*. Esta

modificación, ampliamente utilizada en el diseño de ARNm vacunal, se realizó para mejorar la estabilidad del transcrito y su eficiencia de traducción. En la reacción de transcripción, el trifosfato de nucleósido de uridina fue reemplazado por su análogo sintético, N1-metilpseudouridina trifosfato (MedChemExpress, Estados Unidos), a la misma concentración, manteniéndose constante los demás parámetros.

El proceso continuó con la eliminación del ADN molde con Dnasa I y la purificación del ARN con cloruro de litio. El producto purificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, detectándose una banda definida de aproximadamente 3.7 kb, concordante con el tamaño esperado. Al igual que en la primera transcripción, se observaron bandas de mayor tamaño, atribuibles a la formación de asociaciones intermoleculares del ARN (Figura 25A). La adición de la caperuza en el extremo 5' se efectuó de manera análoga, y la observación del ARNm purificado en electroforesis en gel de agarosa al 1 % evidenció una banda nítida del mismo tamaño (Figura 25B). La estabilidad del ARNm modificado también se evaluó bajo condiciones de estrés térmico a 37 °C, en las que se constató la integridad de la molécula y la robustez del proceso (Figura 25C). En conjunto, estos resultados demostraron que, con el empleo del nucleósido modificado en la producción, no se detectaron diferencias cualitativas relevantes en el patrón electroforético ni evidencias apreciables de fragmentación bajo las condiciones evaluadas.

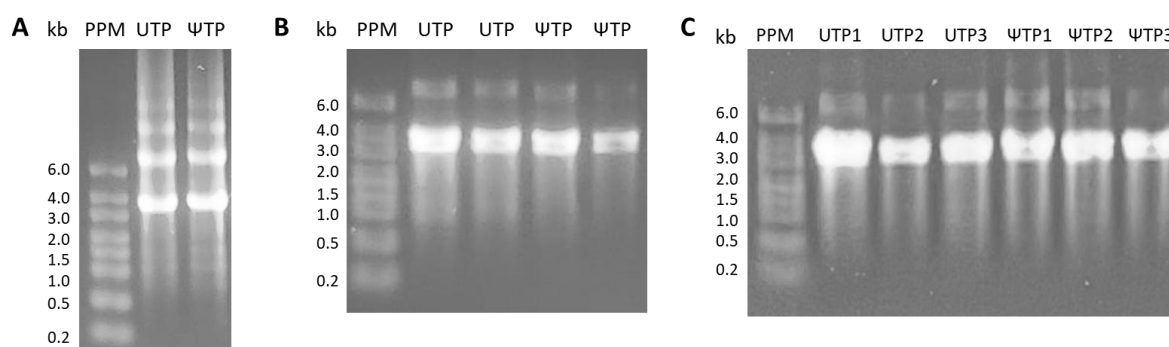


Figura 25. Comparación de la identidad, integridad y estabilidad del ARNm GPC modificado y no modificado.

A. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la transcripción *in vitro* de ARN GPC. **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ARNm GPC con caperuza en el extremo 5'. **C.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del ARNm GPC incubado a 37 °C durante 0 min (1), 30 min (2), y 60 min (3). PPM: Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). UTP: ARNm GPC sin modificar. ΨTP: ARNm modificado. *Fuente: elaboración propia.*

En paralelo, se evaluó la eficiencia de las reacciones de transcripción *in vitro*, considerando tanto la producción total de ARNm como el rendimiento volumétrico por lote. Este análisis se realizó para la transcripción del ARNm modificado, pues esta molécula se utilizó en la formulación y ensayos posteriores. En total, se sintetizaron cuatro lotes de ARNm, con una producción total de $172.69 \pm 15.35 \mu\text{g}$ y un rendimiento volumétrico de $8.63 \pm 0.77 \text{ g/L}$ (Tabla 7). Considerando que la caperuza 5' se añadió después de la transcripción, el rendimiento de recuperación del ARNm se cuantificó de manera independiente, obteniéndose un promedio de $140.32 \pm 4.70 \mu\text{g}$ ARNm, con una eficiencia de recuperación del $93.55 \pm 3.13 \%$ (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de la producción de ARNm GPC modificado con N1-metilpseudouridina.

No. Lote	ARN transcrito (μg)	Volumen (μL)	Rendimiento transcripción (g/L)	ARNm pre-capping (μg)	ARNm post-capping (μg)	Rendimiento recuperación (%)
1	172.18	20.00	8.61	150	133.92	89.28
2	161.47	20.00	8.07	150	141.64	94.43
3	194.55	20.00	9.73	150	145.16	96.77
4	162.55	20.00	8.13	150	140.57	93.71
Media	172.69	-	8.63	-	140.32	93.55
SD	15.35	-	0.77	-	4.70	3.13

Fuente: elaboración propia.

La funcionalidad del ARNm modificado se determinó de forma cualitativa, comparándola con la obtenida con su contraparte sin modificar. Las células HEK-293A fueron transfectadas con 500 ng de ARNm (Figura 26A), y a las 24 h se evaluó la expresión de los antígenos Gn/Gc mediante inmunodetección con *Western blot*. En este caso, el control positivo correspondió a las células tratadas con el ARNm sin modificar, y como control de transfección se empleó el ARNm que expresaba GFP (Genscript, Estados Unidos) (Figura 26B). Posterior a la separación de las proteínas celulares totales a través de SDS-PAGE (Figura 26C), se procedió con la inmunodetección con el anticuerpo secundario anti-Gc. Se observó en las fracciones de las células tratadas con el ARNm GPC modificado y sin modificar, la presencia de una banda entre 63 kDa y 48 kDa, concordante con el peso molecular de 55 kDa de la glicoproteína Gc (Figura 26D).

Este hallazgo evidenció que el ARNm GPC modificado, al igual que su equivalente sin modificar, expresó correctamente los antígenos Gn/Gc en células de mamífero.

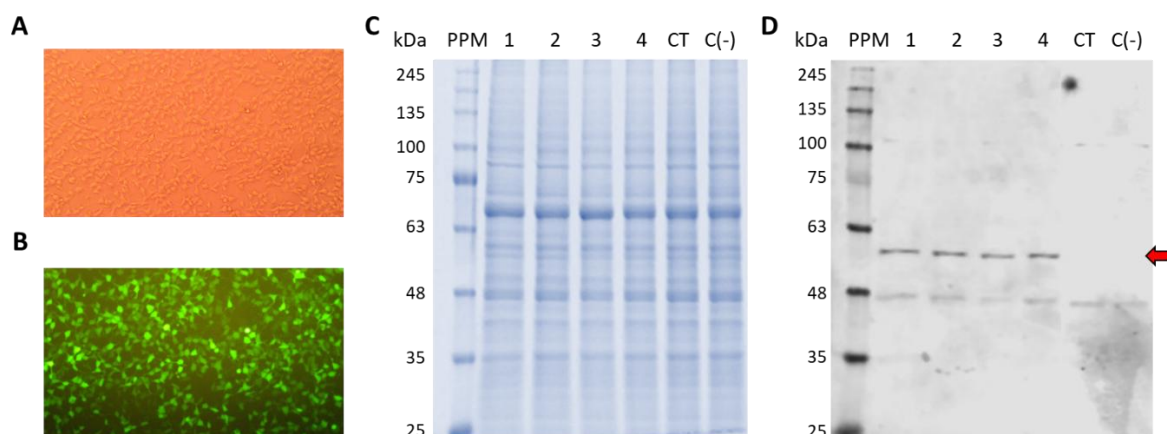


Figura 26. Evaluación de la expresión de los antígenos Gn/Gc a partir del ARNm GPC modificado. Las células transfectadas con los ARNm GPC modificado y sin modificar expresaron los antígenos Gn/Gc, detectados mediante *Western blot*. **A.** Micrografía de las células HEK-293A observadas con luz visible. **B.** Micrografía de las células HEK-293A transfectadas con el ARNm GFP, observadas con luz ultravioleta. **C.** SDS-PAGE al 10 % del contenido proteico de las células tratadas. **D.** Inmunodetección por *Western blot* de los antígenos Gn/Gc con el anticuerpo anti-Gc del hibridoma 20C1F10. La flecha roja indica la glicoproteína Gc detectada a los ~55 kDa. PPM: Patrón de peso molecular de proteínas AccuRuler RGB Plus 250 kDa (Maestrogen, Estados Unidos). 1-2: Lisado de células transfectadas con ARNm GPC sin modificar. 3-4: Lisado de células transfectadas con ARNm GPC modificado. CT: Control de transfección. C(-): Control negativo. *Fuente: elaboración propia.*

5.1.4. Encapsulación del ARN mensajero en nanopartículas lipídicas.

La formulación del prototipo vacunal se completó con la encapsulación del ARNm GPC modificado en nanopartículas lipídicas (LNPs), con el fin de proteger el principio activo de la degradación, facilitar su entrada celular y asegurar su liberación eficiente en el citoplasma. Las LNPs se elaboraron mediante el método de nanoprecipitación, que consistió en la mezcla de una fase lipídica con una fase acuosa. La solución lipídica se preparó con los componentes catiónico (SM-102), auxiliador (DSPC), estructural (colesterol), y PEGilado (DMG-PEG 2000), a las proporciones molares definidas. La solución acuosa se constituyó al diluir 251 μ g de ARNm GPC en tampón acetato de sodio 100 mM pH 5.0. Para alcanzar la cantidad requerida de ARNm se combinaron dos lotes de producción por cada proceso de encapsulación. Ambas soluciones se mezclaron rápidamente durante 20 segundos a una relación volumétrica acuosa:lipídica de 3:1. Durante este proceso, el lípido ionizable adquirió carga positiva al entrar en

contacto con el entorno ácido de la fase acuosa, y, en consecuencia, se asoció con el ARNm con carga negativa por interacción electrostática. La suspensión resultante de LNPs-ARNm se concentró en un dispositivo Amicon Ultra-15 de 30 000 MWCO (Merck, Darmstadt, Alemania) con tampón fosfato salino, y se almacenó en microtubos libres de RNasas a 4 °C hasta su uso. Se formularon dos lotes de LNPs-ARNm: el lote 1 se preparó con los lotes 1 y 2 de ARNm, mientras que el lote 2 se produjo con los lotes 3 y 4. Además, por cada lote de LNPs-ARNm, también se elaboraron LNPs vacías mediante el mismo método.

5.2. Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

5.2.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.

La caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones es un paso crítico en las etapas tempranas de su desarrollo, pues contribuye a los principios de calidad, seguridad y eficacia. Los parámetros fisicoquímicos como el tamaño de partícula, la polidispersidad, la carga superficial y la eficiencia de encapsulación determinan la biodistribución, la captación celular, el escape endosomal y la eficiencia de traducción del ARNm. Además, esta caracterización permite garantizar la baja variabilidad entre dos lotes evaluados, constituyendo una primera aproximación al cumplimiento de los requisitos regulatorios.

5.2.1.1. Determinación de la distribución de tamaño y carga superficial mediante dispersión dinámica y electroforética de luz.

El método estándar en la determinación del tamaño y dispersidad de nanopartículas es la dispersión dinámica de la luz, y para la medición del potencial zeta es la dispersión electroforética de la luz. Estas técnicas destacan por su rapidez, simplicidad, alto grado de estandarización, y bajo requerimiento de muestra. En consecuencia, la distribución de tamaño e índice de polidispersidad de las LNPs vacías y LNPs-ARNm se precisaron

por DLS, y el potencial zeta de estas se estimó mediante ELS. Los valores medios obtenidos de las determinaciones de las dos formulaciones se muestran en la tabla 8, y las mediciones completas se presentan en el Anexo 2.

Tabla 8. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs.

Tipo de LNPs	Diámetro hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial zeta (mV)
LNPs-ARNm	150.77 ± 2.05	0.057 ± 0.021	-3.19 ± 0.25
LNPs vacías	159.17 ± 2.18	0.093 ± 0.009	-2.04 ± 0.25

Los datos se expresaron como la media aritmética ± SD. Fuente: elaboración propia.

Las LNPs vacías tuvieron un diámetro hidrodinámico medio de 159.17 ± 2.18 y un índice de polidispersidad de 0.093 ± 0.009 , mientras que las LNPs-ARNm exhibieron un diámetro hidrodinámico medio de 150.77 ± 2.05 nm, y un PDI de 0.057 ± 0.021 . En ambos casos, las partículas se caracterizaron por tamaños promedios inferiores a 200 nm y valores de PDI inferiores a 0.1, indicativos de una distribución estrecha y alta homogeneidad (Figura 27). Respecto a la carga superficial, el potencial zeta de las LNPs vacías se estimó en -2.04 ± 0.25 , ligeramente negativo debido a su composición fosfolipídica. Las LNPs-ARNm presentaron una carga superficial cercana a la neutralidad. La diferencia observada respecto de las LNP vacías fue pequeña y su origen no fue determinado experimentalmente. En conjunto, estas cargas superficiales cercanas a la neutralidad se asocian con un comportamiento estable en condiciones fisiológicas.

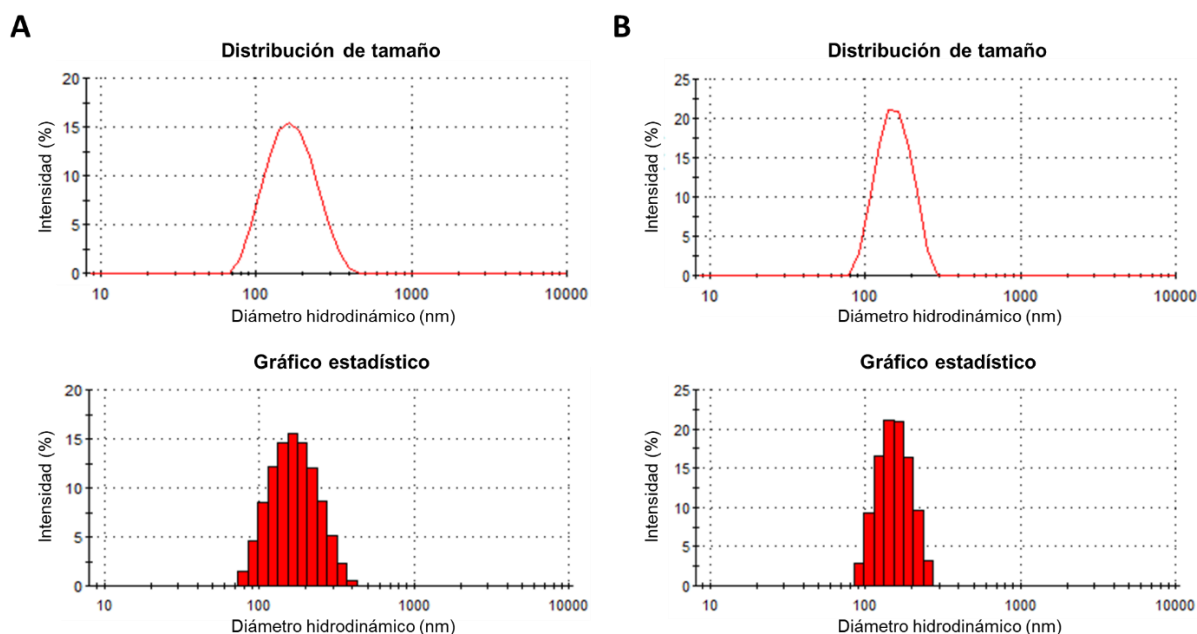


Figura 27. Determinación por dispersión dinámica de la luz de la distribución de tamaños de las nanoformulaciones.

A. Curva de distribución e histograma de la población de LNPs vacías. **B.** Curva de distribución e histograma de la población de LNPs-ARNm. *Fuente: Imágenes generadas en el software Zetasizer Nano.*

5.2.1.2. Identificación de la morfología a través de microscopía electrónica de transmisión.

La combinación de dos o más técnicas es recomendable para lograr una caracterización completa de las nanopartículas. La microscopía electrónica de transmisión se emplea con frecuencia en el análisis de LNPs, ya que su alto poder de contraste y resolución permite determinar con precisión la morfología y tamaño. Las micrografías TEM de las formulaciones revelaron que las LNPs presentaban una morfología cuasi esférica con contornos bien delimitados y sin signos de fusión (Figura 28A y B). No se apreciaron diferencias morfológicas evidentes entre las LNPs vacías y las LNPs-ARNm. La agregación localizada, identificada en la micrografía de las LNPs-ARNm (Figura 28B), es consistente con artefactos asociados al secado durante la preparación de la muestra, y por ello no contradice la monodispersidad reportada por DLS. Asimismo, se observó una distribución de tamaño homogénea, con diámetros de partícula inferiores a 200 nm, en concordancia con los valores previamente obtenidos mediante DLS.

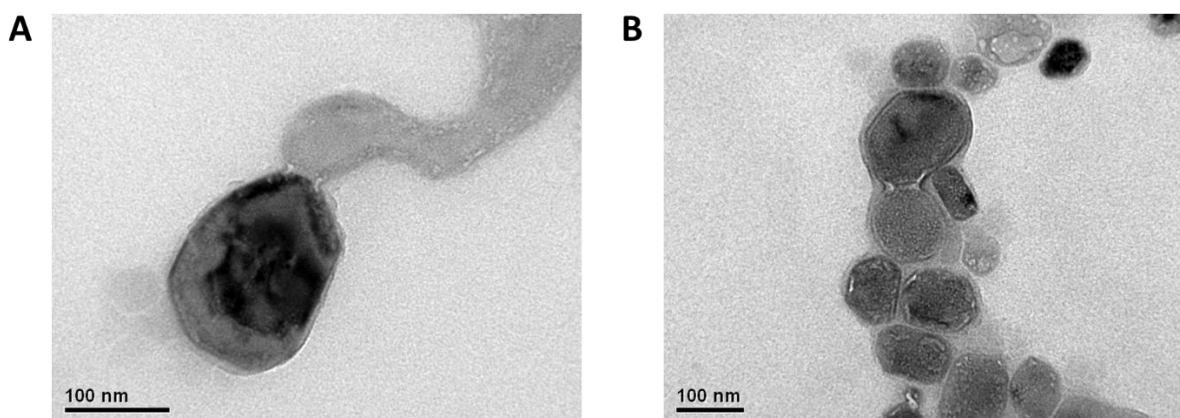


Figura 28. Observación de las LNPs mediante microscopía electrónica de transmisión.
A. Micrografía de las LNPs vacías. **B.** Micrografía de las LNPs-ARNm. La barra de escala se muestra en la parte inferior izquierda de las imágenes. *Fuente: elaboración propia.*

5.2.1.3. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARN mensajero.

La determinación de la concentración de ARNm contenido en las LNPs, así como de la eficiencia con la cual se encapsuló, permiten precisar la dosis, la estabilidad frente a la degradación por RNasas y la eficiencia de traducción, pues la presencia de ARNm libre en la formulación puede afectar la seguridad y la respuesta biológica. Además, esta cuantificación es clave para evaluar y optimizar el proceso de formulación, asegurando la baja variabilidad entre los dos lotes evaluados y el cumplimiento de criterios de calidad.

En la cuantificación de las concentraciones de ARNm encapsulado se emplea de forma habitual el colorante fluorescente RiboGreen®, ya que su alta sensibilidad y selectividad por ácidos nucleicos permiten detectar bajas cantidades con mayor precisión que métodos espectrofotométricos. El ensayo es indirecto, pues el ARNm encapsulado se determina a partir de la medición del ARNm no encapsulado y total, en ausencia o presencia de detergentes que liberan el contenido de las nanopartículas, respectivamente. Se realizó un ensayo para cada lote producido, construyendo la curva de calibración con diluciones de ARNm comercial con concentración conocida que expresaban GFP (Figura 29A). Con las ecuaciones lineales obtenidas, se precisaron las concentraciones de ARNm libre y ARNm total, y con estos valores se cuantificó para cada lote el ARNm encapsulado (ecuación 2) y la eficiencia de encapsulación (ecuación 3).

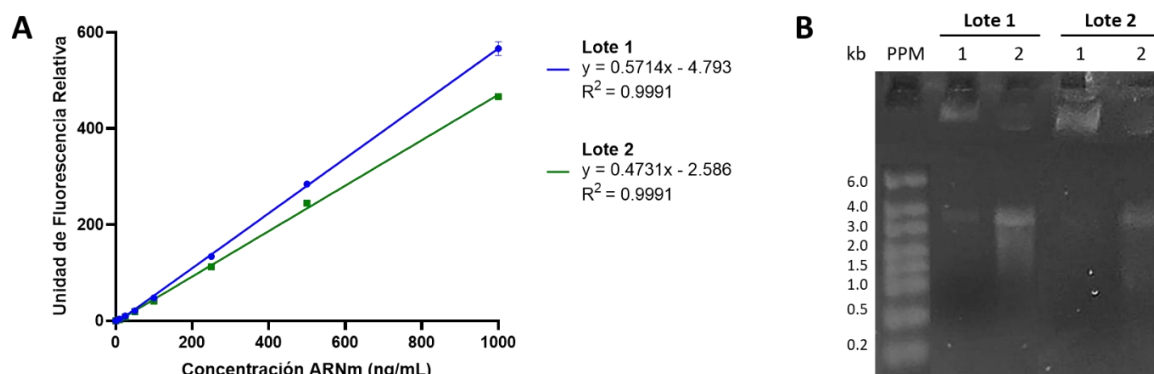


Figura 29. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARNm en LNPs.

A. Curvas de calibración empleadas en el cálculo de la concentración de ARNm encapsulado y de la eficiencia de encapsulación. **B.** Visualización de las fracciones de ARNm no encapsulado y total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. PPM: Patrón de peso molecular de ARN *RiboRuler High Range* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 1: LNPs no tratadas con detergente (ARNm no encapsulado). 2: LNPs tratadas con detergente (ARNm total). *Fuente: elaboración propia.*

Se determinó una concentración promedio de ARNm encapsulado de 126.75 ± 20.03 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la eficiencia de encapsulación media fue del 94.12 ± 0.35 % (Tabla 9). Se apreció que en el segundo lote la concentración de ARNm encapsulado fue más alta, indicando que durante la formación de los complejos LNPs-ARNm existió una mayor cantidad de ARNm disponible para asociarse con el lípido ionizable. La eficiencia de encapsulación en ambos casos fue superior al 90 %, lo que evidenció la consistencia de las LNPs como sistema de transporte, mostró eficiencias similares entre los dos lotes evaluados y permitió estimar la concentración de ARNm encapsulado para el ajuste de las dosis.

Tabla 9. Cuantificación de la eficiencia de encapsulación del ARNm en LNPs.

No. Lote	ARNm total ($\mu\text{g/mL}$)	ARNm no encapsulado ($\mu\text{g/mL}$)	ARNm encapsulado ($\mu\text{g/mL}$)	Eficiencia de encapsulación (%)
1	119.94	7.35	112.59	93.87
2	149.33	8.41	140.91	94.37
Media	134.63	7.88	126.75	94.12
SD	20.78	0.75	20.03	0.35

Fuente: elaboración propia.

La correcta formación de los complejos LNPs-ARNm también se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, en el que las muestras tratadas y no tratadas con detergente se separaron para visualizar el ARNm no encapsulado y total (Figura

29B). Se observó que el ARNm de las fracciones no tratadas con detergente no migró al encontrarse encapsulado en las LNPs, en contraste con las fracciones de las partículas tratadas con detergente, en las cuales el ARNm se separó con normalidad debido a la ruptura de las LNPs después de la exposición al tensioactivo.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las LNPs-ARNm, que incluyó la determinación del tamaño, dispersidad, carga superficial, morfología y eficiencia de encapsulación, mostraron tanto la homogeneidad del prototipo, como la consistencia del proceso. Estos parámetros influyen en la seguridad y funcionalidad de las nanoformulaciones, así que el siguiente paso correspondió a la evaluación de la capacidad de las LNPs-ARNm de producir el efecto biológico esperado en modelos *in vitro*.

5.2.2. Caracterización biológica de las nanopartículas lipídicas que encapsulan al ARN mensajero.

Una vez establecidas las propiedades fisicoquímicas relevantes de las LNPs-ARNm, se continuó con la caracterización de su citotoxicidad y expresión antigénica *in vitro*. Mediante estos análisis, se determinó el perfil de seguridad preliminar y la actividad biológica funcional a nivel celular de la nanoformulación, previo a la evaluación de la respuesta inmune en el modelo animal correspondiente.

5.2.2.1. Estimación del perfil de seguridad *in vitro* de la formulación vacunal.

El efecto de las LNPs sobre la viabilidad celular se estimó mediante el ensayo MTT en dos líneas celulares: una tumoral (cáncer cervical humano, HeLa) y una normal (fibroblasto humano, HFF). En este experimento se trataron las células durante 24 h con diferentes concentraciones de LNPs-ARNm, partiendo de una concentración diez veces mayor a la utilizada en el ensayo de actividad biológica. También se evaluó la viabilidad de las células tratada con LNPs vacías, y con ARNm libre. Se empleó como control de sobrevivencia a células sin tratamiento, y como control de muerte a células tratadas con peróxido de hidrógeno al 10 %.

En el caso de las células tumorales, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en la concentración más alta, tanto en las células tratadas con LNPs vacías (reducción del 20.7 %, $p = 0.001$) como con LNPs-ARNm (reducción del 24.6 %, $p = 0.005$), mientras que en la concentración de trabajo (0.5 $\mu\text{g/mL}$) no se observaron diferencias significativas (Figuras 30A y 30B). En las células tratadas con ARNm libre, no se identificaron diferencias significativas en las distintas diluciones (Figura 30C), lo que indica que la toxicidad a la dosis más alta estaría relacionada a la naturaleza de la partícula lipídica. La reducción de la viabilidad observada en esta dosis, aunque es estadísticamente significativa, no es suficiente para considerar a la formulación citotóxica según la normativa de la Organización Internacional de Normalización (ISO 10993-5:2009), que establece que un producto se considera citotóxico si la reducción de la viabilidad es mayor al 30 %.

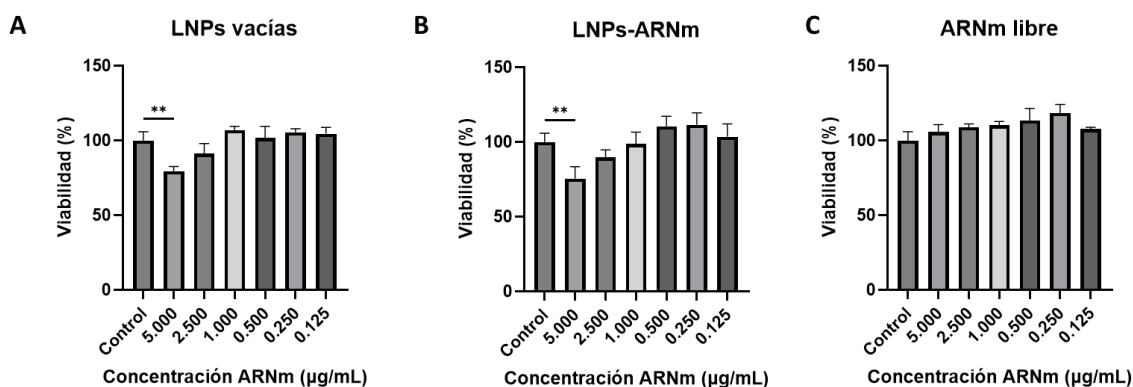


Figura 30. Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de la formulación en células HeLa.

A. Viabilidad de las células tratadas con LNPs vacías. **B.** Viabilidad de las células tratadas con LNPs-ARNm. **C.** Viabilidad de las células tratadas con ARNm GPC libre. Las mediciones se realizaron por triplicado. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. La comparación de los diferentes tratamientos respecto al control se realizó con un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido de una prueba de Dunnett, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. **: $p < 0.001$. Fuente: elaboración propia.

Al realizar la comparación de cada concentración entre los distintos tratamientos en la línea celular HeLa, se encontraron diferencias significativas en las diluciones más altas. A 5 $\mu\text{g/mL}$, se apreció una reducción de la viabilidad en las células tratadas con LNPs vacías ($p = 0.004$) y LNPs-ARNm ($p = 0.002$) respecto al tratamiento con ARNm libre. Esta reducción también se observó a 2 $\mu\text{g/mL}$, al comparar las células incubadas con LNPs vacías ($p = 0.01$) y con LNPs-ARNm ($p = 0.008$) contra el grupo ARNm libre

(Figura 31). Estos hallazgos sugirieron que la partícula lipídica es el componente de la formulación correlacionado con la citotoxicidad observada en células tumorales.

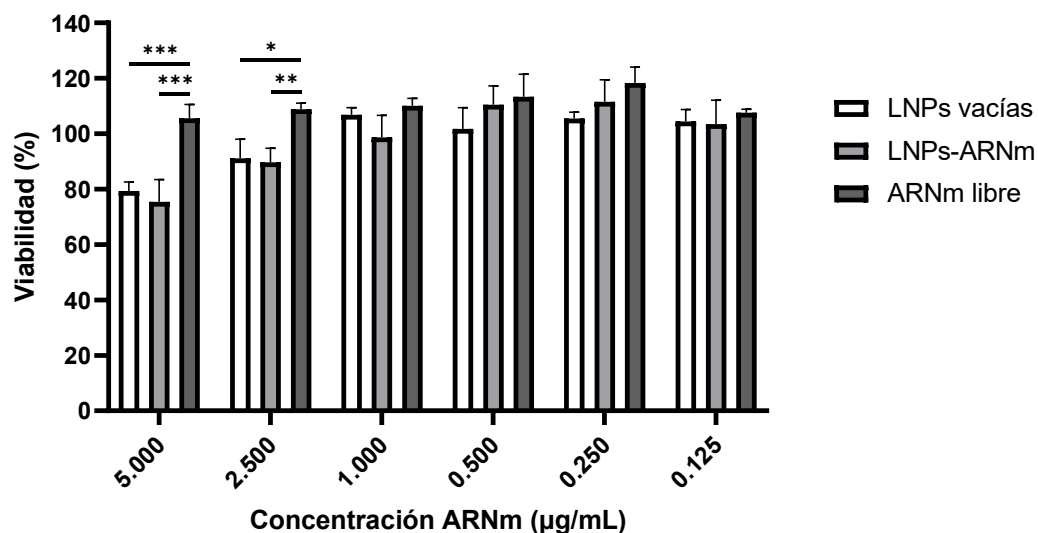


Figura 31. Comparación de las concentraciones entre tratamientos en células HeLa.

Las mediciones se realizaron por triplicado. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. La comparación entre tratamientos para cada concentración se efectuó con un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.005$. Fuente: elaboración propia.

En los fibroblastos humanos (células normales) no se apreciaron diferencias significativas en la viabilidad celular en ninguna concentración de los tres tratamientos (Figura 32). Se apreció una ligera reducción en la concentración más alta del tratamiento con LNP-ARNm, pero esta no fue significativa ($p = 0.465$).

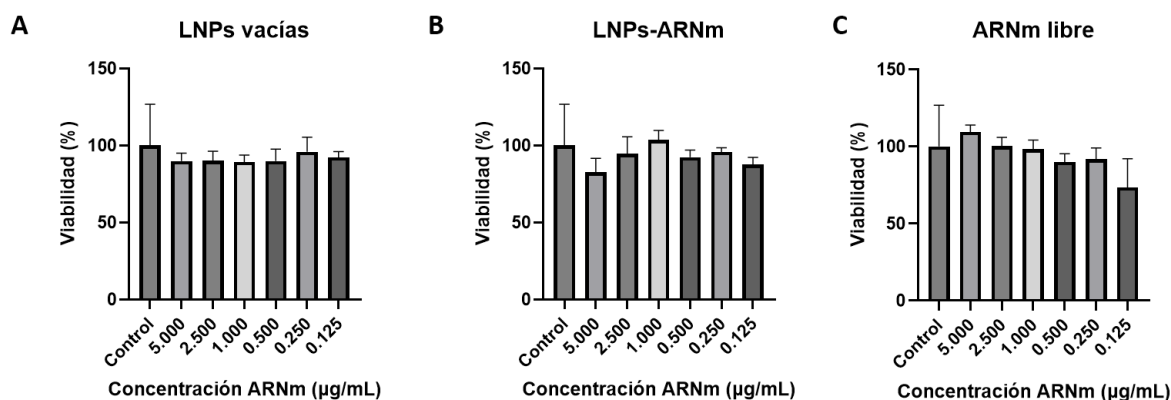


Figura 32. Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de la formulación en células HFF.

A. Viabilidad de las células tratadas con LNP-vacías. **B.** Viabilidad de las células tratadas con LNP-ARNm. **C.** Viabilidad de las células tratadas con ARNm GPC libre. Las mediciones se realizaron por

triplicado. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. La comparación de los diferentes tratamientos respecto al control se realizó con un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido de una prueba de Dunnett, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Fuente: elaboración propia.

La comparación entre tratamientos reveló que a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ existió una viabilidad menor en las células con LNPs vacías ($p = 0.026$) y LNPs-ARNm ($p = 0.006$) (Figura 33). Debido a que las comparaciones respecto al control de viabilidad celular no arrojaron diferencias significativas (Figura 32), esta reducción se atribuyó a que el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de ARNm libre fue incluso superior al del control (Figura 32C).

