



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN  
INMUNÓGENO QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-CoV-2  
BASADO EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y  
EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA**

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestría en Ciencias Farmacobiológicas**

Presenta:

**García Valenzuela Sonia**

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

Codirector de Tesis: **Dr. Omar González Ortega**

---

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO, 2024



## **UASLP-Sistema de Bibliotecas**

### **Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso**

#### **DERECHOS RESERVADOS**

#### **PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Producción y caracterización de un inmunógeno quimérico contra el SARS-CoV-2  
basado en el dominio de unión al receptor y el fragmento C de la toxina tetánica ©

2024 por Sonia Garcia Valenzuela tiene licencia [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biofármacos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas, en el periodo comprendido entre Agosto de 2022 y Julio de 2024, bajo la dirección de Dr. Sergio Rosales Mendoza y Dr. Omar González Ortega.

---

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 003382. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 827286, Número de CVU: 1235948.

Los datos del trabajo titulado “PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-CoV-2 BASADO EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA” se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

**REGISTRO DE TESIS DE MAESTRÍA**

**GENERACIÓN: 2022 – 2024**

**Nombre del Alumno:** Sonia García V.

**Tema de Tesis:** Producción de un inmunógeno soluble del SARS-CoV-2 en *Escherichia coli*

**Línea de Investigación en la que se inserta la Tesis** Evaluación y desarrollo de medicamentos

---

---

**COMITÉ TUTELAR**

	<b>Nombre</b>	<b>Firma</b>
Director de tesis	Dr. Sergio Rosales Mendoza	
Codirector de tesis (Opcional)	Dr. Omar González Ortega	
Asesor del PCFB	Dra. Diana Patricia Portales Pérez	
Asesor del PCFB		
Asesor externo		



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

Formato M13

### Aprobación de Tema de Tesis

San Luis Potosí SLP a julio/11 /2024

**En Atención a Dr. Sergio Rosales Mendoza  
Director de Tesis Terminal**

La presente es para que quede asentado que el tema de Tesis de maestría:

**Producción y Caracterización de un inmunógeno quimérico contra el SARS-CoV-2  
basado en el dominio de unión al receptor y el fragmento C de la toxina tetánica.**

De la estudiante: **Sonia García Valenzuela**, que se llevará a cabo en el laboratorio de

Biofarmacéuticos Recombinantes de la Facultad de Ciencias Químicas, el cambio de tema de tesis es **APROBADO**.

Sin más por el momento, quedo de Uds.

**ATENTAMENTE**



POSGRADO EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán

Coordinador PCFB



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SAN LUIS POTOSÍ

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

26 de agosto de 2020

**DR. SERGIO ROSALES MENDOZA.**  
**PROFESOR INVESTIGADOR.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.**  
**PRESENTE.**

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo titulado **“DESARROLLO Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE VACUNAS INNOVADORAS CONTRA SARS-COV-2”**, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 26 de agosto del año en curso por el Comité Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

**APROBADO**

Su protocolo tiene la clave **CEID2020-07R1**.

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

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

**ATENTAMENTE**

**Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia**  
**Presidente del CEID-FCQ**



**FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS**

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

Ccp. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN  
INMUNÓGENO QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-  
CoV-2 BASADO EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL  
RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE LA  
TOXINA TETÁNICA**

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestría en Ciencias Farmacobiológicas**

Presenta:

**García Valenzuela Sonia**

**SINODALES:**

**Presidente:**

Dr. Omar González Ortega

**Secretario:**

Dr. Sergio Rosales Mendoza

**Vocal:**

Dra. Diana Patricia Portales P.

