



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Prueba de concepto de una proteína antigénica,
compuestos y péptidos antivirales contra SARS-
CoV-2.**

Tesis que presenta

Melvin Eduardo Zúñiga Hernández

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

**Director de la Tesis:
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2022



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Prueba de concepto de una proteína antigénica, compuestos y péptidos antivirales contra SARS-CoV-2**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Melvin Eduardo Zúñiga Hernández** y aprobada el **día 30 de Junio del 2022** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Director de la tesis

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Miembro del Comité Tutorial

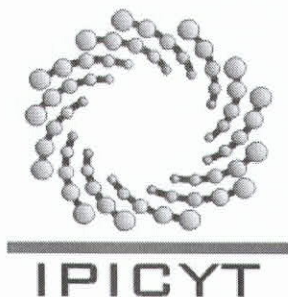
Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y el bioterio de animales de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 1080319 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. y el apoyo del Fideicomiso CEEPAC SLP No. 18397, para la realización de los experimentos



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

La Secretaría Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 232 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2022, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Presidenta
Secretario
Sinodal externo

IPICYT
IPICYT
UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Melvin Eduardo Zúñiga Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Prueba de concepto de una proteína antigénica, compuestos y péptidos antivirales contra SARS-CoV-2

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:17 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaría Académica del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2022.


Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Secretaria Académica


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mi madre Victoria Hernández Ríos, por siempre apoyarme de manera incondicional, creer en mis capacidades y brindarme todo su apoyo.

A mi abuela Florinda Ríos Bautista, por todo el amor que me brindó, por ser pieza clave en mi motivación para lograr mis objetivos y brindarme sus sabios consejos que son parte fundamental en mi vida diaria.

Agradecimientos

Agradecer brevemente a las personas e instituciones que hayan contribuido significativamente para la realización del trabajo.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y a la Dra. Karen Lizbeth Reyes Barrera por el tiempo y asesoría que me dieron durante el desarrollo del proyecto, en la parte técnica del laboratorio, en el trabajo con animales y en la redacción de la tesis.

Al Dr. Edgar Daniel Páez Pérez por su asesoría técnica en la purificación de la proteína RBD.

A la Dra. Jazmín Abraham y el Dr. Alfredo Guzmán por el diseño del gen de RBD y su estandarización en la expresión y purificación de la proteína RBD.

Al Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa por el acoplamiento molecular de los compuestos y péptidos antivirales contra la proteína ACE2.

Al Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda, Dr. Samuel Enoch y M. C. Luz Adriana Valtierra por proporcionar los compuestos putativamente antivirales.

A la Dra. Leonor Huerta Hernández por proporcionarnos el anticuerpo monoclonal IgG anti-RBD anti-humano.

A todos mis compañeros de laboratorio y de generación por su amistad.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica y a la División de Biología Molecular por brindarme la oportunidad de hacer la maestría en sus instalaciones y al LANBAMA por los servicios ofrecidos.

Al CONACYT por la beca otorgada que me ayudó a cursar cómodamente la maestría y me permitió enfocarme tiempo completo en ella.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Virus de SARS-CoV-2	2
1.1.1 Etiología	2
1.1.2 Fisiopatología	3
1.1.3 Epidemiología	5
1.2 Plataformas de producción de vacunas	6
1.2.1 Plataforma de producción de proteínas recombinantes	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos específicos	9
2.2.1 Proteína antigénica	9
2.2.2 Compuestos antivirales	9
2.2.3 Péptidos antivirales	10
3. RESULTADOS	11
3.1 Obtención de la proteína antigénica	11
1.1.1 Clonación del gen RBD mediante recombinación GATEWAY	11
1.1.2 Expresión y purificación de la proteína RBD	12
1.1.3 Cuantificación y verificación de la pureza de la proteína RBD	14
1.2 Cuantificación de anticuerpos anti-RBD (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgA e IgE) en suero de sangre periférica de las vías de inmunización subcutánea e intranasal.	15
1.2.1 Cuantificación de anticuerpos IgM en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal	15
1.2.2 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal	16
1.2.3 Cuantificación de isotipos IgG1 e IgG2a anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal	18
1.2.4 Cuantificación de anticuerpos IgA en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal	20
1.2.5 Cuantificación de anticuerpos IgE en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal	21

3.3 Cuantificación de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) en lavados pulmonares e intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	22
3.3.1 Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en lavados pulmonares de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	23
3.3.1 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en lavados pulmonares de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	24
3.3.2 Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en lavados pulmonares de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	25
3.3.3 Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	26
3.3.4 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	27
3.3.5 Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal	28
3.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de los diferentes tratamientos de RBD por la vía subcutánea, de compuestos y péptidos antivirales.	29
3.4.1 Cuantificación de anticuerpos neutralizantes de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea en muestras de suero de sangre periférica	30
3.4.2 Cuantificación de anticuerpos neutralizantes de muestras de anticuerpos purificados obtenidos de suero de sangre periférica de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea	31
3.4.3 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por diferentes compuestos antivirales	32
3.4.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por diferentes péptidos antivirales	36
4 DISCUSIÓN	40
4.1 Producción de la proteína RBD en <i>E. coli</i> y análisis de inmunogenicidad en ratones BALB/c	40
4.2 Evaluación de compuestos putativamente antivirales	44
4.3 Inhibición de la interacción RBD-ACE2 de los péptidos antivirales	46
5 MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1 Proteína antigénica	48
5.1.1 Clonación del gen RBD mediante recombinación GATEWAY	48
5.1.2 Expresión y purificación de la proteína RBD	49
5.1.3 Cuantificación y verificación de la calidad de la proteína RBD	49
5.2 Ensayo de inmunización en ratones Balb/c con la proteína RBD	50
5.2.1 Inmunización vía subcutánea	51
5.2.2 Inmunización vía intranasal	52
5.3 Cuantificación de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a, IgM, IgA e IgE) en suero de sangre periférica y en lavados pulmonares e intestinales	54
5.3.1 Ensayo ELISA para determinación de IgG, IgG1, IgG2a, IgA, IgE e IgM	54
5.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de anticuerpos neutralizantes en suero de sangre periférica, en anticuerpos purificados del suero, de diferentes compuestos y péptidos antivirales	55
5.4.1 Determinación de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero	55

de sangre periférica	
5.4.2 Determinación de anticuerpos neutralizantes en muestras de anticuerpos anti-RBD purificados en suero de sangre periférica	56
5.4.3 Análisis de compuestos antivirales	57
5.4.4 Diseño de péptidos antivirales	58
5.4.5 Análisis de péptidos antivirales	59
6 CONCLUSIONES	60
7 PERSPECTIVAS	62
8 BIBLIOGRAFÍA	63

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de grupos para inmunización vía subcutánea	52
Tabla 2. Distribución de grupos para inmunización vía intranasal	53

Lista de figuras

Figura 1. Vector de expresión pDEST-17 con el gen RBD.	11
Figura 2. Gel de digestión de clonas que contienen el gen RBD.	12
Figura 3. Gel SDS-PAGE que muestra la proteína RBD purificada.	14
Figura 4. Western Blot para la detección de RBD mediante diferentes anticuerpos primarios.	15
Figura 5. Monitoreo de la producción de anticuerpos IgM en ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con RBD.	16
Figura 6. Monitoreo de la producción de anticuerpos IgG en ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con RBD.	18
Figura 7. Cuantificación de anticuerpos IgG1 anti-RBD en ratones BALB/c.	19
Figura 8. Cuantificación de anticuerpos IgG2a anti-RBD en ratones BALB/c.	20
Figura 9. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posteriores a la 3ra. dosis.	21
Figura 10. Cuantificación de anticuerpos IgE anti-RBD en ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posteriores a la 3ra. dosis.	22
Figura 11. Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posterior a la 3er. dosis.	23
Figura 12. Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	25
Figura 13. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	26
Figura 14. Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posterior a la 3er. dosis.	27
Figura 15. Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	28
Figura 16. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	29
Figura 17. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD en muestras de suero de sangre periférica de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	31
Figura 18. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de anticuerpos purificados de muestras de suero de sangre periférica de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3er. dosis.	32
Figura 19. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de compuestos de tipo alcaloide.	33

Figura 20. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de un compuesto de tipo flavonoide.	34
Figura 21. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de un compuesto derivado de paracetamol.	35
Figura 22. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de un compuesto derivado de paracetamol.	36
Figura 23. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido nativo.	37
Figura 24. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 3.	37
Figura 25. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 4.	38
Figura 26. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido Nativo-XL.	39
Figura 27. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 1.	39
Figura 28. Distribución de grupos para inmunización vía subcutánea.	52
Figura 29. Distribución de grupos para inmunización vía nasal	53

Abreviaturas

ACE2	Enzima convertidora de angiotensina-2
CHO	Células de ovario de hámster chino
CLR	Receptores tipo lectina C
COVID-19	Coronavirus 2019
HEK293	Células de riñón embrionario humano 293, por sus siglas en inglés
IFN I	Interferón α y β
IL	Interleucinas
IRA	Infecciones respiratorias agudas
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
NLR	Receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
Pp1a	Lipoproteína 1a
Pp1b	Lipoproteína 1ab
RBD	Dominio de Unión a Receptor, por sus siglas en inglés
RLR	Receptores similares al gen I inducibles por ácido retinoico Complejo de replicación-transcripción
RTC	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2
SARS-CoV-2	Subunidad 1 de la Spike
S1	Subunidad 2 de la Spike
S2	
TA	Temperatura ambiente
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral

Resumen

Prueba de concepto de una proteína antigénica, compuestos y péptidos antivirales contra SARS-CoV-2

Los principales agentes causales de las infecciones respiratorias agudas son los virus. El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés), es un coronavirus que causa una infección crónica aguda, ocasionando síntomas como fiebre, tos, cefalea, neumonía, entre otros, el cual ha causado cerca de 6.3 millones de muertes en el mundo a la fecha. La mejor alternativa para evitar casos graves causados por este virus es la vacunación. Las diferentes plataformas para la producción de vacunas se han ido mejorando con el fin de reducir costos, reducir efectos secundarios y mejorar la respuesta inmune que repercute en una protección duradera. Actualmente, se han desarrollado y aplicado varias vacunas producidas por diversas plataformas contra el SARS-CoV-2, y se siguen realizando mejoras contra las nuevas variantes. Además, se siguen buscando compuestos que reduzcan la replicación del virus, y por lo tanto hospitalizaciones y muertes. En este trabajo se realizó una prueba de concepto de una proteína recombinante antigénica del dominio de unión al receptor (RBD), de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2, la cual fue expresada en bacteria y aplicada en 5 y 7.5 μg por vía subcutánea y 5 μg por la vía nasal. Esto con la finalidad de elucidar su respuesta inmune e identificar anticuerpos neutralizantes en sueros de ratones BALB/c. Por otro lado, se realizó la prueba de neutralización de la unión RBD-ACE2 de anticuerpos vs RBD, compuestos y péptidos putativamente antivirales mediante un ensayo de ELISA subrogado. Los péptidos se diseñaron en la región de unión a la enzima convertidora de Angiotensina II humana y algunos se modificaron por mutagénesis *in silico* para una mejor interacción. Los compuestos y péptidos fueron seleccionados *in silico* mediante acoplamiento molecular. La inmunización de la proteína antigénica RBD por la vía subcutánea generó una buena respuesta inmune sesgada a tipo Th2 y produjo anticuerpos neutralizantes que en suero inhiben la unión RBD-ACE2 en un 80% y purificados en un 20%. Los compuestos antivirales inhibieron desde 20 al 30%, siendo el derivado de paracetamol el más prometedor. Los péptidos antivirales mostraron un porcentaje de inhibición del 50 al 60%, siendo el péptido nativo, 3 y 4 los que mostraron mejor resultado. Los mejores compuestos deberán validarse en ensayos de líneas celulares y de ser posible en ensayos en animales.

PALABRAS CLAVE: COVID-19, antígeno, anticuerpos neutralizantes, inhibición de la replicación.

Abstract

Proof-of-concept of an antigenic protein, antiviral compounds and peptides against SARS-CoV-2

The main causative agents of acute respiratory infections are viruses. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a coronavirus that causes acute chronic infection, causing symptoms such as fever, cough, headache, pneumonia, among others, which has caused about 6.3 million deaths worldwide. The best alternative to avoid serious cases caused by this virus is the vaccination. The different platforms to produce vaccines have been improved, to reduce costs, side effects and to obtain a better immune response that results in lasting protection. Currently, different vaccines produced by different platforms have been developed and applied against SARS-CoV-2, and improvements are under development against the new variants of SARS-CoV-2. Furthermore, new compounds against viral replication are studied which reduce hospitalization and deaths. In this work, a proof of concept of a recombinant antigenic protein of the receptor binding domain (RBD), from the SARS-CoV-2 spike protein, which was expressed in bacteria and applied in 5 and 7.5 μ g subcutaneously and 5 μ g nasally, to elucidate its immune response and to identify neutralizing antibodies in sera of BALB/c mice. On the other hand, the RBD-ACE2 binding neutralization assay was performed with antibodies against RBD and putatively antiviral compounds and peptides. By a subrogate ELISA. The peptides were designed on the binding region to the human angiotensin-converting enzyme II and some of them were modified by *in silico* mutagenesis. The compounds and peptides were selected *in silico* by molecular docking. Immunization of the RBD antigenic protein by the subcutaneous route generated a good Th2-biased immune response and produced neutralizing antibodies that in serum inhibited the 80% of RBD-ACE2 binding and 20% with the purified antibodies. The antiviral compounds inhibited from 20 to 30%, with the paracetamol derivative being the most promising. The antiviral peptides showed an inhibition percentage of 50 to 60%, being the native peptide, 3 and 4 which showed the best results. The best compounds should be validated in cell lines assays and subsequently in animal tests.

KEY WORDS: COVID-19, antigen, neutralizing antibodies, replication inhibition.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) representan un importante problema de salud ya que ocupan el segundo lugar a nivel mundial de morbilidad en niños menores de 5 años y además son frecuentes en personas de la tercera edad y en sujetos inmunocomprometidos (Solís-Rodríguez et al., 2020).

Los principales agentes causales de las IRA son los virus, siendo el virus de la influenza y coronavirus los que más han afectado a la población mundial en el siglo XXI. Los virus de la familia Coronaviridae son de ARN y pueden infectar periódicamente las vías respiratorias de mamíferos y aves. Se conocen 7 que infectan humanos de los cuales 3 causan síntomas de resfriado común: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, sin embargo, hay otros 3 que causan síndromes respiratorios graves como el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) con 9.6% de letalidad, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) con 34.5% de letalidad y el síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) causante de la enfermedad de coronavirus 2019 (COVID-19) con 2-4% de letalidad (Alejandre-García et al., 2020). La morbilidad severa causada por los coronavirus en humanos se hizo más evidente después de la identificación del SARS-CoV en 2003, HCoV-NL63 en 2004, HKU1 en 2005, MERSCoV en 2012 y finalmente SARS-CoV-2 en 2019, ya que algunos de estos virus pueden provocar la muerte a gran escala debido a su alta tasa de letalidad y además propagarse rápidamente por su tasa de contagio (Oroojalian et al., 2020). Solo el SARS-CoV-2 ha causado el contagio de casi 543.6 millones de personas a la fecha (Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, 2022).

1.1 Virus SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 causa una infección crónica aguda como el SARS-CoV y el MERS-CoV, ocasionando síntomas como fiebre, tos, cefalea, neumonía, entre otros (Alejandre-García et al., 2020). Su tasa de transmisión o (R_0) inició con 3.5 personas contagiadas y ha ido aumentando hasta 7.5 contagios con las variantes como la delta a más de 10 con ómicron.

1.1.1 Etiología

La subfamilia se clasifica en cuatro géneros: alfa, beta, gamma y delta, siendo los primeros dos los que infectan al humano. Se han descrito siete coronavirus que causan enfermedad en humanos: 229E (α -CoV), NL63 (α -CoV), OC43 (β -CoV), HKU1 (β -CoV), MERS-CoV (β -CoV), SARS-CoV (β -CoV) y el séptimo miembro es el recién descubierto SARS-CoV-2 (β -CoV) (Le et al., 2020).

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto, con un diámetro de aproximadamente 60-140 nm, cuya forma puede ser esférica, elíptica o pleomórfica. El genoma viral tiene aproximadamente de 27-32 Kb y codifica proteínas estructurales y no estructurales; por su importancia, las primeras se describen a continuación:

- Espícula (proteína S o Spike): se proyecta a través de la envoltura viral y forma las espículas de la corona; spike se divide en dos subunidades nombradas S1 y S2. Spike se encuentra glicosilada y la subunidad S1 es la encargada de mediar la unión del receptor, mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión viral con la membrana de la célula del huésped. Por otro lado, la enzima convertidora de angiotensina II humana (ACE2), es el principal receptor del SARS-CoV-2, por el cual la proteína S del SARS-CoV-2 ingresa a las células huésped. La proteína de

unión viral o proteína Spike se une a ACE2 a través del dominio de unión al receptor (RBD) ubicado en la superficie de la proteína S (Mittal et al., 2020).