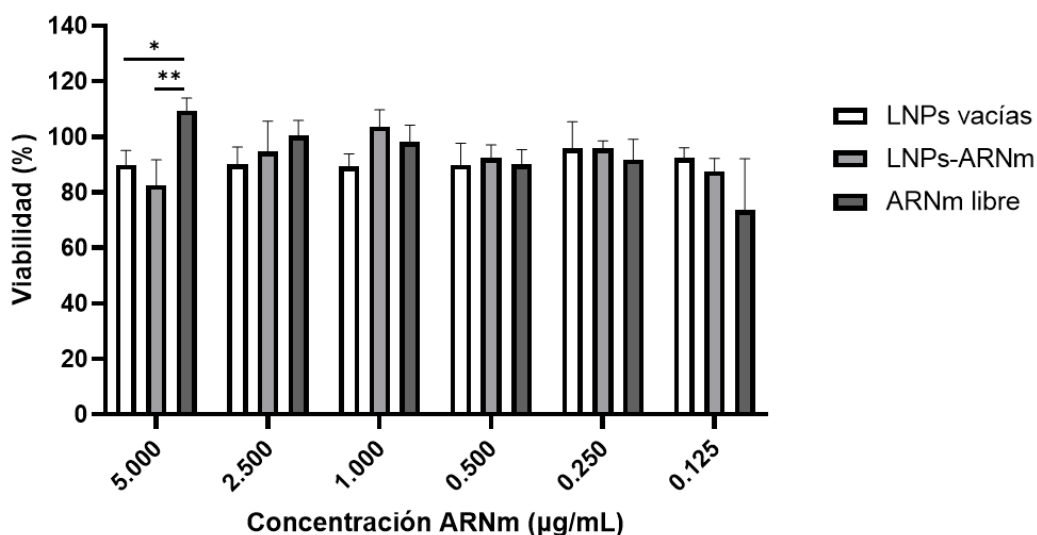


Figura 33. Comparación de las concentraciones entre tratamientos en células HFF.

Las mediciones se realizaron por triplicado. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. La comparación entre tratamientos para cada concentración se efectuó con un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$. Fuente: elaboración propia.

En conjunto, se observó que la naturaleza lipídica de la formulación tuvo un efecto negativo en la viabilidad celular de células tumorales a altas concentraciones. No obstante, la reducción fue inferior al 30 %, lo que indicó un bajo nivel de citotoxicidad del prototipo; además, este efecto no se observó en la línea celular normal, lo que respaldó el perfil de seguridad aceptable *in vitro*.

5.2.2.2. Evaluación de la actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

Después de comprobar la seguridad *in vitro* del prototipo, se procedió con la determinación de su actividad biológica, que consistió en verificar la expresión de los antígenos Gn/Gc en células de mamífero. El ensayo fue similar al de la funcionalidad, con la diferencia de que el tratamiento con los lotes de LNPs-ARNm se realizó mediante la adición directa a las células una cantidad ajustada de 500 ng de las suspensiones de partículas, sin utilizar reactivos de transfección. Para cuantificar la potencia relativa preliminar basada en expresión antigénica de la formulación, se definió como estándar de referencia interno al tratamiento con el complejo de transfección formado por la mezcla del ARNm GPC con el reactivo *Lipofectamine™ MessengerMAX™*.

Una vez finalizado el tiempo de incubación con los tratamientos, se recuperó el contenido proteico celular de cada uno, se separó por SDS-PAGE (Figura 34A), y se detectaron los antígenos Gn/Gc por *Western blot*. En la inmunodetección, se observó una banda entre los 63 kDa y 48 kDa en el estándar de referencia interno, y en los tratamientos con los lotes de LNPs-ARNm (Figura 34B), que correspondió con la glicoproteína Gc de 55 kDa. Este resultado demostró la funcionalidad de la formulación, evidenciándose una mayor intensidad de las bandas en los grupos tratados con LNPs-ARNm. La cuantificación de la expresión mostró que la expresión de los antígenos Gn/Gc inducida por las LNPs-ARNm fue 1.75 ± 0.09 mayor que el estándar de referencia interno (Figura 34C, Tabla 10, $p < 0.0001$), en concordancia con la mayor intensidad de las bandas observada en el *Western blot*. Este valor indicó que las LNPs, formuladas como sistema de transporte, entregaron el ARNm con mayor eficiencia que el reactivo de transfección.

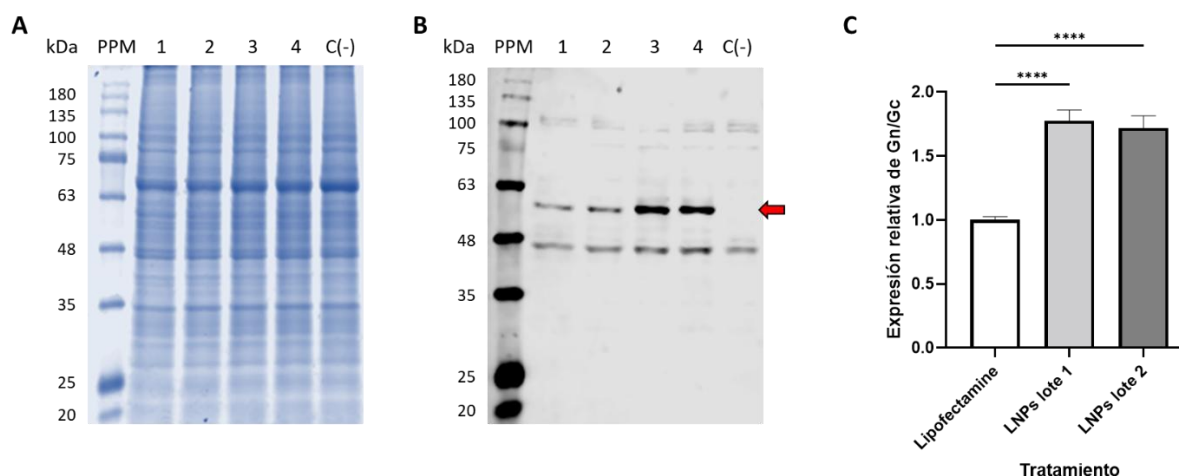


Figura 34. Evaluación de la expresión relativa *in vitro* de LNPs-ARNm.

A. SDS-PAGE al 10 % del contenido proteico de las células tratadas. **B.** Inmunodetección por *Western blot* de los antígenos Gn/Gc con el anticuerpo anti-Gc del hibridoma 20C1F10. La flecha roja indica la glicoproteína Gc detectada a los ~55 kDa. PPM: Patrón de peso molecular de proteínas AccuRuler RGB Plus 250 kDa (Maestrogen, Estados Unidos). 1-2: Estándar de referencia interno: lisado de células transfectadas con ARNm GPC y *Lipofectamine™ MessengerMAX™*. 3: Lisado de células tratadas con el lote 1 de LNPs-ARNm. 4: Lisado de células tratadas con el lote 2 de LNPs-ARNm. C(-): Control negativo. **C.** Cuantificación de la expresión relativa de los lotes, respecto al estándar de referencia interno. Las mediciones se realizaron por triplicado. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. La comparación de los diferentes tratamientos respecto al control se realizó con un ANOVA de una vía de muestras independientes, seguido de una prueba de Dunnett, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. ****: $p < 0.0001$. Fuente: elaboración propia.

Tabla 10. Cuantificación de la expresión relativa de las LNPs-ARNm.

No. Lote	Intensidad total	Intensidad del antígeno	Fracción del antígeno	Fracción estándar	Expresión relativa
1	$1.00 \cdot 10^6 \pm 7.53 \cdot 10^3$	$4.43 \cdot 10^4 \pm 1.75 \cdot 10^3$	0.044 ± 0.002	0.025	1.78 ± 0.08
2	$9.96 \cdot 10^5 \pm 6.68 \cdot 10^4$	$4.26 \cdot 10^4 \pm 9.92 \cdot 10^2$	0.043 ± 0.002	0.025	1.72 ± 0.10
Media	$9.98 \cdot 10^5$	$4.34 \cdot 10^4$	0.044	0.025	1.75
SD	$4.26 \cdot 10^4$	$1.58 \cdot 10^3$	0.002	0.001	0.09

Las mediciones se realizaron por triplicado, y los datos se expresaron como la media aritmética $\pm$ SD. Fuente: elaboración propia.

La caracterización biológica aportó evidencia preliminar de viabilidad celular favorable y confirmó la actividad biológica *in vitro* de las LNPs-ARNm. Estos resultados, junto con los atributos fisicoquímicos de la formulación, sustentaron la continuación de su evaluación inmunológica en el modelo animal.

5.3. Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio.

La dosis candidata del prototipo LNPs-ARNm se evaluó mediante un ensayo *in vivo* en hámster sirio, en el que se analizaron dos niveles de dosis administrados en un esquema de dos aplicaciones, y empleando la formulación basada en proteínas recombinantes (rGnGc adyuvado con Alhydrogel®) como control positivo (Figura 8). Esta evaluación incluyó el monitoreo de peso corporal y temperatura, el análisis de la respuesta humoral mediante cinética de anticuerpos en suero y determinación de títulos de anticuerpos totales y neutralizantes, y la caracterización de la respuesta celular mediante la expresión relativa de citocinas en los esplenocitos recuperados de los animales y expuestos al antígeno.

5.3.1. Monitoreo del peso corporal y la temperatura durante el experimento.

La primera etapa del análisis *in vivo* consistió en el monitoreo del peso corporal y la temperatura de los animales durante el periodo experimental. Estos parámetros fueron registrados con el propósito de realizar el seguimiento del estado general de los hámsteres tras la administración de las distintas formulaciones, y examinar posibles efectos de la inmunización sobre estas variables fisiológicas.

El peso corporal fue registrado de forma semanal durante el periodo experimental. Al inicio del estudio, los animales presentaron pesos entre 117 y 164 g. Con el fin de evaluar la evolución de esta variable fisiológica, se analizó su comportamiento a lo largo del tiempo en los distintos grupos experimentales. En general, todos los grupos mostraron una tendencia progresiva al aumento de peso, con excepción del grupo 5, en el que se observó una disminución gradual durante el seguimiento (Figura 35). Después de verificar la normalidad de los datos, se compararon los pesos iniciales y finales de cada grupo mediante una prueba t de *Student* para datos pareados, encontrándose que en los grupos 1-4 existió una tendencia a la ganancia de peso sin significancia estadística (Tabla 11). Mientras tanto, en el grupo 5 se identificó que el peso final de los animales fue menor al inicial ($p = 0.049$), y en el grupo 6 el aumento de peso fue significativo ($p = 0.001$).

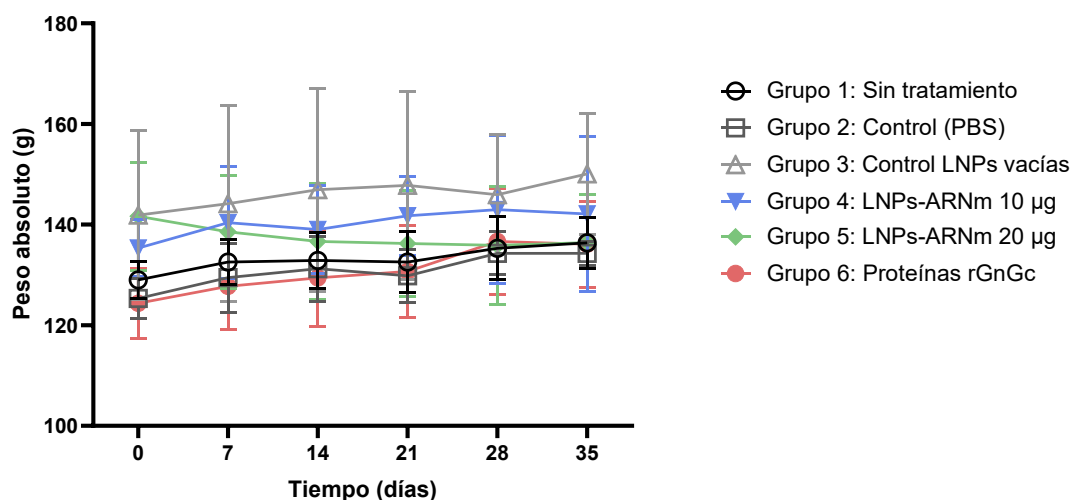


Figura 35. Ensayo en hámster sirio. Curso del peso absoluto en gramos.

Los animales ($n = 4$) asignados a los diferentes grupos de tratamiento recibieron las dosis en los días 0 y 14 por vía intramuscular. El gráfico muestra la dinámica del peso corporal absoluto (g) a lo largo del experimento. Los datos muestran la media aritmética $\pm$ SD. *Fuente: elaboración propia.*

Tabla 11. Ensayo en hámster sirio. Peso absoluto en gramos de cada grupo al inicio y final.

Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
0	129.0 $\pm$ 3.7	125.3 $\pm$ 3.9	141.9 $\pm$ 16.8	135.4 $\pm$ 5.8	141.7 $\pm$ 10.8	124.4 $\pm$ 7.0
35	136.4 $\pm$ 2.6	134.3 $\pm$ 2.3	150.1 $\pm$ 12.1	142.1 $\pm$ 15.4	136.4 $\pm$ 9.7	136.1 $\pm$ 8.6
p (t de Student)	0.064	0.059	0.063	0.268	0.049	0.001

Los datos de cada grupo ($n = 4$) corresponden a la media aritmética $\pm$ SD del peso absoluto al inicio (día 0) y final (día 35) del experimento. Las comparaciones entre ambos puntos temporales se realizaron mediante pruebas t de *Student* para datos pareados, con una significación estadística $\alpha = 0.05$. *Fuente: elaboración propia.*

Debido a la variabilidad observada en el peso inicial de los animales, los datos se expresaron como el peso relativo al basal de cada individuo (Figura 36). Este enfoque permitió comparar la evolución relativa del peso corporal entre los grupos experimentales, al reducir la influencia de las diferencias iniciales en el peso absoluto. A través del ANOVA de una vía se determinaron diferencias significativas en todos los puntos temporales (Tabla 12), y los análisis *post hoc* mostraron que el grupo 5 presentó una reducción significativa del cambio porcentual de peso en todos los puntos temporales respecto a los siguientes grupos:

- En el día 7: grupo 1 ($p = 0.048$) y grupo 6 ($p = 0.030$)
- En el día 14: grupo 2 ($p = 0.014$), grupo 3 ($p = 0.048$) y grupo 6 ($p = 0.027$)

- En el día 21: grupo 1 ($p = 0.023$), grupo 2 ($p = 0.009$), grupo 3 ($p = 0.005$), grupo 4 ($p = 0.002$) y grupo 6 ($p = 0.002$)
- En el día 28: grupo 2 ($p = 0.0003$) y grupo 6 ($p = 0.006$)
- En el día 35: grupo 2 ($p = 0.030$) y grupo 6 ($p = 0.007$).

Los otros grupos experimentales no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$). Estos resultados, junto con el análisis del peso absoluto, permitieron establecer que la administración de las distintas formulaciones no se asoció con una disminución del peso corporal en la mayoría de los grupos, en los que predominó una tendencia a la ganancia de peso. Sin embargo, el grupo 5, correspondiente a la dosis de 20 μg de LNPs-ARNm, no siguió este patrón, sino que presentó una disminución sostenida del peso corporal, cercana al 4 – 5 % respecto al basal, consistente con la reducción significativa observada entre el peso inicial y final de este grupo. De esta manera, este grupo fue la única condición en la que el seguimiento del peso corporal mostró una desviación sostenida respecto a la tendencia observada en los demás grupos experimentales.

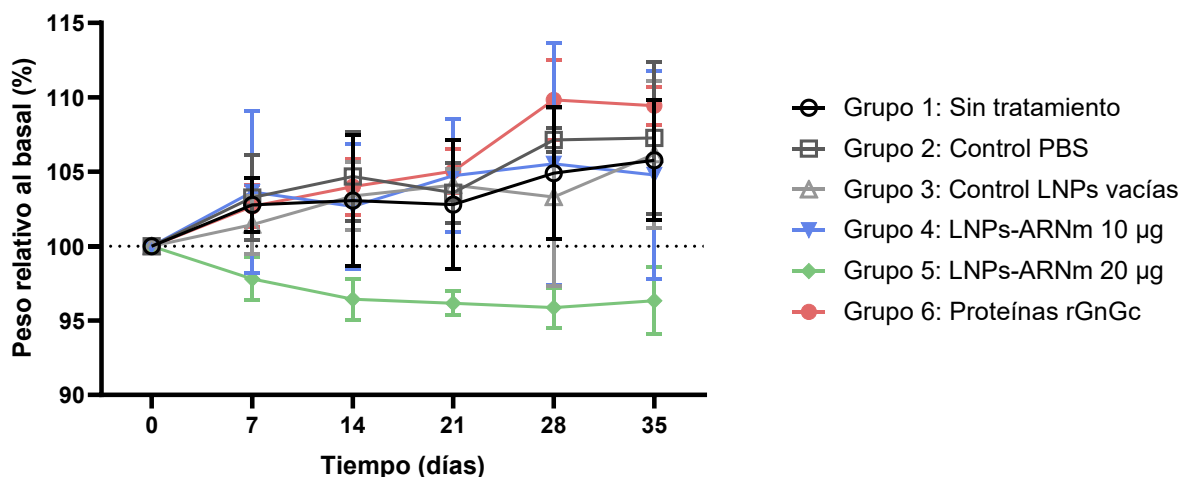


Figura 36. Ensayo en hámster sirio. Peso corporal relativo al basal en función del tiempo.

Los animales ($n = 4$) asignados a los diferentes grupos de tratamiento recibieron las dosis en los días 0 y 14 por vía intramuscular. El gráfico muestra la dinámica temporal del cambio porcentual del peso respecto al peso inicial de cada animal. Los datos indican la media aritmética $\pm$ SD. *Fuente: elaboración propia.*

Tabla 12. Ensayo en hámster sirio. Peso corporal relativo al valor basal por grupo.

Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	ANOVA F (p)
0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	-
7	102.8 ± 1.8	103.3 ± 2.8	101.4 ± 1.9	103.6 ± 5.4	97.8 ± 1.5	102.7 ± 1.4	0.023
14	103.1 ± 4.4	104.7 ± 3.0	103.4 ± 2.3	102.7 ± 4.2	96.4 ± 1.4	104.0 ± 1.9	0.016
21	102.8 ± 4.3	103.6 ± 2.0	104.1 ± 1.1	104.7 ± 3.8	96.2 ± 0.8	105.0 ± 1.5	0.001
28	104.9 ± 4.4	107.1 ± 0.8	103.3 ± 6.0	105.5 ± 8.1	95.9 ± 1.3	109.8 ± 2.7	0.035
35	105.8 ± 4.0	107.3 ± 5.1	106.2 ± 4.9	104.8 ± 7.0	96.3 ± 2.3	109.4 ± 1.3	0.013

Los datos muestran la media aritmética ± SD del cambio porcentual del peso por grupo experimental (n = 4). Los grupos se compararon a través de un ANOVA de una vía, y una prueba *post hoc* de Tukey o Dunnett según el cumplimiento de homocedasticidad de los datos grupales. La significación estadística empleada fue $\alpha = 0.05$. *Fuente: elaboración propia.*

La temperatura corporal se evaluó como una segunda variable fisiológica de seguimiento durante el ensayo *in vivo*. Este registro permitió evaluar posibles variaciones térmicas asociadas a la administración de las distintas formulaciones y complementar el análisis del estado general de los animales. En esta evaluación se incluyó el día -1, correspondiente al registro basal obtenido durante la toma de muestra sanguínea previa al inicio del esquema de inmunización, realizada un día antes de la primera inoculación. Por tanto, este punto se consideró como una medición preinmunización y no como parte del seguimiento posterior a la administración de las formulaciones.

Durante el curso temporal del experimento, la temperatura corporal de los animales se mantuvo dentro del rango fisiológico descrito para hámster sirio (36.0 – 39.0 °C) (Zhugunissov et al., 2021). Sin embargo, se registraron disminuciones puntuales en los días asociados a la toma de muestra sanguínea (-1, 6, 13, 20 y 27 y 34), lo que se atribuyó al efecto hipotérmico de la anestesia empleada durante el procedimiento (Figura 37).

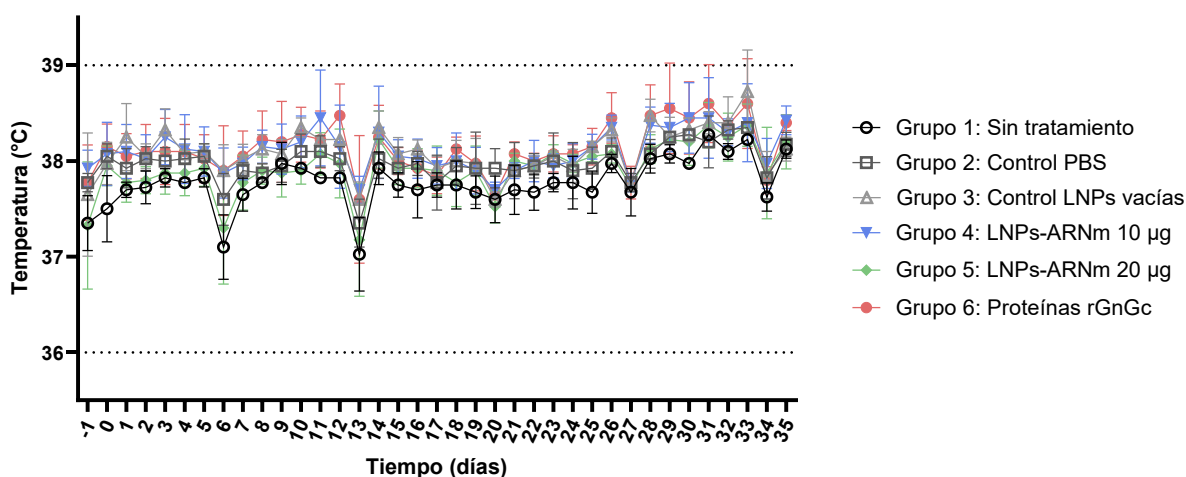


Figura 37. Ensayo en hámster sirio. Dinámica de la temperatura corporal.

Los animales ($n = 4$) asignados a los diferentes grupos de tratamiento recibieron las dosis en los días 0 y 14 por vía intramuscular. El gráfico muestra la relación entre la temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) y el tiempo por cada grupo experimental. Los valores indican la media aritmética $\pm$ SD. *Fuente: elaboración propia.*

Para el análisis estadístico de la temperatura corporal, se realizaron comparaciones pareadas dentro de cada grupo experimental. En primer lugar, se compararon los valores iniciales y finales del seguimiento (día 0 vs día 35), con el propósito de evaluar variaciones globales durante el período experimental. Además, se compararon las mediciones realizadas antes y después de la administración de las formulaciones (día 0 vs día 1 y día 14 vs día 15), a fin de examinar posibles cambios térmicos agudos asociados a la inmunización. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk, y las comparaciones intragrupo se realizaron mediante pruebas t de Student para medidas repetidas. En la comparación entre los valores iniciales y finales del seguimiento, no se detectaron diferencias con significancia estadística en ninguno de los grupos evaluados (Tabla 13). Del mismo modo, las comparaciones antes y después de las inoculaciones tampoco mostraron diferencias significativas. Por tanto, no se evidenciaron variaciones térmicas globales ni cambios agudos atribuibles a la inmunización.

Tabla 13. Ensayo en hámster sirio. Comparación de la temperatura entre días.

Días comparados	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Diferencia 0 vs. 35 (p)	0.625 (0.053)	0.125 (0.141)	0.150 (0.057)	0.350 (0.241)	0.250 (0.063)	0.250 (0.063)
Diferencia 0 vs. 1 (p)	0.200 (0.343)	-0.125 (0.342)	0.275 (0.102)	0.025 (0.873)	-0.175 (0.256)	-0.100 (0.092)
Diferencia 14 vs. 15 (p)	-0.175 (0.070)	-0.100 (0.252)	-0.275 (0.195)	-0.250 (0.269)	-0.300 (0.114)	-0.250 (0.080)

Las métricas representan las diferencias de medias térmicas (°C) entre los días evaluados, y los valores p respectivos se detallan entre paréntesis. Estos niveles de significación estadística se calcularon con pruebas t de *Student* para datos pareados ($\alpha = 0.05$). Fuente: elaboración propia.

La comparación entre grupos en cada punto temporal se realizó tras verificar la normalidad de los datos, empleando ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey. Este análisis mostró diferencias globales entre grupos en los días 0, 1 y 35 (Tabla 14). En el día 0, la prueba de Tukey identificó una diferencia significativa entre el grupo 1 y el grupo 6 ($p = 0.022$), mientras que en el día 1 se detectó una diferencia entre el grupo 1 y el grupo 3 ($p = 0.047$). En ambos casos, las diferencias correspondieron a variaciones puntuales de baja magnitud y dentro del rango fisiológico descrito para la especie. En el día 35, aunque el ANOVA mostró diferencias globales entre grupos ($p = 0.041$), el análisis post hoc de Tukey no identificó diferencias significativas en ninguna comparación pareada ($p > 0.05$). Por tanto, no se observó un patrón sostenido de variación térmica entre grupos durante el seguimiento.

Tabla 14. Ensayo en hámster sirio. Comparación de la temperatura entre grupos.

Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	ANOVA F (p)
0	37.5 ± 0.3	38.1 ± 0.1	38.0 ± 0.2	38.1 ± 0.3	38.0 ± 0.2	38.2 ± 0.2	3.266 (0.028)
1	37.7 ± 0.1	37.9 ± 0.2	38.3 ± 0.4	38.1 ± 0.3	37.8 ± 0.2	38.1 ± 0.2	2.929 (0.042)
14	37.9 ± 0.2	38.0 ± 0.2	38.4 ± 0.2	38.3 ± 0.5	38.2 ± 0.3	38.3 ± 0.3	1.251 (0.327)
15	37.8 ± 0.1	37.9 ± 0.2	38.1 ± 0.2	38.1 ± 0.2	37.9 ± 0.2	38.0 ± 0.1	1.909 (0.143)
35	38.1 ± 0.1	38.2 ± 0.1	38.1 ± 0.1	38.4 ± 0.2	38.2 ± 0.3	38.4 ± 0.1	2.947 (0.041)

La información muestra la media aritmética ± SD de la temperatura corporal (°C) de cada grupo en los días evaluados. La comparación entre grupos se efectuó mediante ANOVA de una vía y pruebas post hoc de Tukey, con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Fuente: elaboración propia.

El análisis conjunto de peso corporal y temperatura mostró que el seguimiento fisiológico de los animales no evidenció alteraciones generalizadas durante el ensayo. La desviación observada en el peso corporal se restringió al grupo 5, mientras que la

temperatura se mantuvo dentro del rango fisiológico, con diferencias puntuales entre grupos que no siguieron un patrón temporal sostenido. Por ello, los cambios registrados en estas variables no indicaron un efecto sistémico generalizado de la inmunización bajo las condiciones evaluadas.

5.3.2. Caracterización de la respuesta humoral estimulada por la formulación vacunal.

La respuesta humoral inducida por las inmunizaciones con las diferentes dosis del prototipo vacunal y el control positivo se evaluó mediante la cuantificación del nivel de inmunoglobulinas G anti-Gn/Gc presentes en los sueros de los animales. En primer lugar, se analizó la cinética de producción de anticuerpos totales a lo largo del experimento, y posteriormente se establecieron los títulos de IgG totales y neutralizantes en los puntos temporales correspondientes a la máxima respuesta humoral.

5.3.2.1. Evaluación del curso temporal de la producción de anticuerpos anti-Gn/Gc.

Los niveles de anticuerpos anti-Gn/Gc en los sueros colectados cada semana se determinaron mediante ELISA indirecto, utilizando las proteínas rGnGc como antígeno de recubrimiento. El curso temporal de la respuesta humoral (Figura 38) mostró que ambas dosis del prototipo de ARNm estimularon la producción de anticuerpos de forma similar, con una baja respuesta inicial en el día 7, seguida de un incremento en el día 21, una semana después de la segunda dosis. En el día 28 se apreció un descenso en los niveles de anticuerpos, y un posterior aumento en el día 35. Los animales inmunizados con el control positivo también mostraron una leve respuesta en el día 7, y en el día 21 se observó un incremento exponencial en los niveles de anticuerpos, hasta alcanzar el máximo en el día 35.

El ANOVA de dos vías mostró que los efectos de los factores tiempo ($p < 0.0001$) y grupo experimental ($p < 0.0001$), así como de la interacción tiempo*grupo ($p < 0.0001$) fueron significativos. Al día 21 la respuesta de IgG fue mayor que el control PBS (Grupo 2) para las inmunizaciones con 10 μg de ARNm ($p < 0.0001$), 20 μg de ARNm ($p <$

0.0001), y rGnGc ($p < 0.0001$). La comparación contra el grupo 2 en el día 28 también reveló una respuesta estadísticamente superior en los grupos 4 ($p = 0.003$), 5 ($p = 0.013$), y 6 ($p < 0.0001$). Una tendencia similar se apreció en el término del experimento, donde se detectaron diferencias significativas respecto al placebo en las dosis de 10 μg ($p < 0.0001$) y 20 μg de ARNm ($p < 0.0001$), así como en el control positivo ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas en los demás puntos temporales para ninguno de los grupos, de manera que los días 21 y 35 se identificaron como los de mayor respuesta humoral.

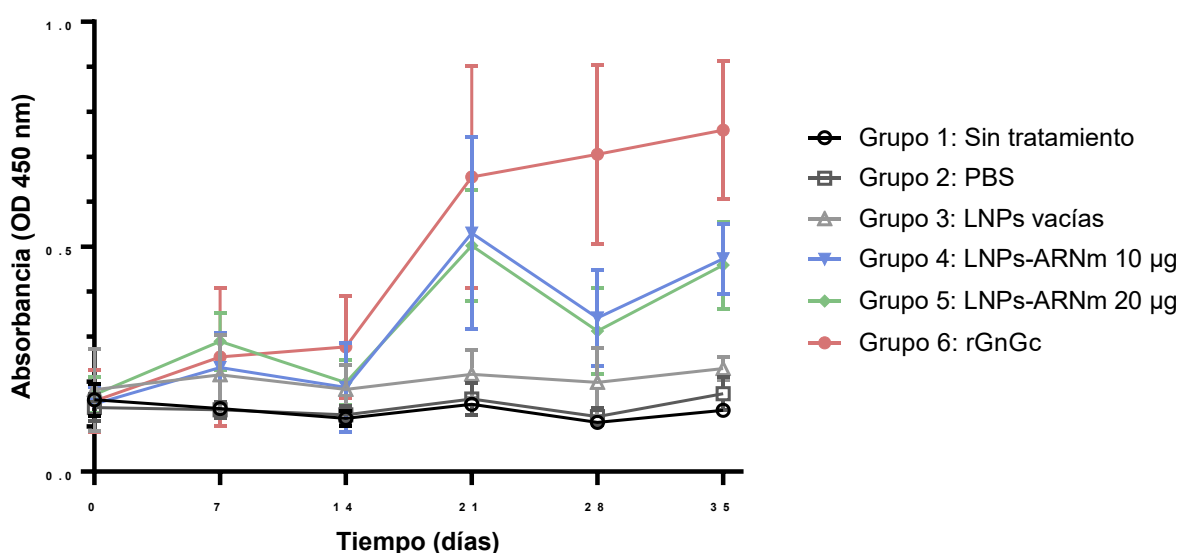


Figura 38. Curso temporal de los niveles de IgG anti-Gn/Gc estimados por el prototipo vacunal. Los niveles plasmáticos de anticuerpos anti-Gn/Gc se establecieron mediante ELISA indirecto a partir de las muestras semanales. Los puntos temporales indicados corresponden al calendario nominal de seguimiento, debido a que la recolección sanguínea se realizó un día antes de cada punto semanal para evitar su coincidencia con las inmunizaciones. Los datos se presentan como la media aritmética $\pm$ SD en cada punto temporal, y las medias se conectaron entre tiempos para ilustrar la dinámica de la respuesta humoral. *Fuente: elaboración propia.*

5.3.2.2. Determinación del título de anticuerpos totales.

El título de anticuerpos totales anti-Gn/Gc se determinó por ELISA indirecto en los días nominales 21 y 35, en los que se evidenció la mayor respuesta humoral inducida por las formulaciones evaluadas. El título se definió como el recíproco de la última dilución cuya absorbancia fue mayor que el doble del fondo. En este caso, el fondo fue la absorbancia producida por el plasma del control negativo (grupo placebo), a la

dilución correspondiente. Los títulos individuales se expresaron como GMT con sus respectivos IC 95 %. El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del factor grupo ($F = 4.749$, $p = 0.039$), mientras que no se detectó un efecto significativo del tiempo ($F = 2.026$, $p = 0.188$) ni de la interacción grupo*tiempo ($F = 3.996$, $p = 0.057$). El análisis *post hoc* de Tukey confirmó que no existieron diferencias significativas entre los días 21 y 35 dentro de cada grupo experimental ($p > 0.05$). Estos resultados indicaron que las diferencias en los títulos dependieron del grupo evaluado, sin variaciones temporales significativas entre los puntos analizados. Al día 21, se cuantificó un GMT de 40.53 para la dosis de 10 μg de ARNm, de 49.28 para la dosis de 20 μg de ARNm, y de 90.89 para el control positivo (Figura 39), sin observarse diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.500$). Para el día 35, los GMT fueron de 14.97 para la dosis de 10 μg de ARNm, 14.46 para la dosis de 20 μg de ARNm y 228.65 para el control positivo (Figura 39). En este punto, el título de anticuerpos inducido por la inmunización con rGnGc fue significativamente mayor que el registrado con 10 μg ($p = 0.007$) y 20 μg de ARNm ($p = 0.005$).