**Vocal:**

Dra. Gabriela Navarro Tovar

---

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO, 2024

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

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

Dr. Omar González Ortega: Codirector de tesis. Adscrito al Posgrado en Ingeniería en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Diana Patricia Portales Pérez: Tutora de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



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

Formato M5

## Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a Julio/ 03/2024

En la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P. el día 03 del mes de Julio del año 2024. La que suscribe Sonia García Valenzuela alumna del programa de posgrado en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Rosales Mendoza y codirección Dr. Omar González Ortega cede los derechos del trabajo titulado “PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-CoV-2 BASADO EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección [sonia.gv.97@gmail.com](mailto:sonia.gv.97@gmail.com); [rosales.s@uaslp.mx](mailto:rosales.s@uaslp.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Sonia Garcia Valenzuela



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

Formato M28

## Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a Julio/ 19 / 2024

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
**Biblioteca de Posgrado FCQ**

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-CoV-2 BASADO EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA, presentada por el autor Sonia Garcia Valenzuela. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 17 % excluyendo referencias y metodología.

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

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

**A T E N T A M E N T E**

---

**Dr. Sergio Zarazúa Guzmán**

Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias Farmacobiológicas

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO  
QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-COV-2 BASADO EN EL  
DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE  
LA TOXINA TETÁNICA**

---

INFORME DE ORIGINALIDAD

---

**17%**

ÍNDICE DE SIMILITUD

---

## **Dedicatorias y agradecimientos**

Agradezco infinitamente al Laboratorio de Biofármacos, por abrirme las puertas y permitirme trabajar y aprender a su lado.

Al Dr. Sergio, por la oportunidad de trabajar dentro de su equipo, y por toda la confianza, el apoyo y paciencia brindados durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Omar, por su disposición a enseñar, y todo el apoyo derivado de ello.

A Arleth y Marijo, porque más que colegas, encontré dos grandes amigas.

A Andrea, por el apoyo tanto moral como técnico, incluso en vacaciones.

A Javi, por ayudarme a abrir los frascos, y a Alejo por cuidar con tanto cariño a los ratones.

Agradezco a todos los seres queridos que me acompañaron en mi aventura por San Luis Potosí y se preocuparon por mí.

A mis papás, Cryss, Lupita, Ma Chela, tía Marisol, tía Chelita, por estar ahí para mí incluso a la distancia.

A Elena, Karla y Alonso, por acompañarme incluso en los momentos más complicados de la vida.

A Noris y Blanquis, por creer en mí e impulsarme a no quedarme estancada y luchar por mis sueños.

Esta tesis está dedicada a Lupita, mi mayor amor, mi motor de vida y mi ejemplo a seguir.

## RESUMEN

El SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID-19 desde diciembre de 2019, ha tenido un profundo impacto global en la salud pública, la economía y la sociedad. Las vacunas de subunidades recombinantes han surgido como una estrategia crucial debido a su seguridad y eficacia, utilizando fragmentos específicos del virus para inducir una respuesta inmune sin exponer al organismo al virus completo. En este estudio se presenta la proteína quimérica TTC-RBD, que combina el fragmento C de la Toxina Tetánica con el dominio RBD del SARS-CoV-2, producida en *E. coli*. Se lograron rendimientos de 195 µg/L de proteína purificada replegada bajo condiciones estandarizadas, indicando la robustez y replicabilidad de los métodos desarrollados. A pesar de la formación de cuerpos de inclusión que requirieron solubilización y replegamiento, TTC-RBD demostró inmunogenicidad en ratones BALB/c con Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante, con una respuesta modesta, sugiriendo la exploración de otros adyuvantes para mejorar su eficacia.

Palabras clave: COVID-19, vacunas de subunidades, *E. coli*, adyuvante, respuesta humoral.