- Proteína de membrana (M): posee dos extremos, un dominio N-terminal corto que se proyecta en la superficie externa de la envoltura y un extremo C-terminal largo interno; juega un papel importante en el ensamblaje del virus.
- Proteína de la nucleocápside (N): se asocia con el genoma de ARN para formar la nucleocápside; se piensa que puede estar involucrada en la regulación de la síntesis del ARN e interactúa con la proteína M al momento de la replicación viral.
- Proteína de la envoltura (E): es una proteína que funciona como porina, formando canales iónicos, se desconoce su función específica; sin embargo, en el virus SARS-CoV, esta proteína participa en el ensamblaje del virus (Alejandre-García et al., 2020).

1.1.2 Fisiopatología

El mecanismo de transmisión de la enfermedad por SARS-CoV-2 es de persona a persona por medio de la vía aérea a través de las microgotas de secreciones (gotas de Flügge) que se exhalan al toser, estornudar o hablar y son inhaladas o depositadas en boca y conjuntivas oculares, así como superficies, que pueden fungir como fómites. También los aerosoles juegan un papel importante en la propagación del virus, siendo esta vía la más importante, por lo que la ventilación es vital para reducir el riesgo de contagio (Wang et al., 2021). Los factores virales y del huésped influyen en la patogénesis del SARS-CoV-2.

Cuando el virus de SARS-CoV-2 infecta una célula humana, el sistema inmune entra en acción para eliminar los viriones y destruir las células infectadas. Como primera línea de defensa contra las infecciones víricas, la respuesta inmune innata

comienza su lucha contra el virus produciendo citocinas y quimiocinas inflamatorias. Los mediadores más importantes de la respuesta inmune innata que participan en la defensa inicial contra el coronavirus son los receptores tipo RIG-I (RLR), los receptores tipo lectina C (CLR), los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR) y también los receptores citoplasmáticos como cGAS, IFI16, STING y DAI (Mittal et al., 2020). Una vez que el SARS-COV-2 accede a las células y subsecuentemente libera su material genético (ARN), es reconocido por receptores de la inmunidad innata localizados de manera intracelular, como el receptor tipo Toll 7 (TLR7), RIG-1 y MDA 5, activando una cascada de señalización, lo que conduce a la expresión de IFN tipo I (α y β) cuyo objetivo es interferir en la replicación viral. Por otra parte, los antígenos virales pueden ser procesados por las células presentadoras de antígeno mediante su complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I) al receptor de linfocitos T (TCR) CD8+, lo cual conlleva la liberación de sus enzimas proteolíticas (citotoxicidad). Al mismo tiempo, se incrementa la síntesis de mediadores proinflamatorios (tormenta de citocinas) como: IL-1B (activación de neutrófilos y pirógeno endógeno), IL-6 (activación de neutrófilos), IL-7 (diferenciación de linfocitos T), IL-8 (activación de neutrófilos), IL-9 (factor de crecimiento para linfocitos), IL-10 (suprime la proliferación y producción de citocinas de linfocitos) y TNF- α (activa la respuesta de neutrófilos) (Guo et al., 2020).

La ACE2 es una proteína de membrana tipo I que tiene receptores en el pulmón, corazón, riñón e intestino, principalmente asociados con enfermedades cardiovasculares. Se ha documentado que la replicación viral primaria ocurre en el epitelio de la mucosa de la cavidad nasal y faringe. Los receptores ACE2 que

están localizados en el tracto respiratorio inferior de los humanos son los receptores celulares para SARS-CoV-2. La glucoproteína S incluye dos subunidades, S1 y S2: la primera determina el tropismo celular, y la segunda media la fusión de la membrana celular del virus. Posterior a esta fusión de membrana, el ARN del genoma viral es liberado en el citoplasma, el ARN no envuelto traduce dos lipoproteínas, pp1a y pp1ab, que codifican proteínas no estructurales, y forman complejos de replicación-transcripción (RTC, por sus siglas en inglés) en una vesícula de doble membrana que continuamente se replica (Guo et al., 2020).

1.1.3 Epidemiología

Los coronavirus son conocidos por su circulación entre algunos mamíferos y aves. El SARS-CoV-2 fue aislado por primera vez en el líquido del lavado broncoalveolar (LBA) de tres pacientes con enfermedad por COVID-19 en diciembre del 2019 y el análisis de la secuencia genómica demostró que SARS-CoV-2 es 96.2% idéntico a la secuencia de Bat CoV RaTG13 de murciélago, por lo que es probable que SARS-CoV-2 haya surgido en el mercado de Wuhan, China en donde inició el brote. El análisis filogenético de todo el genoma indica que SARS-CoV-2 comparte 79.5 y 50% de identidad de secuencia con SARS-CoV y MERS-CoV, respectivamente (Mittal et al., 2020).

El número de casos de COVID-19 notificados a la OMS ha ido en aumento desde el primer informe de COVID-19 en diciembre de 2019 en la oficina de la OMS en China. La infección comenzó a extenderse desde Wuhan, China. El número de casos confirmados en China creció hasta mediados de febrero de 2020. Hasta el 15 de marzo de 2020, según la OMS se habían notificado 153,517 casos de

COVID-19 confirmados por laboratorio con 5,735 muertes a nivel mundial (aproximadamente un 3.8% de mortalidad).

La tasa de mortalidad del SARS-CoV-2 (3.8%) es menor que la del SARS-CoV (10%) o MERS-CoV (37.1%), pero el número de casos de infección relativa es 10 veces mayor. Los informes acumulados revelaron que el SARS-CoV-2 puede transmitirse de personas asintomáticas o con infecciones leves. Estas características explican la rápida propagación epidémica del virus.

Actualmente, los casos confirmados a nivel mundial de personas infectadas con SARS-CoV-2 ascienden hasta los 543 millones y las muertes están por encima de los 6 millones de personas, lo cual genera una tasa de mortalidad del menos del 2%.

Por este motivo, se han desarrollado de manera rápida diferentes tipos de vacunas contra el virus del SARS-CoV-2 mediante diferentes plataformas de producción. Algunas de las plataformas presentan limitaciones, desde el alto costo de producción del antígeno debido al uso de líneas celulares de mamíferos hasta el alto costo en el mantenimiento de la vacuna de ARN debido a la cadena de frío que necesita para almacenarse.

1.2 Plataformas de producción de vacunas

Se entiende por “plataforma de vacuna” a una categoría de estrategia tecnológica para la producción de una vacuna y que finalmente repercute en la forma de actuar sobre el sistema inmune. Las plataformas de vacunas hasta ahora desarrolladas son: virus atenuados, virus inactivados, vectores virales (replicantes y no replicantes) también llamadas de virus recombinantes, vacunas basadas en ácidos nucleicos (ADN o ARNm) y vacunas a base de proteínas virales (proteínas

completas, subunidades de proteínas, partículas similares a virus, proteínas recombinantes) (Le et al., 2020).

En términos generales, las vacunas requieren dos componentes, antígenos del patógeno-diana que son proporcionados en la vacuna o pueden ser generados por el individuo receptor de la vacuna, y una señal de infección que alerta y activa el sistema inmunológico del huésped. Las vacunas atenuadas pueden proporcionar naturalmente ambos componentes; mientras que las demás plataformas de vacunas pueden proporcionar los antígenos o epítomos, pero a menudo requieren la provisión artificial de señales para alertar al sistema inmunológico, que se conocen como adyuvantes (Batty et al., 2021).

1.2.2 Plataformas de expresión de proteínas recombinantes

Las plataformas de expresión de proteínas recombinantes tienen la finalidad de producir a gran escala proteínas o subunidades de ellas, pero la selección de la plataforma dependerá de la naturaleza de la proteína a producir, así como la finalidad que tendrá (Cid y Bolívar, 2021).

La proteína del dominio de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés), se ha expresado en sistemas de expresión de células eucariotas, incluyendo células de baculovirus, células de levadura y células de mamíferos (por ejemplo, células HEK293 y células CHO). Sin embargo, el bajo rendimiento de expresión y el alto coste de la producción de la proteína RBD, ha elevado el precio de las vacunas. Por lo anterior, se ha realizado la búsqueda de diferentes tipos de plataformas de expresión de proteínas recombinantes para su uso en vacunas, que disminuyan el precio de producción de antígenos. Un modelo muy atractivo son las células

bacterianas que por su fácil manipulación o bajo costo se han intentado implementar en la producción de antígenos para la producción de vacunas.

1.2.2.1 Bacterias

Los sistemas de expresión bacteriana para la expresión de proteínas heterólogas tienen las ventajas de ser fáciles de usar, de bajo costo, de corto tiempo de generación y fácilmente escalable, siendo *E. coli* uno de los huéspedes bacterianos más populares para la expresión de proteínas heterólogas (Chen et al., 2020).

La RBD expresada por *E. coli* carece de glicosilación, aunque no es necesario para que se genere una respuesta inmune en un ratón inmunizado con ella, y sus epítopos antigénicos pueden no estar suficientemente expuestos. Sin embargo, se han estandarizado protocolos de expresión de RBD para *E. coli* y de purificación mediante una columna de Ni Sepharose Fast Flow. Además, se ha realizado la comparación estructural de RBD expresada en *E. coli* con la RBD expresada por las células HEK293 y se vio que la RBD de *E. coli* podía unirse fuertemente a la ACE2 (He et al., 2021). Por lo tanto, se espera que la RBD producida en *E. coli* sea biológicamente activa y se aplique en el desarrollo de vacunas, el cribado de fármacos y el kit de prueba de virus (He et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar mediante ensayos de interacción receptor-ligando (ACE2-RBD) *in vitro* el efecto inhibitorio de moléculas de diseño (compuestos putativamente antivirales y péptidos), así como el efecto neutralizante de anticuerpos obtenidos de la inmunización de un prototipo de vacuna contra SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Proteína antigénica

- 1) Demostrar que es posible expresar y purificar la proteína RBD de SARS-CoV-2 (proteína antigénica) en *E. coli* Rosetta.
- 2) Evaluar la inmunogenicidad de la proteína antigénica expresada en *E. coli* mediante un ensayo *in vivo* de administración en ratones BALB/c.
- 3) Caracterizar el tipo de respuesta inmunológica en suero y el nivel de respuesta de anticuerpo en las principales mucosas generadas por la inmunización de la proteína antigénica en ratones BALB/c.
- 4) Determinar el título neutralizante de la interacción ACE2-RBD de los anticuerpos generados por la inmunización de la proteína antigénica en ratones BALB/c.

2.2.2 Compuestos antivirales

- 1) Determinar el porcentaje de inhibición de la interacción ACE2-RBD de los compuestos putativamente antivirales.

2.2.3 Péptidos antivirales

- 1) Determinar el porcentaje de inhibición de la interacción ACE2-RBD de los péptidos antivirales.

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de la proteína antigénica

3.1.1 Clonación del gen de RBD mediante recombinación GATEWAY

La Dra. María Jazmín Abraham, investigadora de nuestro grupo, diseñó previamente oligonucleótidos basados en la secuencia del virus SARS-CoV-2, para amplificar el dominio RBD del gen que codifica para la proteína Spike y se amplificó de una muestra positiva a COVID-19, donada por el LANBAMA. Las bacterias de *E. coli* Rosetta fueron transformadas con éxito mediante el sistema de recombinación GATEWAY, utilizando el vector de expresión p-Dest-17 el cual tenía fusionado el gen de RBD (Figura 1).

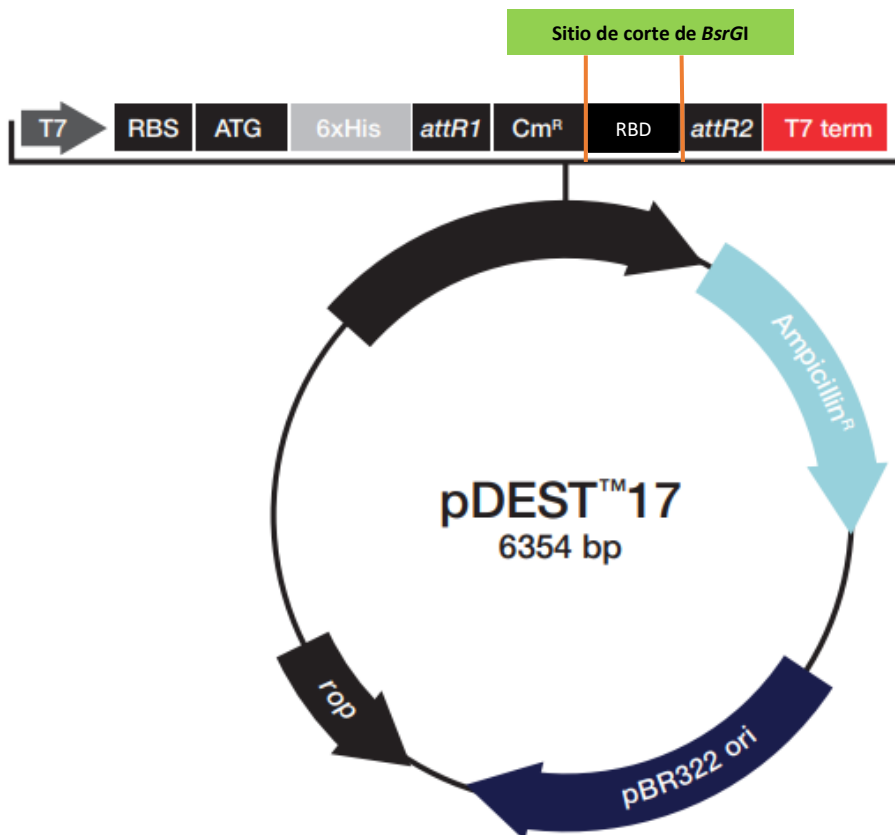


Figura 1. Vector de expresión pDEST-17 con el gen RBD. T7: Promotor; RBS: Shine-Dalgarno sequence; ATG: codón de inicio de la transcripción; Cm^R: marcador de selección resistencia a cloranfenicol; *attR1*: sitio de recombinación, T7 term: Terminador. *BsrGI* corta en los bordes del gen RBD.

Después de la digestión con la enzima *BsrGI*, se obtuvieron las bandas esperadas de 705 pb para RBD y 4,699 pb para el vector p-Dest-17 relajado. La banda cercana a 2,000 pb es el plásmido súper enrollado (Figura 2).

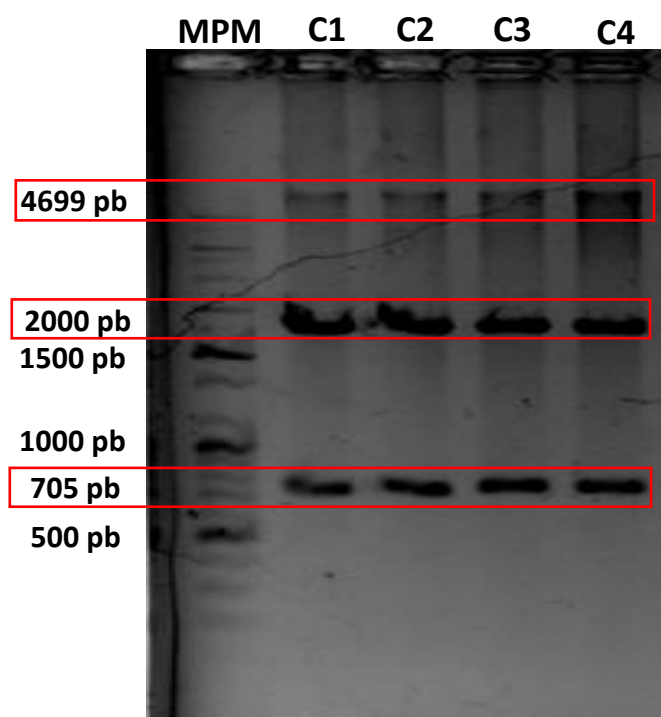


Figura 2. Gel de digestión de clonas que contienen el gen RBD. Confirmación de la transformación *E. coli* Rosetta con p-Dest-17 que contiene el gen *RBD*. La digestión con *BsrGI* genera una banda de 705 pb en las clonas transformadas. MPM: Marcador de peso molecular Generuler 1 Kb, C1: Clona 1, C2: Clona 2, C3: Clona 3, C4: Clona 4.

3.1.2 Expresión y purificación de la proteína RBD

Se realizó la inducción de la proteína RBD con IPTG 1mM toda la noche por cada litro de cultivo de *E. coli* Rosetta en medio LB. Obteniéndose un rendimiento de 6 mg/L, por cultivo en frasco. El peso molecular de la proteína RBD recombinante es

de 26 kDa y en el gel SDS-PAGE se observan dos bandas de ese peso molecular (Figura 3). En el carril dos la proteína RBD se encuentra desalada después de su purificación por columna de níquel, mientras que en el carril 3 la proteína RBD contiene 8M de urea. El proceso de desalado con centricon plus centrifugal filter de SARTORIUS, Goettingen Germany ayudó a obtener una proteína más concentrada y con menos bandas contaminantes, en comparación con la proteína en 8M de urea.