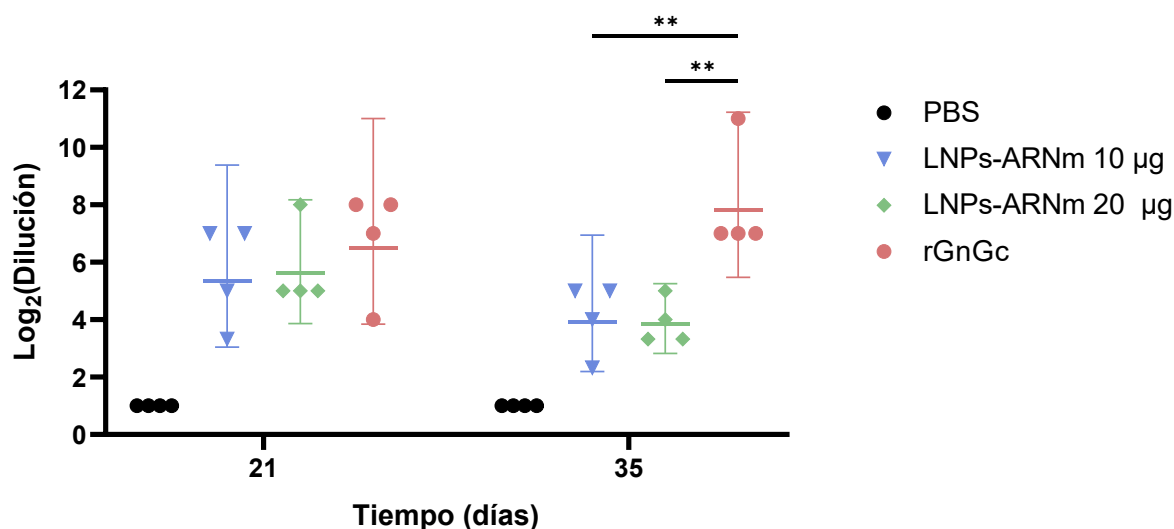


Figura 39. Título de anticuerpos anti-Gn/Gc totales estimulados por el prototipo vacunal.

Títulos de anticuerpos totales determinados en los días 21 y 35. El gráfico muestra como puntos a los títulos de cada animal según el grupo, y las líneas indican GMT $\pm$ IC 95 % de los grupos. La influencia de las variables tiempo y grupo se analizaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de una prueba de Tukey para identificar diferencias entre tratamientos en ambos tiempos. Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. **: $p < 0.01$. *Fuente: elaboración propia.*

5.3.2.3. Cuantificación del título de anticuerpos neutralizantes.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes también se calcularon en los días nominales 21 y 35, a través de un ensayo de neutralización con un vector lentiviral pseudotipado con las glicoproteínas Gn/Gc en su superficie. El título de anticuerpos neutralizantes se definió como la última dilución que neutralizó todas las partículas virales, es decir, en la que no se observó fluorescencia. El ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo del factor grupo ($F = 2.867$, $p = 0.109$), del tiempo ($F = 2.764$, $p = 0.131$) ni de la interacción grupo*tiempo ($F = 3.817$, $p = 0.063$). El análisis *post hoc* de Tukey confirmó que no existieron diferencias significativas entre los días 21 y 35 dentro de cada grupo experimental. Al día 21, los GMT de anticuerpos neutralizantes fueron de 23.57 para 10 μg y 23.05 para 20 μg de ARNm, así como de 32.22 para el control positivo (Figura 40), sin evidencia de diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.800$). Respecto al día 35, los GMT fueron de 9.51 para 10 μg de ARNm, 7.14 para 20 μg de ARNm y 66.81 para el control positivo (Figura 40). En este punto temporal, el análisis de Tukey identificó diferencias significativas entre los grupos, con un título inducido por rGnGc superior al observado para 10 μg ($p = 0.0298$) y 20 μg de ARNm ($p = 0.0128$).

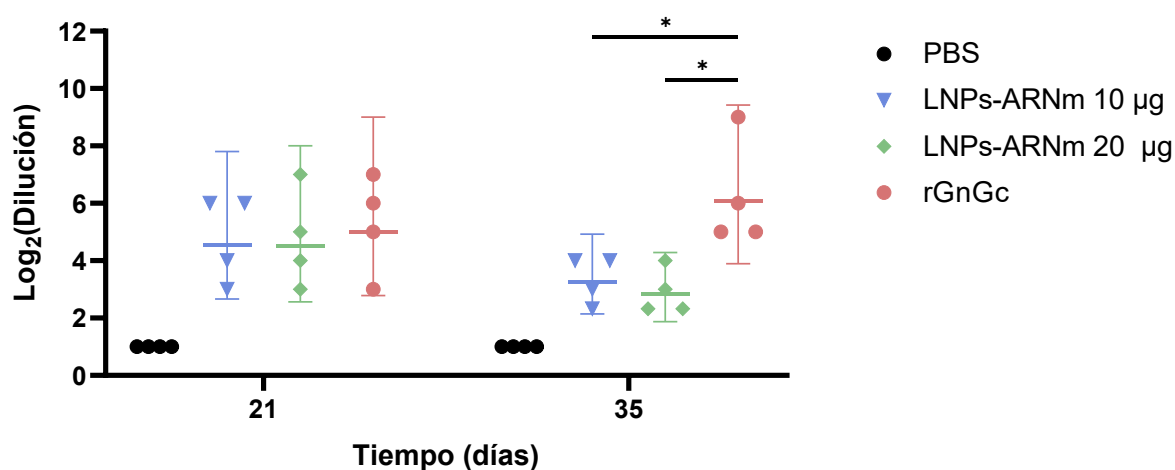


Figura 40. Título de anticuerpos neutralizantes anti-Gn/Gc estimulados por el prototipo vacunal.

Títulos de anticuerpos neutralizantes determinados en los días 21 y 35. El gráfico muestra como puntos a los títulos de cada animal según el grupo, y las líneas indican GMT $\pm$ IC 95 % de los grupos. La influencia de las variables tiempo y grupo se analizaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de pruebas de Tukey para identificar diferencias entre tratamientos en ambos tiempos, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. *: $p < 0.05$. Fuente: elaboración propia.

Los datos del curso temporal y de la cuantificación de títulos de anticuerpos totales y neutralizantes mostraron que el prototipo LNPs-ARNm indujo una respuesta humoral específica y funcional. En términos inmunológicos, ambas dosis de ARNm indujeron anticuerpos totales y neutralizantes, sin diferencias significativas frente al control positivo en el día 21 y sin que la dosis de 20 μg mostrara una ventaja sobre 10 μg . Sin embargo, esta respuesta no se mantuvo hacia el final del experimento, ya que en el día 35 los grupos inmunizados con ARNm presentaron una disminución de los títulos, mientras que el control positivo alcanzó valores superiores. Estos resultados, junto con el perfil de peso corporal, respaldaron la selección de 10 μg como la dosis candidata para estudios posteriores bajo el esquema evaluado.

5.3.3. Caracterización de la respuesta celular estimulada por la formulación vacunal.

La respuesta celular inducida por las formulaciones vacunales se evaluó al final del ensayo mediante el análisis de la expresión relativa de citocinas en esplenocitos recuperados de los animales y estimulados *ex vivo* con el antígeno rGnGc. La expresión de cada citocina fue normalizada frente a Rib18 y calibrada respecto a la condición sin estimular de cada grupo, definida como valor basal teórico de 1. Esta aproximación permitió examinar la capacidad de los distintos grupos experimentales para inducir una respuesta celular específica, considerando la expresión de citocinas asociadas a la activación inmunitaria y a la polarización funcional de la respuesta. Para ello, se analizaron IFN- γ e IL-12 como marcadores vinculados a un perfil de expresión de citocinas compatible con una orientación Th1, IL-4 como citocina asociada a un perfil Th2 e IL-6 como marcador de activación proinflamatoria.

En primer lugar, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La expresión de cada grupo estimulado se comparó frente a su condición sin estimular mediante una prueba t de una muestra, con el propósito de determinar si la estimulación con rGnGc incrementó la expresión relativa de cada citocina. Además, las diferencias entre grupos se evaluaron mediante ANOVA de una vía para muestras independientes, seguido de la prueba post hoc de Dunnett frente al grupo PBS.

En el caso de IFN- γ , la estimulación con rGnGc incrementó la expresión relativa en los grupos LNPs vacías ($p = 0.004$), LNPs-ARNm 10 μg ($p = 0.004$), LNPs-ARNm 20 μg ($p = 0.004$) y rGnGc ($p = 0.004$), respecto a sus respectivas condiciones sin estimular. El ANOVA de una vía mostró diferencias entre grupos ($F = 54.78$, $p < 0.0001$), y la prueba de Dunnett identificó una expresión superior a PBS en los grupos LNPs-ARNm 10 μg ($p = 0.004$), LNPs-ARNm 20 μg ($p = 0.0167$) y rGnGc ($p < 0.0001$).

La evaluación de IL-12 mostró un aumento de la expresión relativa respecto al basal en los grupos LNPs-ARNm 10 μg ($p = 0.032$), LNPs-ARNm 20 μg ($p = 0.009$) y rGnGc ($p = 0.0002$). El ANOVA de una vía mostró diferencias entre grupos ($F = 15.63$, $p < 0.0001$), mientras que el análisis de Dunnett identificó una expresión superior a PBS en el grupo rGnGc ($p < 0.0001$) y una tendencia al aumento en los grupos LNPs-ARNm, sin significancia estadística frente al control negativo.

Respecto de IL-4, la expresión relativa fue superior al basal en los grupos PBS ($p = 0.027$), LNPs-ARNm 20 μg ($p = 0.046$) y rGnGc ($p = 0.009$). El ANOVA de una vía mostró diferencias entre grupos ($F = 4.52$, $p = 0.002$), y la prueba de Dunnett identificó una expresión superior a PBS solo en el grupo rGnGc ($p = 0.048$).

El análisis de IL-6 mostró un aumento de la expresión relativa respecto al basal en los grupos LNPs vacías ($p = 0.008$), LNPs-ARNm 10 μg ($p = 0.012$), LNPs-ARNm 20 μg ($p < 0.0001$) y rGnGc ($p = 0.001$). El ANOVA de una vía mostró diferencias entre grupos ($F = 7.33$, $p < 0.0001$), y el análisis de Dunnett identificó una expresión superior a PBS en los grupos LNPs-ARNm 10 μg ($p = 0.011$), LNPs-ARNm 20 μg ($p = 0.002$) y rGnGc ($p = 0.016$).

El perfil de expresión de citocinas mostró que las formulaciones LNPs-ARNm indujeron una respuesta celular detectable tras la estimulación *ex vivo* con rGnGc, caracterizada por el aumento de IFN- γ e IL-6 respecto al grupo PBS. Este comportamiento sugiere una activación celular con componente tipo Th1 e inflamatorio, junto con una tendencia al aumento de IL-12. En el caso de IL-4, las formulaciones de ARNm no mostraron incremento significativo frente a PBS, a diferencia de lo observado en el control positivo. La comparación entre las dosis de 10 y 20 μg de ARNm no evidenció un efecto dosis, ya que ambas exhibieron un patrón de respuesta comparable en las citocinas evaluadas. Por su parte, el control positivo rGnGc presentó una respuesta de mayor

amplitud, con aumento significativo de IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-6 respecto a PBS bajo las condiciones evaluadas. De esta manera, las formulaciones basadas en ARNm promovieron una respuesta celular específica, aunque menos extendida que la inducida por la formulación proteica adyuvada.

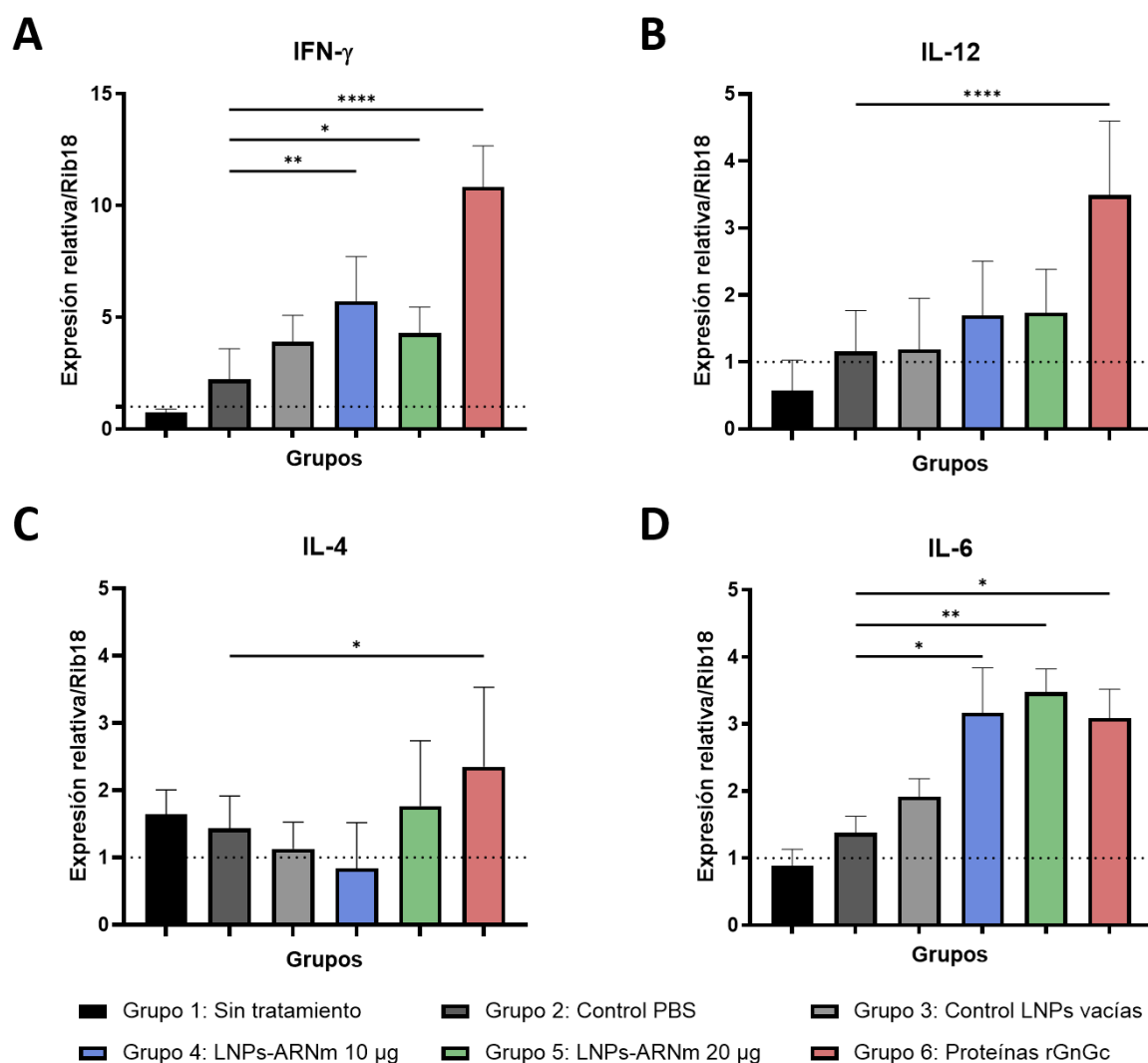


Figura 41. Expresión relativa de citocinas en esplenocitos estimulados con el antígeno rGnGc. **A.** Expresión relativa de IFN- γ . **B.** Expresión relativa de IL-12. **C.** Expresión relativa de IL-4. **D.** Expresión relativa de IL-6. Los valores fueron normalizados frente a Rib18 y calibrados respecto a la condición sin estimular, representada por la línea punteada en $y = 1$. Las barras representan la media aritmética $\pm$ SD. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante ANOVA de una vía para muestras independientes, y pruebas *post hoc* de Dunnett frente al grupo PBS. Se consideró un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$. Fuente: elaboración propia.

La evaluación integrada del seguimiento fisiológico y de las respuestas inmunitarias permitió definir en 10 µg la dosis más adecuada para el prototipo vacunal bajo las condiciones evaluadas. El monitoreo de peso corporal y temperatura no evidenció alteraciones generalizadas asociadas a la inmunización, aunque en la dosis de 20 µg se observó una disminución sostenida del peso corporal. En términos inmunológicos, ambas dosis de ARNm indujeron anticuerpos totales y neutralizantes, con una respuesta comparable al control positivo en el día 21, pero sin que la dosis alta mostrara una ventaja sobre 10 µg. Hacia el final del ensayo, la formulación proteica adyuvada presentó una respuesta humoral más sostenida y una activación celular de mayor amplitud. No obstante, el prototipo LNPs-ARNm de 10 µg indujo respuesta humoral, capacidad neutralizante y activación celular detectable, sin evidenciar un beneficio adicional asociado al aumento de dosis. Bajo estas condiciones experimentales, los resultados permitieron establecer 10 µg como la dosis candidata del prototipo de ARNm en el modelo estudiado.

VI. DISCUSIÓN

El Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus, causado por el virus Andes, representa una amenaza crítica de salud pública en el Cono Sur debido a su alta letalidad y a su capacidad única de transmisión interhumana (Alonso et al., 2020). La ausencia de vacunas aprobadas y antivirales específicos contra ANDV continúa siendo un desafío importante, pese a que diversas plataformas vacunales han mostrado resultados promisorios en modelos preclínicos (Chai et al., 2025). Ante este escenario, la búsqueda de plataformas de inmunización efectivas constituye una prioridad epidemiológica urgente. En este contexto, la tecnología de ARN mensajero surge como una alternativa disruptiva que revolucionó recientemente la industria farmacéutica por la rapidez y versatilidad de su producción (Barbier et al., 2022). La validación masiva de esta plataforma durante la pandemia de COVID-19, en la cual se evidenció su capacidad crítica para mitigar la enfermedad grave y la mortalidad, desencadenó un cambio de paradigma global (Chaudhary et al., 2021). Este hito durante una situación de emergencia impulsó el desarrollo de diversos prototipos dirigidos contra enfermedades infecciosas, varios de los cuales se encuentran actualmente en ensayos clínicos, mientras que otros han obtenido aprobación regulatoria (Žak y Zangi, 2025).

El desarrollo de un candidato vacunal eficaz mediante esta tecnología requiere abordar tres variables críticas que determinan la funcionalidad del prototipo: la estabilidad y capacidad de traducción del ARN, la modulación de la respuesta inmune innata y la eficiencia de entrega intracelular del transcrito (S. C. Kim et al., 2022; Paroor et al., 2025). La primera variable puede modularse mediante el diseño de la secuencia del transcrito, que comprende la optimización del marco de lectura abierto del antígeno, la selección adecuada de las regiones no traducidas (UTRs) y la incorporación de la caperuza 5' y la cola poli(A) (S. C. Kim et al., 2022). Estas estrategias no solo mejoran la estabilidad y la traducción del ARN, sino que también contribuyen a reducir su reconocimiento por sensores citoplasmáticos de inmunidad innata, ya que determinadas modificaciones nucleosídicas atenúan la activación de vías moleculares capaces de inhibir la síntesis proteica (Verbeke et al., 2022). Finalmente, el rendimiento de la plataforma depende de las propiedades fisicoquímicas del sistema de entrega, el

cual debe proteger al principio activo frente a la degradación enzimática, favorecer su captación por las células diana y facilitar la liberación endosomal del transcrito (Paroor et al., 2025). La evaluación analítica de estos factores permite identificar los mecanismos que condicionan la funcionalidad del inmunógeno.

Diseñar una formulación vacunal que contenga como principio activo el ARN mensajero de las proteínas Gn/Gc del virus Andes, obtenido mediante síntesis *in vitro*.

El primer objetivo de esta investigación correspondió al establecimiento de la formulación vacunal, iniciando con el diseño y la construcción del molde de ADN empleado en la IVT. Cada uno de los elementos que componen esta estructura cumple una función específica en la estabilidad y eficiencia de traducción del transcrito, en consecuencia, su diseño resulta fundamental para optimizar ambas variables. En este sentido, la selección del antígeno constituye el punto de partida para inducir una respuesta inmune robusta y protectora (Yang et al., 2022). Las glicoproteínas Gn/Gc fueron seleccionadas como antígenos del candidato vacunal debido a su relevancia inmunológica y a su papel central en la infectividad del virus. Estas proteínas contienen determinantes estructurales conservados que participan en procesos esenciales para la entrada viral, y las alteraciones en dichas regiones pueden reducir la capacidad infectiva del ANDV (Mittler et al., 2023). Dicha dependencia funcional limita la variabilidad de dominios críticos para la infección, lo que favorece la generación de anticuerpos dirigidos contra regiones funcionalmente relevantes de las glicoproteínas Gn/Gc (Engdahl et al., 2023). Por ello, su incorporación en la formulación vacunal resulta consistente con los principios del diseño racional de antígenos virales, que priorizan proteínas de superficie involucradas en funciones esenciales de entrada como principales objetivos de la respuesta neutralizante protectora (Byrne y McLellan, 2022).

Una vez definido el antígeno de interés, en la construcción del ADN molde se incorporó el segmento M completo del genoma viral, que codifica el precursor GPC. Esta estrategia reproduce de manera más cercana la forma en que las glicoproteínas virales son generadas durante la infección, y en plataformas basadas en ARNm, permite que la síntesis y el procesamiento del inmunógeno ocurran dentro de las células

del hospedante (S. C. Kim et al., 2022; Serris et al., 2020). De este modo, la utilización del segmento M como unidad de expresión permitió la generación coordinada de Gn/Gc a partir de un único transcrito. La pertinencia de esta aproximación se encuentra respaldada por diversos antecedentes experimentales: los principales candidatos vacunales desarrollados contra el ANDV, incluyendo plataformas de ADN plasmídico, subunidades proteicas y ARNm, utilizan el segmento M o el precursor GPC como inmunógeno (Tabla 1), evidenciando una convergencia metodológica en la selección de este antígeno. En particular, el candidato basado en subunidades proteicas desarrollado por Starck-Mendez (2020), construido a partir de la misma secuencia utilizada en este estudio (Chile-9717869; GenBank: AF291703.2), indujo respuestas humorales y celulares robustas en hámsteres. Adicionalmente, este registro corresponde a la misma secuencia codificante de GPC utilizada por Kuzmin et al. (2024) en el candidato vacunal de ARNm. En conjunto, estos antecedentes sustentan el uso de este segmento M como base del molde de ADN para la generación del transcrito correspondiente.

Además de la secuencia codificante, las regiones no traducidas son otros elementos que determinan el desempeño funcional del ARNm. La eficiencia de traducción del ARNm está influenciada por la arquitectura de las UTRs, las cuales modulan tanto la accesibilidad del ribosoma al transcrito como la estabilidad del mensajero en el citoplasma. En consecuencia, las UTRs incorporadas en el molde de ADN influyen en la expresión de la proteína codificada en plataformas de ARNm (Jin et al., 2025). La selección de las UTRs se basó en estructuras previamente optimizadas descritas en la patente de Stewart-Jones (2021), desarrolladas para equilibrar eficiencia de traducción y estabilidad del transcrito en sistemas de expresión eucariota. La 5'-UTR consistió en un diseño sintético orientado a favorecer la iniciación de la traducción mediante la reducción de estructuras secundarias inhibitorias y la facilitación del escaneo ribosomal, características asociadas a una mayor eficiencia de reclutamiento del complejo de iniciación (Pan et al., 2025). Por su parte, la 3'-UTR seleccionada deriva de la β -globina humana, que ha sido ampliamente utilizada como elemento estabilizador en constructos de ARNm debido a su contribución a la protección del transcrito frente a procesos de degradación y a la prolongación de su disponibilidad (Orlandini von

Niessen et al., 2019). La combinación de ambos elementos refleja una estrategia de diseño orientada a optimizar de forma simultánea la iniciación de la traducción y la estabilidad del mensajero, lo que se ha asociado con una mayor eficiencia de expresión de la proteína codificada en distintos sistemas de ARNm (Li et al., 2025).

Otros componentes estructurales fundamentales en el diseño de transcritos de ARNm son la caperuza 5' y la cola poli(A) del extremo 3', los cuales regulan la traducción y participan en la estabilidad. En este estudio se empleó una estrategia de adición de caperuza postranscripcional, considerando su capacidad para generar transcritos funcionales con una eficiencia cercana al 100 % (L. Zhang et al., 2023). Aunque el desarrollo reciente de análogos de cap incorporados de forma cotranscripcional ha permitido simplificar los procesos de manufactura y alcanzar eficiencias elevadas, su desempeño puede depender de la compatibilidad entre el análogo utilizado y la ARN polimerasa empleada, lo que puede requerir procesos de optimización específicos (Liu et al., 2026). Por tanto, el método postranscripcional continúa siendo empleado para la obtención de ARNm a nivel industrial y de investigación (Corbett et al., 2020; Wang et al., 2025). En específico, la elevada eficiencia de incorporación de caperuza que permite alcanzar este método contribuye a una mayor uniformidad en el transcrito, que es un atributo crítico de calidad de las vacunas de ARNm (European Medicines Agency, 2025; Pardi y Krammer, 2024).

Por otra parte, la cola poli(A) se codificó directamente en el molde de ADN utilizado para la síntesis del transcrito. Este enfoque es muy utilizado en el desarrollo de ARNm terapéutico ya que, de acuerdo con Al Turihi et al. (2025), permite generar moléculas con una longitud predeterminada de la cola de poli(A), reduciendo la heterogeneidad asociada a los métodos de poliadenilación enzimática. Asimismo, el método cotranscripcional permite simplificar la caracterización del producto, al no requerir la verificación adicional de la incorporación de la cola mediante procedimientos enzimáticos (European Medicines Agency, 2025). La longitud de este elemento debe ser optimizada, ya que influye en la iniciación de la traducción del ARNm (Passmore y Coller, 2022). La cola de poli(A) del ADN molde consistió en una secuencia continua de 100 adeninas, lo que permitió la obtención de transcritos de ARNm con una cola de esta longitud. La selección de este tamaño se basó en los criterios descritos por Quan

et al. (2025), quienes indican que la longitud de 100 nt es suficiente para sostener la estabilidad del transcrito y favorecer una traducción eficiente. Si bien se han descrito estrategias basadas en la incorporación de secuencias espaciadoras entre bloques de adeninas para reducir la recombinación de los moldes plasmídicos durante procesos de clonación y propagación bacteriana, dichas modificaciones responden a consideraciones de manufactura y escalamiento productivo, manteniendo el objetivo funcional de generar transcritos con una cola poli(A) definida que favorezca su estabilidad y expresión (Zhang et al., 2026).

Finalmente, el molde de ADN incorporó un sitio de restricción para la enzima BspQI en el extremo 3', con el propósito de generar una linealización precisa del molde previo a la IVT. La ubicación de este sitio permitió obtener transcritos con un extremo 3' definido, evitando la incorporación de nucleótidos adicionales corriente abajo de la cola poli(A). Esta consideración se sustenta en los hallazgos de Holtkamp et al. (2006), quienes demostraron que secuencias residuales posteriores a la cola poli(A) alteran su función biológica y reducen la expresión del ARNm. La estrategia de linealización también se diseñó para generar un extremo cohesivo 5' en el ADN molde, ya que Triana-Alonso et al. (1995) reportaron que los extremos cohesivos 3' pueden favorecer la formación de productos de ARN aberrantes durante la transcripción por la ARN polimerasa T7.

En una instancia previa a la producción del ARNm, la secuencia codificante fue clonada en un vector de expresión eucariota bajo el control del promotor CMV con el fin de evaluar su funcionalidad en células de mamífero. Estrategias similares han sido utilizadas durante el desarrollo de vacunas basadas en ácidos nucleicos para confirmar la capacidad de expresión de los antígenos codificados antes de avanzar hacia etapas posteriores de caracterización biológica. Por ejemplo, Perdiguero et al. (2023) verificaron la expresión de un constructo vacunal mediante transfección de células HEK-293T y análisis por *Western blot* previo a la evaluación del candidato en plataformas de ADN y virus atenuados. En este caso, el experimento permitió confirmar que la secuencia incorporada en el ADN molde era capaz de dirigir la síntesis de los antígenos virales antes de proceder con la producción del ARNm. El análisis se realizó sobre el lisado celular, considerando que las glicoproteínas codificadas por el segmento

M se localizan en la membrana celular tras su procesamiento (Serris et al., 2020). En esta fracción se detectó una banda de aproximadamente 55 kDa, consistente con la expresión de la glicoproteína Gc. Estudios previos sobre la expresión de glicoproteínas de ANDV en células de mamífero han reportado la presencia de monómeros de Gc con una masa aparente similar a la observada en este estudio (Acuña et al., 2014; Beltrán-Ortiz et al., 2017). La detección exclusiva de esta glicoproteína puede atribuirse al uso de un anticuerpo monoclonal desarrollado previamente en el laboratorio, lo que restringió el reconocimiento a un epítipo específico presente en Gc (Dang et al., 2023).

Como fase preliminar a la IVT, el plásmido fue linealizado mediante digestión con la enzima BspQI para generar un molde de ADN con extremos definidos. El análisis por electroforesis en gel de agarosa evidenció la linealización completa del ADN plasmídico, confirmando la correcta preparación del molde para la síntesis del ARNm. La verificación de esta etapa es fundamental porque la linealización del ADN es un requisito para la obtención de transcritos de longitud definida y para minimizar la heterogeneidad asociada a eventos de terminación incorrecta durante la IVT (Nair et al., 2024; New England Biolabs, 2026). Posteriormente, el ADN linealizado fue purificado con el fin de eliminar enzimas residuales y otras impurezas derivadas de la digestión. Martínez et al. (2023) describieron que la calidad del molde linealizado influye sobre la formación de ARNdc en la IVT, observando una disminución de estas impurezas cuando se emplearon moldes purificados. Los autores plantean que moléculas del vector no linealizadas o fragmentos de ADN parcialmente digeridos pueden actuar como plantillas alternativas para la ARN polimerasa T7, favoreciendo la generación de subproductos durante la reacción. Por tanto, la correcta linealización y posterior purificación del molde permitieron obtener un ADN de mayor calidad para la IVT y complementaron las consideraciones de diseño orientadas a minimizar la generación de especies de ARN no deseadas durante la síntesis del transcrito.

A través de la IVT convencional se produjeron 170 µg de ARN a partir de 1 µg de ADN molde, equivalente a un rendimiento de 8.5 g/L. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Miller et al. (2024) y Sari et al. (2024) para procesos de síntesis de ARNm mediante ARN polimerasa T7, los cuales pueden alcanzar rendimientos entre 5 y 14 g/L. Tras la reacción, el ARN fue recuperado mediante precipitación con LiCl, un

método ampliamente utilizado a escala de laboratorio para la purificación de transcritos debido a su capacidad para remover nucleótidos no incorporados, proteínas y otros componentes residuales de la reacción, favoreciendo la obtención de un producto adecuado para las etapas posteriores de procesamiento y caracterización (Feng et al., 2024; Martínez et al., 2023). Posteriormente, la calidad del ARN obtenido fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa, una técnica que permite verificar la integridad de transcritos generados por IVT y confirmar su tamaño aparente (Nair et al., 2024). El análisis electroforético mostró una banda predominante de aproximadamente 3.7 kb, concordante con la longitud esperada del transcrito considerando la arquitectura completa del constructo, compuesta por la 5'-UTR, la secuencia codificante de GPC, la 3'-UTR y la cola poli(A). Adicionalmente, se observaron bandas de menor intensidad con una movilidad reducida respecto al transcrito principal. De acuerdo con Marklund et al. (2023), la presencia de estas especies podría relacionarse con la formación de estructuras secundarias o asociaciones intermoleculares que modifican su comportamiento electroforético sin implicar degradación del transcrito.