## ABSTRACT

SARS-CoV-2, which caused the COVID-19 pandemic in December 2019, has had a profound global impact on public health, the economy, and society. Recombinant subunit vaccines have emerged as a crucial strategy due to their safety and efficacy, using specific fragments of the virus to induce an immune response without exposing the body to the entire virus. This study presents the chimeric protein TTC-RBD, which combines the C fragment of the Tetanus Toxin with the RBD domain of SARS-CoV-2, produced in *E. coli*. Yields of 195 µg/L of refolded purified protein were achieved under standardized conditions, indicating the robustness and replicability of the methods developed. Despite the formation of inclusion bodies that required solubilization and refolding, TTC-RBD demonstrated immunogenicity in BALB/c mice with Al(OH)<sub>3</sub> as an adjuvant with a modest response, suggesting the exploration of other adjuvants to improve its efficacy.

Keywords: COVID-19, subunit vaccines, *E. coli*, adjuvant, humoral response.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
2.1	Pandemia de COVID-19 .....	4
2.2	SARS-CoV-2.....	9
2.2.1	Variantes.....	10
2.3	Estructura del SARS-CoV-2.....	13
2.4	Patogénesis .....	14
2.5	Respuesta inmune .....	16
2.5.1	Respuesta humoral.....	17
2.6	Vacunas aprobadas contra SARS-CoV-2 .....	18
2.7	Vacunas de subunidades.....	20
2.8	<i>Escherichia coli</i> como plataforma de expresión .....	21
2.9	Importancia de los adyuvantes en el desarrollo de vacunas.....	26
2.10	Proteína TTC-RBD.....	29
2.10.1	La subunidad TTC .....	29
<b>3</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>31</b>
5.1	Objetivo general.....	31
5.2	Objetivos específicos .....	31
<b>6</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>31</b>
6.1	Cepas, Materiales y medios de cultivo.....	31
6.2	Extracción de proteína .....	32

6.3	Extracción de cuerpos de inclusión.....	33
6.4	Purificación .....	33
6.5	Análisis SDS – PAGE y Western Blot .....	34
6.6	Evaluación de inmunogenicidad .....	35
6.6.1	Toma de muestras .....	35
6.7	Determinación de títulos de anticuerpos mediante ELISA .....	36
<b>7</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
7.1	La proteína TTC-RBD se produce en cuerpos de inclusión .....	37
7.2	La proteína TTC-RBD puede solubilizarse con urea 8M.....	38
7.3	TTC-RBD no se adsorbe a la columna IMAC .....	39
7.4	Cuantificación de TTC-RBD.....	40
7.5	Análisis por Western Blot .....	41
7.6	Pruebas de inmunogenicidad.....	42
7.7	TTC-RBD muestra una mayor respuesta frente a la proteína S de la variante Delta 45	
7.8	Análisis de subclases.....	46
<b>8</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>Glosario .....</b>	<b>65</b>

# 1 Introducción

El Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), causante de la COVID-19, es un microorganismo altamente patógeno y transmisible (Polatoğlu et al., 2023). Desde su emergencia en diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan, China, causó una pandemia que ha tenido un impacto significativo, afectando especialmente a la salud pública, la economía y la sociedad en su conjunto, desencadenado una crisis sanitaria sin precedentes.

El impacto de la COVID-19 ha sido enorme. Hasta julio de 2024, se han confirmado más de 600 millones de casos en todo el mundo y más de 6,5 millones de muertes. Estados Unidos ha sido uno de los países más afectados, con más de 90 millones de casos y 1 millón de muertes (Fondo de las Naciones Unidas para los Niños [UNICEF], 2020).

Las repercusiones de la pandemia han ido más allá de la salud. Los confinamientos y otras medidas restrictivas han provocado una interrupción económica significativa, con una reducción del PIB mundial del 3,1% en 2020. Millones de personas han perdido sus empleos y muchos negocios han cerrado de manera permanente. La educación también se ha visto gravemente afectada, con el cierre de escuelas que impactó a más de 1,6 mil millones de estudiantes en el punto álgido de la crisis (Mathieu et al., 2020).