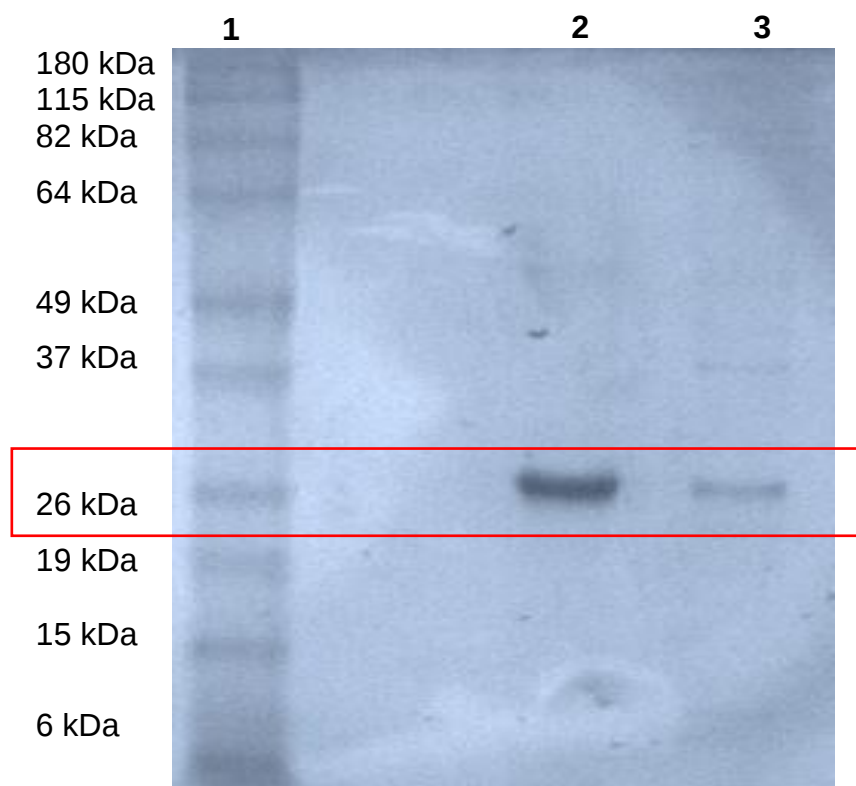


Figura 3. Gel SDS-PAGE que muestra la proteína RBD purificada. 1: Marcador de Peso Molecular BenchMark, 2: Proteína RBD desalada, 3: Proteína RBD en 8M de urea.

3.1.3 Cuantificación y verificación de la pureza de la proteína RBD

Se realizó la cuantificación de la proteína RBD mediante el método de Bradford, obteniéndose una producción de 6 mg/L de la proteína RBD, por cultivo en frasco. El ensayo de Western blot se realizó para identificar la proteína RBD mediante diferentes anticuerpos primarios. Se observa que la proteína RBD se detectó con un anticuerpo primario anti-histidina (Figura 4A), lo cual indica su integridad. Por otra parte, cuando se utiliza el suero de los ratones inmunizados con 5 µg de RBD se logra detectar la banda de 26 kDa correspondiente a la proteína RBD (Figura 4B), lo cual refleja que los anticuerpos producidos por los ratones de este tratamiento son específicos para la proteína RBD. En el ensayo de Western blot con anticuerpo de ratones inmunizados con 7.5 µg de RBD se obtiene un dato similar (Figura 4C), en donde se observa una banda de 26 kDa. Por último, en el ensayo en donde se utilizó el suero de ratones inmunizados con adyuvante sin RBD no se ve ninguna banda (Figura 4D). Lo cual indica que nuestro control experimental con adyuvantes no está produciendo anticuerpos específicos para la proteína RBD.

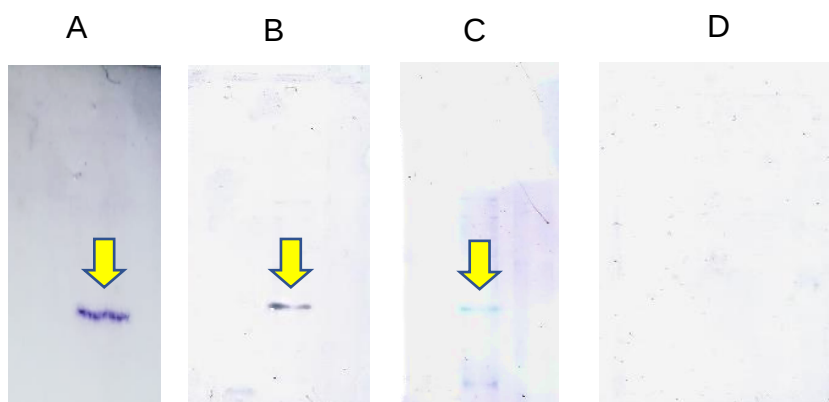


Figura 4. Western Blot para la detección de RBD mediante diferentes anticuerpos primarios. A: Anticuerpo primario Anti-histidina, B: Anticuerpo primario de suero de ratones inmunizados con 5 µg de RBD, C: Anticuerpo primario de suero de ratones inmunizados con 7.5 µg de RBD, D: Anticuerpo de suero de ratones inmunizados con adyuvante sin RBD. Las flechas amarillas indican la presencia de la proteína RBD producida en *E. coli* Rosetta y purificada en columna de níquel.

3.2 Cuantificación de anticuerpos anti-RBD (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgA e IgE) en suero de sangre periférica de las vías de inmunización subcutánea e intranasal

El proceso de desarrollo de una respuesta inmune involucra el sistema inmune innato y adaptativo, este último es el principal responsable de generar anticuerpos que ayudarán al organismo a defenderse del patógeno de manera específica. Por lo cual, se realizó la identificación de la respuesta inmune adaptativa a través de la cuantificación de diferentes anticuerpos en suero de sangre periférica de los ratones BALB/c inmunizados por distintas vías, utilizando un ELISA indirecto.

3.2.1 Cuantificación de anticuerpos IgM en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal

Se cuantificaron los anticuerpos IgM anti-RBD para las vías de inmunización subcutánea e intranasal durante 60 días, en ese periodo se aplicaron tres inmunizaciones, esto se hizo para monitorear el título de anticuerpos, lo cual es una de las características más importantes en una vacuna. Se observó que la inmunización vía intranasal no se detectó presencia de IgM anti-RBD posterior a cada aplicación realizada. Por otro lado, con la vía subcutánea se produjeron anticuerpos IgM anti-RBD desde la segunda inmunización con el tratamiento de 7.5 µg de RBD (día 14) como era de esperarse ya que este es el primer tipo de

anticuerpo que se genera, manteniéndose hasta los 40 días después de la primera dosis (Figura 5).

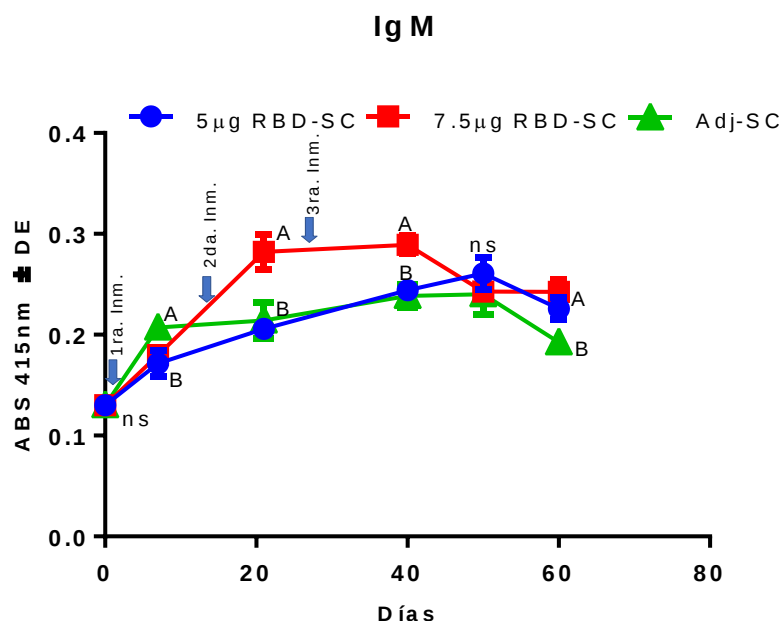


Figura 5. Monitoreo de la producción de anticuerpos IgM en ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con RBD. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.2.2 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal

El mantenimiento del título de anticuerpos IgG por un periodo largo es clave en una vacuna, por lo cual realizamos varias cuantificaciones de IgG anti-RBD de la vía subcutánea hasta que el título de anticuerpos empezara a descender.

Se determinó el título de anticuerpos de los diferentes tratamientos en ambas vías de inmunización (subcutánea e intranasal), 7 días después de cada inmunización, siendo la 3ra., la que presentó mayor título de anticuerpos 1:64,000 (log2: 15.97) para ambos tratamientos (5 y 7.5 µg de RBD) en la vía subcutánea y no hubo

señal en el grupo control. Por otra parte, en la vía intranasal no hubo señal del tratamiento y el grupo control (datos no mostrados).

Posteriormente, se cuantificaron los IgG anti-RBD de las diferentes vías de inmunización 7 días posteriores de cada aplicación del prototipo de vacuna (Figura 6). Se observó que en la 1ra. inmunización no se produjeron anticuerpos IgG anti-RBD por ninguna vía de inmunización. Sin embargo, en la 2da. dosis se detectaron IgG anti-RBD de forma significativa en la vía subcutánea, observándose una mayor respuesta en el tratamiento con 7.5 µg de RBD, esto significa que con mayor cantidad de proteína inmunizada se producen anticuerpos IgG anti-RBD en menor tiempo para este experimento. Además, en la 3ra. inmunización se obtuvieron absorbancias considerables de IgG con diferencias estadísticamente significativas, en la vía subcutánea en ambos tratamientos (5 µg y 7.5 µg de RBD), mientras que en la vía intranasal no hay señal (datos no mostrados). Aunque la vía natural de infección es por vías respiratorias y esperábamos una respuesta en este tipo de inmunización, es probable que se requieran cantidades más altas de RBD para observar efecto por esta última vía, o el uso alternativo de un adyuvante. Asimismo, se ha visto que utilizando esta vía como refuerzo potencia la producción de anticuerpos (Sánchez-Alvarez et al., 2021).

Por otra parte, al día 60 posterior a la 1ra. inmunización, ambos tratamientos de la vía subcutánea alcanzan la misma cantidad de IgG anti-RBD para después empezar a descender. Mientras que el tratamiento con adyuvante se mantuvo sin producción de IgG anti-RBD. Esto nos indica que al menos ambos tratamientos

producen una buena cantidad de anticuerpos IgG anti-RBD entre los días 40 y 60 posterior a la primera inmunización.

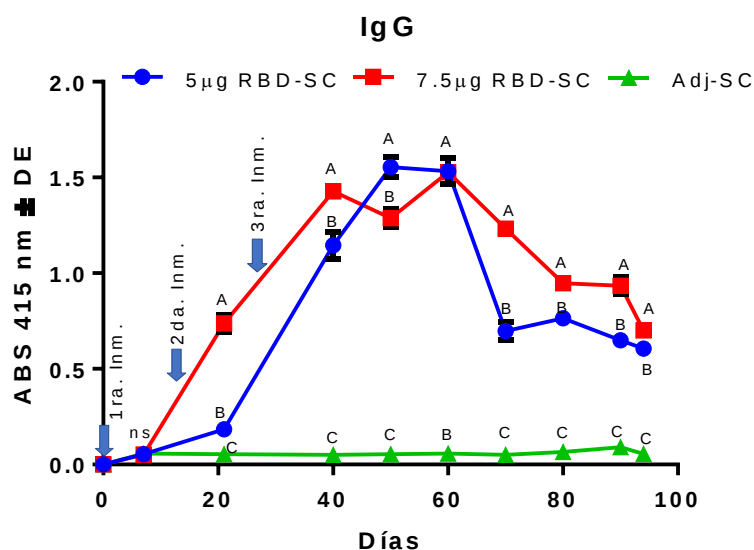


Figura 6. Monitoreo de la producción de anticuerpos IgG en ratones BALB/c inmunizados subcutáneamente con RBD. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.2.3 Cuantificación de isotipos IgG1 e IgG2a anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal

Se cuantificaron los isotipos de IgG anti-RBD (IgG1 e IgG2a) en los ratones inmunizados por vía subcutánea en cada uno de los tratamientos (Figura 7 y 8). Esta cuantificación es importante pues nos indica el balance de respuesta inmune tipo Th1 o Th2. Las citocinas de tipo Th1 tienden a producir las respuestas proinflamatorias responsables de matar los parásitos intracelulares y de perpetuar las respuestas autoinmunes, mientras que las citocinas de tipo Th2 se asocian con una respuesta antiinflamatoria. Se observó que la producción de IgG1 anti-RBD

fue abundante en ambos tratamientos, siendo el tratamiento con 7.5 μ g de RBD el que obtuvo mayor cantidad de producción de anticuerpos (Figura 7).

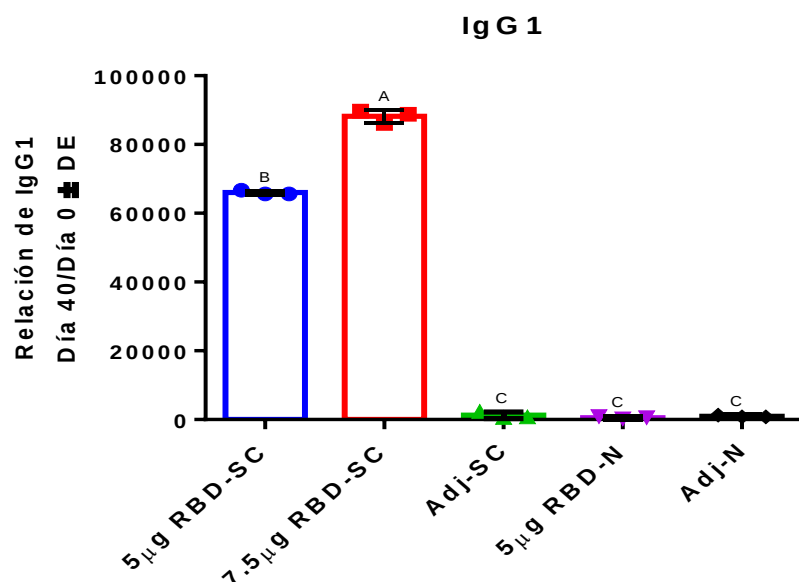


Figura 7. Cuantificación de anticuerpos IgG1 anti-RBD en ratones BALB/c. Se inmunizaron con 5 y 7.5 μ g de RBD y el adyuvante TiterMax como control por la vía subcutánea y solo 5 μ g por la intranasal. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

Se observa el mismo comportamiento entre los tratamientos para la producción de IgG2a anti-RBD, pero con valores más bajos (Figura 8). El hecho de que haya mayor producción de IgG1 con respecto a IgG2a nos indica que la respuesta inmune se está inclinado más a la respuesta tipo Th2, lo cual nos dice que no hay un balance entre ambos tipos de respuesta que idealmente debería haber para que no haya respuestas exacerbadas de producción de eosinófilos, por lo que en trabajos futuros se puede tratar de mejorar este balance introduciendo secuencias antigénicas que generen una mayor respuesta de IgG2a.

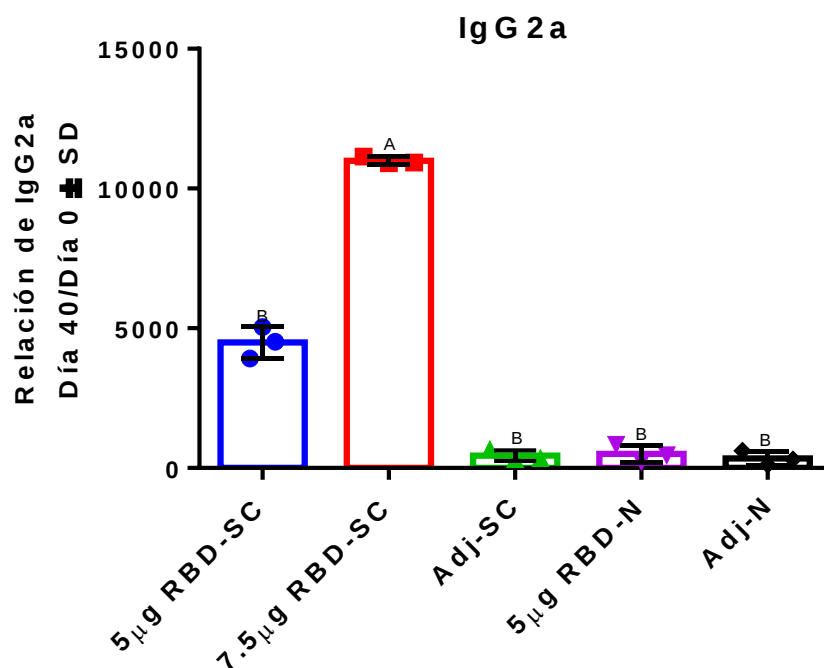


Figura 8. Cuantificación de anticuerpos IgG2a anti-RBD en ratones BALB/c. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea y solo 5 µg por la intranasal. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.2.4 Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

Se realizó la cuantificación de los anticuerpos IgA anti-RBD en las diferentes vías de inmunización aplicadas posterior a la 3ra. dosis. La IgA es importante por ser una inmunoglobulina de mucosas. La cantidad de IgA fue ligeramente mayor en el tratamiento de 5 µg de RBD con respecto a 7.5 µg de RBD, sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, estos valores tan bajos podrían deberse a que las IgAs no se encuentran en abundancia en el suero (Figura 9).