La siguiente etapa productiva fue la adición postranscripcional de la caperuza 5' de tipo Cap-1. Esta estructura corresponde a la forma predominante presente en los ARNm eucariotas maduros y participa en los mecanismos celulares de discriminación entre ARN propio y exógeno (Tsukamoto et al., 2024). En concordancia con estas características, Pardi y Krammer (2024) señalan que Cap-1 es la modificación de caperuza más utilizada en vacunas basadas en ARNm, pues contribuye a la estabilidad del transcrito y al proceso de traducción. Como parte del procedimiento postranscripcional, el ARNm fue sometido a una etapa previa de calentamiento a 65 °C destinada a optimizar la accesibilidad del extremo 5' a las enzimas involucradas en la reacción. Considerando que la exposición a temperatura elevada puede afectar la estabilidad estructural del ARN (Chheda et al., 2024), y que la integridad del ARNm es un atributo crítico de calidad en este tipo de vacunas (Quan et al., 2025), el estado del transcrito con caperuza 5' fue reevaluado mediante electroforesis en gel de agarosa. El análisis mostró una banda predominante de características similares a las observadas antes de la reacción, sin evidencias de degradación apreciable del transcrito. Este

resultado indicó que la adición de la estructura Cap-1 no afectó la integridad del principio activo.

El ARNm es una molécula con susceptibilidad intrínseca a degradación y a alteraciones en su integridad estructural, en particular bajo condiciones de manipulación que impliquen variaciones de temperatura o exposición prolongada en solución (Chheda et al., 2024). En el contexto de la manufactura de vacunas basadas en ARNm, Parveen y Elkordy (2024) describen la temperatura como un parámetro que puede influir en la conformación del transcrito y, en consecuencia, en su estabilidad durante etapas posteriores a la síntesis. En este marco, la integridad del ARNm se comprobó mediante un ensayo de estrés térmico a 37 °C durante 30 y 60 min, con el objetivo de evaluar su resistencia frente a dichas condiciones. Esta metodología permite analizar la estabilidad de transcritos obtenidos por IVT, en los que la exposición prolongada a 37 °C, la temperatura óptima para la actividad de RNasas, puede asociarse a pérdida progresiva de integridad detectable por electroforesis en gel de agarosa (Korenč et al., 2021). El perfil electroforético de las muestras tratadas no evidenció diferencias apreciables entre las condiciones evaluadas, observándose una banda predominante correspondiente al transcrito intacto y sin señales de fragmentación adicional. He et al. (2024) señalan que la fragmentación del ARNm es una consecuencia frecuente de procesos de degradación, y que la conservación de transcritos de longitud completa es esencial para mantener sus propiedades funcionales. De esta forma, la ausencia de especies de menor tamaño tras la incubación a 37 °C sugirió que el transcrito mantuvo su integridad durante el período de estrés térmico evaluado.

La funcionalidad del ARNm se evaluó mediante un ensayo de expresión en células eucariotas, considerando que la actividad biológica de este tipo de moléculas depende de su capacidad para dirigir la síntesis del antígeno codificado tras su ingreso a la célula (Qureischi et al., 2022). La detección de una banda inmunorreactiva de aproximadamente 55 kDa, concordante con la observada durante la validación del constructo de ADN, confirmó que el ARNm conservó la capacidad de dirigir la expresión de Gc después de la IVT y el procesamiento postranscripcional. Este resultado concuerda con lo descrito por Kuzmin et al. (2024), quienes también demostraron la

expresión de Gn/Gc de ANDV en células transfectadas con ARNm que codifica el segmento M. Considerando que la producción de proteínas a partir de ARNm exógeno requiere el reconocimiento eficiente del transcrito por la maquinaria de traducción celular, la detección de Gc reflejó que los elementos estructurales incorporados durante el diseño de la construcción permitieron preservar la funcionalidad biológica de la molécula (von der Haar et al., 2023).

La sustitución de uridina por N1-metilpseudouridina se adoptó en la producción del ARNm debido a que esta modificación reduce el reconocimiento del ARN exógeno por mecanismos de inmunidad innata, y favorece la producción de proteínas en células eucariotas. Por estas razones, es una de las estrategias de optimización más utilizadas en vacunas basadas en ARNm (Bérouti et al., 2025; Karikó et al., 2008). Estudios posteriores demostraron además que los efectos de esta modificación se extienden a otros aspectos de la biología del transcrito, incluyendo su estabilidad, traducción y desempeño funcional, consolidando su uso en plataformas vacunales de nueva generación (Elkhalifa et al., 2022; Oude Blenke et al., 2023).

La producción de cuatro lotes independientes de ARNm modificado permitió evaluar la consistencia del proceso desarrollado. Los rendimientos de transcripción se mantuvieron dentro del rango esperado, oscilando entre 8.07 y 9.73 g/L. Mientras tanto, la cantidad de ARNm recuperado tras la adición de la caperuza presentó una variabilidad reducida entre producciones independientes ($140.32 \pm 4.70 \mu\text{g}$), acompañada de una eficiencia de recuperación promedio de $93.55 \pm 3.13 \%$. La baja dispersión observada entre lotes indicó la capacidad del proceso para minimizar la variabilidad introducida durante las etapas de transcripción, procesamiento y purificación, consideradas fuentes potenciales de heterogeneidad en la manufactura de productos basados en ARNm (Rosa et al., 2021). La consistencia observada también es coherente con la obtención de transcritos estructuralmente homogéneos, favorecida por el uso de una cola poli(A) de longitud definida. Whitley et al. (2022) destacan que el control de este atributo estructural garantiza la robustez del producto final y del proceso. Asimismo, He et al. (2024) mostraron que la sustitución de uridina por nucleósidos modificados puede realizarse manteniendo rendimientos de transcripción similares a los obtenidos con transcritos convencionales. En concordancia con dichas

observaciones, los rendimientos obtenidos en el presente trabajo indican que la incorporación de N1-metilpseudouridina fue compatible con una producción eficiente y consistente del ARNm de interés, sin evidencias de una disminución sustancial del desempeño del proceso productivo.

Más allá de los parámetros de manufactura, la utilidad de esta modificación depende de que el transcrito conserve su funcionalidad biológica. Diversas investigaciones han asociado la N1-metilpseudouridina con una mayor estabilidad frente a procesos de degradación y con la generación de productos proteicos fieles al mensaje codificado, sin alteraciones relevantes en la fidelidad global de traducción (Ho et al., 2024; K. Q. Kim et al., 2022). En este sentido, los lotes de ARNm producidos conservaron su integridad estructural en condiciones de estrés, y tuvieron la capacidad de dirigir la producción de Gn/Gc en células eucariotas. En términos generales, los resultados obtenidos respaldaron la capacidad del proceso implementado para generar ARNm modificado de manera consistente, preservando atributos críticos como la integridad estructural y la funcionalidad biológica, aspectos fundamentales para su posterior evaluación como candidato vacunal.

El ARNm producido se encapsuló en LNPs mediante nanoprecipitación, una técnica basada en el autoensamblaje espontáneo de los componentes lipídicos alrededor del material genético durante la mezcla de fases acuosas y orgánicas. El empleo del vehículo lipídico como sistema de administración se adoptó en función de su biocompatibilidad y en su capacidad para transportar ácidos nucleicos con una alta eficiencia de encapsulación, propiedades que respaldaron su implementación en las primeras vacunas basadas en ARNm aprobadas para uso humano (Hou et al., 2021; Schoenmaker et al., 2021). El procedimiento se llevó a cabo mediante mezcla manual de las fases de formulación. Si bien existen plataformas basadas en microfluídica para la producción de nanopartículas lipídicas, Strelkova Petersen et al. (2023) indican que la mezcla manual es una alternativa adecuada para estudios a escala de laboratorio, permitiendo generar formulaciones durante etapas tempranas de desarrollo sin requerir equipamiento especializado.

La composición lipídica empleada en este estudio se basó en formulaciones previamente validadas para vacunas basadas en ARNm. Como lípido ionizable se

seleccionó SM-102, utilizado en la vacuna mRNA-1273, considerando los resultados reportados por L. Zhang et al. (2023), quienes observaron que este componente presentó un mejor rendimiento respecto a otros lípidos ionizables en términos de administración intramuscular del ARNm, inducción de anticuerpos y estabilidad de la formulación. Los demás componentes (DSPC, colesterol y DMG-PEG 2000) se definieron de acuerdo con el trabajo de Wu et al. (2024). Estos autores describen que DSPC y el colesterol son determinantes para la organización estructural y estabilidad de las nanopartículas, mientras que los lípidos PEGilados, como el DMG-PEG 2000, confieren estabilidad coloidal a la formulación y reducen fenómenos de agregación.

Caracterizar los atributos fisicoquímicos de distribución de tamaño, composición y eficiencia de encapsulación, y parámetros biológicos de citotoxicidad y actividad relativa de expresión *in vitro* de la formulación vacunal.

Una vez formulado el prototipo, se caracterizaron el tamaño, la dispersidad, el potencial zeta, la morfología y la eficiencia de encapsulación, atributos que condicionan la estabilidad, consistencia y actividad biológica de las LNPs-ARNm (Cullis y Felgner, 2024; Di et al., 2025; Nogueira et al., 2024; World Health Organization, 2022).

La distribución de tamaño de las nanopartículas se determinó mediante DLS, pues proporciona una estimación representativa del diámetro hidrodinámico en solución y ofrece una alta sensibilidad para la detección de agregados, lo que garantiza la caracterización de la homogeneidad de la formulación (Jia et al., 2023). Las LNPs-ARNm presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 150.77 ± 2.05 nm, y las LNPs vacías alcanzaron 159.17 ± 2.18 nm. Estos resultados concuerdan con los valores reportados con anterioridad para vehículos lipídicos que encapsulan ARNm. Heshmati et al. (2024) obtuvieron nanopartículas con diámetros de 50 - 200 nm, mientras que Kong et al. (2024) prepararon formulaciones comprendidas entre 95 y 167 nm para estudiar la administración intramuscular de ARNm. El límite de 200 nm suele emplearse como criterio de control de calidad en la producción de LNPs que encapsulan ARNm, pues la literatura indica que partículas con tamaños menores a este umbral presentan una mayor capacidad para drenar hacia los ganglios linfáticos y ser captadas

por las APCs (Ji et al., 2023; Michalaki et al., 2025). En consecuencia, el tamaño de las LNPs-ARNm formuladas se situaron dentro del intervalo apropiado para su aplicación vacunal. Asimismo, la baja variabilidad observada entre lotes independientes y la escasa diferencia entre LNPs-ARNm y LNPs vacías sugieren una consistencia del proceso de formulación dentro de las condiciones evaluadas, permitiendo obtener nanopartículas con parámetros fisicoquímicos definidos entre producciones independientes. Esta característica es coherente con los criterios generales descritos por Whitley et al. (2022) para productos de ARNm, en los que la consistencia entre lotes es un elemento clave durante su desarrollo y manufactura.

El índice de polidispersidad es otro parámetro fundamental en la caracterización de sistemas nanoparticulados, ya que refleja la uniformidad de la distribución de tamaños presente en el sistema; valores más bajos se asocian a poblaciones más homogéneas y a una menor heterogeneidad entre partículas (Mehraji y DeVoe, 2024). Las LNPs-ARNm exhibieron un PDI de 0.057 ± 0.02 , y las LNPs vacías registraron 0.093 ± 0.009 , los cuales se encontraron dentro del rango inferior observado en formulaciones lipídicas basadas en ARNm. Heshmati et al. (2024) reportaron valores entre 0.20 y 0.30; por su parte, Kong et al. (2024) obtuvieron índices de 0.06 y 0.14. Desde una perspectiva de consistencia, Ripoll et al. (2022) establecen que formulaciones con valores de PDI inferiores a 0.2 presentan una distribución de tamaños homogénea y cumplen criterios de uniformidad del producto. Los índices obtenidos en este estudio se situaron por debajo de dicho umbral, lo que indica una población nanoparticulada uniforme y una limitada heterogeneidad entre partículas.

La carga superficial de las nanopartículas se analizó mediante la determinación del potencial zeta por ELS, ya que este parámetro proporciona información sobre las interacciones entre partículas y su comportamiento frente a componentes biológicos (Ly et al., 2024). Las LNPs-ARNm alcanzaron un potencial zeta de -3.19 ± 0.25 mV y las LNPs vacías de -2.04 ± 0.25 mV. Estos valores coinciden con los descritos para este sistema de transporte de ARNm. Heshmati et al. (2024) publicaron potenciales zeta entre -2.5 y +5 mV, y Kong et al. (2024) obtuvieron cifras de -5 a +5 mV. Fernandes et al. (2025) señalan que una característica esperada de las partículas lipídicas que encapsulan ARNm es un potencial zeta ligeramente negativo a pH fisiológico, como

consecuencia de la deprotonación del lípido ionizable y de la contribución de los componentes estructurales y PEGilados. En esta línea, la estabilidad coloidal de las LNPs que contienen ARNm no depende de la carga superficial, sino de la estabilización estérica proporcionada por los lípidos PEGilados, la cual previene la agregación de las nanopartículas (Gao, 2025). Este perfil coincide con lo descrito por Ripoll et al. (2022), quienes consideran que este vehículo debe exhibir un potencial zeta ligeramente negativo. De este modo, los valores observados en la formulación desarrollada se ajustan a las características superficiales descritas para este tipo de sistemas y resultan compatibles con su aplicación terapéutica, ya que las LNPs con potencial zeta negativo presentan una menor toxicidad y reducidas interacciones inespecíficas con proteínas plasmáticas, respecto a las nanoformulaciones con carga positiva (Fernandes et al., 2025; Wang et al., 2026).

La morfología de las nanopartículas se evaluó mediante TEM, con el objetivo de complementar la información obtenida mediante DLS. Esta técnica permite la visualización directa de las nanopartículas y la evaluación de su forma y homogeneidad morfológica a escala nanométrica, por ello se emplea en la caracterización estructural de nanomedicinas basadas en lípidos (C. Chen et al., 2023). Debido a que TEM y DLS se basan en principios analíticos diferentes, su uso combinado permite obtener una caracterización más completa de las nanopartículas (Parot et al., 2024). Las micrografías mostraron una población cuasi esférica y homogénea, apreciándose una ligera agregación en algunas regiones, atribuible a la formación de artefactos durante el proceso de secado de la muestra (Hunter et al., 2024; Michen et al., 2015). Este comportamiento concuerda con lo reportado en los trabajos de Kong et al. (2024) y (Park et al., 2024), que describen una morfología esférica y población monodispersa como característica habitual del sistema. De forma simultánea, las observaciones realizadas mediante TEM permitieron corroborar los resultados de tamaño obtenidos por DLS, los cuales situaron a las LNPs por debajo de los 200 nm. En conjunto, la información aportada por ambas técnicas evidenció que la formulación presentó características morfológicas acordes con las descritas para LNPs encapsulantes de ARNm.

La concentración de ARNm encapsulado y la eficiencia de encapsulación se determinaron mediante el ensayo de RiboGreen®, uno de los métodos de referencia para la cuantificación de la cantidad de material genético incorporado en las nanopartículas, dada su alta sensibilidad y especificidad hacia el ARN (Tsalmpouris et al., 2025). Los lotes evaluados presentaron concentraciones de ARNm encapsulado de 112.59 y 140.91 µg/mL, con eficiencias de encapsulación de 93.87 % y 94.37 %, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los informados por Park et al. (2024) para formulaciones obtenidas mediante mezcla manual, las cuales alcanzaron eficiencias de encapsulación del 82 %. En efecto, los porcentajes observados fueron próximos a los descritos para LNPs formuladas por microfluídica, en las que se han documentado valores entre 90 y 96 % (Alqahtani et al., 2024; Atallah et al., 2024). A su vez, las concentraciones de ARNm encapsulado evidenciaron una cantidad considerable de material genético incorporado a las LNPs, lo que permitió disponer de dosis comparables a las utilizadas en estudios realizados en hámster sirio (Liao et al., 2024).

Una vez establecidas las principales características fisicoquímicas de la formulación, se evaluaron sus parámetros biológicos, incluyendo el perfil de seguridad y la actividad relativa de la expresión *in vitro*. Los posibles efectos tóxicos inducidos por las LNPs abarcan inmunogenicidad no deseada, inflamación, hemotoxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad, los cuales influyen en la seguridad de la formulación (Yuan et al., 2024). Entre estas respuestas, la citotoxicidad representa una aproximación inicial para la evaluación de la biocompatibilidad de la formulación y la detección de posibles efectos no deseados derivados de su interacción con las células (Syama et al., 2022). Este parámetro se determinó mediante el ensayo MTT, una metodología basada en la actividad metabólica mitocondrial, recomendada por estándares para estimar la viabilidad celular y evaluar la biocompatibilidad de materiales nanoparticulados (Parot et al., 2024). La evaluación se realizó en una línea celular de cáncer (HeLa) y una de fibroblastos humanos (HFF) con el fin de comparar las respuestas y obtener una aproximación inicial de seguridad más representativa, considerando que las nanoformulaciones lipídicas pueden presentar citotoxicidad dependiente de la dosis y

del tipo celular, observándose respuestas diferenciales entre modelos bajo condiciones equivalentes de exposición (Dutta et al., 2024; Szwed et al., 2020).

Las LNPs-ARNm, las LNPs vacías y el ARNm libre se ensayaron en concentraciones comprendidas entre 0.125 y 5 $\mu\text{g/mL}$ en células HeLa y HFF, correspondiendo la concentración máxima a un valor diez veces superior al empleado en los ensayos de transfección. En las células HeLa se observó una disminución significativa de la viabilidad a 5 $\mu\text{g/mL}$ para las LNPs vacías ($p = 0.001$) y las LNPs-ARNm ($p = 0.005$). Al comparar los tratamientos entre sí, el ARNm libre presentó porcentajes de viabilidad significativamente superiores a los observados para las LNPs vacías y las LNPs-ARNm a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.004$ y $p = 0.002$, respectivamente) y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.01$ y $p = 0.008$, respectivamente). Las diferencias identificadas sugirieron que la reducción de viabilidad estuvo asociada principalmente a los componentes lipídicos de la formulación y no al material genético, pues las LNPs vacías y las LNPs-ARNm produjeron respuestas comparables. Čechová et al. (2025) describen que los lípidos ionizables pueden interactuar con las membranas biológicas durante los procesos de internalización y tráfico intracelular, generando respuestas celulares detectables a concentraciones elevadas sin comprometer la integridad celular de manera irreversible. Sin embargo, ninguno de los tratamientos produjo una reducción superior al 30 %, umbral establecido por la norma ISO 10993-5:2009 para clasificar un material como citotóxico. Por tanto, pese a las diferencias observadas respecto al control, ninguna de las formulaciones evaluadas fue considerada citotóxica bajo las condiciones ensayadas.

En las células HFF no se detectaron diferencias significativas respecto al control para ninguno de los tratamientos evaluados. Aunque a 5 $\mu\text{g/mL}$ se observaron diferencias entre tratamientos ($p = 0.026$ para LNPs-ARNm y $p = 0.006$ para LNPs vacías), estas estuvieron determinadas por una viabilidad superior del grupo tratado con ARNm libre respecto al control, más que por una reducción significativa de la viabilidad inducida por las LNPs. Este hallazgo contrasta con lo observado en células HeLa y apuntó a una respuesta diferencial entre ambas líneas celulares. La mayor sensibilidad observada en células HeLa podría relacionarse con características propias de las células tumorales. Dutta et al. (2024) explican que las células tumorales tienen una mayor internalización de nanopartículas y una elevada susceptibilidad a alteraciones de la morfología en

comparación con las células normales, lo que puede amplificar los efectos biológicos asociados a determinados nanomateriales. Desde esta perspectiva, la disminución moderada de viabilidad observada en la línea tumoral podría reflejar una interacción más intensa entre las células HeLa y los componentes lipídicos de la formulación. Aunque esta observación requiere estudios adicionales para dilucidar los mecanismos subyacentes, resulta interesante considerando el creciente interés por el uso de nanopartículas lipídicas como plataformas para aplicaciones oncológicas (Sayour et al., 2024).

En vista de que el efecto únicamente se evidenció a concentraciones muy superiores a las empleadas para la determinación de actividad biológica, y que ninguna formulación superó el criterio de citotoxicidad, los resultados respaldaron un perfil de seguridad favorable para las LNPs desarrolladas. Esta interpretación es consistente con lo reportado por Billingsley et al. (2020) y Yanhao Zhang et al. (2023), quienes describieron una adecuada tolerancia celular para formulaciones de LNPs-ARNm con características similares.

La actividad relativa de la expresión del antígeno a partir de las LNPs-ARNm se evaluó mediante un ensayo basado en células. Este parámetro se define como la capacidad de la formulación para ingresar a las células y expresar el antígeno de interés (Guerrini et al., 2025). De acuerdo con la guía de procedimientos analíticos para vacunas de ARNm de la Farmacopeia de los Estados Unidos (USP) (2025), la actividad puede determinarse mediante la cuantificación de la proteína codificada, así que la producción de Gn/Gc se empleó como atributo de actividad. La cuantificación se realizó mediante *Western blot*, una de las metodologías propuestas por la USP para la detección del antígeno. La normalización se efectuó respecto a la proteína total transferida por carril mediante tinción con Ponceau S, estrategia que ha sido propuesta como una alternativa robusta al uso de proteínas constitutivas individuales por su capacidad para corregir variaciones asociadas a la carga y transferencia de proteínas (Westerberg et al., 2025).

La actividad se expresó de forma relativa respecto a una referencia, pues los sistemas celulares presentan una variabilidad biológica inherente, entonces la comparación frente a una referencia proporciona una medida más consistente que una determinación absoluta de la actividad biológica (Li et al., 2023). Se empleó como estándar de

referencia interno la respuesta obtenida en células transfectadas con el mismo ARNm mediante *Lipofectamine™ MessengerMAX™*. La selección de este sistema se fundamentó en su uso extendido como reactivo de transfección de alta eficiencia para la entrega intracelular de ARNm (B. Liu et al., 2025; Medjmedj et al., 2022), y en el trabajo de Swingle et al. (2023) en el que se emplearon complejos basados en esta lipofectamina como referencia para comparar la capacidad de expresión de sistemas alternativos de administración.

Los lotes evaluados presentaron expresiones relativas de 1.78 ± 0.08 y 1.72 ± 0.10 para los lotes 1 y 2, respectivamente. Estos valores indicaron que la expresión de Gn/Gc obtenida mediante las LNPs fue aproximadamente 1.7 veces superior a la observada en células transfectadas con el estándar de referencia interno. La mayor expresión observada indicó que el ARNm encapsulado mantuvo su capacidad para dirigir la síntesis de Gn/Gc tras el proceso de formulación. De manera similar, Swingle et al. (2023) documentaron una expresión proteica superior respecto al reactivo de transfección utilizado como referencia, resultado que coincide con lo observado en este trabajo. Los resultados respaldaron la funcionalidad biológica de la formulación y mostraron que el proceso de encapsulación no comprometió la capacidad del ARNm para dirigir la síntesis de la proteína de interés.

Asimismo, la similitud entre los valores obtenidos para ambos lotes indicó una respuesta consistente bajo las condiciones evaluadas. Esta observación fue coherente con las elevadas eficiencias de encapsulación y las características fisicoquímicas previamente descritas, sugiriendo que las variaciones inherentes al proceso de producción no afectaron de manera apreciable la actividad biológica del prototipo.

Comparar la inmunogenicidad y la tolerabilidad preliminar del prototipo vacunal de ARN mensajero evaluando la respuesta inmunitaria humoral y celular en el modelo de hámster sirio.

La caracterización fisicoquímica y biológica del prototipo LNPs-ARNm permitió establecer atributos compatibles con su evaluación *in vivo*, incluyendo una distribución de tamaño homogénea, alta eficiencia de encapsulación, viabilidad celular conservada y actividad biológica confirmada. Esta transición desde la caracterización de la

formulación hacia el modelo animal es fundamental en el desarrollo de vacunas de ARNm, debido a que los ensayos *in vitro* permiten una primera aproximación a la seguridad y funcionalidad del sistema, pero no reemplazan la evaluación de la inmunogenicidad en un organismo completo (Muzard et al., 2025; Sanyal, 2025). La selección de una dosis no depende solo de la magnitud de la respuesta inmunitaria inducida, sino también de la relación entre respuesta humoral, capacidad neutralizante, activación celular y comportamiento fisiológico tras la inmunización, aspecto vinculado al balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad descrito para vacunas de ARNm (J. Lee et al., 2023; J. Wang et al., 2024).

En el presente estudio, esta aproximación no se planteó como un ensayo toxicológico formal, sino como una evaluación de inmunogenicidad complementada con el monitoreo de peso corporal y temperatura, variables que aportaron información preliminar sobre el comportamiento fisiológico de los animales tras la inmunización. El hámster sirio se seleccionó como modelo experimental por corresponder, hasta la fecha, al único modelo animal pequeño de infección letal por ANDV, condición que sustenta su uso en la evaluación preclínica de estrategias de inmunización contra este patógeno (Tscherne et al., 2026). Bajo este diseño, los grupos controles permitieron separar niveles distintos de interpretación experimental. Los animales sin tratamiento se incorporaron como referencia basal del comportamiento fisiológico e inmunitario en ausencia de intervención, mientras que el grupo PBS permitió controlar el efecto asociado a la manipulación, inoculación y seguimiento del esquema experimental (du Sert et al., 2020). La inclusión de LNPs vacías permitió evaluar la contribución de la plataforma lipídica sin ARNm, en vista de que las LNPs pueden modular la respuesta inmune innata y actuar como componentes inmunoactivos de la formulación (Y. Lee et al., 2023; Ndeupen et al., 2021). Por su parte, el grupo rGnGc formulado con Alhydrogel® se empleó como control positivo, ya que permitió contrastar la respuesta inducida por el prototipo LNPs-ARNm con una formulación proteica adyuvada basada en el mismo blanco antigénico y con inmunogenicidad demostrada (Starck-Mendez, 2020). Finalmente, la comparación entre 10 y 20 µg de ARNm permitió identificar si el incremento de dosis se traducía en una mejora de la respuesta inmune, suficiente para justificar su selección, y en concordancia con la necesidad de realizar estudios de dosis

durante la evaluación preclínica de candidatos vacunales (J. Lee et al., 2023; World Health Organization, 2005).

En varios estudios de prototipos vacunales en hámster sirio, el peso corporal y la temperatura se han registrado junto con la condición clínica general para monitorear el estado de los animales durante la inmunización o tras la exposición al agente infeccioso, aportando información sobre tolerancia, respuesta sistémica y evolución clínica del modelo experimental (Shanmugaraj et al., 2023; Shorayeva et al., 2023). Sin embargo, ambos parámetros son indicadores fisiológicos globales y no específicos de un mecanismo determinado, de modo que su análisis requiere considerar la trayectoria temporal de los cambios y el comportamiento de los grupos control (Madar-Balakirski et al., 2022). En el caso particular de la comparación del peso entre grupos en cada punto temporal, se utilizó el cambio porcentual respecto al valor inicial de cada animal, en lugar del peso absoluto, ya que este enfoque reduce el efecto de las diferencias basales entre individuos y permite comparar la evolución relativa durante el ensayo. Este criterio permite controlar diferencias basales de peso en animales jóvenes con crecimiento activo y es consistente con estudios preclínicos en hámster que reportan el porcentaje de cambio de peso como variable clínica comparativa (Lelis et al., 2023).

En relación con el peso corporal, la mayoría de los grupos no presentó pérdida sostenida durante el periodo experimental. Los animales sin tratamiento, PBS, LNPs vacías, LNPs-ARNm 10 µg y rGnGc mantuvieron una trayectoria de ganancia o estabilidad de peso, lo que indica que estas condiciones no se asociaron con una reducción del peso corporal bajo el esquema evaluado. Este comportamiento coincide con lo reportado por Zhugunissov et al. (2021), quienes evaluaron una vacuna inactivada contra SARS-CoV-2 en hámster sirio y monitorearon peso corporal, temperatura y condición clínica general en animales vacunados y controles, sin observar diferencias relevantes frente al grupo placebo durante el seguimiento. De forma similar, Shorayeva et al. (2023) registraron el peso en hámsteres vacunados y controles durante el seguimiento posterior a cada inmunización, sin describir alteraciones fisiológicas relevantes asociadas a la vacunación. Bajo este criterio, el comportamiento de la mayoría de los grupos del presente estudio no mostró señales

compatibles con una alteración fisiológica sostenida asociada a las formulaciones evaluadas.

El grupo inmunizado con 20 µg de LNPs-ARNm se separó de este patrón, ya que presentó una disminución progresiva del peso corporal, cercana al 4 – 5 % respecto al basal, junto con una reducción significativa entre el peso inicial y final. Esta observación debe analizarse bajo un criterio longitudinal, ya que las variaciones de peso posteriores a la inmunización no se interpretan solo por su magnitud, sino también por su duración y reversibilidad durante el seguimiento. Schilder et al. (2023) encontraron que los cambios de peso descritos en estudios de vacunas contra SARS-CoV-2 fueron, por lo general, transitorios y reversibles, mientras que Destexhe (2025) reportó pérdidas menores de peso que fueron consideradas no adversas debido a su recuperación posterior. En contraste, la disminución identificada en el grupo de 20 µg correspondió a una trayectoria sostenida durante el periodo experimental y diferenciada respecto a los demás grupos. Por tanto, aunque la magnitud de la pérdida fue moderada, su persistencia respalda una interpretación menos favorable para los 20 µg de ARNm desde el seguimiento fisiológico. Este hallazgo no es suficiente para atribuir un efecto tóxico a la formulación, pero sí señala un comportamiento fisiológico diferencial que debe considerarse en la selección de dosis del candidato, ya que la evaluación en modelos animales debe integrar la definición de dosis con la identificación de posibles señales de seguridad durante el desarrollo vacunal (World Health Organization, 2005).

En cuanto a la temperatura corporal, ningún grupo presentó variaciones globales entre el inicio y el final del ensayo, ni cambios agudos después de la primera inmunización o del refuerzo. Además, los valores se mantuvieron dentro del rango fisiológico descrito para hámster sirio, entre 36.0 y 39.0 °C (Zhugunissov et al., 2021). Este punto permitió contrastar los resultados con el mismo estudio, en el que la evaluación de una vacuna inactivada contra SARS-CoV-2 no mostró diferencias significativas en la temperatura corporal promedio entre hámsteres vacunados y controles. Este resultado también coincide con lo reportado para formulaciones basadas en ARNm, ya que Lu et al. (2026), no observaron cambios significativos de temperatura corporal ni señales de pirogenicidad tras la inmunización. Aun así, la ausencia de hipertermia en las mediciones realizadas no descarta la posibilidad de variaciones térmicas de corta

duración, pues Min et al. (2025) observaron un aumento de temperatura a las 6 h tras la administración de un prototipo de ARNm, con retorno a valores normales a las 24 h.

En el caso de las disminuciones puntuales registradas en los días de toma de muestra sanguínea, estas coincidieron con el uso de anestesia durante el procedimiento. Este patrón se explica por el efecto de la combinación ketamina/xilacina sobre la termorregulación en roedores, ya que puede reducir la temperatura corporal durante el periodo anestésico (Irwin et al., 2023). Por ello, las caídas térmicas observadas se atribuyeron al procedimiento de muestreo y no a un efecto sostenido de las formulaciones administradas.

En síntesis, el seguimiento de las variables peso y temperatura corporal no mostró alteraciones generalizadas asociadas a las formulaciones. La principal diferencia entre las dosis fue la disminución sostenida del peso en el grupo de 20 µg, señal fisiológica que se consideró posteriormente en la selección de dosis.

El monitoreo de peso corporal y temperatura aportó un criterio fisiológico clave para la evaluación de las formulaciones; sin embargo, la caracterización del candidato vacunal de ARNm debe integrar la respuesta inmunitaria inducida, como parte de los estudios de inmunología y prueba de concepto (World Health Organization, 2022). Dentro de esta caracterización, la evaluación de la respuesta humoral es un componente clave, ya que permite determinar si la formulación induce anticuerpos específicos frente al antígeno seleccionado, y aporta una primera aproximación a la magnitud y persistencia de la respuesta inducida (Plotkin, 2023). En el desarrollo de vacunas, los anticuerpos se emplean como marcadores de inmunogenicidad y pueden contribuir a la definición de indicadores de protección, en particular cuando se evalúa su actividad funcional mediante ensayos de neutralización. En este aspecto, la detección de anticuerpos totales refleja reconocimiento antigénico, pero no equivale necesariamente a actividad neutralizante, de manera que ambas mediciones entregan información complementaria durante la evaluación de una formulación candidata (King et al., 2024). El análisis de la respuesta humoral se orientó a determinar la inducción de anticuerpos específicos frente a las glicoproteínas Gn/Gc, ya que su participación en la entrada viral permite vincular el reconocimiento antigénico con una potencial actividad funcional mediada por anticuerpos neutralizantes frente a ANDV (Tscherne et al., 2026).