La pandemia ha exacerbado las desigualdades existentes, afectando desproporcionadamente a ciertas poblaciones. Las minorías raciales y étnicas, especialmente las comunidades negras e hispanas, han sufrido más por el COVID-19. Estas disparidades se deben a varios factores sociales de la salud, como mayores tasas de condiciones médicas preexistentes, menor acceso a la atención médica y mayor exposición al virus debido a los tipos de trabajos que realizan muchos miembros de estas comunidades (Vasquez, 2020).

Los niños también han sido gravemente afectados, con el cierre de escuelas, interrupciones en servicios esenciales y un mayor riesgo de violencia y abuso. Los niños más pobres han sido los más perjudicados, perdiendo acceso a vacunas vitales y enfrentando mayores riesgos de desnutrición y otros problemas de salud (Vasquez, 2020).

La pandemia de COVID-19 ha sido una crisis mundial de gran magnitud, cuyas consecuencias perdurarán por años. Abordar los efectos persistentes y desarrollar sistemas de salud más robustos y equitativos serán prioridades esenciales para la comunidad internacional en el futuro próximo.

Los principales signos y síntomas asociados a la infección por COVID-19 son tos seca, rinorrea, cefalea, fiebre y cansancio, así como anosmia, ageusia y una variedad de manifestaciones en distintos órganos y sistemas (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2021; Mohammed et al., 2022). Esta diversidad y complejidad de presentaciones clínicas hacen que tanto el diagnóstico como los posibles tratamientos para COVID-19 sean un reto para el personal de salud.

Los gobiernos de todo el mundo han implementado varias medidas para controlar la propagación del virus, incluyendo confinamientos, restricciones de viaje y el uso obligatorio de mascarillas. La creación y distribución de vacunas contra el COVID-19 han sido una prioridad, con más de 12 mil millones de dosis administradas a nivel mundial hasta julio de 2024. Sin embargo, la distribución de las vacunas ha sido desigual, y muchos países de bajos ingresos todavía luchan por vacunar a una parte significativa de sus poblaciones (Fondo de las Naciones Unidas para los Niños [UNICEF], 2020).

A medida que la investigación científica ha trabajado en comprender y combatir la enfermedad, se han logrado avances significativos en el desarrollo de vacunas seguras y eficaces contra el SARS-CoV-2; siendo éstas un pilar fundamental en la

lucha contra la pandemia. Entre las plataformas vacunales disponibles actualmente, las vacunas de subunidades recombinantes han demostrado ser una opción prometedora dado que se basan en la producción de proteínas específicas del virus, lo que desencadena una respuesta inmune protectora sin exposición al virus completo, ofreciendo una mayor seguridad respecto a las vacunas que implican la manufactura empleando al virus completo, el cual tiende a ser más reactogénico. Además, la producción de vacunas de subunidades se realiza en un conjunto de plataformas de expresión, lo que facilita su desarrollo en diferentes entornos tecnológicos y en general su producción a gran escala es relativamente simple y rentable (Solís-Andrade et al., 2022). Hasta el momento, las vacunas de subunidades aprobadas en México contra el SARS-CoV-2 son NVX-CoV2373 (Novavax), Abdala (Empresa Laboratorios AICA), SOBERANA 02 y SOBERANA PI (Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN)).

A pesar de las ventajas que confiere el empleo de vacunas de subunidades, su desarrollo implica algunos desafíos; por ejemplo, la necesidad de múltiples dosis debido a su inmunogenicidad modesta en comparación con las vacunas que utilizan el patógeno completo inactivado o atenuado. Una estrategia para mejorar la capacidad inmunogénica de este tipo de vacunas consiste en incluir adyuvantes y sistemas de entrega a la formulación, así como el uso de acarreadores (Liljeqvist & Ståhl, 1999). Una molécula que puede ser empleada como acarreador inmunogénico es el fragmento C de la Toxina Tetánica (TTFC o TTC). Anteriormente, se ha reportado que éste tiene actividad adyuvante, tanto en un esquema de coadministración como en uno de fusión genética con el antígeno vacunal (Bayart et al., 2022).