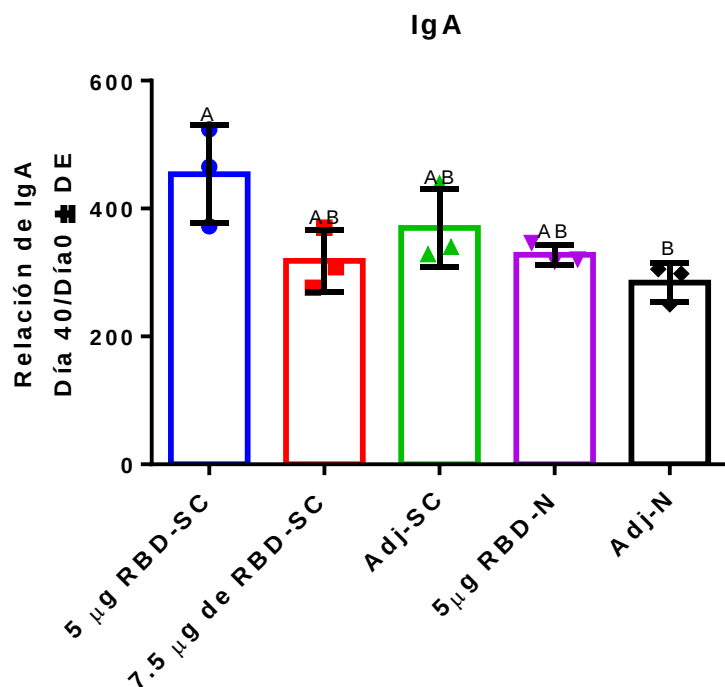


Figura 9. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posteriores a la 3ra. dosis. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.2.5 Cuantificación de anticuerpos IgE anti-RBD en suero de sangre periférica en la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

Se cuantificaron los anticuerpos IgE anti-RBD en los diferentes tratamientos de vías de inmunización. Esta inmunoglobulina nos da información relativa a la alergenidad de una proteína y es importante que no haya producción tras la inmunización. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (adyuvante) de la vía subcutánea, pero sí hubo un ligero aumento entre el grupo de 5 µg de RBD con suero de preinmunización, aunque los valores de las absorbancias son muy pequeños. Por otra parte, el tratamiento y el grupo

control de la vía intranasal presentaron diferencias significativas, pero no hubo diferencias del tratamiento con el preimmune, el cual es un suero antes de inmunizar para ver cuanta IgE hay (Figura 10). La comparación de los tratamientos con los grupos control y el preimmune nos indica que no hay un incremento significativo de IgE anti-RBD, lo cual es deseable.

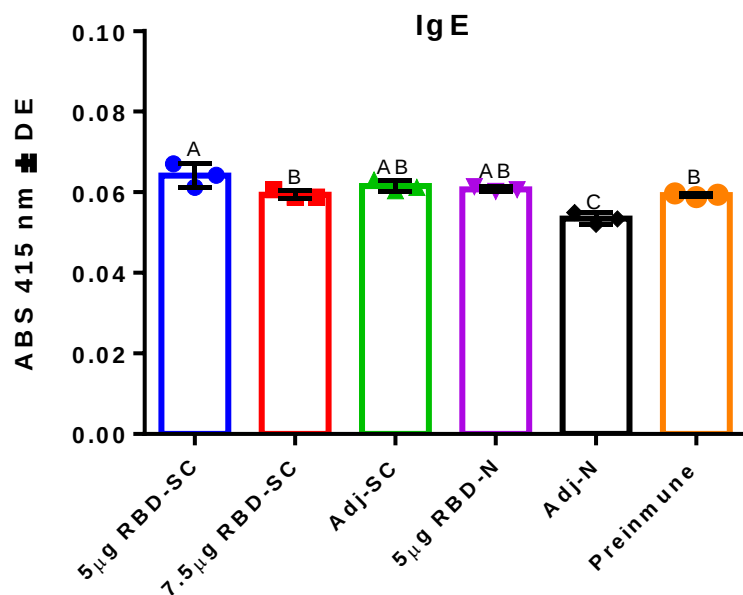


Figura 10. Cuantificación de anticuerpos IgE anti-RBD en ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posteriores a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea y solo 5 µg por la intranasal. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3 Cuantificación de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) en lavados pulmonares e intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal

La producción de anticuerpos en la vía de mucosas es de mucho interés debido a que son la primera línea de defensa contra patógenos intracelulares contra

enfermedades respiratorias, lo cual tiene mucha relevancia cuando se quiere generar una respuesta rápida y que no genere una reacción inflamatoria excesiva contra estos tipos de patógenos. Por lo anterior, se realizó la identificación de la respuesta inmune adaptativa a través de la cuantificación de diferentes anticuerpos en los lavados pulmonares e intestinales de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea e intranasal.

3.3.1 Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en lavados pulmonares de la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

Se realizó la cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavados pulmonares de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea e intranasal. Se observó que los valores obtenidos de IgM anti-RBD en ambas vías fueron muy bajos, inferiores a 1,000 unidades. Esto nos indica que la producción de IgM en pulmones es prácticamente nula (Figura 11).

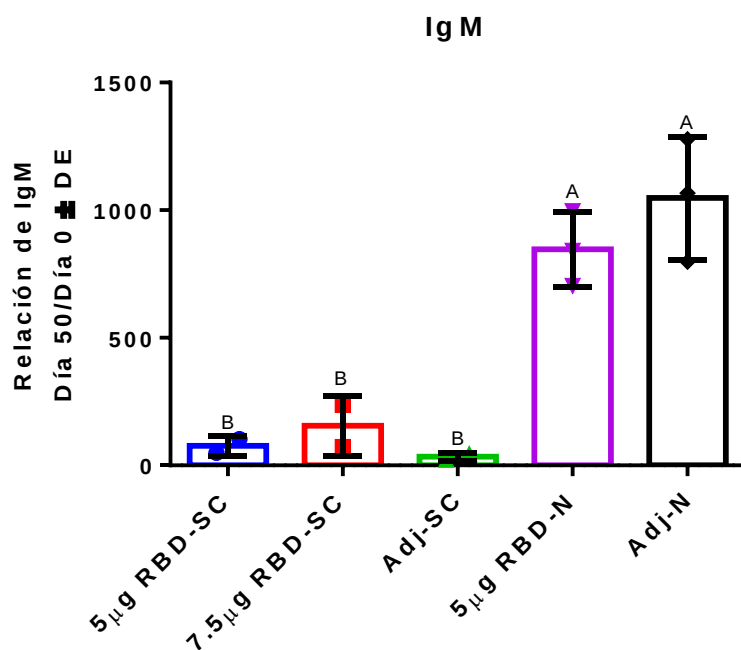


Figura 11. Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea y solo 5 µg por la intranasal. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3.2 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en lavados pulmonares de las vías de inmunización subcutánea e intranasal.

Se analizó la cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en muestras de lavados pulmonares de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea e intranasal.

Se observó que en ambos tratamientos de la vía subcutánea hubo una alta presencia de anticuerpos IgG anti-RBD, siendo el tratamiento de 7.5 µg de RBD el que generó mayor cantidad de estos anticuerpos con diferencia estadísticamente significativa (Figura 12). Por otro lado, la vía intranasal no mostró resultados positivos para este anticuerpo (datos no mostrados).

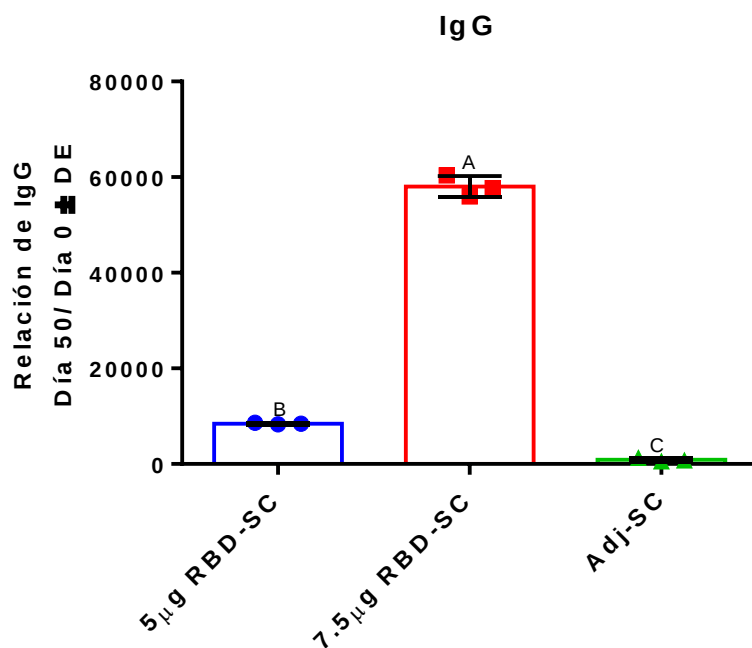


Figura 12. Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3.3 Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en lavados pulmonares de las vías de inmunización subcutánea e intranasal.

Se analizaron los anticuerpos IgA anti-RBD de muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c inmunizados por las vías subcutánea e intranasal. Se observó que en el tratamiento con 7.5 µg de RBD hubo mayor cantidad de IgA anti-RBD, sin embargo, debido a la desviación estándar, no hubo diferencia significativa con los demás tratamientos (Figura 13). Al igual que el análisis de IgG anti-RBD en muestras de lavado pulmonar, la vía intranasal no mostró presencia de anticuerpos (datos no mostrados).

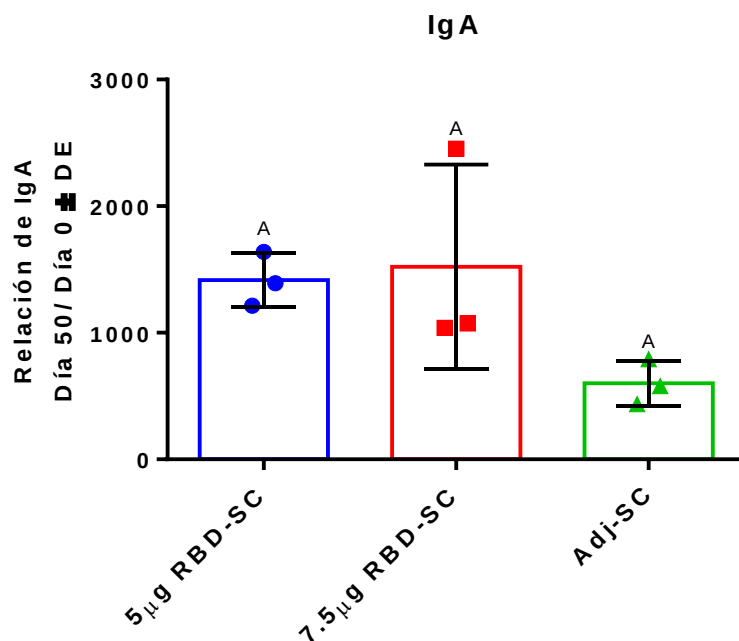


Figura 13. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en muestras de lavado pulmonar de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3.4 Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

En la cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavados intestinales de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea e intranasal, se observó que los valores obtenidos de IgM en ambas vías fueron inferiores a 1000. Esto nos indica que la producción de IgM anti-RBD en intestino tiene el mismo comportamiento encontrado en los lavados de pulmón, el cual es prácticamente nulo a pesar de observarse algunas diferencias entre vías de inmunización (Figura 14).

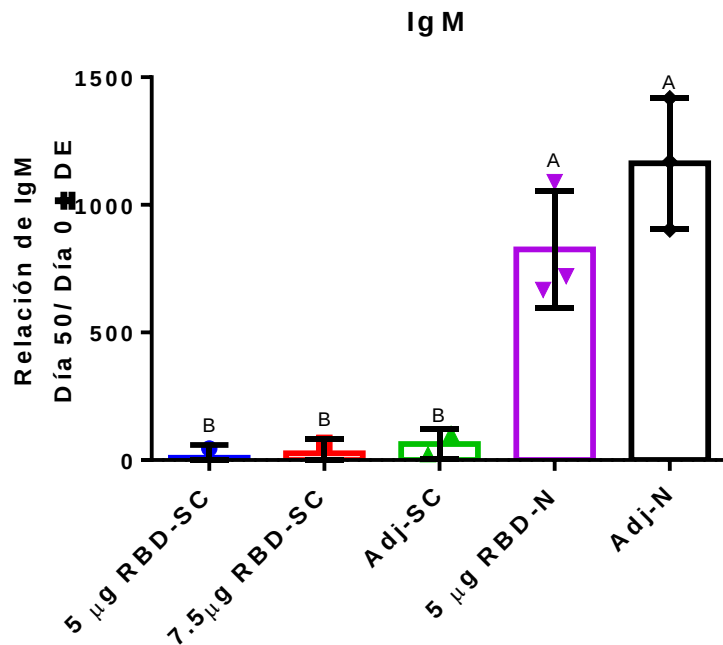


Figura 14. Cuantificación de anticuerpos IgM anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en las diferentes vías de inmunización posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea y solo 5 µg por la intranasal. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3.5 Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

Se analizó la cantidad de anticuerpos IgG anti-RBD en ambas vías de inmunización. El comportamiento de los resultados es muy similar al encontrado en el análisis de IgG anti-RBD en lavados pulmonares, en donde 7.5 µg de RBD de la vía subcutánea presentó la mayor cantidad de IgG anti-RBD superando las 20 mil unidades. Mientras que la vía nasal no presentó resultados positivos (datos no mostrados) (Figura 15).

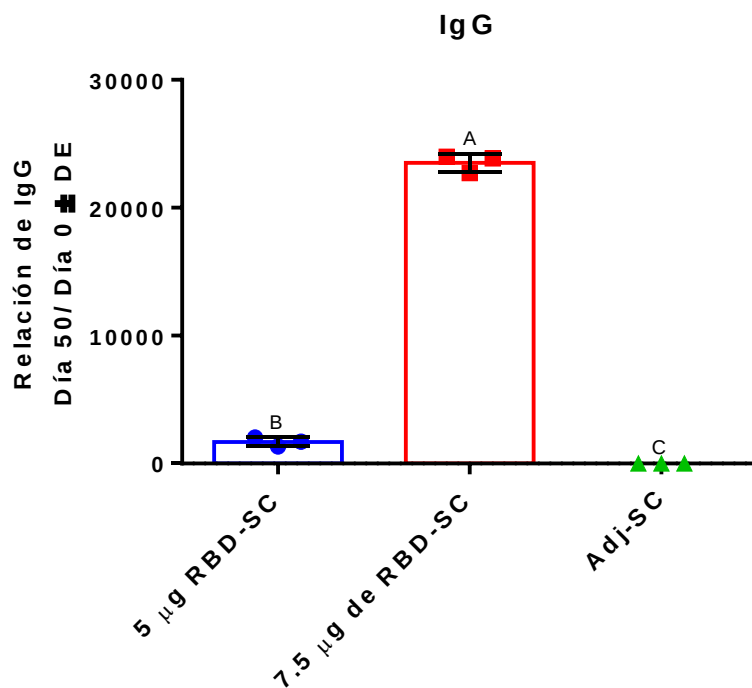


Figura 15. Cuantificación de anticuerpos IgG anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.3.6 Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en lavados intestinales de la vía de inmunización subcutánea e intranasal.

Se realizó la cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en los lavados intestinales de la vía subcutánea e intranasal. Se puede observar que la vía subcutánea presenta IgA anti-RBD en cantidades bajas y la vía intranasal no mostró señal de IgA anti-RBD (Figura 16). Estos resultados de IgA son similares al comportamiento obtenido en los lavados de pulmón (Figura 13).

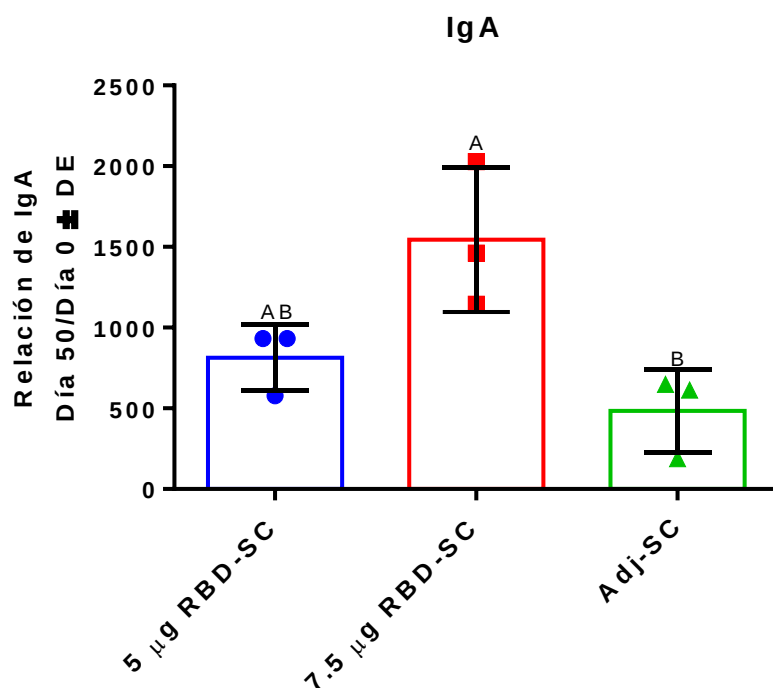


Figura 16. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-RBD en muestras de lavado intestinal de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión

ACE2-RBD de los diferentes tratamientos de RBD por la vía subcutánea, de compuestos y péptidos antivirales

El proceso de inhibición de la unión entre los receptores ACE2 de las células de mamíferos y el RBD del virus de SARS-CoV-2, lo realizan los anticuerpos neutralizantes generados por el mecanismo de defensa de inmunidad adaptativa, ya sea mediante la enfermedad de COVID-19 o la vacunación con RBD producida en algún sistema de expresión celular. No todos los anticuerpos generados en un proceso de infección o de vacunación son neutralizantes. Para demostrar el efecto neutralizante de un anticuerpo nosotros evaluamos la capacidad de unirse al RBD

e inhibir la unión con el receptor ACE2 humano a través un ensayo de interacción proteína-proteína conocido como ELISA subrogado para cuantificar el porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD. Además, se evaluaron el porcentaje de inhibición de diferentes compuestos y péptidos antivirales (sección 3.4.3 y 3.4.4).