La evaluación cinética permitió analizar la aparición, magnitud máxima y persistencia de IgG anti-Gn/Gc durante el periodo de seguimiento. Este tipo de análisis destaca en la evaluación vacunal porque las trayectorias de anticuerpos entregan información sobre la duración de la respuesta humoral y pueden orientar la definición de esquemas de inmunización y momentos de refuerzo (Deichmann et al., 2025). La determinación se realizó mediante ELISA, debido a su sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento, lo que permitió comparar la magnitud de la respuesta entre los distintos grupos y puntos temporales (Tang et al., 2024). El análisis mostró que la señal de IgG anti-Gn/Gc se mantuvo baja después de la primera inmunización y hasta el día 14, mientras que el refuerzo administrado en ese punto fue seguido por un aumento al día 21. En este tiempo, ambas dosis de LNPs-ARNm mostraron absorbancias mayores respecto a PBS, tanto para 10 µg como para 20 µg, al igual que el control rGnGc. Este perfil es compatible con la capacidad de las vacunas de ARNm para inducir respuestas humorales rápidas frente a antígenos virales, como describe la investigación de Gebre et al. (2022), en la que los anticuerpos aumentaron durante las primeras semanas posteriores a la inmunización o al refuerzo con plataformas de ARNm. Sin embargo, la disminución observada en el día 28, seguida por una recuperación parcial en el día 35, indicó que la respuesta detectada no se sostuvo con la misma magnitud durante el intervalo evaluado. Dicha caída apuntó a una posible contracción de una respuesta humoral temprana, cuya persistencia depende de la consolidación posterior de células B de memoria y células plasmáticas de larga vida (Wietschel et al., 2024).

La caracterización de la respuesta humoral continuó con la medición de los títulos de anticuerpos totales y neutralizantes. Mediante ELISA se estimó la magnitud de las inmunoglobulinas específicas totales contra Gn/Gc, mientras que para la cuantificación neutralizante se empleó un vector lentiviral pseudotipado con dichas glicoproteínas. Este sistema no replicativo proporcionó una evaluación funcional y precisa de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la entrada viral (Ning et al., 2023). La determinación de la actividad neutralizante es crítica para ANDV, ya que anticuerpos monoclonales dirigidos contra Gn/Gc han mostrado capacidad de protección *in vivo* en el modelo de hámster sirio (Duehr et al., 2020). En el día 21, los títulos de anticuerpos totales alcanzaron medias de 47.84 para 10 µg, 53.82 para 20 µg y 107.63 para rGnGc,

sin diferencias entre los grupos activos. De forma concordante, los títulos neutralizantes alcanzaron medias de 26.91 para ambas dosis de ARNm, y 38.05 para rGnGc, también sin diferencias entre los grupos activos. Los resultados indican que, una semana después del refuerzo, la formulación LNPs-ARNm indujeron no solo reconocimiento antigénico frente a Gn/Gc, sino también anticuerpos con actividad funcional. Además, la similitud entre 10 µg y 20 µg muestra que el incremento de la dosis de ARNm no se tradujo en una mayor magnitud de anticuerpos totales ni en una mejora de la actividad neutralizante en el punto de mayor respuesta. Hacia el día 35, los títulos de anticuerpos totales disminuyeron a 16.92 y 15.04 para 10 µg y 20 µg, respectivamente, mientras que rGnGc alcanzó una media de 256.00. El mismo patrón se observó en los títulos neutralizantes, que disminuyeron a 10.06 para 10 µg y 7.52 para 20 µg, en tanto que el control proteico alcanzó una media de 66.81. Esta evolución mostró que la respuesta inducida por las formulaciones de ARNm perdió magnitud durante el seguimiento, y que esa disminución no se limitó a los anticuerpos de unión, sino que también alcanzó a la fracción funcional de la respuesta humoral.

El intervalo de 14 días entre la primera inmunización y el refuerzo permitió evaluar la respuesta humoral temprana inducida por una segunda administración de LNPs-ARNm frente a Gn/Gc. Esta elección se alineó con la cinética rápida descrita para vacunas de ARNm, capaces de inducir anticuerpos específicos pocos días después de la inmunización en modelos murinos (Gebre et al., 2022), y con estudios preclínicos de vacunas de ARNm que han empleado refuerzos en el día 14 para evaluar inmunogenicidad temprana (Zhang et al., 2020). En ese sentido, el aumento de anticuerpos totales y neutralizantes al día 21 confirmó la actividad inmunológica del candidato en un esquema corto. La disminución posterior indicó que esa ventana no favoreció una respuesta sostenida en los tiempos evaluados, y se vincula con lo discutido por Garcia-Dominguez et al. (2022) respecto a la asociación entre intervalos prolongados de inmunización con ARNm y respuestas humorales más estables. Estos autores reportaron que el intervalo entre la primera inmunización y el refuerzo en modelo murino modifica la cinética, calidad y magnitud de la respuesta inmune, con respuestas humorales más durables cuando se emplean intervalos más prolongados entre dosis. Por ello, el esquema seleccionado fue válido para demostrar

inmunogenicidad funcional temprana, pero no como el intervalo más adecuado para maximizar la persistencia de la respuesta humoral frente a Gn/Gc.

La comparación con otros prototipos dirigidos contra ANDV permitió matizar la respuesta obtenida. Kuzmin et al. (2024) reportaron que formulaciones de ARNm con uridina y N1-metilpseudouridina indujeron títulos neutralizantes detectables frente a ANDV tras dos inmunizaciones en los días 0 y 21 en hámster sirio, con un rango amplio después del refuerzo, entre 49 y 946. El extremo inferior de ese rango se ubicó en un orden de magnitud cercano al observado en este estudio al día 21, lo que refuerza que las formulaciones evaluadas indujeron una respuesta funcional temprana. A la vez, los valores superiores alcanzados por Kuzmin et al. (2024) mostraron que el mismo blanco antigénico puede inducir títulos neutralizantes de mayor magnitud bajo condiciones de formulación, expresión o esquema distintas. Además, en dicho estudio los títulos neutralizantes fueron comparables entre plataformas pese a diferencias en los títulos de anticuerpos de unión, lo que mostró que la magnitud de anticuerpos totales anti-Gn/Gc no predice de forma lineal la actividad neutralizante.

Esta relación entre unión y neutralización también ha sido abordada desde la estructura y presentación de Gn/Gc. Guo et al. (2026) aportaron evidencia estructural sobre la organización *in situ* del complejo Gn/Gc de ANDV y mostraron que la presentación del antígeno puede condicionar la relación entre anticuerpos de unión y actividad neutralizante. En particular, el estudio describió que una mayor respuesta de anticuerpos de unión no se traduce necesariamente en un aumento proporcional de la neutralización. Este antecedente adquiere relevancia al considerar que Gn/Gc no es un antígeno soluble simple, sino un complejo de glicoproteínas de membrana cuya organización, procesamiento y presentación estructural pueden influir en la calidad funcional de la respuesta humoral. De manera complementaria, Meyer et al. (2026) demostraron que la formulación de Kuzmin et al. (2024) contra ANDV puede alcanzar protección en hámster sirio bajo un esquema de dosis única. Frente a estos antecedentes, los resultados confirmaron la capacidad de ambas formulaciones para inducir una respuesta humoral funcional temprana, aunque con menor magnitud y persistencia que la descrita para prototipos más avanzados.

Las diferencias con estos candidatos no se limitan al intervalo de inmunización o a la dosis evaluada, sino que también involucran el diseño molecular del ARNm. Kuzmin et al. (2024) emplearon una construcción diferente a la establecida en este trabajo, con la 5'-UTR del mismo segmento M viral, y una 3'-UTR humana compuesta por secuencias naturales previamente asociadas con aumento de expresión proteica (Orlandini von Niessen et al., 2019). En vista que las regiones no traducidas del ARNm influyen en la expresión de las glicoproteínas, la menor magnitud y persistencia observadas también podrían atribuirse a las diferencias en el diseño entre prototipos, lo cual probablemente influyó en la eficiencia, duración y calidad de la expresión de Gn/Gc mediada por el ARNm. En particular, las UTRs empleadas por Kuzmin et al. (2024) entregan un punto de comparación directo para futuras optimizaciones de la construcción, ya que estos elementos contribuirían a modular la traducción, estabilidad y disponibilidad del antígeno durante la fase crítica de activación y maduración de la respuesta humoral.

Otro factor con influencia potencial en la respuesta observada es la biodistribución de las LNPs después de la administración intramuscular. Hassett et al. (2024) mostraron que, tras la inmunización con vacunas de ARNm por esta vía, el principio activo y la proteína expresada pueden detectarse tanto en el sitio de inyección como en ganglios linfáticos drenantes, con una señal temprana que disminuye con el tiempo. Este antecedente respalda que la magnitud y duración de la respuesta humoral no dependen solo de la dosis de ARNm administrada, sino también del acceso del sistema de entrega a tejidos inmunológicos, y de la persistencia del estímulo antigénico. En esta línea, la entrega y expresión de ARNm en órganos linfoides secundarios se ha asociado con la inducción de respuestas adaptativas en modelos murinos (Takanashi et al., 2023). Las LNPs formuladas en este estudio presentaron un tamaño promedio cercano a 150 nm, lo que las coloca dentro del rango compatible con formulaciones vacunales de ARNm, pero al encontrarse en el límite superior del intervalo, también se considera una variable de optimización para favorecer el tráfico hacia ganglios linfáticos y la expresión antigénica posterior a la administración intramuscular (Hassett et al., 2024).

La relación entre anticuerpos totales y neutralizantes también debe dilucidarse considerando el formato antigénico usado en los ensayos. Los títulos de anticuerpos totales se determinaron mediante ELISA frente a rGnGc renaturalizado producido en *P.*

pastoris, mientras que la neutralización evaluó la capacidad funcional de los anticuerpos en un vector pseudotipado con Gn/Gc y producido en células de mamífero. En la generación del vector se utilizó el vector pENTRY-GPC, de manera que el procesamiento hacia Gn/Gc dependió del sistema de expresión, que debió ser similar al antígeno expresado por el ARNm. Por tanto, ambas mediciones no interrogaron exactamente el mismo repertorio de anticuerpos. La detección por ELISA depende de la conformación, exposición y accesibilidad de los epítomos presentes en el antígeno de captura; en contraste, la neutralización depende de anticuerpos capaces de reconocer regiones funcionales de Gn/Gc en un contexto más próximo a la entrada viral (Duehr et al., 2020; Moritz et al., 2022). En este aspecto, los perfiles de glicosilación asociados a la producción recombinante en *P. pastoris* difieren de los generados en sistemas celulares de mamífero y pueden influir en la exposición, accesibilidad o reconocimiento de epítomos en glicoproteínas recombinantes (van Oort et al., 2004). Así, la señal de anticuerpos totales se planteó como una medición dependiente del formato antigénico usado en el ensayo, mientras que los títulos neutralizantes aportaron una lectura funcional frente a un formato de Gn/Gc más cercano al expresado por la plataforma de ARNm.

La evolución de los títulos totales y neutralizantes puede integrarse con esta interpretación. El aumento observado al día 21 reflejó una respuesta humoral temprana posterior al refuerzo, mientras que la caída posterior fue compatible con la contracción de una respuesta sustentada inicialmente por plasmablastos o células plasmáticas de vida corta (Wietschel et al., 2024). En los títulos, esta dinámica fue más evidente porque la disminución no solo afectó a los anticuerpos de unión, sino también a la fracción neutralizante. La activación diferencial de respuestas extrafoliculares y de centro germinal ofrece un marco adicional para explicar esta dinámica. La vía extrafolicular permite una generación rápida de plasmablastos y células plasmáticas de vida corta, asociada con producción temprana de anticuerpos; la vía de centro germinal sigue una cinética más lenta, pero favorece hipermutación somática, maduración de afinidad, generación de memoria y células plasmáticas de mayor duración (Voss et al., 2022). En modelos de respuesta aguda, los plasmablastos extrafoliculares alcanzan su máximo antes que las células B de centro germinal, lo que respalda un desfase temporal

entre ambas rutas de diferenciación (Serrán et al., 2022). Desde esta perspectiva, el máximo del día 21 puede asociarse con una oleada temprana posterior al refuerzo, mientras que la caída del día 28 se relaciona con la contracción de esa respuesta de vida corta. La recuperación parcial observada al día 35 podría reflejar una contribución más tardía de células derivadas del centro germinal, aunque todavía limitada bajo las condiciones evaluadas.

Esta lectura concuerda con lo descrito para vacunas de ARNm, en las que la respuesta de centro germinal participa en la maduración progresiva de células B y anticuerpos. W. Kim et al. (2022) reportaron que la vacunación con ARNm frente a SARS-CoV-2 indujo respuestas persistentes de centro germinal, aumento de hipermutación somática y mayor avidez de anticuerpos durante el seguimiento. En este estudio, la recuperación parcial del día 35 no alcanzó la magnitud observada al día 21, lo que mostró que la contribución tardía no compensó por completo la contracción inicial. Además, la conservación del patrón temporal entre 10 µg y 20 µg indicó que el aumento de dosis no modificó la cronología general de la respuesta, por tanto, la dinámica observada parece depender más de la duración y calidad del estímulo antigénico que de la cantidad de ARNm administrada.

En síntesis, las formulaciones de LNPs-ARNm indujeron anticuerpos específicos y neutralizantes frente a Gn/Gc después del refuerzo, lo que confirmó la actividad inmunológica del candidato y respaldó la selección del antígeno como blanco funcional. Sin embargo, la disminución de ambos títulos hacia el día 35 mostró una persistencia limitada de la respuesta. La similitud entre 10 µg y 20 µg indicó que el aumento de dosis no mejoró el componente humoral bajo el esquema evaluado.

La evaluación de la respuesta celular complementó la caracterización humoral del candidato vacunal, ya que la inmunidad inducida por vacunas no depende solo de la producción de anticuerpos, sino también de la activación de respuestas celulares capaces de modular la respuesta antiviral y contribuir a la memoria inmunológica. Las vacunas de ARNm tienen la capacidad de inducir respuestas humorales y celulares con orientación Th1, caracterizadas por la producción de IFN-γ en respuestas T específicas (Hellgren et al., 2024). Además, la inmunidad celular aporta información adicional sobre la calidad de la respuesta vacunal, especialmente cuando se evalúan antígenos virales

cuya protección puede depender de la integración entre anticuerpos, linfocitos T y células presentadoras de antígeno (Chen et al., 2025). En este estudio, la respuesta celular se evaluó al final del ensayo mediante RT-qPCR en esplenocitos estimulados *ex vivo* con rGnGc, con el propósito de estimar la expresión relativa de citocinas asociadas con activación inflamatoria, y polarización Th1/Th2. La técnica RT-qPCR permite cuantificar de forma sensible y simultánea cambios en la expresión de múltiples genes de citocinas, por consiguiente resultó adecuada para caracterizar el perfil transcripcional de IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-6 (Liu et al., 2023).

La respuesta de IFN- γ fue el componente más informativo de esta evaluación. Tras la estimulación, los esplenocitos de los animales inmunizados con LNPs-ARNm mostraron un aumento de la expresión relativa respecto al grupo PBS, con una señal más marcada en la dosis de 10 μ g que en la de 20 μ g. El control rGnGc también mostró aumento de IFN- γ , en concordancia con su mayor respuesta humoral al final del seguimiento. Este patrón indicó que ambas formulaciones de ARNm indujeron una respuesta celular detectable frente al antígeno, con un perfil compatible con activación de tipo Th1. La inducción de IFN- γ es importante porque esta citocina participa en la activación de células efectoras, el aumento de la presentación antigénica y la coordinación de respuestas celulares frente a antígenos virales (Chen et al., 2025). Además, el resultado concuerda con lo descrito para vacunas de ARNm, en las que las respuestas específicas de memoria CD4⁺ pueden mostrar predominio de citocinas asociadas a perfiles Th1, como IFN- γ e IL-2 (Hellgren et al., 2024).

El comportamiento de IL-12 complementó el perfil observado para IFN- γ , ya que ambas dosis de LNPs-ARNm mostraron un aumento respecto a los controles no inmunizados o formulados sin ARNm, aunque de menor magnitud que el observado para rGnGc. Este resultado concordó con una orientación hacia respuesta Th1, debido a la participación de IL-12 en la diferenciación de linfocitos Th1 y en la inducción de IFN- γ (Hojecki et al., 2025). La inducción moderada de IL-12 puede relacionarse con la modificación del ARNm empleado en la formulación, pues la incorporación de nucleósidos modificados, como N1-metilpseudouridina, reduce el reconocimiento por sensores innatos y atenúa la producción de citocinas asociadas a la activación de células dendríticas (Andries et al., 2015; Karikó et al., 2005). Por ello, la señal moderada

de IL-12 no descartó activación celular, sino que reflejó el equilibrio esperado en una plataforma diseñada para mantener expresión antigénica y limitar una activación innata excesiva. La similitud entre 10 µg y 20 µg también indicó que el incremento de dosis no mejoró de forma clara la expresión de esta citocina.

La estimulación de IL-4 mostró un perfil distinto. La dosis de 10 µg no evidenció una inducción marcada de esta citocina, mientras que la dosis de 20 µg y el control rGnGc mostraron una mayor señal. Esta distribución no apoyó una polarización Th2 dominante por las formulaciones de ARNm, especialmente para la dosis de 10 µg. El resultado fue coherente con el perfil descrito por Hellgren et al. (2024) para vacunas de ARNm, quienes observaron una orientación preferente hacia respuestas Th1 antes que una polarización Th2 marcada. En el caso del control proteico, la mayor señal de IL-4 puede relacionarse con el sesgo Th2 asociado a adyuvantes de aluminio en modelos murinos (HogenEsch, 2013).

La expresión de IL-6 aumentó en los grupos activos respecto al grupo PBS, con un perfil similar entre ambas dosis de LNPs-ARNm y el control proteico. Esta citocina puede reflejar activación inflamatoria posterior a la estimulación antigénica *ex vivo*, más que una polarización específica de la respuesta adaptativa. En vacunas de ARNm, la activación innata de la plataforma forma parte de su actividad inmunoestimulante, ya que tanto el ARNm como los componentes lipídicos pueden inducir señales inflamatorias y de interferón que condicionan la respuesta adaptativa posterior (Kim et al., 2024; Y. Lee et al., 2023). En esa línea, la señal de IL-6 observada en los grupos activos fue consistente con una capacidad de respuesta inflamatoria frente al estímulo antigénico, sin una separación clara entre 10 µg y 20 µg.

Al igual que en el ELISA, la interpretación debe considerar que el rGnGc empleado para la reestimulación difirió del antígeno producido en células tras la administración de LNPs-ARNm. Por ello, la respuesta observada representó reactividad frente al formato recombinante utilizado y podría no abarcar todo el repertorio celular inducido por Gn/Gc expresado en células de mamífero (Moritz et al., 2022).

El análisis global de citocinas indicó una respuesta celular compatible con orientación Th1 en los grupos vacunados con LNPs-ARNm. Esta interpretación se apoyó en el aumento de IFN-γ y, en menor medida, de IL-12, junto con la ausencia de una inducción

marcada de IL-4 en la dosis de 10 µg. Yizhuo Zhang et al. (2023) reportaron hallazgos comparables en un prototipo vacunal de ARNm, con inducción de anticuerpos específicos, aumento de citocinas como IFN-γ, IL-12, IL-4 e IL-10, y proliferación de esplenocitos tras estimulación antigénica. De esta forma, los resultados reforzaron la capacidad del candidato vacunal desarrollado para activar de manera simultánea componentes humorales y celulares de la respuesta inmunitaria. Este comportamiento también mantuvo relación con la validación previa del control positivo empleado en este estudio, en la que Starck-Mendez (2020) describió una elevación significativa de IFN-γ, IL-12 e IL-6. Sin embargo, debido a que la expresión de citocinas se evaluó en esplenocitos totales, no fue posible identificar las poblaciones celulares responsables de esta respuesta. Esta distinción es relevante, dado que las citocinas evaluadas pueden ser producidas por diferentes componentes de la respuesta inmunitaria y la disponibilidad de reactivos para la caracterización fenotípica inmunitaria en hámster sirio es limitada.

En términos comparativos, la ausencia de diferencias claras entre 10 µg y 20 µg en el perfil de citocinas indicó que el aumento de dosis no fortaleció de forma evidente el componente celular evaluado. Este comportamiento coincidió con la respuesta humoral, en la que la dosis alta tampoco incrementó los títulos totales ni neutralizantes.

Los resultados demostraron la factibilidad de producir un ARNm modificado que codifica Gn/Gc, formularlo en LNPs con atributos fisicoquímicos adecuados y generar respuestas humorales, neutralizantes y celulares detectables en hámster sirio. La disminución de la respuesta humoral hacia el final del seguimiento indicó que las siguientes etapas de desarrollo deberán priorizar la persistencia de la expresión antigénica, el diseño de las regiones regulatorias y el intervalo de inmunización. Además, la ausencia de una ventaja inmunológica de 20 µg, junto con su comportamiento fisiológico menos favorable, sustentó la selección de 10 µg bajo las condiciones evaluadas. Estos hallazgos aportaron una base experimental para optimizar el prototipo y evaluar posteriormente su capacidad protectora.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente proyecto permiten aceptar parcialmente la hipótesis planteada, de acuerdo con las siguientes afirmaciones:

El prototipo vacunal de ARNm codificante de las glicoproteínas Gn/Gc del virus Andes se produjo mediante un proceso de síntesis *in vitro* libre de células, se formuló de manera eficiente en nanopartículas lipídicas, y mantuvo la capacidad de expresar los antígenos de interés. Asimismo, la inmunización en el modelo de hámster sirio indujo una respuesta inmunitaria específica, basada en anticuerpos con actividad neutralizante frente al sistema de lentiviral pseudotipado con Gn/Gc y un perfil de expresión de citocinas compatible con una orientación Th1. En su conjunto, dichos resultados respaldan el componente de inmunogenicidad planteado en la hipótesis.

Los resultados proporcionan evidencia preliminar de tolerabilidad de la formulación, pero no nos permiten establecer una demostración definitiva de seguridad, dado que el estudio no posee el alcance de una evaluación toxicológica formal. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la dosis de 10 µg mostró el comportamiento fisiológico más favorable, mientras que el incremento a 20 µg no produjo una mejora detectable de las respuestas humores, neutralizantes o celulares y presentó un comportamiento fisiológico menos favorable. En consecuencia, se propone la alternativa de 10 µg como la dosis candidata más adecuada para futuros desarrollos del prototipo.

En conjunto, este trabajo demostró la factibilidad tecnológica e inmunológica de generar un candidato vacunal de ARNm contra el virus Andes, y permite establecer una base experimental para su optimización y posterior evaluación preclínica. Sin embargo, la capacidad protectora del prototipo no está validada y deberá determinarse en estudios posteriores, mediante un desafío con virus Andes infeccioso.

VIII. RECOMENDACIONES

La optimización del diseño molecular del ARNm debería priorizar la evaluación de la 5'-UTR natural del segmento M de ANDV, considerando su uso en construcciones vacunales previas dirigidas a Gn/Gc. Esta estrategia compararía el efecto de dicho elemento regulatorio sobre la eficiencia de expresión, la estabilidad del transcrito y la persistencia de la respuesta inmunológica inducida, junto con ajustes complementarios en la 3'-UTR, la cola de poli(A) y el control de impurezas derivadas de la transcripción *in vitro*.

La evaluación de esquemas de inmunización con intervalos de refuerzo más amplios y seguimientos más prolongados permitiría determinar si la caída de anticuerpos observada hacia el final del ensayo puede corregirse mediante ajustes en la cinética de estimulación antigénica y maduración de la respuesta humoral.

La caracterización de la respuesta celular se puede profundizar con metodologías complementarias, como ELISpot, citometría de flujo o análisis multiparamétrico de citocinas, que permitan identificar las poblaciones celulares involucradas y definir con mayor precisión la contribución de linfocitos T CD4+, T CD8+ y otras células efectoras.

La presentación estructural de Gn/Gc generada por el ARNm debería analizarse en relación con la actividad neutralizante, incorporando ensayos orientados a evaluar conformación antigénica, reconocimiento de epítopos y funcionalidad de los anticuerpos inducidos frente a formas más cercanas a la glicoproteína viral nativa.

Como siguiente etapa preclínica, se propone avanzar hacia estudios de protección con mayor número de animales, seguimiento ampliado de seguridad y evaluación frente a desafío viral o modelos funcionales equivalentes, para determinar la capacidad protectora del prototipo y establecer los parámetros necesarios para su optimización como candidato vacunal frente a ANDV.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceil, J., Paschall, A. V., Knoot, C. J., Robinson, L. S., Scott, N. E., Feldman, M. F., Harding, C. M., & Avci, F. Y. (2022). Immunogenicity and protective efficacy of a prototype pneumococcal bioconjugate vaccine. *Vaccine*, 40(42), 6107-6113. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.09.018>
- Acuña, R., Cifuentes-Muñoz, N., Márquez Chantal, L., Bulling, M., Klingström, J., Mancini, R., Lozach, P.-Y., & Tischler Nicole, D. (2014). Hantavirus Gn and Gc Glycoproteins Self-Assemble into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 88(4), 2344-2348. <https://doi.org/10.1128/jvi.03118-13>
- Afzal, S., Ali, L., Batool, A., Afzal, M., Kanwal, N., Hassan, M., Safdar, M., Ahmad, A., & Yang, J. (2023). Hantavirus: an overview and advancements in therapeutic approaches for infection. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1233433. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1233433>
- Ahl, P. L. (2025). Microfluidic and Turbulent Mixing for mRNA LNP Vaccines. *Pharmaceutics*, 17(9), 1148. <https://www.mdpi.com/1999-4923/17/9/1148>
- Akram, S. M., Mangat, R., & Huang, B. (2022). Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Al Turihi, N., Allouche, D., Quéré, M., Sculler, M., & Legastelois, I. (2025). Characterization of poly(A) and poly(T) tail lengths in plasmid DNA by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 417(1), 59-68. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05654-6>
- Alandijany, T. A., & Qashqari, F. S. (2025). Evaluating the efficacy, safety, and immunogenicity of FDA-approved RSV vaccines: a systematic review of Arexvy, Abrysvo, and mResvia [Systematic Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 16 - 2025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1624007>
- Alonso, D. O., Pérez-Sautu, U., Bellomo, C. M., Prieto, K., Iglesias, A., Coelho, R., Periolo, N., Domenech, I., Talmon, G., Hansen, R., Palacios, G., & Martinez, V. P. (2020). Person-to-Person Transmission of Andes Virus in Hantavirus Pulmonary Syndrome, Argentina, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 26(4), 756-759. <https://doi.org/10.3201/eid2604.190799>
- Alqahtani, M. S., Syed, R., Alqahtani, A. S., Almarfadi, O. M., Roni, M. A., & Sadhu, S. S. (2024). Synthesis and bioactivity of a novel surfactin-based lipopeptide for mRNA delivery [10.1039/D4NA00404C]. *Nanoscale Advances*, 6(20), 5193-5206. <https://doi.org/10.1039/D4NA00404C>
- An, S. S., Pennella, C. M., Gonnabathula, A., Chen, J., Wang, N., Gaestel, M., Hassoun, P. M., Fredberg, J. J., & Kayyali, U. S. (2005). Hypoxia alters biophysical properties of endothelial cells via p38 MAPK- and Rho kinase-dependent pathways. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 289(3), C521-530. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00429.2004>
- Anderson, E. J., Roupheal, N. G., Widge, A. T., Jackson, L. A., Roberts, P. C., Makhene, M., Chappell, J. D., Denison, M. R., Stevens, L. J., Pruijssers, A. J., McDermott, A. B., Flach, B., Lin, B. C., Doria-Rose, N. A., O'Dell, S., Schmidt, S. D., Corbett, K. S., Swanson, P. A., Padilla, M.,...Beigel, J. H. (2020). Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *New England Journal of Medicine*, 383(25), 2427-2438. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2028436>
- Andries, O., Mc Cafferty, S., De Smedt, S. C., Weiss, R., Sanders, N. N., & Kitada, T. (2015). N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in

- mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release*, 217, 337-344.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>
- Atallah, C., Piegay, B., Chiavazza, V., & Charcosset, C. (2024). Encapsulation of mRNA in lipid nanoparticles by membrane micromixing. *Chemical Engineering Science*, 290, 119877. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2024.119877>
- Avižinienė, A., Kučinskaitė-Kodžė, I., Petraitytė-Burneikienė, R., Žvirblienė, A., Mertens, M. L., Schmidt, S., Schlegel, M., Lattwein, E., Koellner, B., & Ulrich, R. G. (2023). Characterization of a Panel of Cross-Reactive Hantavirus Nucleocapsid Protein-Specific Monoclonal Antibodies. *Viruses*, 15(2), 532.
<https://doi.org/10.3390/v15020532>
- Avšič-Županc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, e6-e16. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Barbier, A. J., Jiang, A. Y., Zhang, P., Wooster, R., & Anderson, D. G. (2022). The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. *Nature Biotechnology*, 40(6), 840-854. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01294-2>
- Barker, J., daSilva, L. L. P., & Crump, C. M. (2023). Mechanisms of bunyavirus morphogenesis and egress. *Journal of General Virology*, 104(4).
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001845>
- Beitari, S., Agbayani, G., Hewitt, M., Duque, D., Bavananthasivam, J., Sandhu, J. K., Akache, B., Hadžisejdić, I., & Tran, A. (2023). Effectiveness of VSV vectored SARS-CoV-2 spike when administered through intranasal, intramuscular or a combination of both. *Scientific Reports*, 13(1), 21390. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48397-7>
- Bellomo, C. M., Alonso, D. O., Pérez-Sautu, U., Prieto, K., Kehl, S., Coelho, R. M., Periolo, N., Di Paola, N., Ferressini-Gerpe, N., Kuhn, J. H., Sanchez-Lockhart, M., Palacios, G., & Martínez, V. P. (2023). Andes Virus Genome Mutations That Are Likely Associated with Animal Model Attenuation and Human Person-to-Person Transmission. *mSphere*, 8(3), e0001823. <https://doi.org/10.1128/msphere.00018-23>
- Bellomo, C. M., Kehl, S., Alonso, D. O., López, W., Cassinelli, F., Coelho, R. M., Bravo, G., Aguirre, S., Dib, M., Periolo, N., Toscano, C., Gil, J., García Campos, F., Ferro, I., & Martínez, V. P. (2025). Novel Orthohantavirus Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northern Argentina. *Viruses*, 17(5), 717.
<https://doi.org/10.3390/v17050717>
- Beltrán-Ortiz, C. E., Starck-Mendez, M. F., Fernández, Y., Farnós, O., González, E. E., Rivas, C. I., Camacho, F., Zuñiga, F. A., Toledo, J. R., & Sánchez, O. (2017). Expression and purification of the surface proteins from Andes virus. *Protein Expression and Purification*, 139, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.013>
- Bérouti, M., Wagner, M., Greulich, W., Piseddu, I., Gärtig, J., Hansbauer, L., Müller-Hermes, C., Heiss, M., Pichler, A., Tölke, A. J., Witte, G., Hopfner, K.-P., Anz, D., Sattler, M., Carell, T., & Hornung, V. (2025). Pseudouridine RNA avoids immune detection through impaired endolysosomal processing and TLR engagement. *Cell*, 188(18), 4880-4895.e4815. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.05.032>
- Bill, R. M. (2015). Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *J Pharm Pharmacol*, 67(3), 319-328. <https://doi.org/10.1111/jphp.12353>
- Billingsley, M. M., Singh, N., Ravikumar, P., Zhang, R., June, C. H., & Mitchell, M. J. (2020). Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. *Nano Letters*, 20(3), 1578-1589.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04246>
- Bird, B. H., Shrivastava-Ranjan, P., Dodd, K. A., Erickson, B. R., & Spiropoulou, C. F. (2016). Effect of Vandetanib on Andes virus survival in the hamster model of Hantavirus

- pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, 132, 66-69.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.05.014>
- Blakney, A. K., Top, K. A., Cowling, B. J., Larson, H. J., Shattock, R. J., & Sadarangani, M. (2026). Safety and efficacy of mRNA vaccines: a mechanistic and public health perspective. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(26\)00512-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(26)00512-X)
- Borah, P., Deb, P. K., Al-Shar'i, N. A., Dahabiyeh, L. A., Venugopala, K. N., Singh, V., Shinu, P., Hussain, S., Deka, S., Chandrasekaran, B., & Jaradat, D. s. M. M. (2021). Perspectives on RNA Vaccine Candidates for COVID-19 [Review]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.635245>
- Bouazzaoui, A., Abdellatif, A. A. H., Al-Allaf, F. A., Bogari, N. M., Al-Dehlawi, S., & Qari, S. H. (2021). Strategies for Vaccination: Conventional Vaccine Approaches Versus New-Generation Strategies in Combination with Adjuvants. *Pharmaceutics*, 13(2).
- Bradfute, S. B., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., Laenen, L., Tischler, N. D., & Maes, P. (2024). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hantaviridae 2024. *Journal of General Virology*, 105(4). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001975>
- Braun, M. R., Martinez, C. I., Dora, E. G., Showalter, L. J., Mercedes, A. R., & Tucker, S. N. (2023). Mucosal immunization with Ad5-based vaccines protects Syrian hamsters from challenge with omicron and delta variants of SARS-CoV-2 [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 14 - 2023.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1086035>
- Brocato, R., Josleyn, M., Ballantyne, J., Vial, P., & Hooper, J. W. (2012). DNA vaccine-generated duck polyclonal antibodies as a postexposure prophylactic to prevent hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *PloS One*, 7(4), e35996.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035996>
- Brocato, R. L., & Hooper, J. W. (2019). Progress on the Prevention and Treatment of Hantavirus Disease. *Viruses*, 11(7).
- Brown, K. S., Safronetz, D., Marzi, A., Ebihara, H., & Feldmann, H. (2011). Vesicular stomatitis virus-based vaccine protects hamsters against lethal challenge with Andes virus. *J Virol*, 85(23), 12781-12791. <https://doi.org/10.1128/jvi.00794-11>
- Byrne, P. O., & McLellan, J. S. (2022). Principles and practical applications of structure-based vaccine design. *Current Opinion in Immunology*, 77, 102209.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102209>
- Cameau, E., Zhang, P., Ip, S. Y., Mathiasson, L., & Stenklo, K. (2022). Process & analytical insights for GMP manufacturing of mRNA lipid nanoparticles. *Cell and Gene Therapy Insights*.
- Camperi, J., Lippold, S., Ayalew, L., Roper, B., Shao, S., Freund, E., Nissenbaum, A., Galan, C., Cao, Q., Yang, F., Yu, C., & Guilbaud, A. (2024). Comprehensive Impurity Profiling of mRNA: Evaluating Current Technologies and Advanced Analytical Techniques. *Analytical Chemistry*, 96(9), 3886-3897.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05539>
- Cao, D., Tian, M., Liu, Z., Guo, K., Peng, J., Ravichandra, A., Ferrell, C., & Dong, Y. (2025). Unlock the sustained therapeutic efficacy of mRNA. *Journal of Controlled Release*, 383, 113837. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113837>
- Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00535. <https://doi.org/10.1002/prp2.535>
- Čechová, P., Paloncýová, M., Šrejber, M., & Otyepka, M. (2025). Mechanistic insights into interactions between ionizable lipid nanodroplets and biomembranes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 43(17), 9983-9993.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2329307>

- Chai, S., Wang, L., Du, H., & Jiang, H. (2025). Achievement and Challenges in Orthohantavirus Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 13(2).
<https://doi.org/10.3390/vaccines13020198>
- Chandy, S., & Mathai, D. (2017). Globally Emerging Hantaviruses: An Overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35(2), 165-175.
https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_429
- Chang, B., Crowley, M., Campen, M., & Koster, F. (2007). Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 28(2), 193-200.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-976491>
- Chapman, L. E., Mertz, G. J., Peters, C. J., Jolson, H. M., Khan, A. S., Ksiazek, T. G., Koster, F. T., Baum, K. F., Rollin, P. E., Pavia, A. T., Holman, R. C., Christenson, J. C., Rubin, P. J., Behrman, R. E., Bell, L. J., Simpson, G. L., & Sadek, R. F. (1999). Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. Ribavirin Study Group. *Antiviral Therapy*, 4(4), 211-219.
<https://doi.org/10.1177/135965359900400404>
- Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(11), 817-838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chen, C., Chen, C., Li, Y., Gu, R., & Yan, X. (2023). Characterization of lipid-based nanomedicines at the single-particle level. *Fundamental Research*, 3(4), 488-504.
<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.09.011>
- Chen, K., Hu, J., Li, J., Wu, G., Tie, X., Wu, H., Li, H., Li, J., & Zhang, Y. (2025). Harnessing cellular immunity for next-generation vaccines against respiratory viruses: mechanisms, platforms, and optimization strategies [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 16 - 2025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1618406>
- Chen, L., Zhang, H., Li, M., Wu, B., Zhang, Z., & Gong, R. (2022). An intranasal vaccine targeting the receptor binding domain of SARS-CoV-2 elicits a protective immune response [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1005321>
- Chen, R.-X., Gong, H.-Y., Wang, X., Sun, M.-H., Ji, Y.-F., Tan, S.-M., Chen, J.-M., Shao, J.-W., & Liao, M. (2023). Zoonotic Hantaviridae with Global Public Health Significance. *Viruses*, 15(8), 1705. <https://doi.org/10.3390/v15081705>
- Chheda, U., Pradeepan, S., Esposito, E., Strezsak, S., Fernandez-Delgado, O., & Kranz, J. (2024). Factors Affecting Stability of RNA – Temperature, Length, Concentration, pH, and Buffering Species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(2), 377-385.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.11.023>
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. (2014). Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses*, 6(4), 1801-1822. <https://doi.org/10.3390/v6041801>
- Cimica, V., Dalrymple, N. A., Roth, E., Nasonov, A., & Mackow, E. R. (2014). An innate immunity-regulating virulence determinant is uniquely encoded by the Andes virus nucleocapsid protein. *mBio*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01088-13>
- Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R. A., Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, C. T., Dipiazza, A. T., Dinno, K. H., Elbashir, S. M., Shaw, C. A., Woods, A., Fritch, E. J., Martinez, D. R., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M.,...Graham, B. S. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 586(7830), 567-571.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>

- Costello, R. A., Leslie, S. W., & Nehring, S. M. (2024). Disseminated Intravascular Coagulation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.
- Cullis, P. R., & Felgner, P. L. (2024). The 60-year evolution of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(9), 709-722.
<https://doi.org/10.1038/s41573-024-00977-6>
- Custer, D. M., Thompson, E., Schmaljohn, C. S., Ksiazek, T. G., & Hooper, J. W. (2003). Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol*, 77(18), 9894-9905.
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.18.9894-9905.2003>
- da Costa, H. H. M., Bielavsky, M., Orts, D. J. B., Araujo, S., Adriani, P. P., Nogueira, J. S., Astray, R. M., Pandey, R. P., Lancellotti, M., Cunha-Junior, J. P., & Prudencio, C. R. (2023). Production of Recombinant Zika Virus Envelope Protein by Airlift Bioreactor as a New Subunit Vaccine Platform. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13955. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/18/13955>
- Dalrymple, N. A., & Mackow, E. R. (2014). Virus interactions with endothelial cell receptors: implications for viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 7, 134-140.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.006>
- Dang, X., Guelen, L., Lutje Hulsik, D., Ermakov, G., Hsieh, E. J., Kreijtz, J., Stammen-Vogelzangs, J., Lodewijks, I., Bertens, A., Bramer, A., Guadagnoli, M., Nazabal, A., van Elsas, A., Fischmann, T., Juan, V., Beebe, A., Beaumont, M., & van Eenennaam, H. (2023). Epitope mapping of monoclonal antibodies: a comprehensive comparison of different technologies. *MAbs*, 15(1), 2285285.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2285285>
- Deichmann, J., Barda, N., Canetti, M., Peretz, Y., Weiss-Ottolenghi, Y., Lustig, Y., Regev-Yochay, G., & Lipsitch, M. (2025). Predicting antibody kinetics and duration of protection against SARS-CoV-2 following vaccination from sparse serological data. *PLOS Computational Biology*, 21(6), e1013192.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1013192>
- Deng, Z., Tian, Y., Song, J., An, G., & Yang, P. (2022). mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy [Review]. *Frontiers in Immunology, Volume 13 - 2022*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.887125>
- Deo, S., Desai, K., Patore, A., Wadapurkar, R., Rade, S., Mahudkar, S., Sathe, M., Srivastava, S., Prasanna, P., & Singh, A. (2023). Evaluation of self-amplifying mRNA platform for protein expression and genetic stability: Implication for mRNA therapies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 680, 108-118.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.09.016>
- Destexhe, E. (2025). A platform approach as a plausible option for nonclinical safety assessment of adjuvanted vaccines. *npj Vaccines*, 10(1), 192.
<https://doi.org/10.1038/s41541-025-01245-3>
- Dheerasekara, K., Sumathipala, S., & Muthugala, R. (2020). Hantavirus Infections-Treatment and Prevention. *Curr Treat Options Infect Dis*, 12(4), 410-421.
<https://doi.org/10.1007/s40506-020-00236-3>
- Di, J., Xu, Y., & Li, T. (2025). Critical quality attributes of lipid nanoparticles and in vivo fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(6), 101092.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2025.101092>
- Dieterle, M. E., Solà-Riera, C., Ye, C., Goodfellow, S. M., Mittler, E., Kasikci, E., Bradfute, S. B., Klingström, J., Jangra, R. K., & Chandran, K. (2021). Genetic depletion studies inform receptor usage by virulent hantaviruses in human endothelial cells. *eLife*, 10.
<https://doi.org/10.7554/elife.69708>

- Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de Argentina. (2023). *Boletín Epidemiológico Nacional* N°672, SE 39. Buenos Aires: Ministerio de Salud de Argentina Retrieved from https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2024/04/ben_672_se_39.pdf
- du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M.,...Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Duboeuf, M., Legrand, A.-F., Lozach, P.-Y., & Maise, C. (2025). NSs: the multifaceted bunyavirus virulence factor. *npj Viruses*, 3(1), 65. <https://doi.org/10.1038/s44298-025-00146-5>
- Duehr, J., McMahon, M., Williamson, B., Amanat, F., Durbin, A., Hawman, D. W., Noack, D., Uhl, S., Tan, G. S., Feldmann, H., & Krammer, F. (2020). Neutralizing Monoclonal Antibodies against the Gn and the Gc of the Andes Virus Glycoprotein Spike Complex Protect from Virus Challenge in a Preclinical Hamster Model. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00028-20>
- Duran, T., Cine, N., Karaselek, M. A., Gul, N., Kuccukturk, S., Hatipoglu, D., Ates, M. B., Caliskan, U., & Kocak, N. (2025). Innovative design and comprehensive characterization of a valine-enhanced lipid nanoparticle-coated mRNA vaccine targeting the SARS-CoV-2 S-RBD antigen. *Scientific Reports*, 15(1), 33898. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08142-8>
- Durieux Trouilleteau, Q., Barata-García, S., Arragain, B., Reguera, J., & Malet, H. (2023). Structures of active Hantaan virus polymerase uncover the mechanisms of Hantaviridae genome replication. *Nature Communications*, 14(1), 2954. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38555-w>
- Dutta, B., Kumar Das, S., Temgire, M., Bellare, J., Barick, K. C., Kumar, A., & Hassan, P. A. (2024). Selective induction of apoptotic cell death in lung carcinoma cells by curcumin-loaded PEGylated lipid nanoparticles with minimal normal tissue toxicity: in vitro and in vivo toxicity evaluation by oral delivery [10.1039/D4MA00050A]. *Materials Advances*, 5(10), 4504-4523. <https://doi.org/10.1039/D4MA00050A>
- Ebel, H., Benecke, T., & Vollmer, B. (2022). Stabilisation of Viral Membrane Fusion Proteins in Prefusion Conformation by Structure-Based Design for Structure Determination and Vaccine Development. *Viruses*, 14(8), 1816. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/8/1816>
- Echelon Biosciences Inc. (2023). *Protocol for LNP Preparation and Analysis*. Retrieved 17 febrero 2026 from https://www.echelon-inc.com/wp-content/uploads/2023/09/TDS-LNP-Protocol_Rev1.pdf
- Elkhalifa, D., Rayan, M., Negmeldin, A. T., Elhissi, A., & Khalil, A. (2022). Chemically modified mRNA beyond COVID-19: Potential preventive and therapeutic applications for targeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 145, 112385. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112385>
- Engdahl, T. B., Binshtein, E., Brocato, R. L., Kuzmina, N. A., Principe, L. M., Kwilas, S. A., Kim, R. K., Chapman, N. S., Porter, M. S., Guardado-Calvo, P., Rey, F. A., Handal, L. S., Diaz, S. M., Zagol-Ikapitte, I. A., Tran, M. H., McDonald, W. H., Meiler, J., Reidy, J. X., Trivette, A.,...Crowe, J. E. (2023). Antigenic mapping and functional characterization of human New World hantavirus neutralizing antibodies. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.81743>

- Engdahl, T. B., Kuzmina, N. A., Ronk, A. J., Mire, C. E., Hyde, M. A., Kose, N., Josleyn, M. D., Sutton, R. E., Mehta, A., Wolters, R. M., Lloyd, N. M., Valdivieso, F. R., Ksiazek, T. G., Hooper, J. W., Bukreyev, A., & Crowe, J. E. (2021). Broad and potently neutralizing monoclonal antibodies isolated from human survivors of New World hantavirus infection. *Cell Reports*, 35(5), 109086. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109086>
- Essex, K., Mullen, J., Lauria, M. J., & Braude, D. A. (2023). Management of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Critical Care Transport: A Review. *Air Medical Journal*, 42(6), 483-487. <https://doi.org/10.1016/j.amj.2023.07.011>
- Guideline on the quality aspects of mRNA vaccines (2025). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-aspects-mrna-vaccines_en.pdf
- Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Zhu, B., Wu, X., Liu, J., Zhao, D., & Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- Analytical Procedures for Quality of mRNA Vaccines and Therapeutics, (2025).
- Feng, X., Li, Z., Su, Z., Che, S., Dai, B., Cheng, Y., & Zhang, S. (2024). Rapid and high recovery isolation of mRNA from in vitro transcription system by ammonium sulphate precipitation at room temperature. *Separation and Purification Technology*, 336, 126331. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.126331>
- Feng, X., Su, Z., Cheng, Y., Ma, G., & Zhang, S. (2023). Messenger RNA chromatographic purification: advances and challenges. *Journal of Chromatography A*, 1707, 464321. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464321>
- Fernandes, R. S., de Assis Burle-Caldas, G., Sergio, S. A. R., Bráz, A. F., da Silva Leite, N. P., Pereira, M., de Oliveira Silva, J., Hojo-Souza, N. S., de Oliveira, B., Fernandes, A. P. S. M., da Fonseca, F. G., Gazzinelli, R. T., dos Santos Ferreira, D., & Teixeira, S. M. R. (2025). The immunogenic potential of an optimized mRNA lipid nanoparticle formulation carrying sequences from virus and protozoan antigens. *Journal of Nanobiotechnology*, 23(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03201-8>
- Ferrés, M., Martínez-Valdebenito, C., Angulo, J., Henríquez, C., Vera-Otárola, J., Vergara, M. J., Pérez, J., Fernández, J., Sotomayor, V., Valdés, M. F., González-Candia, D., Tischler, N. D., Vial, C., Vial, P., Mertz, G., & Le Corre, N. (2020). Mother-to-Child Transmission of Andes Virus through Breast Milk, Chile(1). *Emerging Infectious Diseases*, 26(8), 1885-1888. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200204>
- Ferrés, M., Martínez-Valdebenito, C., Henriquez, C., Marco, C., Angulo, J., Barrera, A., Palma, C., Barriga Pinto, G., Cuiza, A., Ferreira, L., Rioseco, M. L., Calvo, M., Fritz, R., Bravo, S., Bruhn, A., Graf, J., Llancaqueo, A., Rivera, G., Cerda, C.,...Le Corre, N. (2024). Viral shedding and viraemia of Andes virus during acute hantavirus infection: a prospective study. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00142-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00142-7)
- Ferrés, M., Vial, P., Marco, C., Yañez, L., Godoy, P., Castillo, C., Hjelle, B., Delgado, I., Lee, S.-J., Mertz, G. J., & Group, A. V. H. C. S. (2007). Prospective Evaluation of Household Contacts of Persons with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Chile. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(11), 1563-1571. <https://doi.org/10.1086/516786>
- Gao, P. (2025). PEGylated lipids in lipid nanoparticle delivery dynamics and therapeutic innovation. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 16, 1914-1930. <https://doi.org/10.3762/bjnano.16.133>
- Garcia-Dominguez, D., Henry, C., Ma, L., Jani, H., Amato, N. J., Manning, T., Freyn, A., Davis, H., Hsiao, C. J., Li, M., Koch, H., Elbashir, S., DiPiazza, A., Carfi, A., Edwards,

- D., & Bahl, K. (2022). Altering the mRNA-1273 dosing interval impacts the kinetics, quality, and magnitude of immune responses in mice [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.948335>
- Garrido, J. L., Prescott, J., Calvo, M., Bravo, F., Alvarez, R., Salas, A., Riquelme, R., Rioseco, M. L., Williamson, B. N., Haddock, E., Feldmann, H., & Barria, M. I. (2018). Two recombinant human monoclonal antibodies that protect against lethal Andes hantavirus infection in vivo. *Science Translational Medicine*, 10(468). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat6420>
- Gavard, J. (2014). Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*, 8(2), 158-164. <https://doi.org/10.4161/cam.29026>
- Gavrilovskaya, I. N., Gorbunova, E. E., & Mackow, E. R. (2010). Pathogenic Hantaviruses Direct the Adherence of Quiescent Platelets to Infected Endothelial Cells. *Journal of Virology*, 84(9), 4832-4839. <https://doi.org/10.1128/jvi.02405-09>
- Gavrilovskaya, I. N., Gorbunova, E. E., & Mackow, E. R. (2013). Hypoxia induces permeability and giant cell responses of Andes virus-infected pulmonary endothelial cells by activating the mTOR-S6K signaling pathway. *Journal of Virology*, 87(23), 12999-13008. <https://doi.org/10.1128/jvi.02103-13>
- Gebre, M. S., Rauch, S., Roth, N., Gergen, J., Yu, J., Liu, X., Cole, A. C., Mueller, S. O., Petsch, B., & Barouch, D. H. (2022). mRNA vaccines induce rapid antibody responses in mice. *npj Vaccines*, 7(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00511-y>
- Gocher, A. M., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2022). Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nature Reviews Immunology*, 22(3), 158-172. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00566-3>
- Goeijenbier, M., Meijers, J. C., Anfasa, F., Roose, J. M., van de Weg, C. A., Bakhtiari, K., Henttonen, H., Vaheri, A., Osterhaus, A. D., van Gorp, E. C., & Martina, B. E. (2015). Effect of Puumala hantavirus infection on human umbilical vein endothelial cell hemostatic function: platelet interactions, increased tissue factor expression and fibrinolysis regulator release. *Frontiers in Microbiology*, 6, 220. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00220>
- Govender, K., & Chuturgoon, A. (2022). An Overview of Repurposed Drugs for Potential COVID-19 Treatment. *Antibiotics (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121678>
- Guerrini, G., Scaccabarozzi, D., Mehn, D., Sarracino, A., Gioria, S., & Calzolari, L. (2025). Challenges in Measuring In Vitro Activity of LNP-mRNA Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(17), 8152. <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/17/8152>
- Guimaraes, G. J., Kim, J., & Bartlett, M. G. (2024). Characterization of mRNA therapeutics. *Mass Spectrometry Reviews*, 43(5), 1066-1090. <https://doi.org/10.1002/mas.21856>
- Guo, L., McFadden, E., Slough, M. M., Stone, E. T., Berrigan, J., Mittler, E., Hatzakis, K., Hinkley, T., Kain, H. S., Ke, Z., Warner, N. L., Erasmus, J. H., Chandran, K., & McLellan, J. S. (2026). High-resolution *in situ* structures of hantavirus glycoprotein tetramers. *Cell*, 189(9), 2731-2747.e2715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2026.01.030>
- Hald Albertsen, C., Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Lind, M., Petersson, K., & Simonsen, J. B. (2022). The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 188, 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
- Hamid, K., Sathyanarayanan, S. P., Naim, T., Hamza, M., Mahmood Baig, M. O., & Sitta, E. A. (2021). Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome and Diffuse Alveolar Hemorrhage in the Era of COVID-19. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2021, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2021/8800500>

- Hassett, K. J., Rajlic, I. L., Bahl, K., White, R., Cowens, K., Jacquinet, E., & Burke, K. E. (2024). mRNA vaccine trafficking and resulting protein expression after intramuscular administration. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 35(1). <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.102083>
- He, W., Zhang, X., Zou, Y., Li, J., Wang, C., He, Y., Jin, Q., & Ye, J. (2024). Effective Synthesis of High-Integrity mRNA Using In Vitro Transcription. *Molecules*, 29(11), 2461. <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/11/2461>
- Hellgren, F., Rosdahl, A., Arcoverde Cerveira, R., Lenart, K., Ols, S., Gwon, Y.-D., Kurt, S., Delis, A. M., Joas, G., Evander, M., Normark, J., Ahlm, C., Forsell, M. N. E., Cajander, S., & Loré, K. (2024). Modulation of innate immune response to mRNA vaccination after SARS-CoV-2 infection or sequential vaccination in humans. *JCI Insight*, 9(9). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.175401>
- Heshmati, N., Chakka, L. R. J., Zhang, Y., & Maniruzzaman, M. (2024). Fabrication of mRNA encapsulated lipid nanoparticles using state of the art SMART-MaGIC technology and transfection in vitro. *Scientific Reports*, 14(1), 22714. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73804-y>
- Ho, L. L. Y., Schiess, G. H. A., Miranda, P., Weber, G., & Astakhova, K. (2024). Pseudouridine and N1-methylpseudouridine as potent nucleotide analogues for RNA therapy and vaccine development [10.1039/D4CB00022F]. *RSC Chemical Biology*, 5(5), 418-425. <https://doi.org/10.1039/D4CB00022F>
- Ho, W., Gao, M., Li, F., Li, Z., Zhang, X. Q., & Xu, X. (2021). Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 10(8), 2001812. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>
- Hogan, M. J., & Pardi, N. (2022). mRNA Vaccines in the COVID-19 Pandemic and Beyond. *Annual Review of Medicine*, 73(Volume 73, 2022), 17-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042420-112725>
- HogenEsch, H. (2013). Mechanism of Immunopotentiality and Safety of Aluminum Adjuvants [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 3 - 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00406>
- Hojecki, C. E., Tursi, N. J. J., Livingston, C., Weiner, D. B., & Gary, E. N. (2025). Advances in molecular adjuvants for nucleic acid vaccines [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 16 - 2025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1646800>
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009-4017. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024>
- Hong Hoang, J., Ott, M., Samaridou, E., Beck-Broichsitter, M., & Simon, J. (2026). Industrial Perspective on the Manufacturing of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics*, 18(4), 489. <https://www.mdpi.com/1999-4923/18/4/489>
- Hooper, J. W., Custer, D. M., Smith, J., & Wahl-Jensen, V. (2006). Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. *Virology*, 347(1), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.035>
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6(12), 1078-1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Hunter, S. J., Chohan, P., Varlas, S., & Armes, S. P. (2024). Effect of Temperature, Oil Type, and Copolymer Concentration on the Long-Term Stability of Oil-in-Water Pickering Nanoemulsions Prepared Using Diblock Copolymer Nanoparticles. *Langmuir*, 40(7), 3702-3714. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03423>

- Iglesias, A. A., Períolo, N., Bellomo, C. M., Lewis, L. C., Olivera, C. P., Anselmo, C. R., García, M., Coelho, R. M., Alonso, D. O., Dighero-Kemp, B., Sharma, H., Kuhn, J. H., Di Paola, N., Sanchez-Lockhart, M., Palacios, G., Schierloh, L. P., & Martínez, V. P. (2022). Delayed viral clearance despite high number of activated T cells during the acute phase in Argentinean patients with hantavirus pulmonary syndrome. *eBioMedicine*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103765>
- Instituto de Salud Pública. (2025). *Boletín epidemiológico semanal Hantavirus SE 52 2025*. Retrieved from [https://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2025/12/Boletín Epidemiológico Hantavirus SE 52 2025.pdf](https://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2025/12/Boletín_Epidemiológico_Hantavirus_SE_52_2025.pdf)
- Irwin, M. R., Curay, C. M., Choi, S., & Kiyatkin, E. A. (2023). Basic physiological effects of ketamine-xylazine mixture as a general anesthetic preparation for rodent surgeries. *Brain Research*, 1804, 148251. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148251>
- Jacob, A. T., Ziegler, B. M., Farha, S. M., Vivian, L. R., Zilinski, C. A., Armstrong, A. R., Burdette, A. J., Beachboard, D. C., & Stobart, C. C. (2023). Sin Nombre Virus and the Emergence of Other Hantaviruses: A Review of the Biology, Ecology, and Disease of a Zoonotic Pathogen. *Biology*, 12(11), 1413. <https://www.mdpi.com/2079-7737/12/11/1413>
- Jangra, R. K., Herbert, A. S., Li, R., Jae, L. T., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Barker, S. L., Guardado-Calvo, P., Román-Sosa, G., Dieterle, M. E., Kuehne, A. I., Muenz, N. A., Wirchnianski, A. S., Nyakatura, E. K., Fels, J. M., Ng, M., Mittler, E., Pan, J., Bharrhan, S.,...Chandran, K. (2018). Protocadherin-1 is essential for cell entry by New World hantaviruses. *Nature*, 563(7732), 559-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0702-1>
- Jeyachandran, A. V., Irudayam, J. I., Dubey, S., Chakravarty, N., Daskou, M., Zaiss, A., Garcia, G., Konda, B., Shah, A., Venkatraman, A., Su, B., Wang, C., Cui, Q., Williams, K. J., Srikanth, S., Kumar, A., Shi, Y., Deb, A., Damoiseaux, R.,...Arumugaswami, V. (2025). Differential tropisms of old and new world hantaviruses influence virulence and developing host-directed antiviral candidates. *PLoS Pathogens*, 21(8), e1013401. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1013401>
- Ji, A., Xu, M., Pan, Y., Diao, L., Ma, L., Qian, L., Cheng, J., & Liu, M. (2023). Lipid Microparticles Show Similar Efficacy With Lipid Nanoparticles in Delivering mRNA and Preventing Cancer. *Pharmaceutical Research*, 40(1), 265-279. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03445-1>
- Jia, Z., Li, J., Gao, L., Yang, D., & Kanaev, A. (2023). Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. *Colloids and Interfaces*, 7(1), 15. <https://www.mdpi.com/2504-5377/7/1/15>
- Jin, L., Zhou, Y., Zhang, S., & Chen, S.-J. (2025). mRNA vaccine sequence and structure design and optimization: Advances and challenges. *Journal of Biological Chemistry*, 301(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108015>
- Juan, E., Levis, S., Pini, N., Polop, J., Steinmann, A. R., & Provencal, M. C. (2019). Mechanisms of Hantavirus Transmission in *Oligoryzomys longicaudatus*. *EcoHealth*, 16(4), 671-681. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01454-y>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D. (2008). Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Molecular Therapy*, 16(11), 1833-1840. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>

- Kayser, V., & Ramzan, I. (2021). Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Hum Vaccin Immunother*, 17(12), 5255-5268. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1977057>
- Keyer, V., Syzdykova, L., Ingirbay, B., Sedova, E., Zauatbayeva, G., Kulatay, T., Shevtsov, A., & Shustov, A. V. (2024). Non-industrial production of therapeutic lentiviral vectors: How to provide vectors to academic CAR-T. *Biotechnology and Bioengineering*, 121(10), 3252-3268. <https://doi.org/10.1002/bit.28794>
- Khaiboullina, S. F., Levis, S., Morzunov, S. P., Martynova, E. V., Anokhin, V. A., Gusev, O. A., St Jeor, S. C., Lombardi, V. C., & Rizvanov, A. A. (2017). Serum Cytokine Profiles Differentiating Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 8, 567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00567>
- Khaiboullina, S. F., Martynova, E. V., Khamidullina, Z. L., Lapteva, E. V., Nikolaeva, I. V., Anokhin, V. V., Lombardi, V. C., & Rizvanov, A. A. (2014). Upregulation of IFN- γ and IL-12 is associated with a milder form of hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33(12), 2149-2156. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2176-x>
- Khan, A., Khan, M., Ullah, S., & Wei, D.-Q. (2021). Hantavirus: The Next Pandemic We Are Waiting For? *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 13(1), 147-152. <https://doi.org/10.1007/s12539-020-00413-4>
- Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M., & Sahay, G. (2021). Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 83-112. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.014>
- Kim, K. Q., Burgute, B. D., Tzeng, S.-C., Jing, C., Jungers, C., Zhang, J., Yan, L. L., Vierstra, R. D., Djuranovic, S., Evans, B. S., & Zaher, H. S. (2022). N1-methylpseudouridine found within COVID-19 mRNA vaccines produces faithful protein products. *Cell Reports*, 40(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111300>
- Kim, N., Dong, E., Tschudi, K., & Camperi, J. (2026). In-process analytics for IVT mRNA manufacturing: from process understanding to advanced process control [Mini Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 14 - 2026. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2026.1800423>
- Kim, S., Jeon, J. H., Kim, M., Lee, Y., Hwang, Y.-H., Park, M., Li, C. H., Lee, T., Lee, J.-A., Kim, Y.-M., Kim, D., Lee, H., Kim, Y.-J., Kim, V. N., Park, J.-E., & Yeo, J. (2024). Innate immune responses against mRNA vaccine promote cellular immunity through IFN- β at the injection site. *Nature Communications*, 15(1), 7226. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51411-9>
- Kim, S. C., Sekhon, S. S., Shin, W.-R., Ahn, G., Cho, B.-K., Ahn, J.-Y., & Kim, Y.-H. (2022). Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Molecular & Cellular Toxicology*, 18(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00171-4>
- Kim, W., Zhou, J. Q., Horvath, S. C., Schmitz, A. J., Sturtz, A. J., Lei, T., Liu, Z., Kalaidina, E., Thapa, M., Alsoussi, W. B., Haile, A., Klebert, M. K., Suessen, T., Parra-Rodriguez, L., Mudd, P. A., Whelan, S. P. J., Middleton, W. D., Teefey, S. A., Pusic, I.,...Ellebedy, A. H. (2022). Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*, 604(7904), 141-145. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04527-1>
- King, D. F., Groves, H., Weller, C., Jones, I., Cramer, J. P., Gilbert, P. B., Goldblatt, D., Gruber, M. F., Kampmann, B., Maïga, D., Pasetti, M. F., Plotkin, S. A., Precioso, A., Wassie, L., Wittke, F., & Kaslow, D. C. (2024). Realising the potential of correlates of protection for vaccine development, licensure and use: short summary. *npj Vaccines*, 9(1), 82. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00872-6>

- Kis, Z., Kontoravdi, C., Dey, A. K., Shattock, R., & Shah, N. (2020). Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response. *Journal of Advanced Manufacturing and Processing*, 2(3). <https://doi.org/10.1002/amp2.10060>
- Kiss, J., Yegutkin, G. G., Koskinen, K., Savunen, T., Jalkanen, S., & Salmi, M. (2007). IFN- β protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3334-3338. <https://doi.org/10.1002/eji.200737793>
- Ko, M. J., & Lim, C.-Y. (2021). General considerations for sample size estimation in animal study. *Korean Journal of Anesthesiology*, 74(1), 23-29. <https://doi.org/10.4097/kja.20662>
- Kong, W., Wei, Y., Dong, Z., Liu, W., Zhao, J., Huang, Y., Yang, J., Wu, W., He, H., & Qi, J. (2024). Role of size, surface charge, and PEGylated lipids of lipid nanoparticles (LNPs) on intramuscular delivery of mRNA. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 553. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02812-x>
- Korenč, M., Mencin, N., Puc, J., Skok, J., Nemec, K. Š., Celjar, A. M., Gagnon, P., Štrancar, A., & Sekirnik, R. (2021). Chromatographic purification with CIMmultus™ Oligo dT increases mRNA stability. *Cell and Gene Therapy Insights*.
- Kozak, M., & Hu, J. (2023). The Integrated Consideration of Vaccine Platforms, Adjuvants, and Delivery Routes for Successful Vaccine Development. *Vaccines (Basel)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>
- Kucinskaite-Kodze, I., Petraityte-Burneikiene, R., Zvirbliene, A., Hjelle, B., Medina, R. A., Gedvilaite, A., Razanskiene, A., Schmidt-Chanasit, J., Mertens, M., Padula, P., Sasnauskas, K., & Ulrich, R. G. (2011). Characterization of monoclonal antibodies against hantavirus nucleocapsid protein and their use for immunohistochemistry on rodent and human samples. *Archives of Virology*, 156(3), 443-456. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0879-6>
- Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., & Van Der Meel, R. (2021). The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 16(6), 630-643. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00898-0>
- Kupferschmidt, K. (2026). *Cruise ship's hantavirus outbreak puts researchers in uncharted territory*. Science. Retrieved May 06 from <https://www.science.org/content/article/cruise-ship-s-hantavirus-outbreak-puts-researchers-uncharted-territory>
- Kuzmin, I. V., Soto Acosta, R., Pruitt, L., Wasdin, P. T., Kedarinath, K., Hernandez, K. R., Gonzales, K. A., Hill, K., Weidner, N. G., Mire, C., Engdahl, T. B., Moon, W. J., Popov, V., Crowe, J. E., Georgiev, I. S., Garcia-Blanco, M. A., Abbott, R. K., & Bukreyev, A. (2024). Comparison of uridine and N1-methylpseudouridine mRNA platforms in development of an Andes virus vaccine. *Nature Communications*, 15(1), 6421. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50774-3>
- Kwilas, S., Kishimori, J. M., Josleyn, M., Jerke, K., Ballantyne, J., Royals, M., & Hooper, J. W. (2014). A hantavirus pulmonary syndrome (HPS) DNA vaccine delivered using a spring-powered jet injector elicits a potent neutralizing antibody response in rabbits and nonhuman primates. *Curr Gene Ther*, 14(3), 200-210. <https://doi.org/10.2174/1566523214666140522122633>
- Kwon, S., Kwon, M., Im, S., Lee, K., & Lee, H. (2022). mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA. *Archives of Pharmacal Research*, 45(4), 245-262. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01381-7>
- Lapointe, A., Gale, M., & Kell, A. M. (2023). Orthohantavirus Replication in the Context of Innate Immunity. *Viruses*, 15(5), 1130. <https://doi.org/10.3390/v15051130>