En este trabajo se desarrolló una proteína quimérica llamada TTC-RBD, basada en el fragmento C de la Toxina Tetánica y el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2. Se empleó *E. coli* como plataforma de expresión y se establecieron los métodos para su producción, así como su posterior purificación a partir de cuerpos de inclusión y su replegamiento. También se evaluó en ratones BALB/c la

inmunogenicidad de TTC-RBD en formulación con Alum como adyuvante y en un esquema de inmunización por la ruta subcutánea.

## **2 Antecedentes**

### **2.1 Pandemia de COVID-19**

Desde finales de diciembre de 2019, muchos países comenzaron con la elaboración de estrategias para hacer frente a una de las más devastadoras crisis sanitarias del siglo XXI: la pandemia de COVID-19 (Yıldırım & Ashraf, 2023). Esta pandemia tuvo un enorme impacto tanto social como económico, en especial para los países en desarrollo. Solamente en México, dejó cerca de 7 millones de casos confirmados y más de 300,000 defunciones hasta junio de 2023 (Cita sugerida: Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud Resumen de la situación, s/f). A nivel mundial, se han registrado más de 600 millones de casos confirmados de COVID-19 y más de 6,5 millones de muertes hasta julio de 2024 (United Nations & Economic Commission for Latin America and the Caribbean [ECLAC], 2020).

En términos de mortalidad, los países de bajos ingresos han sido los más afectados, con una tasa promedio del 34%. Les siguen los países de ingresos medios con un 14% y los países de altos ingresos con un 10%. Cabe resaltar que, aunque los países más pobres han presentado más dificultades en términos de salud, los países de ingresos medios han experimentado el mayor impacto en el decremento del PIB, seguidos por los países de altos ingresos (Naseer et al., 2023; Sanchez, 2021).

A través de una actualización epidemiológica emitida en enero de 2024, la OPS/OMS indicó que, aún en 2023, se registraron niveles elevados de enfermedad respiratoria aguda asociada a varios virus, entre ellos el SARS-CoV-2, se informó también que en 2024, este virus todavía permanece en circulación, por lo que es preciso continuar con

los esfuerzos para aumentar la vacunación, principalmente en población vulnerable (Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud [OPS / OMS], 2024).

### **2.1.1 Fases de la pandemia**

Desde los primeros casos reportados a finales de 2019 hasta el presente, esta crisis ha pasado por varias fases, cada una con sus propios desafíos y respuestas por parte de los gobiernos y la comunidad internacional. Una mejor manera de comprender lo acontecido es atendiendo al contexto histórico y social de cada una de las fases.

#### Fase Inicial: El Brote en Wuhan

A finales de 2019, se reportaron los primeros casos de una nueva enfermedad respiratoria en Wuhan, provincia de Hubei, China. Las autoridades chinas identificaron rápidamente el nuevo coronavirus, denominado SARS-CoV-2, que causa la enfermedad conocida como COVID-19 (Pinazo-Hernandis, 2020). Con el aumento de los casos en Wuhan, las autoridades chinas tomaron medidas de contención, como el cierre de mercados, restricciones de movimiento y confinamiento de la población. Sin embargo, el virus ya se había propagado a otros países, y para enero de 2020, se habían reportado casos en varias naciones.

#### Fase de Propagación Global

Debido a la rápida expansión del virus, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el 30 de enero de 2020 que el brote era una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII) (OPS/OMS, 2022). En marzo de 2020, la OMS declaró la pandemia, reconociendo que el SARS-CoV-2 se había extendido globalmente, afectando a múltiples países y regiones.

Durante esta fase, los gobiernos implementaron diversas medidas de salud pública para intentar frenar la propagación del virus. Estas incluyeron el cierre de

fronteras, restricciones de viajes, confinamientos, cierre de escuelas y negocios no esenciales, y el uso obligatorio de mascarillas, entre otras (Martinez, 2023). A pesar de estos esfuerzos, el virus se propagó rápidamente, abrumando los sistemas de salud de muchos países. Los casos y las muertes por COVID-19 aumentaron drásticamente, generando una crisis sanitaria, económica y social sin igual.