3.4.1 Cuantificación de anticuerpos neutralizantes de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea en muestras de suero de sangre periférica

Un paso crítico de la infección del virus del SARS-CoV-2 se lleva a cabo en la internalización de su material genético en las células humanas, para que ocurra, se requiere la interacción del RBD de la proteína de SARS-CoV-2 en la superficie de la partícula viral y el receptor ACE2 en la superficie de las células humanas. Así, la identificación de pequeñas moléculas, anticuerpos (neutralizantes) u otras moléculas biológicas que interfieran en la formación del complejo ACE2-RBD podría ayudar a desarrollar fármacos para prevenir o tratar la COVID-19. Por lo antes mencionado, se realizó el ensayo de inhibición entre ACE2 y RBD. En este análisis se empleó un control negativo y positivo de la inhibición, un anticuerpo IgG RBD monoclonal comercial, y los sueros de los ratones al día 40 con 3 inmunizaciones de los tratamientos 5 µg de RBD y 7.5 µg de RBD de la vía subcutánea en las diluciones 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1,000 (Figura 17). Se obtuvo un porcentaje de inhibición del 80% en las muestras de suero de ambos tratamientos (5 y 7.5 µg de RBD) en la dilución 1:20 y 1:50, resultado similar y sin diferencias estadísticamente significativa al control positivo de la inhibición y al anticuerpo monoclonal anti-RBD de humano comercial. Por otra parte, se observa un comportamiento dosis respuesta en ambos tratamientos (5 y 7.5 µg de RBD)

porque a medida que se diluye el suero, baja el porcentaje de inhibición. Sin embargo, debido a que el control experimental también inhibe la unión entre ACE2-RBD en esta prueba a nivel de placa, probablemente provocado por alguna molécula del suero, se tomó la decisión de realizar la purificación de anticuerpos anti-RBD de las muestras de suero con Dynabeads y repetir el ensayo.

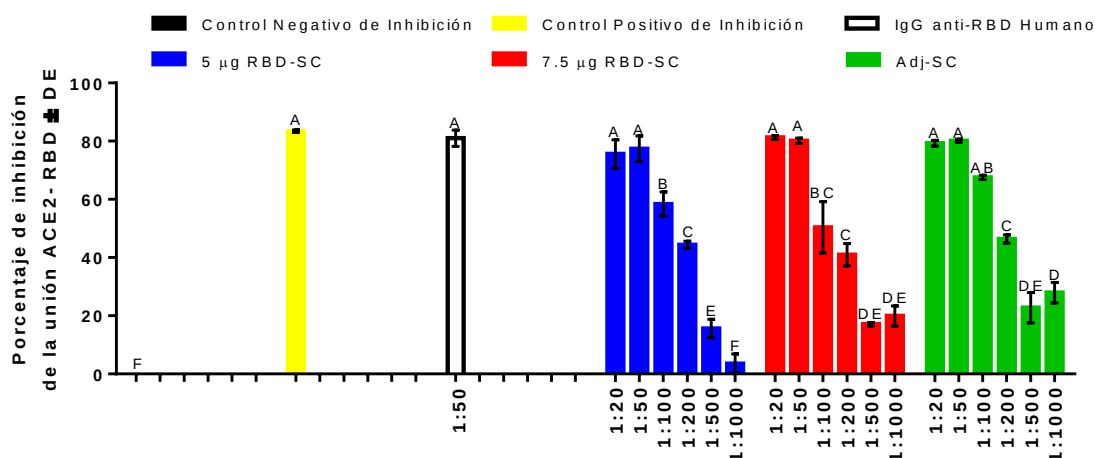


Figura 17. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD en muestras de suero de sangre periférica de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 µg de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.2 Cuantificación de anticuerpos neutralizantes de muestras de anticuerpos purificados obtenidos de suero de sangre periférica de los diferentes tratamientos de la vía subcutánea

Se realizó la cuantificación del porcentaje de inhibición de muestras de anticuerpos purificados obtenidos del suero de sangre periférica. Se evaluaron diferentes diluciones desde 1:10 a 1:5,000, siendo las diluciones 1:100 y 1:500 las que presentaron mayor inhibición para el tratamiento con 5 µg de RBD en la vía subcutánea, inhibiendo cerca del 20% de la unión entre ACE2-RBD (Figura 18).

Por otro lado, el tratamiento con 7.5 μ g de RBD de la misma vía de inmunización inhibió en un 5% la unión de ACE2-RBD. Además, el control experimental inmunizados con solo adyuvante no inhibió esa unión, lo cual es un resultado esperado y confirma la inhibición de manera específica por los anticuerpos anti-RBD generados de las inmunizaciones por RBD, siendo la de 7.5 μ g de RBD.

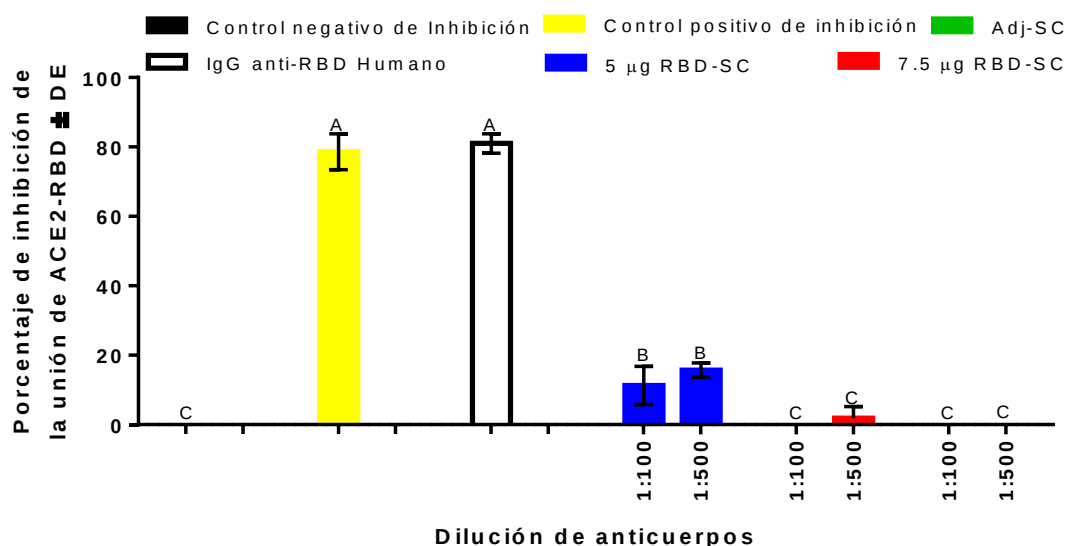


Figura 18. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de anticuerpos purificados de muestras de suero de sangre periférica de ratones BALB/c en la vía de inmunización subcutánea posterior a la 3ra. dosis. Se inmunizaron con 5 y 7.5 μ g de RBD y el adyuvante como control por la vía subcutánea. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.3 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por diferentes compuestos antivirales

Se realizó la cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD utilizando diferentes compuestos antivirales en diferentes concentraciones, dos de tipo alcaloide, uno de tipo flavonoide, uno de un derivado de paracetamol y uno de nanopartículas de plata.

3.4.3.1 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por compuestos de tipo alcaloide

Se realizó un ensayo del porcentaje de inhibición de diferentes compuestos antivirales. Se probaron compuestos de naturaleza alcaloide (donados por el Dr. Samuel Enoch de la UAEM) en concentraciones de 10 μ M, 1 μ M y 0.01 μ M (Figura 19). Ambos compuestos tuvieron un porcentaje de inhibición ligeramente mayor en la concentración de 10 μ M siendo del 8% para el alcaloide-1 y del 16% para el alcaloide-2, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas. El compuesto alcaloide-1 tiene una tendencia de un comportamiento dosis respuesta, mientras el compuesto alcaloide-2 no lo tiene, porque la dilución de 0.01 μ M inhibe más que la de 1 μ M, esto podría explicarse porque algunos compuestos en concentraciones más bajas pueden interactuar mejor debido a que el sistema no se encuentra saturado.

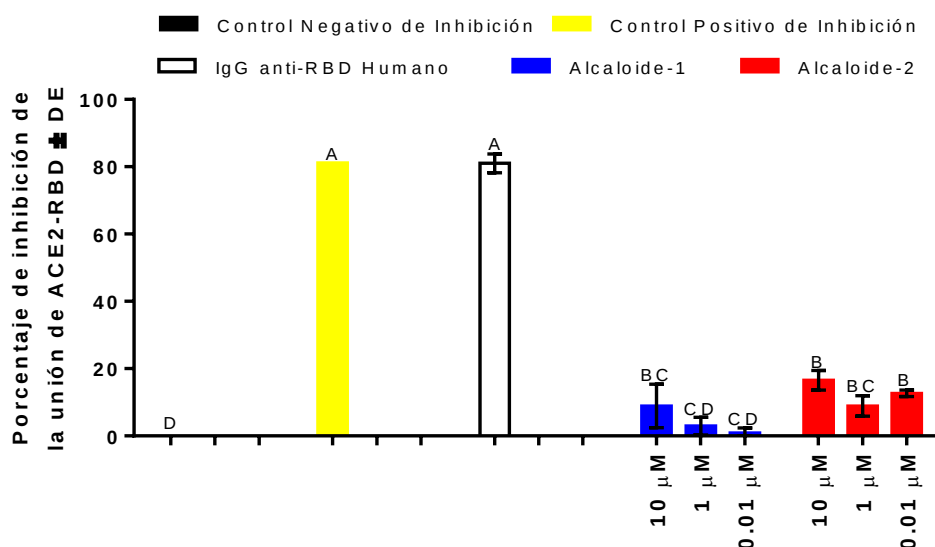


Figura 19. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de compuestos de tipo alcaloide. Se utilizaron concentraciones de 10, 1 y 0.1 μ M. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de dos vías con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.3.2 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por un compuesto de tipo flavonoide

Los compuestos de naturaleza flavonoide PhV-H₂O y PhV-AHA1 (donados por el Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda del IPICYT) presentaron diferencias entre sí. El compuesto PhV-H₂O no presentó inhibición de la unión RBD-ACE2. Por otro lado, el flavonoide PhV-AHA1 obtuvo un porcentaje de inhibición menor al 15%. La concentración 1 μ M fue la que inhibió más de las tres probadas (Figura 20). Además, no se observa un comportamiento dosis respuesta, por lo cual es muy poco probable que al aumentar o disminuir las concentraciones se obtengan mejores porcentajes de inhibición.

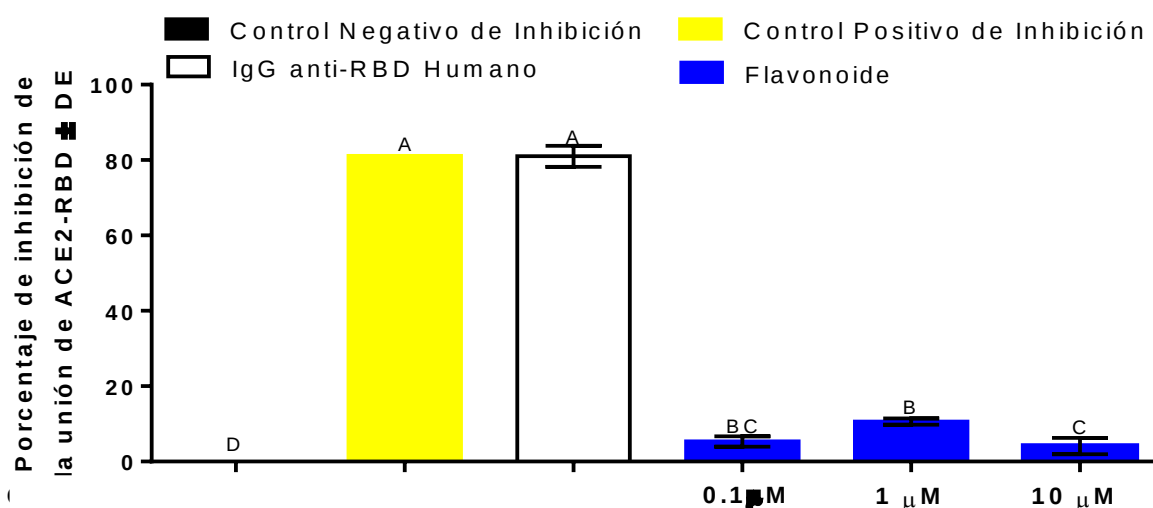


Figura 20. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de un compuesto de tipo flavonoide. Se utilizaron concentraciones de 10, 1 y 0.1 μ M. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.3.3 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por un compuesto derivado de paracetamol

El compuesto derivado del paracetamol (donado por el Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa del IPICYT) se probó a diferentes concentraciones en el ensayo de inhibición entre ACE2-RBD. La concentración 10 μ M y 50 μ M fueron las que

presentaron mayor porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD, siendo del 30 y 28%, respectivamente. En este caso, pareciera que hay dos tipos de comportamientos, de la concentración 0.1 μM a la 10 μM se comporta como dosis respuesta mientras que de 10 μM a 100 μM pareciera una sobresaturación del sistema debido a que el soluto ya no se puede disolver correctamente, lo cual baja el porcentaje de inhibición (Figura 21).

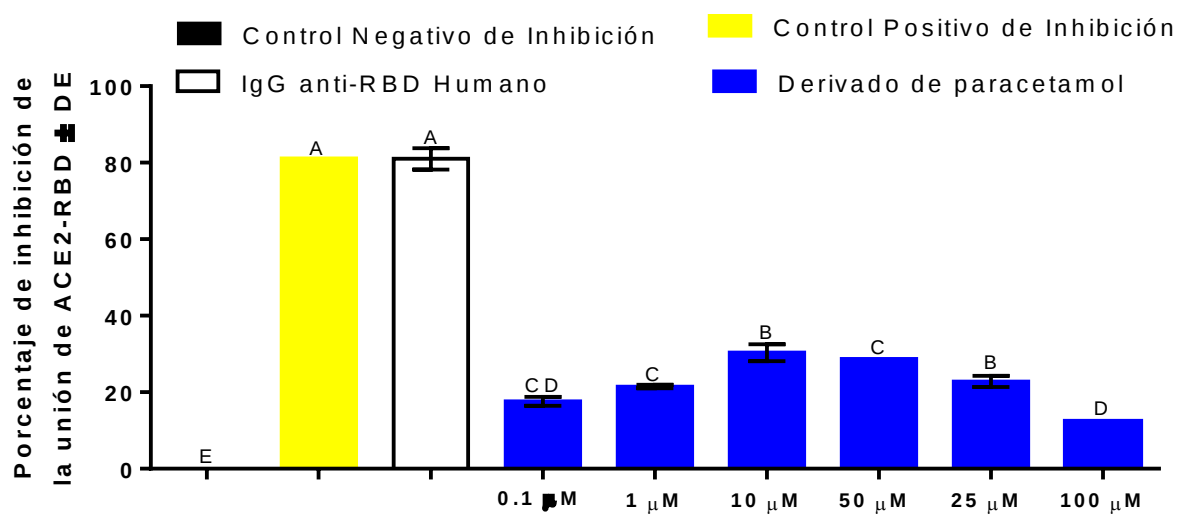


Figura 21. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de un compuesto derivado de paracetamol. Se utilizaron concentraciones de 0.1 a 100 μM . Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.3.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por nanopartículas de plata

El ensayo de porcentaje de inhibición entre ACE2-RBD con nanopartículas (donada por la MC Luz Valtierra de NanoBio and Tronics, S.A. de C.V.) generó una inhibición cercana al 20% utilizando 4 ppm de estas nanopartículas (Figura 22). Se puede notar una dosis respuesta, por lo cual es muy probable que si se aumenta la concentración de nanopartículas de plata aumentará el porcentaje de inhibición.

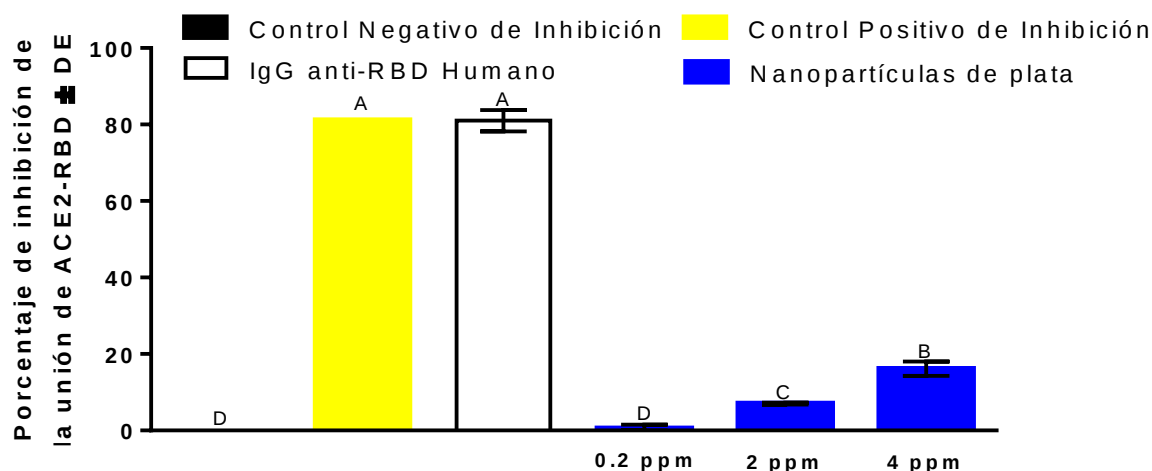


Figura 22. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD de nanopartículas de plata. Se utilizaron concentraciones de 0.2, 2 y 4 ppm. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por diferentes péptidos antivirales

Se realizó la cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD utilizando diferentes péptidos antivirales en diferentes concentraciones.