- Lee, J., Woodruff, M. C., Kim, E. H., & Nam, J.-H. (2023). Knife's edge: Balancing immunogenicity and reactogenicity in mRNA vaccines. *Experimental and Molecular Medicine*, 55(7), 1305-1313. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00999-x>
- Lee, Y., Jeong, M., Park, J., Jung, H., & Lee, H. (2023). Immunogenicity of lipid nanoparticles and its impact on the efficacy of mRNA vaccines and therapeutics. *Experimental and Molecular Medicine*, 55(10), 2085-2096. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01086-x>
- Lelis, F., Byk, L. A., Pustynnikov, S., Nguyen, V., Nguyen, B., Nitz, M., Tarte, P., Tungare, K., Li, J., Manna, S., Maiti, S., Mehta, D. H., Sekar, N., Posadas, D. M., Dhamankar, H., Hughes, J. A., Aulisa, L., Khan, A., Melo, M. B., & Dey, A. K. (2023). Safety, immunogenicity and efficacy of an mRNA-based COVID-19 vaccine, GLB-COV2-043, in preclinical animal models. *Scientific Reports*, 13(1), 21172. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46233-6>
- Leong, K. Y., Tham, S. K., & Poh, C. L. (2025). Revolutionizing immunization: a comprehensive review of mRNA vaccine technology and applications. *Virology Journal*, 22(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02645-6>
- Li, H. H., Xu, J., He, L., Denny, L. I., Rustandi, R. R., Dornadula, G., Fiorito, B., & Zhang, Z.-Q. (2023). Development and qualification of cell-based relative potency assay for a human respiratory syncytial virus (RSV) mRNA vaccine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115523. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115523>
- Li, T., Liu, G., Bu, G., Xu, Y., He, C., & Zhao, G. (2025). Optimizing mRNA translation efficiency through rational 5'UTR and 3'UTR combinatorial design. *Gene*, 942, 149254. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2025.149254>
- Liao, H.-C., Shen, K.-Y., Yang, C.-H., Chiu, F.-F., Chiang, C.-Y., Chai, K. M., Huang, W.-C., Ho, H.-M., Chen, Y.-H., Huang, M.-S., Liao, C.-L., Chen, H.-W., Huang, M.-H., & Liu, S.-J. (2024). Lipid nanoparticle-encapsulated DNA vaccine robustly induce superior immune responses to the mRNA vaccine in Syrian hamsters. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 32(1). <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.101169>
- Liu, A., & Wang, X. (2022). The Pivotal Role of Chemical Modifications in mRNA Therapeutics [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.901510>
- Liu, B., Sajiki, Y., Littlefield, N., Hu, Y., Stuart, W. D., Sridharan, A., Cui, X., Siefert, M. E., Araki, K., Ziady, A. G., Shi, D., Whitsett, J. A., & Maeda, Y. (2025). PBAE-PEG-based lipid nanoparticles for lung cell-specific gene delivery. *Molecular Therapy*, 33(3), 1154-1165. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.01.037>
- Liu, D., Chen, H., Pan, A., & Wang, X. (2026). Beyond the Sequence: Chemical and Topological Design and Innovations in mRNA Therapeutics. *Chemical Reviews*, 126(7), 3907-3956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5c00347>
- Liu, G., Cao, W., Salawudeen, A., Zhu, W., Emeterio, K., Safronetz, D., & Banadyga, L. (2021). Vesicular Stomatitis Virus: From Agricultural Pathogen to Vaccine Vector. *Pathogens*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens10091092>
- Liu, Q., Sun, Z., Liu, Y., He, X., Ren, C., Wang, X., Di, R., Zhao, Y., Zhang, Z., & Chu, M. (2025). Whole transcriptome analysis in oviduct provides insight into microRNAs and ceRNA regulative networks that targeted reproduction of goat (*Capra hircus*). *BMC Genomics*, 26(1), 250. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11438-8>
- Liu, R., Ma, H., Shu, J., Zhang, Q., Han, M., Liu, Z., Jin, X., Zhang, F., & Wu, X. (2020). Vaccines and Therapeutics Against Hantaviruses. *Front Microbiol*, 10, 2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>
- Liu, R., Sun, W., Sun, T., Zhang, W., Nan, Y., Zhang, Z., Xiang, K., Yang, H., Wang, F., & Ge, J. (2023). Nano selenium-enriched probiotic *Lactobacillus* enhances alum adjuvant activity and promotes antigen-specific systemic and mucosal immunity [Original

- Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 14 - 2023.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116223>
- Liu, W., Zhang, M., Lv, H., & Yang, C. (2025). Formulation-Driven Optimization of PEG-Lipid Content in Lipid Nanoparticles for Enhanced mRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Pharmaceutics*, 17(8), 950. <https://www.mdpi.com/1999-4923/17/8/950>
- Llah, S. T., Mir, S., Sharif, S., Khan, S., & Mir, M. A. (2018). Hantavirus induced cardiopulmonary syndrome: A public health concern. *Journal of Medical Virology*, 90(6), 1003-1009. <https://doi.org/10.1002/jmv.25054>
- López, R., Pérez-Araos, R., Salazar, Á., Ulloa, A. L., Vial, C., Vial, P. A., & Graf, J. (2019). Hemodynamic and Pulmonary Permeability Characterization of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome by Transpulmonary Thermodilution. *Viruses*, 11(10), 900. <https://doi.org/10.3390/v11100900>
- Lu, C., Li, Y., Chen, R., Hu, X., Leng, Q., Song, X., Lin, X., Ye, J., Wang, J., Li, J., Yao, L., Tang, X., Kuang, X., Zhang, G., Sun, M., Zhou, Y., & Li, H. (2024). Safety, Immunogenicity, and Mechanism of a Rotavirus mRNA-LNP Vaccine in Mice. *Viruses*, 16(2).
- Lu, Z., Lu, Y., Liu, D., Du, F., Wu, Q., Liao, G., Wu, Y., Zhang, R.-L., Zhou, J., & Wang, Q. (2026). *Treponema pallidum* mRNA-LNP vaccine candidate encoding TP0954 induces strongly protective immunity in rabbits [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 17 - 2026. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1769155>
- Luo, J., Klett, J., Gabert, J., Lipp, T., Karbach, J., Jäger, E., Borte, S., Hoffmann, R., & Milkovska-Stamenova, S. (2022). A Quantitative ELISA to Detect Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG Antibodies in Infected Patients and Vaccinated Individuals. *Microorganisms*, 10(9), 1812. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/9/1812>
- Ly, H. H., Daniel, S., Soriano, S. K. V., Kis, Z., & Blakney, A. K. (2022). Optimization of Lipid Nanoparticles for saRNA Expression and Cellular Activation Using a Design-of-Experiment Approach. *Molecular Pharmaceutics*, 19(6), 1892-1905. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00032>
- Ly, P.-D., Ly, K.-N., Phan, H.-L., Nguyen, H. H. T., Duong, V.-A., & Nguyen, H. V. (2024). Recent advances in surface decoration of nanoparticles in drug delivery [Review]. *Frontiers in Nanotechnology*, Volume 6 - 2024. <https://doi.org/10.3389/fnano.2024.1456939>
- Ma, Y., VanKeulen-Miller, R., & Fenton, O. S. (2025). mRNA lipid nanoparticle formulation, characterization and evaluation. *Nature Protocols*, 20(9), 2618-2651. <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01134-4>
- Madar-Balakirski, N., Rosner, A., Melamed, S., Politi, B., Steiner, M., Tamir, H., Yahalom-Ronen, Y., Bar-David, E., Ben-Shmuel, A., Sittner, A., Glinert, I., Weiss, S., Bar-Haim, E., Cohen, H., Elia, U., Achdout, H., Erez, N., Rotem, S., Lazar, S.,... Marcus, H. (2022). Preliminary nonclinical safety and immunogenicity of an rVSV-ΔG-SARS-CoV-2-S vaccine in mice, hamsters, rabbits and pigs. *Archives of Toxicology*, 96(3), 859-875. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03214-w>
- Malburet, C., Leclercq, L., Cotte, J.-F., Thiebaud, J., Bazin, E., Garinot, M., & Cottet, H. (2022). Size and Charge Characterization of Lipid Nanoparticles for mRNA Vaccines. *Analytical Chemistry*, 94(11), 4677-4685. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04778>
- Malik, B., & Ghatol, A. (2024). Understanding How Monoclonal Antibodies Work. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

- Marceau, J., Safronetz, D., Martellaro, C., Marzi, A., Rosenke, K., & Feldmann, H. (2024). Bivalent VSV Vectors Mediate Rapid and Potent Protection from Andes Virus Challenge in Hamsters. *Viruses*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/v16020279>
- Marklund, E., Ke, Y., & Greenleaf, W. J. (2023). High-throughput biochemistry in RNA sequence space: predicting structure and function. *Nature Reviews Genetics*, 24(6), 401-414. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00567-5>
- Markotić, A. (2024). Presence of Andes orthohantavirus in human body fluids. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00172-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00172-5)
- Martínez-Valdebenito, C., Angulo, J., Le Corre, N., Marco, C., Vial, C., Miquel, J., Cerda, J., Mertz, G., Vial, P., Lopez-Lastra, M., & Ferrés, M. (2019). A Single-Nucleotide Polymorphism of $\alpha V\beta 3$ Integrin Is Associated with the Andes Virus Infection Susceptibility. *Viruses*, 11(2), 169. <https://doi.org/10.3390/v11020169>
- Martínez-Valdebenito, C., Calvo, M., Vial, C., Mansilla, R., Marco, C., Palma, R. E., Vial, P., Valdivieso, F., Mertz, G., & Ferrés, M. (2014). Person-to-Person Household and Nosocomial Transmission of Andes Hantavirus, Southern Chile, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1637. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140353>
- Martínez, J., Lampaya, V., Larraga, A., Magallón, H., & Casabona, D. (2023). Purification of linearized template plasmid DNA decreases double-stranded RNA formation during IVT reaction [Original Research]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, Volume 10 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1248511>
- Martínez, V. P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., & Padula, P. J. (2005). Person-to-Person Transmission of Andes Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1848-1853. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050501>
- Martínez, V. P., Di Paola, N., Alonso, D. O., Pérez-Sautu, U., Bellomo, C. M., Iglesias, A. A., Coelho, R. M., López, B., Periolo, N., Larson, P. A., Nagle, E. R., Chitty, J. A., Pratt, C. B., Díaz, J., Cisterna, D., Campos, J., Sharma, H., Dighero-Kemp, B., Biondo, E.,...Palacios, G. (2020). "Super-Spreaders" and Person-to-Person Transmission of Andes Virus in Argentina. *New England Journal of Medicine*, 383(23), 2230-2241. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2009040>
- Matarazzo, L., & Bettencourt, P. J. G. (2023). mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 14 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1172691>
- McKenzie, R., Minnell, J., Ganley, M., Painter, G. F., & Draper, S. L. (2023). mRNA Synthesis and Encapsulation in Ionizable Lipid Nanoparticles. *Current Protocols*, 3(9). <https://doi.org/10.1002/cpz1.898>
- Medjmedj, A., Ngalle-Loth, A., Clemençon, R., Hamacek, J., Pichon, C., & Perche, F. (2022). In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA. *Nanomaterials*, 12(14), 2446. <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/14/2446>
- Mehraji, S., & DeVoe, D. L. (2024). Microfluidic synthesis of lipid-based nanoparticles for drug delivery: recent advances and opportunities [10.1039/D3LC00821E]. *Lab on a Chip*, 24(5), 1154-1174. <https://doi.org/10.1039/D3LC00821E>
- Mendonça, S. A., Lorincz, R., Boucher, P., & Curiel, D. T. (2021). Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *NPJ Vaccines*, 6(1), 97. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>
- Mertz, G. J., Hjelle, B., Crowley, M., Iwamoto, G., Tomicic, V., & Vial, P. A. (2006). Diagnosis and treatment of new world hantavirus infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 437-442. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244048.38758.1f>
- Mertz, G. J., Miedzinski, L., Goade, D., Pavia, A. T., Hjelle, B., Hansbarger, C. O., Levy, H., Koster, F. T., Baum, K., Lindemulder, A., Wang, W., Riser, L., Fernandez, H., &

- Whitley, R. J. (2004). Placebo-controlled, double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. *Clinical Infectious Diseases*, 39(9), 1307-1313. <https://doi.org/10.1086/425007>
- Meyer, M., Kuzmin, I. V., Dews, E. A., Hyde, M. A., & Bukreyev, A. (2026). Single-dose mRNA vaccines against Andes hantavirus. *The Lancet*, 407(10547), 2495-2497. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(26\)01124-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(26)01124-4)
- Michalaki, E., Jeong, K., Chin, R., Qi, Z., Liebman, L., González-Vargas, Y., Echeverri, E. S., Paunovska, K., Muramatsu, H., Pardi, N., Tamburini, B. J., Jakus, Z., Dahlman, J. E., & Dixon, J. B. (2025). Lipid Nanoparticle Library Screen Reveals Lymphatic Endothelial Cell-Targeting Lipid Nanoparticle for Delivering Vascular Endothelial Growth Factor C mRNA after Lymphatic Injury. *ACS Nano*, 19(48), 40873-40891. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5c12080>
- Michen, B., Geers, C., Vanhecke, D., Endes, C., Rothen-Rutishauser, B., Balog, S., & Petri-Fink, A. (2015). Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. *Scientific Reports*, 5(1), 9793. <https://doi.org/10.1038/srep09793>
- Miller, M., Alvizo, O., Baskerville, S., Chintala, A., Chng, C., Dassie, J., Dorigatti, J., Huisman, G., Jenne, S., Kadam, S., Leatherbury, N., Lutz, S., Mayo, M., Mukherjee, A., Sero, A., Sundseth, S., Penfield, J., Riggins, J., & Zhang, X. (2024). An engineered T7 RNA polymerase for efficient co-transcriptional capping with reduced dsRNA byproducts in mRNA synthesis [10.1039/D4FD00023D]. *Faraday Discussions*, 252(0), 431-449. <https://doi.org/10.1039/D4FD00023D>
- Min, S. E., Gu, E.-Y., Jang, M. S., Lee, Y.-J., Han, J.-S., Lee, W. G., Jeong, S. I., Song, J. Y., Lee, I.-C., Kwon, H.-J., Ryu, Y.-B., Ko, K.-C., Min, B. S., Kim, Y.-B., & Han, K.-H. (2025). Efficacy and safety of a novel multivalent mRNA vaccine against SARS-CoV-2 in experimental animals. *Scientific Reports*, 15(1), 21831. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-07661-8>
- Ministerio de Salud de Chile. (2026). *Boletín epidemiológico semanal Hantavirus SE 15 2026*. Santiago de Chile Retrieved from [https://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2026/04/Boletín Epidemiológico Hantavirus SE 15 2026.pdf](https://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2026/04/Boletín_Epidemiológico_Hantavirus_SE_15_2026.pdf)
- Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>
- Mittler, E., Dieterle, M. E., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Chandran, K., & Jangra, R. K. (2019). Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Advances in Virus Research*, 185-224. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.07.002>
- Mittler, E., Serris, A., Esterman, E. S., Florez, C., Polanco, L. C., O'Brien, C. M., Slough, M. M., Tynell, J., Gröning, R., Sun, Y., Abelson, D. M., Wec, A. Z., Haslwanter, D., Keller, M., Ye, C., Bakken, R. R., Jangra, R. K., Dye, J. M., Ahlm, C.,...Guardado-Calvo, P. (2023). Structural and mechanistic basis of neutralization by a pan-hantavirus protective antibody. *Science Translational Medicine*, 15(700), eadg1855. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adg1855>
- Monroe, J., Eyler, D. E., Mitchell, L., Deb, I., Bojanowski, A., Srinivas, P., Dunham, C. M., Roy, B., Frank, A. T., & Koutmou, K. S. (2024). N1-Methylpseudouridine and pseudouridine modifications modulate mRNA decoding during translation. *Nature Communications*, 15(1), 8119. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51301-0>
- Moore, R. A., & Griffen, D. (2022). *Hantavirus Pulmonary Syndrome*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Mori, M., Rothman, A. L., Kurane, I., Montoya, J. M., Nolte, K. B., Norman, J. E., Waite, D. C., Koster, F. T., & Ennis, F. A. (1999). High levels of cytokine-producing cells in the lung

- tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 179(2), 295-302. <https://doi.org/10.1086/314597>
- Moritz, C. P., Do, L.-D., Tholance, Y., Vallayer, P.-B., Rogemond, V., Joubert, B., Ferraud, K., La Marca, C., Camdessanché, J.-P., Honnorat, J., & Antoine, J.-C. (2022). Conformation-stabilizing ELISA and cell-based assays reveal patient subgroups targeting three different epitopes of AGO1 antibodies [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972161>
- Munir, N., Jahangeer, M., Hussain, S., Mahmood, Z., Ashiq, M., Ehsan, F., Akram, M., Ali Shah, S. M., Riaz, M., & Sana, A. (2021). Hantavirus diseases pathophysiology, their diagnostic strategies and therapeutic approaches: A review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(1), 20-34. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13403>
- Muzard, C., Seguin, J., Bonnefoy, J., Salkini, N., Serra, V., Alhareth, K., Lemdani, K., & Mignet, N. (2025). Pre-clinical evaluation of mRNA-lipid nanoparticles' potency and toxicity: current practices and future directions. *In vitro models*, 4(3), 177-194. <https://doi.org/10.1007/s44164-025-00096-5>
- Nair, A., Loveday, K. A., Kenyon, C., Qu, J., & Kis, Z. (2024). Quality by Digital Design for Developing Platform RNA Vaccine and Therapeutic Manufacturing Processes. In T. Kramps (Ed.), *RNA Vaccines: Methods and Protocols* (pp. 339-364). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3770-8_16
- Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., & Igyártó, B. Z. (2021). The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience*, 24(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>
- Negi, G., Sharma, A., Dey, M., Dhanawat, G., & Parveen, N. (2022). Membrane attachment and fusion of HIV-1, influenza A, and SARS-CoV-2: resolving the mechanisms with biophysical methods. *Biophysical Reviews*, 14(5), 1109-1140. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00999-7>
- New England Biolabs. (2026). *FAQ: How to prepare Plasmid Templates?* Retrieved 06 junio from <https://www.neb.com/en/faqs/how-to-prepare-plasmid-templates?>
- Ning, T., Huang, W., Min, L., Yang, Y., Liu, S., Xu, J., Zhang, N., Xie, S.-A., Zhu, S., & Wang, Y. (2023). Pseudotyped Viruses for Orthohantavirus. In Y. Wang (Ed.), *Pseudotyped Viruses* (pp. 229-252). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0113-5_12
- Nitika, Wei, J., & Hui, A. M. (2021). The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Recent Updates. *Infect Drug Resist*, 14, 5271-5285. <https://doi.org/10.2147/idr.S341694>
- Noack, D., Goeijenbier, M., Reusken, C., Koopmans, M. P. G., & Rockx, B. H. G. (2020). Orthohantavirus Pathogenesis and Cell Tropism. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 399. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00399>
- Nogueira, S. S., Samaridou, E., Simon, J., Frank, S., Beck-Broichsitter, M., & Mehta, A. (2024). Analytical techniques for the characterization of nanoparticles for mRNA delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 198, 114235. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114235>
- Oloris, S. C. S., Neves, V. F., Iani, F. C. M., & de Oliveira Scarponi, C. F. (2024). Orthohantavirus infections in South America: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Virology*, 169(9), 187. <https://doi.org/10.1007/s00705-024-06104-5>
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, TRS No 1039*. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/annex-3---mrna-vaccines_who_trs_1039_web-2.pdf?sfvrsn=6e31a112_1&download=true

- Orlandini von Niessen, A. G., Poleganov, M. A., Rechner, C., Plaschke, A., Kranz, L. M., Fesser, S., Diken, M., Löwer, M., Vallazza, B., Beissert, T., Bukur, V., Kuhn, A. N., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2019). Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Molecular Therapy*, 27(4), 824-836. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>
- Oude Blenke, E., Ørnskov, E., Schöneich, C., Nilsson, G. A., Volkin, D. B., Mastrobattista, E., Almarsson, Ö., & Crommelin, D. J. A. (2023). The Storage and In-Use Stability of mRNA Vaccines and Therapeutics: Not A Cold Case. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(2), 386-403. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.001>
- Padula, P. J., Colavecchia, S. B., Martínez, V. P., Gonzalez Della Valle, M. O., Edelstein, A., Miguel, S. D. L., Russi, J., Riquelme, J. M., Colucci, N., Almirón, M., & Rabinovich, R. D. (2000). Genetic Diversity, Distribution, and Serological Features of Hantavirus Infection in Five Countries in South America. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3029-3035. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.8.3029-3035.2000>
- Padula, P. J., Edelstein, A., Miguel, S. D. L., López, N. M., Rossi, C. M., & Rabinovich, R. D. (1998). Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus. *Virology*, 241(2), 323-330. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8976>
- Pagliari, S., Dema, B., Sanchez-Martinez, A., Montalvo Zurbia-Flores, G., & Rollier, C. S. (2023). DNA Vaccines: History, Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *J Mol Biol*, 435(23), 168297. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168297>
- Paludan, S. R., Pradeu, T., Pichlmair, A., Wray, K. B., Mikkelsen, J. G., Olagnier, D., & Mogensen, T. H. (2024). Early host defense against virus infections. *Cell Reports*, 43(12), 115070. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115070>
- Pan American Health Organization. (2025). *Epidemiological Alert Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Americas Region*. Retrieved 2026 from https://www.paho.org/sites/default/files/2025-12/2025-12-19-epidemiological-alert-hantavirus-engfinal_0.pdf
- Pan, S., Wang, H., Zhang, H., Tang, Z., Xu, L., Yan, Z., & Hu, Y. (2025). UTR-Insight: integrating deep learning for efficient 5' UTR discovery and design. *BMC Genomics*, 26(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11269-7>
- Pantaleo, G., Correia, B., Fenwick, C., Joo, V. S., & Perez, L. (2022). Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 21(9), 676-696. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00495-3>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261-279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Pardi, N., & Krammer, F. (2024). mRNA vaccines for infectious diseases — advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(11), 838-861. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-01042-y>
- Park, S. A., Hwang, D., Kim, J. H., Lee, S.-Y., Lee, J., Kim, H. S., Kim, K.-A., Lim, B., Lee, J.-E., Jeon, Y. H., Oh, T. J., Lee, J., & An, S. (2024). Formulation of lipid nanoparticles containing ginsenoside Rg2 and protopanaxadiol for highly efficient delivery of mRNA [10.1039/D4BM01070A]. *Biomaterials Science*, 12(24), 6299-6309. <https://doi.org/10.1039/D4BM01070A>
- Paroor, S., Shaji, A. T., Bino, L., Praveen, N. G., Unnipurath, S., Anil, P., Geo, R., Nagamalleswari, E., Bonam, S. R., & Kurapati, R. (2025). Lipid Nanoparticles for the Delivery of mRNA. In M. Sioud (Ed.), *RNA Therapeutics: From siRNA to mRNA Innovations* (pp. 341-354). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4742-4_16

- Parot, J., Mehn, D., Jankevics, H., Markova, N., Carboni, M., Olaisen, C., Hoel, A. D., Sigfúsdóttir, M. S., Meier, F., Drexel, R., Vella, G., McDonagh, B., Hansen, T., Bui, H., Klinkenberg, G., Visnes, T., Gioria, S., Urban-Lopez, P., Prina-Mello, A.,...Calzolari, L. (2024). Quality assessment of LNP-RNA therapeutics with orthogonal analytical techniques. *Journal of Controlled Release*, 367, 385-401.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.037>
- Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*, 85, 106639.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>
- Parveen, A., & Elkordy, A. A. (2024). Brief Insights into mRNA Vaccines: Their Successful Production and Nanoformulation for Effective Response against COVID-19 and Their Potential Success for Influenza A and B. *Pathogens*, 13(6), 500.
<https://doi.org/10.3390/pathogens13060500>
- Passmore, L. A., & Collier, J. (2022). Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 93-106.
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
- Paulsen, G. C., Frenck, R., Jr., Tomashek, K. M., Alarcon, R. M., Hensel, E., Lowe, A., Brocato, R. L., Kwilas, S. A., Josleyn, M. D., & Hooper, J. W. (2024). Safety and Immunogenicity of an Andes Virus DNA Vaccine by Needle-Free Injection: A Randomized, Controlled Phase 1 Study. *J Infect Dis*, 229(1), 30-38.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiad235>
- Perdiguerro, B., Marcos-Villar, L., López-Bravo, M., Sánchez-Cordón, P. J., Zamora, C., Valverde, J. R., Sorzano, C. Ó. S., Sin, L., Álvarez, E., Ramos, M., Del Val, M., Esteban, M., & Gómez, C. E. (2023). Immunogenicity and efficacy of a novel multi-patch SARS-CoV-2/COVID-19 vaccine candidate [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 14 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1160065>
- Picard-Jean, F., Brand, C., Tremblay-Létourneau, M., Allaire, A., Beaudoin, M. C., Boudreault, S., Duval, C., Rainville-Sirois, J., Robert, F., Pelletier, J., Geiss, B. J., & Bisailon, M. (2018). 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *PloS One*, 13(3), e0193804.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193804>
- Pizarro, E., Navarrete, M., Mendez, C., Zaror, L., Mansilla, C., Tapia, M., Carrasco, C., Salazar, P., Murua, R., Padula, P., Otth, C., & Rodríguez, E. M. (2020). Immunocytochemical and Ultrastructural Evidence Supporting That Andes Hantavirus (ANDV) Is Transmitted Person-to-Person Through the Respiratory and/or Salivary Pathways [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02992>
- Plotkin, S. A. (2023). Recent updates on correlates of vaccine-induced protection [Perspective]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1081107>
- Quan, Y., Yang, H., Li, W., & Li, L. (2025). mRNA vaccines: immunogenicity and quality characteristics. *Journal of Nanobiotechnology*, 24(1), 6.
<https://doi.org/10.1186/s12951-025-03800-5>
- Qureischi, M., Mohr, J., Arellano-Viera, E., Knudsen, S. E., Vohidov, F., & Garitano-Trojaola, A. (2022). Chapter One - mRNA-based therapies: Preclinical and clinical applications. In F. Aranda, P. Berraondo, & L. Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 372, pp. 1-54). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2022.04.007>

- Riesle-Sbarbaro, S. A., Kirchoff, N., Hansen-Kant, K., Stern, A., Kurth, A., & Prescott, J. B. (2023). Human-to-Human Transmission of Andes Virus Modeled in Syrian Hamsters. *Emerg Infect Dis*, 29(10), 2159-2163. <https://doi.org/10.3201/eid2910.230544>
- Riisom, M., Jamieson, S. M. F., & Hartinger, C. G. (2023). Critical evaluation of cell lysis methods for metallodrug studies in cancer cells. *Metallomics*, 15(9). <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfad048>
- Rijkers, G. T., Weterings, N., Obregon-Henao, A., Lepolder, M., Dutt, T. S., Van Overveld, F. J., & Henao-Tamayo, M. (2021). Antigen Presentation of mRNA-Based and Virus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 9(8), 848. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080848>
- Ripoll, M., Martin, E., Enot, M., Robbe, O., Rapisarda, C., Nicolai, M.-C., Deliot, A., Tabeling, P., Authelin, J.-R., Nakach, M., & Wils, P. (2022). Optimal self-assembly of lipid nanoparticles (LNP) in a ring micromixer. *Scientific Reports*, 12(1), 9483. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13112-5>
- Rissmann, M., Noack, D., Spliethof, T. M., Vaes, V. P., Stam, R., van Run, P., Clark, J. J., Verjans, G. M. G. M., Haagmans, B. L., Krammer, F., Koopmans, M. P. G., van den Brand, J. M. A., & Rockx, B. (2025). A pan-orthohantavirus human lung xenograft mouse model and its utility for preclinical studies. *PLoS Pathogens*, 21(1), e1012875. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012875>
- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M., & Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*, 39(16), 2190-2200. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
- Rowan-Nash, A. D., Korry, B. J., Mylonakis, E., & Belenky, P. (2019). Cross-Domain and Viral Interactions in the Microbiome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(1), e00044-00018. <https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.00044-18>
- Royster, A., Ren, S., Ali, S., Mir, S., & Mir, M. (2024). Modulations in the host cell proteome by the hantavirus nucleocapsid protein. *PLoS Pathogens*, 20(1), e1011925. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011925>
- Saavedra, F., Díaz, F. E., Retamal-Díaz, A., Covián, C., González, P. A., & Kalergis, A. M. (2021). Immune response during hantavirus diseases: implications for immunotherapies and vaccine design. *Immunology*, 163(3), 262-277. <https://doi.org/10.1111/imm.13322>
- Saavedra, F., Garrido, J. L., Fuentes-Villalobos, F., Calvo, M., Riquelme, R., Rioseco, M. L., Chahín, C., Ferreira, L., Alvarez, R., Nova-Lamperti, E., & Barria, M. I. (2020). Differential CD4 T Regulatory Cell Phenotype Induced by Andes Hantavirus Glycoprotein [Original Research]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00430>
- Safronetz, D., Ebihara, H., Feldmann, H., & Hooper, J. W. (2012). The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, 95(3), 282-292. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.002>
- Safronetz, D., Hegde, N. R., Ebihara, H., Denton, M., Kobinger, G. P., St Jeor, S., Feldmann, H., & Johnson, D. C. (2009). Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with andes virus. *J Virol*, 83(14), 7285-7295. <https://doi.org/10.1128/jvi.00373-09>
- Saggiaro, F. P., Rossi, M. A., Duarte, M. I. S., Martin, C. C. S., Alves, V. A. F., Moreli, M. L., Figueiredo, L. T. M., Moreira, J. E., Borges, A. A., & Neder, L. (2007). Hantavirus Infection Induces a Typical Myocarditis That May Be Responsible for Myocardial Depression and Shock in Hantavirus Pulmonary Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(10), 1541-1549. <https://doi.org/10.1086/513874>

- Salaududin, M., Saha, S., Hossain, M. G., Okuda, K., & Shimada, M. (2024). Clinical Application of Adenovirus (AdV): A Comprehensive Review. *Viruses*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/v16071094>
- Samad, N., Sodunke, T. E., Banna, H. A., Sapkota, A., Fatema, A. N., Iskandar, K., Jahan, D., Hardcastle, T. C., Nusrat, T., Chowdhury, T. S., & Haque, M. (2020). Convalescent Plasma Therapy for Management of COVID-19: Perspectives and Deployment in the Current Global Pandemic. *Risk Management and Healthcare Policy*, 13, 2707-2728. <https://doi.org/10.2147/rmhp.S281388>
- Sánchez Ramos, O., Toledo Alonso, J. R., & Starck-Méndez, M. F. (2018). *Vacuna contra el síndrome cardiopulmonar causado por hantavirus* (CL Patent No. CL 2018002306 A1). <https://lens.org/073-333-149-148-665>
- Sanyal, G. (2022). Development of functionally relevant potency assays for monovalent and multivalent vaccines delivered by evolving technologies. *npj Vaccines*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00470-4>
- Sanyal, G. (2025). Establishing correlation between in vitro potency and in vivo immunogenicity for mRNA vaccines. *npj Vaccines*, 10(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01181-2>
- Sari, Y., Sousa Rosa, S., Jeffries, J., & Marques, M. P. C. (2024). Comprehensive evaluation of T7 promoter for enhanced yield and quality in mRNA production. *Scientific Reports*, 14(1), 9655. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59978-5>
- Saxena, S., Mandrah, V., Tariq, W., Das, P., Sambhav, K., & Devi, S. H. (2025). The Future of mRNA Vaccines: Potential Beyond COVID-19. *Cureus*, 17(5), e84529. <https://doi.org/10.7759/cureus.84529>
- Sayour, E. J., Boczkowski, D., Mitchell, D. A., & Nair, S. K. (2024). Cancer mRNA vaccines: clinical advances and future opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 21(7), 489-500. <https://doi.org/10.1038/s41571-024-00902-1>
- Schilder, N. K. M., Tiesjema, B., Theunissen, P. T., Rengerink, K. O., & van der Laan, J. W. (2023). Evaluation of non-clinical toxicity studies of COVID-19 vaccines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 142, 105438. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105438>
- Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. A. (2021). mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 601, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
- Schultz, D., Münter, R. D., Cantín, A. M., Kempen, P. J., Jahnke, N., Andresen, T. L., Simonsen, J. B., & Urquhart, A. J. (2024). Enhancing RNA encapsulation quantification in lipid nanoparticles: Sustainable alternatives to Triton X-100 in the RiboGreen assay. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 205, 114571. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114571>
- Serrán, M. G., Vernengo, F. F., Almada, L., Beccaria, C. G., Gazzoni, Y., Canete, P. F., Roco, J. A., Boari, J. T., Ramello, M. C., Wehrens, E., Cai, Y., Zuniga, E. I., Montes, C. L., Cockburn, I. A., Rodriguez, E. V. A., Vinuesa, C. G., & Gruppi, A. (2022). Extrafollicular Plasmablasts Present in the Acute Phase of Infections Express High Levels of PD-L1 and Are Able to Limit T Cell Response [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828734>
- Serris, A., Stass, R., Bignon, E. A., Muenia, N. A., Manuguerra, J.-C., Jangra, R. K., Li, S., Chandran, K., Tischler, N. D., Huiskonen, J. T., Rey, F. A., & Guardado-Calvo, P. (2020). The Hantavirus Surface Glycoprotein Lattice and Its Fusion Control Mechanism. *Cell*, 183(2), 442-456.e416. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.023>