### Fase de Desarrollo y Distribución de Vacunas

Debido a la gravedad de la situación, la comunidad científica y farmacéutica se movilizó rápidamente para desarrollar vacunas contra el SARS-CoV-2. En tiempo récord, se produjeron varias vacunas eficaces, como las de Pfizer-BioNTech, Moderna, AstraZeneca y Johnson & Johnson, entre otras (Torres-Cantero et al., 2022).

La distribución y administración de estas vacunas se convirtieron en una prioridad mundial. Sin embargo, el acceso a las vacunas no fue equitativo, con los países de altos ingresos obteniendo la mayor parte de las dosis iniciales. Esto generó preocupación por la posibilidad de que se crearan "vacunas para ricos" y "vacunas para pobres", exacerbando las desigualdades globales. A pesar de estos desafíos, los esfuerzos de vacunación lograron avances significativos. Para mediados de 2021, varios países habían vacunado a una parte importante de su población, lo que comenzó a reducir la carga de la enfermedad y aliviar la presión sobre los sistemas de salud (Torres-Cantero et al., 2022).

### Fase de Resurgimiento y Variantes

Justo cuando parecía que la pandemia estaba bajo control, surgieron nuevas variantes del SARS-CoV-2, más transmisibles y, en algunos casos, más letales. Variantes como Alpha, Beta, Gamma y Delta provocaron nuevas olas de

contagios en diferentes partes del mundo, obligando a los gobiernos a reimponer medidas de restricción (Torres-Cantero et al., 2022).

La aparición de estas variantes destacó la necesidad de mantener una vigilancia constante, adaptar las estrategias de salud pública y acelerar los esfuerzos de vacunación. Los países ajustaron sus respuestas, implementando cierres temporales, reforzando los protocolos de salud y promoviendo la aplicación de dosis de refuerzo de las vacunas.

Esta fase de resurgimiento y variantes demostró la naturaleza dinámica y desafiante de la pandemia, y la importancia de contar con sistemas de salud resilientes, capacidad de investigación y desarrollo, y una coordinación global efectiva para enfrentar amenazas emergentes.

#### Fase de Transición hacia la Convivencia

A medida que se avanzó en la vacunación a nivel global y se adquirió una mejor comprensión del virus y de la enfermedad, los países comenzaron a transitar hacia una fase de convivencia con el COVID-19. Esto implicó un gradual relajamiento de las medidas más restrictivas, con un enfoque en mantener la vigilancia epidemiológica, fortalecer los sistemas de salud y promover la vacunación continua (Martinez, 2023).

En esta fase, se buscó encontrar un equilibrio entre la protección de la salud pública y la necesidad de reactivar las actividades económicas y sociales. Los gobiernos tuvieron que tomar decisiones complejas sobre cuándo y cómo levantar las restricciones, considerando factores como las tasas de vacunación, la capacidad de los sistemas de salud y la evolución de los indicadores epidemiológicos.

Además, se hizo evidente la necesidad de abordar los impactos sociales y económicos de la pandemia, como la pérdida de empleos, la interrupción de la educación, el aumento de la pobreza y las desigualdades. Los esfuerzos de recuperación y reconstrucción se convirtieron en prioridades clave para los gobiernos y la comunidad internacional (Martinez, 2023).

### Hacia una Fase Endémica

En 2024, la pandemia de COVID-19 parece estar entrando en una fase más estable, con la integración del SARS-CoV-2 como un patógeno endémico, es decir, una enfermedad que se mantiene presente en la población de manera recurrente, pero con un impacto más manejable.