3.4.4.1 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por péptido nativo y 3

El péptido nativo (de una región del receptor ACE2) y 3 (con modificaciones) se analizaron en las concentraciones desde 2.5 a 50 μM , en donde se observa el mismo comportamiento para ambos, siendo la concentración de 10 μM la que tiene el mayor porcentaje de inhibición sobre la unión RBD-ACE2 con un 58.77% para el péptido nativo y un 54% para el péptido 3 (Figuras 23 y 24). Además, para el péptido nativo en la concentración de 5 μM presentó una inhibición muy cercana al 50%. Posterior a 10 μM empezó a descender el porcentaje de inhibición para

ambos péptidos, lo cual puede deberse a una aglomeración del péptido provocado por que llegó a su límite de solubilización.

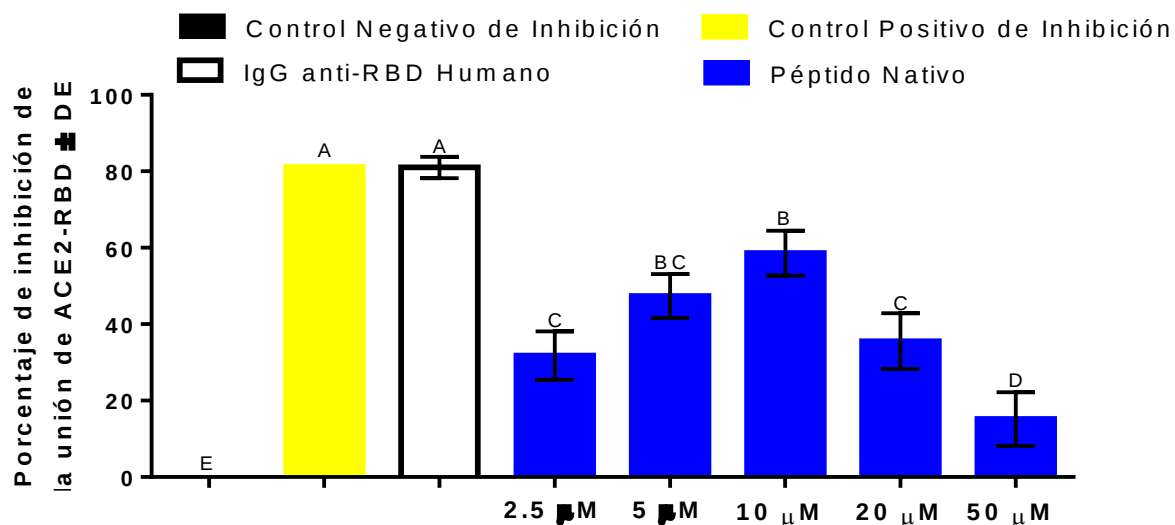


Figura 23. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido nativo. Se utilizaron concentraciones de 2.5 a 50 μM. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

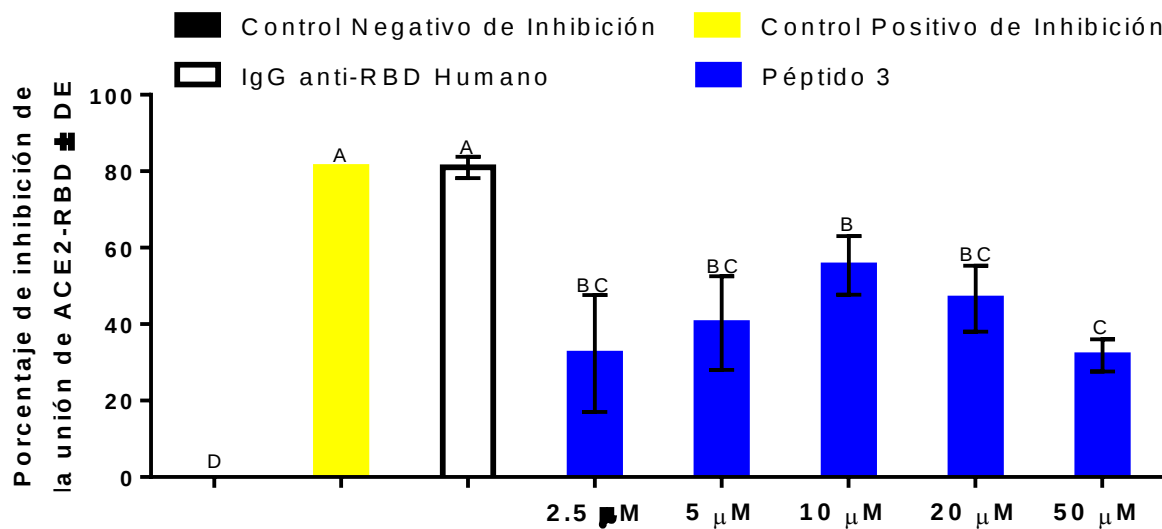


Figura 24. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 3. Se utilizaron concentraciones de 2.5 a 50 μM. Letras diferentes

muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.4.2 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por péptido 4

El péptido 4 tiene un porcentaje de inhibición de 56.8 % en la concentración de 200 μM , y cerca del 50% en las concentraciones de 50, 75 y 100 μM sin diferencia significativa. Por lo cual, la concentración de 50 μM es la mejor (Figura 25).

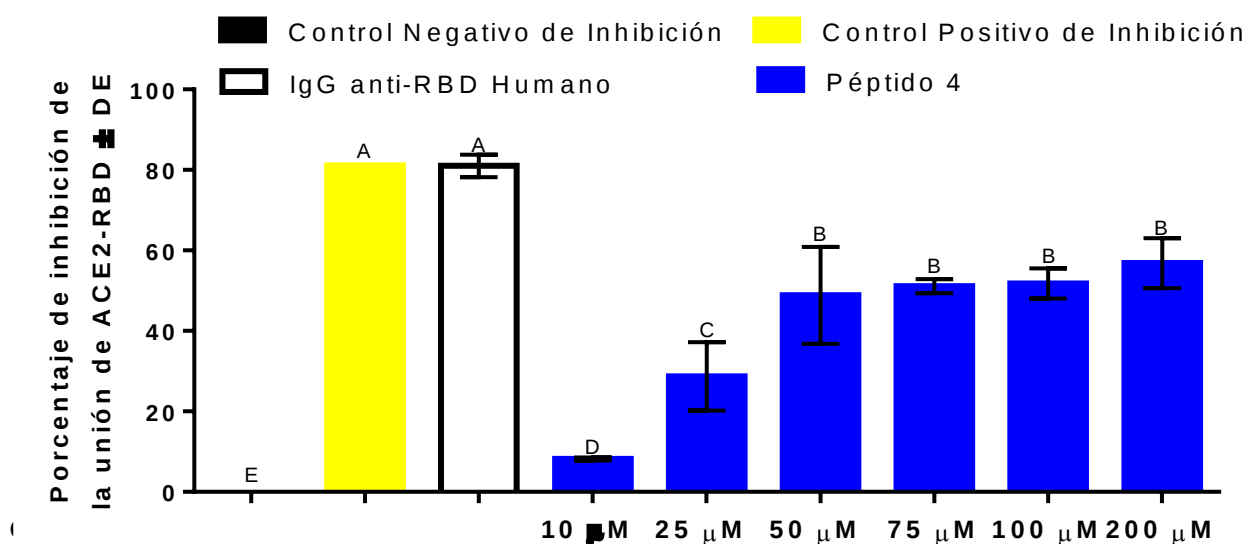


Figura 25. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 4. Se utilizaron concentraciones de 10 a 200 μM . Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

3.4.4.3 Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD por péptido nativo-XL y 1

El péptido Nativo XL mostró un porcentaje inhibitorio del 6.7% y 4.7% en las concentraciones de 50 μM y 0.01 μM (Figura 26). Mientras que el péptido 1 mostró un porcentaje inhibitorio del 12.93% y 9.34% en las concentraciones de 10 μM y 0.01 μM respectivamente (Figura 27).

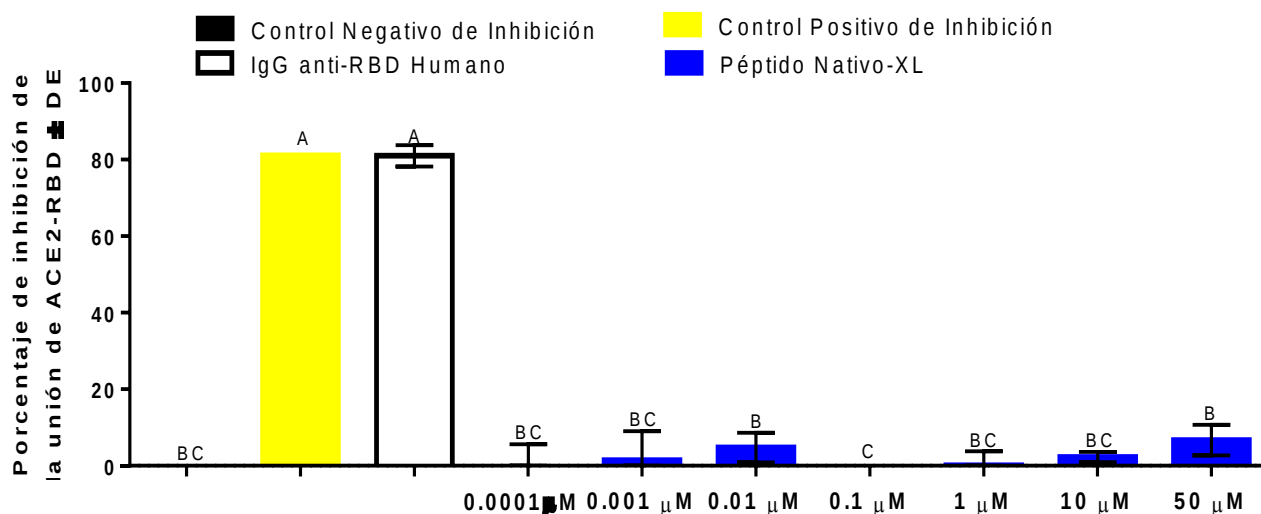


Figura 26. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido Nativo-XL. Se utilizaron concentraciones de 0.0001 a 50 μ M. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

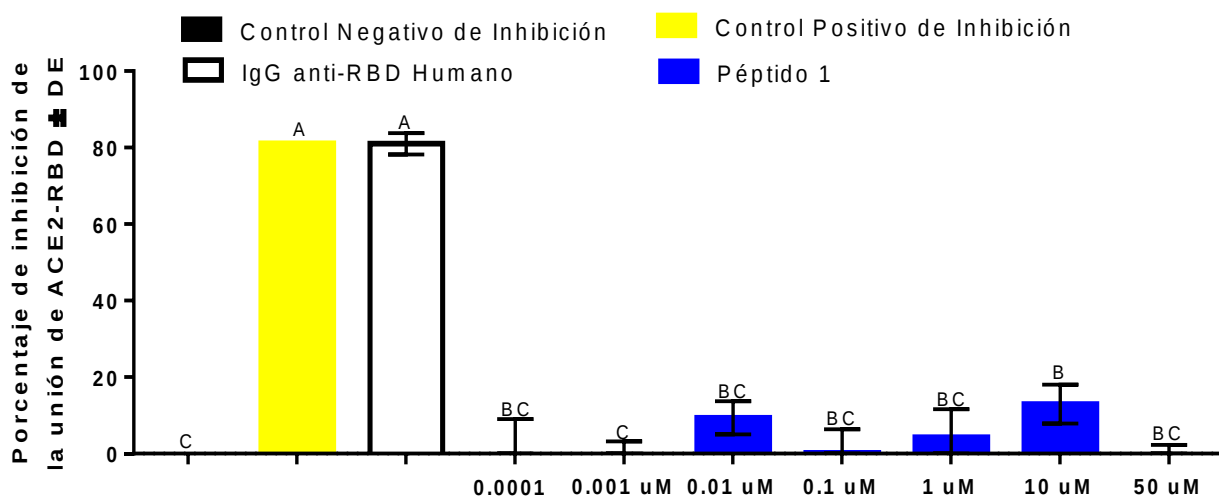


Figura 27. Cuantificación del porcentaje de inhibición de la unión ACE2-RBD del péptido 1. Se utilizaron concentraciones de 0.001 a 50 μ M. Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa. ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey con significancia del 95%.

4. DISCUSIÓN

4.1 Producción de la proteína RBD en *E. coli* y análisis de inmunogenicidad en ratones BALB/c

Las bacterias como plataformas de expresión de proteínas heterólogas tienen las ventajas de ser fáciles de usar, de bajo costo de producción, requieren tiempos cortos generación y son fácilmente escalable, siendo *E. coli* la bacteria más utilizada para la expresión de proteínas heterólogas (Chen et al., 2020).

La cepa de *E. coli* Rosetta generó un buen rendimiento, obteniéndose 6 mg/L de la proteína RBD, por cultivo en frasco. Nuestro protocolo para la producción de RBD en un sistema procariota de manera inducida con IPTG, da un rendimiento un poco menor que el obtenido por He y colaboradores en 2022, en donde el rendimiento de la proteína RBD fue de 13.3 mg/L, además, en ese mismo estudio se realizó la comparación del rendimiento de la proteína RBD obtenido en células HEK293 (células embrionarias de riñón humano) en donde obtuvieron un rendimiento de 5 mg/L de la proteína RBD, siendo menor al obtenido en el presente trabajo (De March et al., 2022).

El proceso de purificación de RBD con un protocolo desnaturizante y con el uso de resina de níquel permitió obtener fracciones puras de RBD. Una diálisis rápida utilizando concentradores nos permitió diluir a nuestra proteína recombinante en un buffer de fosfato, el cual es inocuo para realizar los ensayos de inmunización. Dicha calidad fue demostrada mediante SDS-PAGE y Western Blot, mientras que las pruebas de ELISA confirmaron su funcionalidad.

La inmunización de la proteína RBD por el esquema de aplicación subcutánea generó anticuerpos anti-RBD como IgM, IgG y sus isotipos IgG1 e IgG2a, tanto en el grupo inmunizado con 5 µg como el de 7.5 µg, siendo más abundante la producción de anticuerpos en el tratamiento con mayor cantidad de proteína RBD, además que se obtuvo el título más alto. Por otro lado, Du et al. (2021) probaron una vacuna de subunidad de RBD usando como adyuvante aluminio en diferentes vías de inmunización, y ellos obtuvieron el mejor resultado hasta el segundo refuerzo, obteniendo títulos de 1:32,000 (log 2: 15) de anticuerpos IgG anti-RBD, siendo similar a nuestros resultados en donde obtuvimos un título máximo de 1:64,000 (log 2: 15.97) para ambos tratamientos después del segundo refuerzo.

Las vacunas administradas por vía intramuscular y subcutánea provocan respuestas inmunitarias sistémicas. Entre las vías de mucosas, las vacunas orales y nasales son menos complicadas de administración desde el punto de vista logístico, ya que evitan la necesidad de agujas y ofrecen la oportunidad de autoadministración. Estos aspectos podrían contribuir a mejorar el éxito de la vacunación masiva, especialmente durante las pandemias (Pitcovzki, et al., 2022). En el presente trabajo, la vía intranasal no mostró inducción de la respuesta humoral mediada por anticuerpos, ya que los ratones no produjeron anticuerpos contra RBD. Esto puede deberse a que se requiere una mayor cantidad de proteína para estimular el tejido linfoide asociado al árbol bronquial BALT, pues en ese tejido es donde se encuentra la maquinaria para captar y procesar los antígenos. Otro fenómeno que puede ocurrir es que la cantidad de antígeno que se inmunizó fuese degradada por las proteasas presentes en las secreciones de la

mucosa nasal. Esta situación se puede mejorar al buscar algún adyuvante que sea capaz de proteger al antígeno contra la degradación de las proteasas.

La producción de anticuerpos en las mucosas de pulmón e intestino son de vital importancia para la neutralización del virus SARS-CoV2, debido a que utiliza ambas mucosas como vía de acceso al huésped. Además, las mucosas son la primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos infecciosos. La vía subcutánea presentó una cantidad considerable de anticuerpos IgG anti-RBD en pulmón e intestino, obteniéndose un título de 1:5,000 ($\log_2$: 12.28) comparado con Du et al. (2021) quienes obtuvieron un título en pulmón e intestino de 1:128 ($\log_2$: 7) y 1:64 ($\log_2$: 8), respectivamente. Esto es importante porque quiere decir que hay una primera línea de defensa en estos tejidos contra el antígeno RBD. Por otra parte, se encontró una producción de IgA anti-RBD en ambos tejidos, aunque en menor cantidad. Además, la producción de IgM también fue baja, esto puede deberse a que las muestras de los lavados pulmonares e intestinales fueron tomadas en el día 50 posterior a la primera inmunización con RBD y los anticuerpos IgM son los primeros en producirse, por lo que para el tiempo analizado ya estaban disminuyendo lo cual se puede observar en la figura 6, en donde los IgM en sangre periférica ya empiezan a descender.