- Shanmugaraj, B., Khorattanakulchai, N., Paungpin, W., Akkhawattanangkul, Y., Manopwisedjaroen, S., Thitithanyanont, A., & Phoolcharoen, W. (2023). Immunogenicity and efficacy of recombinant subunit SARS-CoV-2 vaccine candidate in the Syrian hamster model. *Biotechnology Reports*, 37, e00779. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00779>
- Sharma, P., Joshi, R. V., Pritchard, R., Xu, K., & Eicher, M. A. (2023). Therapeutic Antibodies in Medicine. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186438>
- Shi, Y., Zhang, G., Lin, S., Hu, M., Wang, Y., Ge, H., Xia, S., Wang, Q., Jiang, S., & Lu, L. (2026). A VLP-based mRNA vaccine elicits potent humoral and cellular immunity against Oropouche virus. *mBio*, 17(2), e03653-03625. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.03653-25>
- Shorayeva, K., Nakhanov, A., Nurpeisova, A., Chervyakova, O., Jekebekov, K., Abay, Z., Assanzhanova, N., Sadikaliyeva, S., Kalimolda, E., Terebay, A., Moldagulova, S., Absatova, Z., Tulendibayev, A., Kopeyev, S., Nakhanova, G., Issabek, A., Nurabayev, S., Kerimbayev, A., Kutumbetov, L.,...Zakarya, K. (2023). Pre-Clinical Safety and Immunogenicity Study of a Coronavirus Protein-Based Subunit Vaccine for COVID-19. *Vaccines (Basel)*, 11(12), 1771. <https://www.mdpi.com/2076-393X/11/12/1771>
- Shrivastava-Ranjan, P., Lo, M. K., Chatterjee, P., Flint, M., Nichol, S. T., Montgomery, J. M., O'Keefe, B. R., & Spiropoulou, C. F. (2020). Hantavirus Infection Is Inhibited by Griffithsin in Cell Culture [Brief Research Report]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.561502>
- Slough, M. M., Li, R., Herbert, A. S., Lasso, G., Kuehne, A. I., Monticelli, S. R., Bakken, R. R., Liu, Y., Ghosh, A., Moreau, A. M., Zeng, X., Rey, F. A., Guardado-Calvo, P., Almo, S. C., Dye, J. M., Jangra, R. K., Wang, Z., & Chandran, K. (2023). Two point mutations in protocadherin-1 disrupt hantavirus recognition and afford protection against lethal infection. *Nature Communications*, 14(1), 4454. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40126-y>
- Song, W., & Craft, J. (2019). T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunological Reviews*, 288(1), 85-96. <https://doi.org/10.1111/imr.12740>
- South African Parliamentary Communication Services. (2026). *Media Statement: Committee on Health briefed on response to Hantavirus*. Retrieved May 06 from <https://www.parliament.gov.za/press-releases/media-statement-committee-health-briefed-response-hantavirus>
- Spiropoulou, C. F., Goldsmith, C. S., Shoemaker, T. R., Peters, C. J., & Compans, R. W. (2003). Sin nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology*, 308(1), 48-63. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00092-2)
- Sroga, P., Sloan, A., Warner, B. M., Tierney, K., Lew, J., Liu, G., Chan, M., Deschambault, Y., Stein, D. R., Soule, G., Banadyga, L., Falzarano, D., & Safronetz, D. (2021). Polyclonal alpaca antibodies protect against hantavirus pulmonary syndrome in a lethal Syrian hamster model. *Scientific Reports*, 11(1), 17440. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96884-6>
- Starck-Mendez, M. F. (2020). *Desarrollo y caracterización de un candidato vacunal recombinante contra Hantavirus basado en las glicoproteínas de superficie del virus Andes* Universidad de Concepción]. Concepción. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/622>
- Stass, R., Engdahl, T. B., Chapman, N. S., Wolters, R. M., Handal, L. S., Diaz, S. M., Crowe, J. E., & Bowden, T. A. (2023). Mechanistic basis for potent neutralization of Sin Nombre hantavirus by a human monoclonal antibody. *Nature Microbiology*, 8(7), 1293-1303. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01413-y>

- Steininger, P., Herbst, L., Bihlmaier, K., Willam, C., Körper, S., Schrezenmeier, H., Klüter, H., Pfister, F., Amann, K., Weiss, S., Krüger, D. H., Zimmermann, R., Korn, K., Hofmann, J., & Harrer, T. (2023). Fatal Puumala Hantavirus Infection in a Patient with Common Variable Immunodeficiency (CVID). *Microorganisms*, 11(2), 283. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/283>
- Stewart-Jones, G. (2021). *Sars-cov-2 mrna domain vaccines*.
- Strelkova Petersen, D. M., Chaudhary, N., Arral, M. L., Weiss, R. M., & Whitehead, K. A. (2023). The mixing method used to formulate lipid nanoparticles affects mRNA delivery efficacy and organ tropism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 192, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.10.006>
- Su, Q., Sena-Esteves, M., & Gao, G. (2019). Characterization of the Purified Recombinant Adenovirus for Viral Genome Structure by Restriction Enzyme Digestions. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095554>
- Sumaiya, K., Langford, D., Natarajaseenivasan, K., & Shanmughapriya, S. (2022). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 233, 108024. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108024>
- Sundström, K. B., Nguyen Hoang, A. T., Gupta, S., Ahlm, C., Svensson, M., & Klingström, J. (2016). Andes Hantavirus-Infection of a 3D Human Lung Tissue Model Reveals a Late Peak in Progeny Virus Production Followed by Increased Levels of Proinflammatory Cytokines and VEGF-A. *PLoS One*, 11(2), e0149354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149354>
- Swingle, K. L., Safford, H. C., Geisler, H. C., Hamilton, A. G., Thatte, A. S., Billingsley, M. M., Joseph, R. A., Mrksich, K., Padilla, M. S., Ghalsasi, A. A., Alameh, M.-G., Weissman, D., & Mitchell, M. J. (2023). Ionizable Lipid Nanoparticles for In Vivo mRNA Delivery to the Placenta during Pregnancy. *Journal of the American Chemical Society*, 145(8), 4691-4706. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c12893>
- Syama, K., Jakubek, Z. J., Chen, S., Zaifman, J., Tam, Y. Y. C., & Zou, S. (2022). Development of lipid nanoparticles and liposomes reference materials (II): cytotoxic profiles. *Scientific Reports*, 12(1), 18071. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23013-2>
- Szabó, G. T., Mahiny, A. J., & Vlatkovic, I. (2022). COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Molecular Therapy*, 30(5), 1850-1868. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.016>
- Szwed, M., Torgersen, M. L., Kumari, R. V., Yadava, S. K., Pust, S., Iversen, T. G., Skotland, T., Giri, J., & Sandvig, K. (2020). Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0567-y>
- Tang, C., Verwilligen, A., Sadoff, J., Brandenburg, B., Sneekes-Vriese, E., van den Kerkhof, T., Dillen, L., Rutten, L., Juraszek, J., Callewaert, K., Janssen, S., Huizingh, J., Euler, Z., Schilperoord, T., Verhemeldonck, M., Langedijk, J. P. M., Hendriks, J., & Stieh, D. J. (2024). Absolute quantitation of binding antibodies from clinical samples. *npj Vaccines*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00793-w>
- Tang, T. T. L., & Passmore, L. A. (2019). Recognition of Poly(A) RNA through Its Intrinsic Helical Structure. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 84, 21-30. <https://doi.org/10.1101/sqb.2019.84.039818>
- Tapia, M., Mansilla, C., & Vera, J. (2000). Síndrome pulmonar por hantavirus: Experiencia clínica en diagnóstico y tratamiento. Hospital Coyhaique-Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 17, 258-269. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182000000300010&nrm=iso

- Tatsis, N., & Ertl, H. C. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*, 10(4), 616-629. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>
- Tatsumi, K., Hisada, Y., Connolly, A.-M. F., Buranda, T., & Mackman, N. (2019). Patients with severe orthohantavirus cardiopulmonary syndrome due to Sin Nombre Virus infection have increased circulating extracellular vesicle tissue factor and an activated coagulation system. *Thrombosis Research*, 179, 31-33. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.04.032>
- Taylor, S. L., Wahl-Jensen, V., Copeland, A. M., Jahrling, P. B., & Schmaljohn, C. S. (2013). Endothelial Cell Permeability during Hantavirus Infection Involves Factor XII-Dependent Increased Activation of the Kallikrein-Kinin System. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003470>
- To, K. K. W., & Cho, W. C. S. (2021). An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 16(11), 1307-1317. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1935859>
- Toledo, J. R., Prieto, Y., Oramas, N., & Sánchez, O. (2009). Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral Vectors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 538-544. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8381-2>
- Toro, J., Vega, J. D., Khan, A. S., Mills, J. N., Padula, P., Terry, W., Yadón, Z., Valderrama, R., Ellis, B. A., Pavletic, C., Cerda, R., Zaki, S., Shieh, W. J., Meyer, R., Tapia, M., Mansilla, C., Baro, M., Vergara, J. A., Concha, M.,...Ksiazek, T. G. (1998). An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 687-694. <https://doi.org/10.3201/eid0404.980425>
- Triana-Alonso, F. J., Dabrowski, M., Wadzack, J., & Nierhaus, K. H. (1995). Self-coded 3'-Extension of Run-off Transcripts Produces Aberrant Products during in Vitro Transcription with T7 RNA Polymerase (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 6298-6307. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6298>
- Tsalmpouris, A., Mahjoubi, S., Malburet, C., Daher-Hassan, C., François-Heude, M., Cotte, J.-F., Guilleme, D., & Maurer, J. (2025). Anion Exchange Chromatography to Determine mRNA Encapsulation in Lipid Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 97(35), 19275-19282. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c03299>
- Tscherne, A., Halwe, N. J., & Krammer, F. (2026). Vaccines and therapeutics for Andes hantavirus. *npj Viruses*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1038/s44298-026-00200-w>
- Tscherne, A., Schwarz, J. H., Rohde, C., Kupke, A., Kalodimou, G., Limpinsel, L., Okba, N. M. A., Bošnjak, B., Sandrock, I., Odak, I., Halwe, S., Sauerhering, L., Brosinski, K., Liangliang, N., Duell, E., Jany, S., Freudenstein, A., Schmidt, J., Werner, A.,...Volz, A. (2021). Immunogenicity and efficacy of the COVID-19 candidate vector vaccine MVA-SARS-2-S in preclinical vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(28), e2026207118. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2026207118>
- Tsuda, Y., Safronetz, D., Brown, K., LaCasse, R., Marzi, A., Ebihara, H., & Feldmann, H. (2011). Protective efficacy of a bivalent recombinant vesicular stomatitis virus vaccine in the Syrian hamster model of lethal Ebola virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 204 (Suppl 3), S1090-1097. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir379>
- Tsukamoto, Y., Igarashi, M., & Kato, H. (2024). Targeting cap1 RNA methyltransferases as an antiviral strategy. *Cell Chemical Biology*, 31(1), 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.11.011>
- Ulloa-Morrison, R., Pavez, N., Parra, E., Lopez, R., Mondaca, R., Fernandez, P., Kraunik, D., Sanhueza, C., Bravo, S., Cornu, M. G., & Kattan, E. (2024). Critical care management of hantavirus cardiopulmonary syndrome. A narrative review. *Journal of Critical Care*, 84, 154867. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2024.154867>

- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., & Mustonen, J. (2013). Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 539-550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3066>
- van Oort, E., Lerouge, P., de Heer, P. G., Séveno, M., Coquet, L., Modderman, P. W., Faye, L., Aalberse, R. C., & van Ree, R. (2004). Substitution of *Pichia pastoris*-Derived Recombinant Proteins with Mannose Containing O- and N-Linked Glycans Decreases Specificity of Diagnostic Tests. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135(3), 187-195. <https://doi.org/10.1159/000081303>
- Vera-Otarola, J., Solis, L., Lowy, F., Olguín, V., Angulo, J., Pino, K., Tischler, N. D., Otth, C., Padula, P., & López-Lastra, M. (2020). The Andes Orthohantavirus NSs Protein Antagonizes the Type I Interferon Response by Inhibiting MAVS Signaling. *Journal of Virology*, 94(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.00454-20>
- Verbeke, R., Hogan, M. J., Loré, K., & Pardi, N. (2022). Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 55(11), 1993-2005. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.014>
- Vergote, V., Laenen, L., Mols, R., Augustijns, P., Van Ranst, M., & Maes, P. (2021). Chloroquine, an Anti-Malaria Drug as Effective Prevention for Hantavirus Infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 580532. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.580532>
- Vial, P. A., Ferrés, M., Vial, C., Klingström, J., Ahlm, C., López, R., Le Corre, N., & Mertz, G. J. (2023). Hantavirus in humans: a review of clinical aspects and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(9), e371-e382. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00128-7)
- Vial, P. A., Valdivieso, F., Calvo, M., Rioseco, M. L., Riquelme, R., Araneda, A., Tomicic, V., Graf, J., Paredes, L., Florenzano, M., Bidart, T., Cuiza, A., Marco, C., Hjelle, B., Ye, C., Hanfelt-Goade, D., Vial, C., Rivera, J. C., Delgado, I., & Mertz, G. J. (2015). A non-randomized multicentre trial of human immune plasma for treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome caused by Andes virus. *Antiviral Therapy*, 20(4), 377-386. <https://doi.org/10.3851/imp2875>
- Vial, P. A., Valdivieso, F., Ferrés, M., Riquelme, R., Rioseco, M. L., Calvo, M., Castillo, C., Díaz, R., Scholz, L., Cuiza, A., Belmar, E., Hernandez, C., Martinez, J., Lee, S. J., & Mertz, G. J. (2013). High-dose intravenous methylprednisolone for hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile: a double-blind, randomized controlled clinical trial. *Clinical Infectious Diseases*, 57(7), 943-951. <https://doi.org/10.1093/cid/cit394>
- von der Haar, T., Mulrone, T. E., Hedayioglu, F., Kurusamy, S., Rust, M., Lilley, K. S., Thaventhiran, J. E., Willis, A. E., & Smales, C. M. (2023). Translation of in vitro-transcribed RNA therapeutics [Review]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, Volume 10 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1128067>
- Voss, L. F., Howarth, A. J., Wittenborn, T. R., Hummelgaard, S., Juul-Madsen, K., Kastberg, K. S., Pedersen, M. K., Jensen, L., Papanastasiou, A. D., Vorup-Jensen, T., Weyer, K., & Degn, S. E. (2022). The extrafollicular response is sufficient to drive initiation of autoimmunity and early disease hallmarks of lupus [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021370>
- Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C., & Thakur, A. (2020). Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*, 12(2), 102. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>
- Wang, C., & Yuan, F. (2024). A comprehensive comparison of DNA and RNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 210, 115340. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115340>
- Wang, F., Liu, T., Liao, L., Chai, Y., Qi, J., Gao, F., Liang, M., Gao, G. F., & Wu, Y. (2024). Molecular insight into the neutralization mechanism of human-origin monoclonal

- antibody AH100 against Hantaan virus. *Journal of Virology*, 98(8), e0088324. <https://doi.org/10.1128/jvi.00883-24>
- Wang, H., Kang, Z., Wang, X., Pan, Z., Sun, Y., Li, Y., Li, X., Shao, S., Zheng, X., Han, Z., & Ren, J. (2026). Engineering a safe and potent LNP-mRNA delivery system by leveraging the dual activities of α -tocopherol. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 11, 100553. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2026.100553>
- Wang, J., Ding, Y., Chong, K., Cui, M., Cao, Z., Tang, C., Tian, Z., Hu, Y., Zhao, Y., & Jiang, S. (2024). Recent Advances in Lipid Nanoparticles and Their Safety Concerns for mRNA Delivery. *Vaccines (Basel)*, 12(10), 1148. <https://www.mdpi.com/2076-393X/12/10/1148>
- Wang, S., Liu, L., Wang, C., Wang, Z., Duan, X., Chen, G., Zhou, H., & Shao, H. (2022). Establishment of a pseudovirus neutralization assay based on SARS-CoV-2 S protein incorporated into lentiviral particles. *Biosafety and Health*, 4(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.12.006>
- Wang, S., Weissman, D., & Dong, Y. (2025). RNA chemistry and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 24(11), 828-851. <https://doi.org/10.1038/s41573-025-01237-X>
- Wang, Z., & Mir, M. A. (2015). Andes Virus Nucleocapsid Protein Interrupts Protein Kinase R Dimerization To Counteract Host Interference in Viral Protein Synthesis. *Journal of Virology*, 89(3), 1628-1639. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02347-14>
- Wang, Z., Ren, S., Li, Q., Royster, A. D., Lin, L., Liu, S., Ganaie, S. S., Qiu, J., Mir, S., & Mir, M. A. (2021). Hantaviruses use the endogenous host factor P58IPK to combat the PKR antiviral response. *PLoS Pathogens*, 17(10), e1010007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010007>
- Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., & Tong, A. (2022). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Mol Biomed*, 3(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00100-4>
- Warner, B. M., Stein, D. R., Jangra, R. K., Slough, M. M., Sroga, P., Sloan, A., Frost, K. L., Booth, S., Chandran, K., & Safronetz, D. (2019). Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccines Provide Cross-Protection against Andes and Sin Nombre Viruses. *Viruses*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/v11070645>
- Watson, O. J., Barnsley, G., Toor, J., Hogan, A. B., Winskill, P., & Ghani, A. C. (2022). Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(9), 1293-1302. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00320-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00320-6)
- Westerberg, L. J. S., Dedic, B., Näslund, E., Thorell, A., & Spalding, K. L. (2025). Superior normalization using total protein for western blot analysis of human adipocytes. *PLoS One*, 20(7), e0328136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328136>
- Whitley, J., Zwolinski, C., Denis, C., Maughan, M., Hayles, L., Clarke, D., Snare, M., Liao, H., Chiou, S., Marmura, T., Zoeller, H., Hudson, B., Peart, J., Johnson, M., Karlsson, A., Wang, Y., Nagle, C., Harris, C., Tonkin, D.,...Johnson, M. R. (2022). Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Translational Research*, 242, 38-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.11.009>
- Whitmer, S. L. M., Whitesell, A., Mobley, M., Talundzic, E., Shedroff, E., Cossaboom, C. M., Messenger, S., Deldari, M., Bhatnagar, J., Estetter, L., Zufan, S., Cannon, D., Chiang, C.-F., Gibbons, A., Krapivnaya, I., Morales-Betoulle, M., Choi, M., Knust, B., Amman, B.,...Klena, J. D. (2024). Human Orthohantavirus disease prevalence and genotype

- distribution in the U.S., 2008-2020: a retrospective observational study. *The Lancet Regional Health – Americas*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100836>
- Wietschel, K. A., Fechtner, K., Antileo, E., Abdurrahman, G., Drechsler, C. A., Makuvise, M. K., Rose, R., Voß, M., Krumbholz, A., Michalik, S., Weiss, S., Ulm, L., Franikowski, P., Fickenscher, H., Bröker, B. M., Raafat, D., & Holtfreter, S. (2024). Non-cross-reactive epitopes dominate the humoral immune response to COVID-19 vaccination – kinetics of plasma antibodies, plasmablasts and memory B cells [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 15 - 2024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1382911>
- Williamson, B. N., Prescott, J., Garrido, J. L., Alvarez, R. A., Feldmann, H., & Barria, M. I. (2021). Therapeutic Efficacy of Human Monoclonal Antibodies against Andes Virus Infection in Syrian Hamsters. *Emerging Infectious Diseases*, 27(10), 2707-2710. <https://doi.org/10.3201/eid2710.210735>
- World Health Organization. (2005). *Annex 1 - WHO guidelines on non clinical evaluation of vaccines*. W. T. R. Series. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/annex1nonclinical.p31-63.pdf?sfvrsn=d11d7789_3&download=true
- Annex 3 - Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, (2022). https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/annex-3---mrna-vaccines_who_trs_1039_web-2.pdf?sfvrsn=6e31a112_1&download=true
- World Health Organization. (2026). *Hantavirus cluster linked to cruise ship travel, Multi-locations*. Retrieved July 10 from <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2026-DON611>
- Wu, K., Choi, A., Koch, M., Elbashir, S., Ma, L., Lee, D., Woods, A., Henry, C., Palandjian, C., Hill, A., Jani, H., Quinones, J., Nunna, N., O'Connell, S., McDermott, A. B., Falcone, S., Narayanan, E., Colpitts, T., Bennett, H.,... Edwards, D. K. (2021). *Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://dx.doi.org/10.1101/2021.04.13.439482>
- Wu, Y., Yu, S., & de Lázaro, I. (2024). Advances in lipid nanoparticle mRNA therapeutics beyond COVID-19 vaccines [10.1039/D4NR00019F]. *Nanoscale*, 16(14), 6820-6836. <https://doi.org/10.1039/D4NR00019F>
- Xenakis, A., Papadimitriou, V., Zoumpanioti, M., & Mitsou, E. (2026). Nanoprecipitation- and nanoemulsification-based systems for efficient nucleic acid delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 83, 102005. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2026.102005>
- Xiang, Q., Li, L., Wu, J., Tian, M., & Fu, Y. (2022). Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiological Research*, 258, 126993. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126993>
- Xue, Y., Yang, D., Vogel, P., Stabenow, J., Zalduondo, L., Kong, Y., Ravi, Y., Sai-Sudhakar, C. B., Parvathareddy, J., Hayes, E., Taylor, S., Fitzpatrick, E., & Jonsson, C. B. (2022). Cardiopulmonary Injury in the Syrian Hamster Model of COVID-19. *Viruses*, 14(7), 1403. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/7/1403>
- Yang, L., Tang, L., Zhang, M., & Liu, C. (2022). Recent Advances in the Molecular Design and Delivery Technology of mRNA for Vaccination Against Infectious Diseases [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896958>
- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>

- Ye, C., Wang, D., Liu, H., Ma, H., Dong, Y., Yao, M., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, L., Cheng, L., Xu, Z., Lei, Y., Zhang, F., & Ye, W. (2019). An Improved Enzyme-Linked Focus Formation Assay Revealed Baloxavir Acid as a Potential Antiviral Therapeutic Against Hantavirus Infection. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01203>
- Yuan, Z., Yan, R., Fu, Z., Wu, T., & Ren, C. (2024). Impact of physicochemical properties on biological effects of lipid nanoparticles: Are they completely safe. *Science of the Total Environment*, 927, 172240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172240>
- Žak, M. M., & Zangi, L. (2025). Clinical development of therapeutic mRNA applications. *Molecular Therapy*, 33(6), 2583-2609. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.03.034>
- Zhang, L., More, K. R., Ojha, A., Jackson, C. B., Quinlan, B. D., Li, H., He, W., Farzan, M., Pardi, N., & Choe, H. (2023). Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability. *npj Vaccines*, 8(1), 156. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00751-6>
- Zhang, N.-N., Li, X.-F., Deng, Y.-Q., Zhao, H., Huang, Y.-J., Yang, G., Huang, W.-J., Gao, P., Zhou, C., Zhang, R.-R., Guo, Y., Sun, S.-H., Fan, H., Zu, S.-L., Chen, Q., He, Q., Cao, T.-S., Huang, X.-Y., Qiu, H.-Y.,...Qin, C.-F. (2020). A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell*, 182(5), 1271-1283.e1216. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.024>
- Zhang, Y.-Y., Zhang, J.-P., & Zhang, X.-B. (2026). Engineering the poly(A) tail for therapeutic mRNA: from expression control to manufacturing robustness [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 14 - 2026. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2026.1838589>
- Zhang, Y., Li, S., Chu, H., Li, J., Lu, S., & Zheng, B. (2023). A novel mRNA vaccine, TGGT1_278620 mRNA-LNP, prolongs the survival time in BALB/c mice with acute toxoplasmosis. *Microbiology Spectrum*, 12(1), e02866-02823. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02866-23>
- Zhang, Y., Ma, R., Wang, Y., Sun, W., Yang, Z., Han, M., Han, T., Wu, X. A., & Liu, R. (2021). Viruses Run: The Evasion Mechanisms of the Antiviral Innate Immunity by Hantavirus. *Frontiers in Microbiology*, 12, 759198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.759198>
- Zhang, Y., Wang, J., Xing, H., Liu, C., Zha, W., Dong, S., Jiang, Y., & Li, X. (2023). Enhanced immunogenicity induced by mRNA vaccines with various lipid nanoparticles as carriers for SARS-CoV-2 infection [10.1039/D3TB00303E]. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(31), 7454-7465. <https://doi.org/10.1039/D3TB00303E>
- Zhang, Z., Du, J., Zhang, D., Han, R., Wu, X., & Liang, Y. (2025). Research progress of mRNA vaccines for infectious diseases. *European Journal of Medical Research*, 30(1), 792. <https://doi.org/10.1186/s40001-025-03060-x>
- Zheng, L., & Feng, H. (2025). Respiratory virus mRNA vaccines: mRNA Design, clinical studies, and future challenges. *Animal Models and Experimental Medicine*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/ame2.70018>
- Zhou, W., Jiang, L., Liao, S., Wu, F., Yang, G., Hou, L., Liu, L., Pan, X., Jia, W., & Zhang, Y. (2023). Vaccines' New Era-RNA Vaccine. *Viruses*, 15(8).
- Zhugunisso, K., Zakarya, K., Khairullin, B., Orynbayev, M., Abduraimov, Y., Kassenov, M., Sultankulova, K., Kerimbayev, A., Nurabayev, S., Myrzakhmetova, B., Nakhanov, A., Nurpeisova, A., Chervyakova, O., Assanzhanova, N., Burashev, Y., Mambetaliyev, M., Azanbekova, M., Kopeyev, S., Kozhabergenov, N.,...Kutumbetov, L. (2021). Development of the Inactivated QazCovid-in Vaccine: Protective Efficacy of the Vaccine in Syrian Hamsters [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 12 - 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.720437>

Züst, R., Ackermann-Gäumann, R., Liechti, N., Siegrist, D., Ryter, S., Portmann, J., Lenz, N., Beuret, C., Koller, R., Staehelin, C., Kuenzli, A. B., Marschall, J., Rothenberger, S., & Engler, O. (2023). Presence and Persistence of Andes Virus RNA in Human Semen. *Viruses*, 15(11), 2266. <https://doi.org/10.3390/v15112266>

X. ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.



Facultad de
Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Campus Concepción
Edificio Arco s/n, primer piso
www.cienciasbiologicasudec.cl
T: (56-41) 2204508

Concepción, abril 30 de 2025

INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Bioética y Bioseguridad Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción ❖ Dra. Carola Muñoz M. ❖ Dr. José Martínez O. ❖ Dra. Javiera de La Paz ❖ Dr. Pablo Oyarzún R. ❖ Dra. Coralía Rivas R. ❖ Dr. Frank Camacho C. ❖ Dr. Patricio Castro M. ❖ Dra. Fabiola Maureira	PROYECTO	Tesis Doctorado
	TÍTULO	"Desarrollo de un prototipo de vacuna contra el virus Andes basado en la tecnología de ARN mensajero"
	- INVESTIGADOR PRINCIPAL	- Sr. Carlos Alexis Villacís Aguirre
	-INVESTIGADOR RESPONSABLE	-Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso

A solicitud del Sr. Carlos Alexis Villacís Aguirre, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al Proyecto Tesis Doctorado antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

Estas precisiones, así como la metodología del Proyecto, han sido analizadas de acuerdo a las recomendaciones de GUIDE for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Organización Mundial de la Salud (1985), el texto "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal", editado por CONICYT en 2009, y el "Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados" editado por CONICYT en 2018.

De acuerdo con lo señalado en el documento, las precisiones a la metodología son consecuentes con el principio de las "3 Rs" empleado para la investigación con animales. En particular:

1. Dado que no existe un modelo alternativo para realizar el estudio, el Investigador necesita emplear animales, Cantidad/Especie/Cepa: 30 Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) y 48, Ratas (*Rattus norvegicus domestica*), Sprague Dawley, correspondiendo a especies apropiadas para realizar la investigación, lo que representa una buena aproximación al requisito de REEMPLAZAR.
2. En términos de REDUCIR, se utilizará un número de animales dentro de los rangos admisibles.
3. El uso de analgesia y eutanasia son apropiados para la especie en términos de REFINAR. Además, el Proyecto incluye el uso de un protocolo de supervisión de animales de experimentación.
4. En consecuencia, los protocolos existentes son adecuados.
5. El estudio propuesto permitirá realizar avances en los conocimientos en beneficio humano y animal.
6. El personal involucrado es idóneo en el manejo y uso de las muestras animales.



Facultad de
Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Campus Concepción
Edificio Arco s/n, primer piso
www.cienciasbiologicasudec.cl
T: (56-41) 2204508

7. Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOFÁRMACOS, del Departamento de Fisiopatología de nuestra Facultad, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesario para realizar los estudios con animales incluidos en el Proyecto.

8. Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL (www2.udec.cl/matpel), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo con las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

En consecuencia, el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción valida los estudios señalados.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



Dra. Carola Muñoz Montesino
Presidenta
Comité de Bioética y Bioseguridad
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Anexo 2. Determinación del diámetro, dispersidad y potencial zeta de las nanopartículas lipídicas.

Tabla 15. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs-ARNm.

No. lote	No. medición	Diámetro hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial zeta (mV)
1	1	153.9	0.041	-3.04
	2	152.4	0.031	-3.10
	3	150.9	0.067	-3.62
2	1	149.7	0.070	-2.93
	2	148.8	0.085	-3.33
	3	148.9	0.046	-3.11
Promedio ± SD		150.77 ± 2.05	0.057 ± 0.021	-3.19 ± 0.25

Fuente: elaboración propia.

Tabla 16. Determinación del diámetro hidrodinámico, dispersidad y potencial zeta de las LNPs vacías.

No. lote	No. medición	Diámetro hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial zeta (mV)
1	1	160.6	0.107	-1.74
	2	157.7	0.096	-2.26
	3	156.5	0.095	-2.24
2	1	162.0	0.078	-2.28
	2	160.6	0.09	-1.81
	3	157.6	0.094	-2.04
Promedio ± SD		159.17 ± 2.18	0.093 ± 0.009	-2.04 ± 0.25

Fuente: elaboración propia.

Anexo 3. Listado de Reactivos.

Todos estos reactivos tenían grado Biología Molecular.

Nombre	Compañía	Catálogo
2-mercaptoetanol	Sigma	M3148
Ácido acético	Merck	1018302500
Ácido clorhídrico	Sigma	258148
Ácido sulfúrico	Sigma	258105
Acrilamida	Sigma	A8887
Agarosa	Calbiochem	121853
Agua grado biología molecular	Corning	46-100-CM
Azul de Coomassie Brilliant R250	Merck	112553
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Sigma	S6014
Bis Acrilamida	Amresco	0172-250
Bromofenol azul	Merck	108122
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	Thermo Fisher	M6494
Bromuro de etidio	Winkler	BM-0710
Cloroformo	Winkler	CL 0595
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	Thermo Fisher	464595000
Cloruro de calcio	Merck	1023831000
Cloruro de potasio (KCl)	Merck	1049361000
Cloruro de Sodio (NaCl)	Merck	11622450000
Desoxicolato de sodio	Merck	106504
Di hidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	Merck	1048731000
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Sigma	D5758
Dimetilsulfóxido	Merck	67-68-5
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Merck	428015
EDTA	Winkler	ED-0769
Etanol	Sigma	E7023
Etilenodiaminotetraacetato de disodio dihidratado (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O)	Merck	324503
Glicerol	Winkler	BM-0800
Hidrógeno fosfato de disodio (Na ₂ HPO ₄)	Merck	1065861000
Hidróxido de sodio (NaOH)	Merck	1064985000
Isopropanol	Merck	1096342511
Metanol	Merck	1070182511
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) 30 %	Panreac	121076.1211
Persulfato de amonio	Winkler	BM-0250
Rojo Ponceau	Winkler	BM1492
TEMED	Calbiochem	8920-OP
Tris base	Santa Cruz	sc-3715B
Triton™ X-100	Sigma	X100
Tween 20	Calbiochem	9480-OP