Las citocinas secretadas por las células Th1 median el cambio de isotipo a IgG2a, mientras que las citocinas secretadas por las células Th2 median el cambio de isotipo a IgG1. La proporción de IgG1 e IgG2a representa el equilibrio entre la inmunidad celular (Th1) y la inmunidad humoral (Th2). Por lo tanto, analizamos las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en el suero de los ratones inmunizados. En nuestro trabajo, después de la última inmunización en la vía subcutánea, se

observó una mayor producción de IgG1 que de IgG2a, lo que indica una respuesta sesgada a Th2. Nuestros resultados se asemejan a lo obtenido por Du et al. (2021) en donde inmunizaron RBD con adyuvante de aluminio por diferentes rutas de inmunización. En las rutas intradérmica e intramuscular obtuvieron una mayor cantidad de IgG1 lo cual genera una respuesta sesgada a Th2. Sin embargo, mediante la ruta intranasal obtuvieron una respuesta mixta Th1 y Th2 en comparación con las otras dos rutas, por lo que modificando nuestra manera de inmunizar intranasalmente (por ejemplo, usando compuestos que eviten la degradación del antígeno), podríamos obtener un mejor balance o usando regiones de secuencias que han reportado un mejor balance

El prototipo de vacuna que se emplea puede activar tanto la ruta de inmunidad innata como la adaptativa, debido a que para poder producir anticuerpos se requiere de las células de la ruta innata. La principal función de los anticuerpos es poder neutralizar la entrada del virus a la célula, a través de inhibir la unión entre ACE2-RBD.

El porcentaje de inhibición de los sueros de ambos tratamientos en la vía subcutánea fue alto, obteniendo una inhibición del 80% de la unión ACE2-RBD, sin embargo, aunque este resultado fue similar estadísticamente con el control positivo de la inhibición del kit y con el anticuerpo monoclonal anti-RBD, no tuvo diferencia respecto al uso del adyuvante, indicando de la presencia de algún contaminante en el suero que pudiera ser responsable de la inhibición, por lo que nos dimos a la tarea de purificar el anticuerpo producido y el suero inmunizado con el adyuvante. El ensayo de inhibición de la unión ACE2-RBD con los anticuerpos purificados fue del 20%, pero el suero del adyuvante purificado ya no inhibió la

unión RBD-ACE2, esta diferencia respecto al suero sin purificar se puede deber a que hay menos concentración y menor diversidad de anticuerpos en comparación con el suero. Estos resultados de inhibición son prometedores, ya que puede reducir el acceso del virus a las células del epitelio respiratorio y digestivo. Se propone en trabajos futuros probar la capacidad que tiene el virus en bloquear el acceso del virus de SARS-CoV2 con las líneas celulares de mamíferos y evitar la formación de placas líticas. Además, consideramos que la sinergia entre los anticuerpos neutralizantes producidos en sangre periférica y los demás anticuerpos anti-RBD, pulmón e intestinos realizarán un mecanismo de defensa inmunológico completo contra el virus de SARS-CoV-2 en un modelo de reto viral en murinos.

4.2 Evaluación de compuestos putativamente antivirales

La interacción entre la región RBD de la proteína Spike y el receptor ACE2 de humanos está mediada por interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforma en sitio de interacción. Los 5 residuos principales que contribuyen significativamente a la unión entre ACE2 y la proteína Spike nativa incluyen Tyr41, Gln42, Thr27, Gln24 y Lys353 de ACE2 y Gln498, Gln493, Tyr505, Lys417 y Phe486 (Gurung et al., 2022).

Se ha visto que diferentes moléculas presentan actividad antiviral contra coronavirus, los cuales fungen como blanco terapéutico contra la enfermedad de COVID-19. Por ejemplo, Fielding et al. (2020) examinaron los diversos alcaloides que mostraron actividad anticoronavírica *in vitro* e *in vivo*, con énfasis en la actividad anticoronavírica humana, a través de un análisis *in silico* en donde

observaron la afinidad de diferentes alcaloides para unirse a RBD de la proteína Spike del SARS-CoV-2.

Los compuestos fenólicos han presentado actividad inhibitoria contra la unión RBD- hACE2, a través de un ensayo de ELISA subrogado y un ensayo de pseudovirus SARS-CoV-2 unido a hACE2. Las diferentes moléculas presentaron un comportamiento dosis respuesta en donde inhiben hasta un 80% la unión RBD- hACE2 (Goc et al., 2021). Comparado con nuestros resultados, obtuvimos un porcentaje inhibitorio de la unión RBD-ACE2 más bajo, siendo menor al 20%. Adicionalmente nuestro grupo de investigación analizó por el servidor de Autodock Vina 1.1.2 que los compuestos de naturaleza alcaloide (1 y 2) y flavonoide (PhV-H₂O y PhV-AHA1) tienen los mejores scores. El acoplamiento molecular nos indicó que estas cuatro moléculas eran capaces de unirse al RBD de la proteína Spike y de esta manera interferir con la unión de hACE2 (Datos no mostrados por proceso de patente). Dichos compuestos en el ensayo de interacción proteína-proteína nos demostraron que inhibiendo hasta un 20% la unión de RBD-ACE2.

En estudios previos se ha visto que el compuesto derivado de paracetamol ha servido como blanco terapéutico para diabetes tipo 2. Tomando como antecedente la estructura molecular del derivado del paracetamol, el cual es muy similar con el ácido fenofíbrico, (Hidalgo-Figueroa, comunicación personal, Mayo del 2021) dedujo que podría tener una actividad inhibitoria de la unión de RBD con ACE2. Davies et al., (2021) determinaron que el ácido fenofíbrico tiene la capacidad de desestabilizar el RBD de la proteína spike, y con ello evitar el acceso del virus a la célula. Dicha molécula inhibió hasta un 70 % la infección viral en células Vero. En el presente estudio presentamos este compuesto contra COVID-19, en donde se

obtuvo un porcentaje inhibitorio del 30% sobre la unión RBD-ACE2 con la concentración 10 μ M, la cual es una concentración farmacológicamente baja. El derivado de paracetamol es un compuesto prometedor porque inhibe el 30% de la unión a una concentración baja y sería usado como agente protector con personas que ya están enfermas de COVID-19 con la finalidad de inhibir la unión ACE2-RBD y con eso disminuir los síntomas de la enfermedad.

En un estudio *in vitro* reciente, usando nanopartículas de plata (NPs) en células Vero infectadas con SARS-CoV-2, se observó una inhibición completa de la replicación viral, utilizando NPs de 10 nm, dicho tamaño de partícula no es citotóxica para la línea celular de mamífero (Jeremiah et al., 2020). Las nanopartículas de plata tienen como objetivo desestabilizar las cisteínas presentes en las partículas virales, en nuestro ensayo *in vitro* demostraron tener un efecto protector de cerca de 20% de inhibición de la unión, en una concentración de 4 ppm. Como observamos en la gráfica 21 presentada en resultados hay un efecto dosis dependiente, así que podemos inferir que a concentraciones más altas se pueden alcanzar un mejor efecto inhibitorio.

4.3 Inhibición de la interacción RBD- ACE2 de los péptidos antivirales

Idealmente los péptidos tienen un efecto inhibitorio al unirse a la RBD de la Spike de la misma o mejor manera que lo realiza ACE2. Por ejemplo, Han et al. (2006), examinaron la actividad anti-SARS CoV1 de 6 péptidos sintetizados químicamente derivados de ACE2. El péptido con mayor actividad antiviral fue el P6, que se compone de dos fragmentos discontinuos 22-44 y 351-357 conectados por glicina.

El péptido P6 es sólo ocho aminoácidos más largo que el P4. Sin embargo, fue 500 veces más eficaz. En cambio, el péptido P5, que es 13 aminoácidos más largo que el P4, sólo fue 8 veces más eficaz. Esto podría deberse a que hay más residuos en P6 interactuando con RBD de la Spike.

En el presente estudio, los péptidos más prometedores fueron el péptido nativo, el 3 y el 4 porque inhiben más del 50% de la unión ACE2-RBD utilizando concentraciones de 10 μ M para los primeros dos péptidos y de 50 μ M para el último. Estos valores nos indican que los péptidos pueden ser usados como tratamientos profilácticos en persona en riesgo alto o inmunocomprometidos, o ante un posible brote, ya que han péptidos similares han demostrado por los ensayos *in vitro* que pueden inhibir la interacción del virus con su receptor celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Proteína antigénica

A continuación, en este apartado se describe la metodología empleada para la clonación y expresión del gen de RBD en el sistema de expresión de *E. coli* Rosetta, en donde se obtuvieron la concentración y pureza necesarias de la proteína RBD para el ensayo de inmunización de ratones BALB/c.

5.1.1 Clonación del gen de RBD mediante recombinación GATEWAY

El gen del RBD se amplificó de ADN complementario del genoma de SARS-CoV-2 adquirido de muestras de saliva de pacientes positivos a COVID-19 (donadas por LANBAMA) Los oligonucleótidos fueron diseñados por la Dra. María Jazmín Abraham. Posteriormente, se insertó el gen RBD en el vector P-ENTR/D-TOPO. Una vez obtenida la fusión del gen RBD con el vector de entrada, se realizó la recombinación hacia el vector de expresión (p-Dest-17) mediante el sistema GATEWAY. Finalmente, se transformó *E. coli* Rosetta mediante choque térmico utilizando el vector p-Dest-17 fusionado con el gen de RBD. Se corroboró que *E. coli* Rosetta tuviera el inserto de RBD mediante la extracción de DNA plasmídico con el kit de Monarch Bio Labs, Frankfurt, Germany. Posteriormente, se digirió con *Bsr*GI de BioLabs, Waltham, MA, USA a 37°C por 1 h y se inactivó la enzima a 80°C y los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio 1% para su visualización.

5.1.2 Expresión y purificación de la proteína RBD

En 100 mL de medio LB modificado de Lennox con kanamicina (100 mg/ mL) se inoculó *E. coli* Rosetta que contenía el vector RBD-p-Dest-17. Este cultivo bacteriano se dejó crecer toda la noche a 37°C a 180 rpm. Al siguiente día, en matraces de 1L con 25 al 30% de su capacidad de medio LB suplementado con kanamicina, se inocularon 1:10 del preinóculo y se dejó crecer en las mismas condiciones del paso anterior hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 0.8. Por último, se realizó la inducción de la proteína RBD con IPTG al 1mM, se incubó a 21°C por doce horas a 120 rpm.

Mediante centrifugación se recolectó la biomasa bacteriana y se resuspendió en buffer de lisis (NaH_2PO_4 0.1M + Tris base 100 mM + hidrocloreuro de guanidina 6M, pH=8.0 ajustado con NaOH). Se realizó la ruptura celular mediante sonicación (al 50% de amplitud en 20 pulsos de 10 s ON y 50 s OFF), utilizando el equipo procesador ultrasónico de Sonics & Materials, Madrid, España. Una vez terminada la lisis celular, se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se purificó la proteína RBD con la resina Ni^{++} beads ProBond™ de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.1.3 Cuantificación y verificación de la calidad de la proteína RBD

La concentración de proteína en cada una de las fracciones de purificación se determinó a través del método de Bradford, usando como controles una curva estándar de albúmina de suero bovino de Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania (0 a 250 $\mu\text{g/mL}$).

La verificación de la calidad de la proteína RBD purificada se obtuvo por análisis de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida, dicho gel se tiñó con azul de Coomassie. Adicionalmente estas fracciones fueron analizadas por Western blot, para ello se utilizó 1 µg de proteína por SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de Thermo Fisher Scientific, Madrid, España, la cual se bloqueó con leche descremada al 6%, se incubó con un anticuerpo anti-histidina a una dilución 1:3,000 en TBS (buffer de tris salino) con 1% de leche; se utilizó un anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina como secundario en una dilución 1:3,000 en TBS con 1% de leche. Para el revelado se utilizó el sustrato NBT/BCIP substrate solution Thermo Scientific, Madrid, España.

5.2 Ensayo de inmunización en ratones BALB/c con la proteína

RBD

Las ratonas de 6 semanas de edad de las cepas BALB/c (con un peso promedio de 19.5 g) fueron utilizadas para el experimento de inmunización. Los animales se adquirieron del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos y se mantuvieron en el equipo de contención tipo Allentown con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se acondicionaron en jaulas, con camas de olote, agua comercial Electropura y alimento comercial para múridos, todo esterilizado por calor previamente a su utilización. Se mantuvo una temperatura de 18-25°C y humedad de 20-70%. El ciclo de luz-obscuridad fue de 12 h por 12 h. La alimentación y el cuidado general de los animales se llevó a cabo por personal capacitado. Los protocolos fueron aprobados por la Comisión de Bioética y Manejo de Animales del Instituto registrado bajo el número de autorización 8.

5.2.1 Inmunización vía subcutánea.

Los ratones de experimentación se distribuyeron en 3 grupos por estratificación de peso (Tabla 1) y fueron inmunizados vía subcutánea. El esquema de inmunización (Fig. 28) muestra los días de administración y los puntos de toma de muestra. Se consideraron 3 administraciones en un intervalo de 15 días para cada uno de los tratamientos. El monitoreo de la producción de anticuerpos se realizó a la semana de cada inmunización por recolección de sangre periférica obtenida de la vena maxilofacial. El suero obtenido de la centrifugación de las sangrías de prueba se analizó mediante ELISA indirecto (fijando el antígeno RBD a la placa).

En los días de sacrificio se les aplicó una dosis de ketamina-hilacina al 1mg/mL vía intraperitoneal y posteriormente se tomó una colecta de cosecha de 800 µL de sangre de la vena maxilofacial por ratón. Una vez que los animales estuvieron sin signos vitales se realizó un lavado traqueo-pulmonar con 1 mL de PBS frío y se guardó en un tubo Eppendorf. Posteriormente se realizó una cirugía por debajo de la caja torácica y se extrajo el intestino delgado y el grueso para posteriormente realizarle un lavado con 2 mL de PBS frío.

Las muestras de sangre se homogenizaron en microtainers de Becton, Dickinson and Company, USA, y se dejaron reposar por 30-60 min a temperatura ambiente. Las muestras de sangre como los fluidos obtenidos de los lavados traqueo-pulmonares e intestinales se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15-20 min y se recolectaron los sueros haciendo alícuotas de entre 25-50 µL cada una. Se identificaron adecuadamente las muestras y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los niveles de inmunoglobulinas se evaluaron en suero, mediante un ELISA indirecta.

Tabla 1. Distribución de grupos para inmunización vía subcutánea.

Grupo	n	Tratamiento	Vía	Dosis / ratón	Volumen de la dosis	Volumen de Adyuvante
1	5	RBD 5 µg + TiterMax	sc sc sc	1ª inmunización 2ª inmunización 3ª inmunización	25 µL	25 µL
2	5	RBD 7.5 µg + TiterMax	sc sc sc	1ª inmunización 2ª inmunización 3ª inmunización	25µL	25µL
3	5	TiterMax + PBS	sc sc sc	1ª inmunización 2ª inmunización 3ª inmunización	25µL	25µL

Vía subcutánea (Sc), Adyuvante (TiterMax).

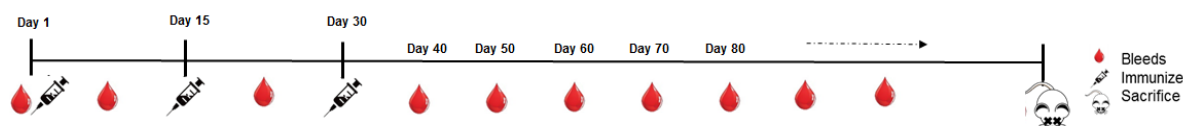


Figura 28. Estrategia del esquema de inmunización vía subcutánea.

5.2.2 Inmunización de vía intranasal

Los ratones de experimentación se distribuyeron en 2 grupos por estratificación de peso (Tabla 2) y fueron inmunizados vía intranasal utilizando la protoxina Cry1a como adyuvante y 5 µg de la proteína antigénica. El esquema de inmunización muestra los días de administración y los puntos de toma de muestra para el monitoreo de anticuerpos (Fig. 29). Se consideraron 3 administraciones en un

intervalo de 15 días para cada uno de los tratamientos. El monitoreo de la producción de anticuerpos se realizó a la semana de cada inmunización y los niveles de inmunoglobulinas producidas se evaluaron por ELISA indirecto.

Para llevar a cabo la inmunización por ratón, se mezclaron 5 µg de RBD diluido en PBS con 10 µg de Cry1a. A cada animal se le colocó una gota de 10 µL de la solución. Se observó que se adsorbiera la gota depositada en la nariz.

Tabla 2. Distribución de grupos para inmunización vía intranasal

Grupo	n	Tratamiento	Vía	Dosis / ratón	Volumen de la dosis	Volumen de Adyuvante
1	5	RBD 5 µg + Cry1a 10 µg	intranasal	1ª inmunización 2ª inmunización 3ª inmunización	5 µL	5 µL
2	5	Cry1a 10 µg + PBS	intranasal	1ª inmunización 2ª inmunización 3ª inmunización	5 µL	5 µL

Adyuvante de mucosa (Cry1a).



Figura 29. Estrategia del esquema de inmunización vía intranasal.

5.3 Cuantificación de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a, IgM, IgA e IgE) en suero de sangre periférica y en lavados pulmonares e intestinales

5.3.1 Ensayo ELISA para determinación de IgG, IgG1, IgG2a, IgA, IgE e IgM

Una placa de poliestileno de 96 pozos con carga se sensibilizó con 100 ng de la proteína RBD producida en *E. coli* Rosetta para IgG, IgG1, IgG2a, IgA e IgE y 200 ng para IgM. Para ello, se hizo una solución de buffer de carbonatos (NaHCO_3 0.1M, Na_2CO_3 33.6 mM, pH 9.5) y se agregó la proteína RBD. Se colocaron 100 μL de la mezcla por pozo (todo por triplicado) y se dejó incubando 12 h a una temperatura de 4°C, se cubrió con papel aluminio.

Al siguiente día, se realizaron 3 lavados de la placa con TBS 1X + Tween 20 (0.05%) después del tiempo de incubación. Posteriormente se bloqueó con leche al 6% durante 1 h a TA, con una agitación de 30 rpm. Una vez terminada la incubación, se lavaron 3 veces los pozos de la placa con TBS 1X + Tween (0.05%). Posteriormente, se adicionan las diluciones del suero o de los lavados pulmonares e intestinales del ratón a conveniencia disueltos en TBS 1X + Tween (0.05%) con leche al 1% (muestras que contienen anticuerpo primario). Se deja incubando la placa cubierta con papel aluminio por 2 h a TA para IgG, IgG1, IgG2a, IgA e IgE y por 12 h a 4°C para IgM, con una agitación de 30 rpm. Finalizado el tiempo, se realizaron 3 lavados de los pozos de la placa con TBS 1X + Tween (0.05%). Se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón en las siguientes diluciones: IgG, IgG1 e IgG2a en 1:5,000, IgA e IgE 1:2,500 e IgM 1:1,000, disueltos en TBS 1X + Tween (0.05%) con leche al 1%. Se deja incubando 1 h a

TA para IgG, IgA e IgE y 2 h para IgM, con una agitación de 30 rpm. Se lava 3 veces con TBS 1X + Tween (0.05%). Finalmente, se adicionan 100 µL de buffer de sustrato preparado (0.01g de P-Nitrofenilfosfato disuelto en buffer de fosfatasa alcalina el cual contiene dietanolamina 1M y MgCl₂ 0.5 mM disuelto en buffer TBS a un pH de 9.8). Se cubrió de la luz y se leyó a una densidad óptica de 415 nm, de 30 a 60 min posterior a la aplicación del sustrato.

5.4 Cuantificación del porcentaje de inhibición de anticuerpos neutralizantes en suero de sangre periférica, en anticuerpos purificados del suero de diferentes compuestos y péptidos antivirales

El kit RayBio® COVID-19 Spike-ACE2 binding assay nos permite analizar la interacción entre la proteína RBD y ACE2 a través de un ELISA subrogado, por lo tanto, permite evaluar la capacidad inhibitoria de moléculas pequeñas, péptidos y anticuerpos dirigidos contra la región de RBD. El kit RayBio® COVID-19 Spike-ACE2 binding assay utiliza una placa de 96 pocillos recubierta con S-RBD expresada recombinantemente.

5.4.1 Determinación de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero de sangre periférica

El suero de cada grupo experimental de ratones inmunizados se analizó desde diluciones 1:20 hasta 1:1,000 en buffer PBS. Para analizar el porcentaje de inhibición de los sueros se realizó dichas diluciones se adicionaron a los pozos de la placa, recubiertos con RBD, y se dejó interaccionar por 90 min. Posteriormente,

se realizó un lavado con wash buffer y se añadió ACE2 a una concentración estándar del kit y se incubó por 90 min. Después, se realizaron 3 lavados para eliminar la ACE2 no unida y se añadió un anticuerpo anti-ACE2 producido en cabra el cual se incubó por 1 h. Se realizaron lavados para retirar el exceso de anticuerpo y posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés). Para el revelado del ELISA se adicionó el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), después de una incubación de 30 min, la reacción HRP-TMB se detuvo con la solución de paro. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 450 nm.

Adicionalmente a las muestras de suero, también se analizaron el control positivo de la inhibición (anticuerpo anti-RBD monoclonal humano) y control negativo de la inhibición (la mezcla de RBD y ACE2).

Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de inhibición del control positivo (Anticuerpo anti-RBD monoclonal de humano) y las muestras a través de los datos de absorbancias usando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{OD control negativo} - \text{OD de la muestra})}{\text{OD control negativo}} \times 100\%$$

5.4.2 Determinación de anticuerpos neutralizantes en muestras de anticuerpos anti-RBD purificados de suero de sangre periférica

Se realizó la purificación de anticuerpos anti-RBD mediante el uso de Dynabeads de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, para ello se siguió el siguiente protocolo. Se pesaron 5 mg de Dynabeads y se lavaron con buffer PBS 1X (pH 7.4), se coloca en el magneto y se descarta sobrenadante. Posteriormente, se

agregaron 10 µg de RBD disueltos en 500 µL de PBS1X y se agregaron 500 µL de sulfato de amonio 3M. Se deja incubando en un rotador de tubos a 28°C durante 24 h. Pasando la incubación, se quitó el sobrenadante y se lavaron las perlas (beads) con buffer PBS 1X con BSA 0.1% y Tween 20 0.05%. Se resuspendieron las beads con el ligando RBD en buffer PBS1X. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 400 µL de suero que contiene inhibidor de proteasa (1,000 U) de Invitrogen, Waltham, MA USA. Se deja incubando 12 h en el rotador de tubos a 4°C. Posterior a la incubación, se lava 3 veces con PBS1X. Se descarta el sobrenadante y se eluye con 200 µL de Glicina-HCl 0.1M (pH 2.5). Posteriormente se colectan los 200 µL y se agregan 50 µL de buffer neutralizante (25 µL de glicerol al 50%, 25 µL de Tris-HCl 1M a pH 8 y 1X de inhibidor de proteasa).

5.4.3 Análisis de compuestos antivirales

Con el kit de RayBio se analizó la capacidad inhibitoria que presentaron las diversas moléculas siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las moléculas extraídas de plantas de tipo flavonoides (PhV-H₂O y PhV-AHA1), dos derivados de la sanguinarina (6-DHS y DHS) y un derivado del paracetamol se disolvieron en DMSO a una concentración stock 10 mM. Las concentraciones analizadas de los compuestos fueron de 0 al 50 µM, los cuales se prepararon en una mezcla con la proteína ACE2. También fueron analizadas nanopartículas de platas recubiertas colocando las concentraciones de 0, 0.2, 2 y 4 partículas por millón (ppm) en una mezcla con la proteína ACE2. Estas mezclas se adicionaron a los pozos de la placa, recubiertos con RBD, y se dejó interaccionar por 90 minutos. Se realizaron lavados para eliminar la ACE2 no unida y se añadió un anticuerpo anti-ACE2

producido en cabra por 1 h. Se realizan lavados para retirar el exceso y posteriormente se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a HRP. Para el revelado del Elisa se adicionó el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), después de una incubación de 30 min, la reacción HRP-TMB se detuvo con la solución de paro. La absorbancia se lee a una longitud de onda de 450 nm. Adicionalmente a las muestras de suero, también se analizan el control positivo de la inhibición (anticuerpo anti-RBD monoclonal humano), el control negativo de la inhibición (la mezcla de RBD y ACE2), control de vehículo (diluyente de la muestra a analizar).

5.4.4 Diseño de péptidos antivirales

Se diseñaron 10 péptidos derivados de la región de interacción del Receptor de Angiotensina II humana con RBD de SARS-CoV-2. Para mejorar la unión de los péptidos al blanco terapéutico se realizó mutagénesis de aminoácidos *in silico* utilizando el programa Chimera versión 1.14 (UCSF) (Diseño realizado por el Dr. Edgar Daniel Pérez Páez y la Dra. Karen Lizbeth Reyes Barrera).

La predicción de la estructura tridimensional de los péptidos se realizó por modelo comparativo en el servidor de Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org>). El modelo con mejor Score se descargó en formato PDB, para su posterior análisis.

Utilizando el servidor HDock el Dr. Sergio Nemorio Hidalgo realizó el acoplamiento *in silico* de los péptidos a su proteína diana que es la proteína S (S1 de la Spike SARS-CoV-2, PDB id: 6MOJ) se realizó un análisis de aminoácidos específicos de anclaje y un análisis libre. Posteriormente, se validó el acoplamiento por re-acoplamiento. Los péptidos con más alto score (que nos indican mayor afinidad) fueron los que se mandaron a sintetizar en la compañía

GeneScrip. Los péptidos: nativo, nativo XL, 1, 3 y 4, fueron analizados por un ensayo de ELISA Subrogado. No se detallan las secuencias ya que están en proceso de patente.

5.4.5 Análisis de péptidos antivirales

Con el kit de RayBio, descrito en el apartado 5.4.1., se analizó la capacidad inhibitoria que presentaron los péptidos de diseño putativamente antivirales. Los péptidos se nombraron nativo, 3, 4, nativo-XL y 1. Los péptidos: nativo y 3 se disolvieron en DMSO, el péptido 4 se disolvió en agua y el péptido nativo-XL y 1 se disolvieron en agua con hidróxido de amonio al 3%.

6. CONCLUSIONES

1. Es posible producir la proteína RBD de SARS- CoV-2 en la bacteria *E. coli* Rosetta, con un rendimiento de 6 mg/L de RBD purificada.
2. La inmunización de ratones BALB/c con la proteína antigénica de RBD mediante la vía subcutánea, genera una respuesta inmune adaptativa humoral, produciendo anticuerpos IgG anti RBD en el suero de la sangre periférica. Mientras que la administración de la vacuna por vía nasal no genera anticuerpos IgG anti RBD en el suero de los ratones.
3. La administración subcutánea de la vacuna induce la producción de IgG e IgA en intestinos y pulmones, siendo la producción más alta en la mucosa asociada a pulmones.
4. Nuestra vacuna basada en el RBD de Spike no produce anticuerpos IgE, por lo tanto, se descarta la respuesta alérgica.
5. Los anticuerpos IgG anti-RBD purificados del tratamiento con 5 µg de RBD, inhibe hasta un 20% la unión de ACE2-RBD.
6. Algunos compuestos antivirales son prometedores ya que inhiben la interacción entre ACE2-RBD. Los compuestos como derivado de

paracetamol a 10 μ M (30%), alcaloide-2 10 μ M (20%) y nanopartículas de plata 4 ppm (20%) son los que presentaron mayor porcentaje de inhibición.

7. Algunos péptidos antivirales inhiben cerca del 60% de la interacción RBD-ACE2, siendo el péptido nativo a una concentración 10 μ M el de mayor porcentaje de inhibición con 52%, siguiendo el péptido 3 a 10 μ M con 48%. Estos resultados nos permiten proponerlos como un tratamiento profiláctico que evitará la interacción del virus con el receptor celular ACE2 y de esa manera reducir la infección por SARS-CoV-2.

7. PERSPECTIVAS

1.- Evaluar la capacidad de neutralización de los anticuerpos generados de nuestro prototipo de vacuna, en un ensayo de inhibición de formación de placas líticas del virus SARS-CoV-2 en líneas celulares de mamíferos.

2.-Determinar el efecto citotóxico de los compuestos y péptidos antivirales en la línea celular HEK293.

3.- Determinar la concentración inhibitoria al 50% de los compuestos y péptidos antivirales mediante un ensayo de inhibición de la replicación viral con las diferentes variantes de SARS-CoV-2 en líneas celulares.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro-García, A., Pavón-Romero, G. F., Carreto-Binaghi, L. E., Bandera-Anzaldo, J., & Alvarado-Amador, I. (2020). Etiología y fisiopatología del SARS-CoV-2. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33 (s1), 5–9. doi: 10.35366/96667.
- Batty, C. J., Heise, M. T., Bachelder, E. M., & Ainslie, K. M. (2021). Vaccine formulations in clinical development for the prevention of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 169, 168–189. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.addr.2020.12.006.
- Chen, W. H., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2020). Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 16(6), 1239–1242. doi: 10.1080/21645515.2020.1740560.
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for production of protein-based vaccines: from classical to next-generation strategies. *Biomolecules*, 11(8), 1072. doi:10.3390/biom11081072.
- Davies, S. P., Mycroft-West, C. J., Pagani, I., Hill, H. J., Chen, Y. H., Karlsson, R., ... & Richardson, A. (2021). The hyperlipidaemic drug fenofibrate significantly reduces infection by SARS-CoV-2 in cell culture models. *Frontiers in Pharmacology*, 1755.
- De March, M., Terdoslavich, M., Polez, S., Guarnaccia, C., Poggianella, M., Marcello, A., et al. (2022). Expression, purification and characterization of SARS-CoV-2 spike RBD in ExpiCHO cells. *Protein expression and purification*, 194, 106071. doi: 10.1016/j.pep.2022.106071.

- Du, Y., Xu, Y., Feng, J., Hu, L., Zhang, Y., Zhang, B., et al. (2021). Intranasal administration of a recombinant RBD vaccine induced protective immunity against SARS-CoV-2 in mouse. *Vaccine*, 39(16), 2280-2287. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.03.006.
- Fielding, B. C., Filho, C. D. S. M. B., Ismail, N. S., & Sousa, D. P. D. (2020). Alkaloids: therapeutic potential against human coronaviruses. *Molecules*, 25(23), 5496.
- Goc, A., Sumera, W., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2021). Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions. *PLoS One*, 16(6), e0253489.
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., et al. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. *Military Medical Research* 7(1), 1-10. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
- Gurung, A. B., Ali, M. A., Lee, J., Farah, M. A., Al-Anazi, K. M., Al-Hemaid, F., et al. (2022). Structural and functional insights into the major mutations of SARS-CoV-2 Spike RBD and its interaction with human ACE2 receptor. *Journal of King Saud University-Science*, 34(2), 101773. doi: 10.1016/j.jksus.2021.101773.
- Han, D. P., Penn-Nicholson, A., & Cho, M. W. (2006). Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor. *Virology*, 350(1), 15-25. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.029.
- He, Y., Qi, J., Xiao, L., Shen, L., Yu, W., & Hu, T. (2021). Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 21(6), 453-460. doi:10.1002/elsc.202000106.

- Hidalgo-Figueroa, S., Rodríguez-Luévano, A., Almanza-Pérez, J. C., Giacomani-Martínez, A., Ortiz-Andrade, R., León-Rivera, I., et al. (2021). Synthesis, molecular docking, dynamic simulation and pharmacological characterization of potent multifunctional agent (dual GPR40-PPAR γ agonist) for the treatment of experimental type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 907, 174244.
- Jeremiah, S. S., Miyakawa, K., Morita, T., Yamaoka, Y., & Ryo, A. (2020). Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(1), 195–200. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.018.
- Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. Recuperado el 27 de junio de 2022, de <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
- Le, T. T., Cramer, J. P., Chen, R., & Mayhew, S. (2020). Evolution of the COVID-19 vaccine development landscape. *Nature reviews. Drug discovery* 19(10), 667-668. NLM (Medline). doi: 10.1038/d41573-020-00151-8.
- Mittal, A., Manjunath, K., Ranjan, R. K., Kaushik, S., Kumar, S., & Verma, V. (2020). COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS pathogens*, 16(8), e1008762. NLM (Medline). doi: 10.1371/journal.ppat.1008762.
- Pitcovski, J., Gruzdev, N., Abzach, A., Katz, C., Ben-Adiva, R., Brand-Shwartz, M., et al. (2022). Oral subunit SARS-CoV-2 vaccine induces systemic neutralizing IgG, IgA and cellular immune responses and can boost neutralizing antibody responses primed by an injected vaccine. *Vaccine*, 40(8), 1098-1107. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.01.025.

- Oroojalian, F., Haghbin, A., Baradaran, B., Hemmat, N., Shahbazi, M. A., Baghi, H. B., et al. (2020). Novel insights into the treatment of SARS-CoV-2 infection: An overview of current clinical trials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165,18–43. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.204.
- Sanchez-Alvarez, K., Rosales-Mendoza, S., Reyes-Barrera, K. L., Moreno-Fierros, L., Soria-Guerra, R. E., Castillo-Collazo, R., et al. (2021). Antibodies induced by oral immunization of mice with a recombinant protein produced in tobacco plants harboring *Bordetella pertussis* epitopes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147(1), 85-96. doi: 10.1007/s11240-021-02107-1.
- Solís-Rodríguez, M., Alpuche-Solís, Á. G., & Tirado-Mendoza, R. G. (2020). Metapneumovirus humano: epidemiología y posibles tratamientos profilácticos *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 63(3), 7-18. doi: 10.22201/fm.24484865e.2019.63.3.02.
- Wang, C. C., Prather, K. A., Sznitman, J., Jimenez, J. L., Lakdawala, S. S., Tufekci, Z., et al. (2021). Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*, 373(6558), eabd9149. doi: 10.1126/science.abd9149.