En esta fase, el énfasis se ha desplazado hacia la vigilancia epidemiológica continua, la adaptación de las vacunas a las nuevas variantes, y el fortalecimiento de los sistemas de salud para hacer frente a los brotes estacionales. La población también ha ido adquiriendo una mayor inmunidad, ya sea a través de la vacunación o de la exposición natural al virus.

Sin embargo, los desafíos persisten. Algunas regiones del mundo aún luchan por alcanzar altas tasas de vacunación, y la aparición de nuevas variantes sigue siendo una amenaza latente (Pan American Health Organization [PAHO], 2024). Además, los impactos sociales y económicos de la pandemia tardarán años en ser superados por completo.

La pandemia de COVID-19 ha sido una prueba sin precedentes para la humanidad. A lo largo de sus diversas fases, hemos aprendido valiosas lecciones sobre la importancia de la preparación, la cooperación internacional, la equidad en el acceso a la salud y la necesidad de fortalecer nuestros sistemas de salud

pública. Estos aprendizajes serán fundamentales para enfrentar futuras crisis sanitarias y construir sociedades más resilientes y equitativas (Martinez, 2023).

## 2.2 SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus con un tamaño de entre 65 y 125 nm de diámetro, de la familia *Coronaviridae*. Esta familia se divide en cuatro subgrupos: Alfa ( $\alpha$ ), Beta ( $\beta$ ), Gamma ( $\gamma$ ) y Delta ( $\delta$ ). Hasta el momento se ha reportado que solamente los coronavirus Alfa ( $\alpha$ ) y Beta ( $\beta$ ) son capaces de infectar a humanos, y esto sucede por zoonosis, es decir, que la transmisión proviene de un animal (Polatoğlu et al., 2023; Rothan & Byrareddy, 2020). La cepa inicial del virus pertenece al grupo Beta ( $\beta$ ), de acuerdo con análisis genómicos comparativos (Wu et al., 2020).

El SARS-CoV-2 posee un ARN monocatenario cuyo tamaño varía entre 20 y 32 kb de longitud. De acuerdo con Papanikolaou et al., (2022), los virus de ARN muestran altas tasas de mutación debido a la ausencia de corrección de errores por parte de las ARN polimerasas. Sanjuán & Domingo-Calap, (2016) señalan que la velocidad de mutación aumenta en un virus de ARN respecto de uno de ADN, del mismo modo que aumenta en un virus monocatenario respecto de uno bicatenario.

En el contexto del SARS-CoV-2, la secuencia genómica de la proteína de espícula (S), sobre la cual se profundizará más adelante, se caracteriza por una alta propensión a nuevas mutaciones (Ozono et al., 2020). Estas mutaciones se encuentran relacionadas con un nivel más alto de replicación viral, mayor afinidad a sitios de unión en la membrana celular del hospedero, alta transmisibilidad del virus y aumento en los niveles de morbilidad y mortalidad en pacientes infectados (Young et al., 2020). Este virus es capaz de generar un gran daño al aparato respiratorio y progresar a una enfermedad respiratoria grave o incluso una falla multiorgánica.

### **2.2.1 Variantes**

La Organización Mundial de la Salud ha establecido una clasificación para las diferentes variantes del SARS-CoV-2 con el fin de evaluar su relevancia virológica y clínica, atendiendo a los términos variantes de gran preocupación (VOHC por sus siglas en inglés), variantes de preocupación (VOC por sus siglas en inglés), variantes de interés (VOI por sus siglas en inglés) y variantes bajo vigilancia (VUM por sus siglas en inglés).

Las VOHC consideran a las variantes que llevan al fallo a las pruebas diagnósticas, evidencian una reducción significativa en la eficacia de las vacunas, una cantidad enormemente alta de casos de infección en vacunados, o muy baja protección inducida por las vacunas, reducción significativa de la susceptibilidad a tratamientos y aumento de las hospitalizaciones debido a la gravedad de los casos; las VOC hacen referencia a aquellas variantes que presentan mayor transmisibilidad, casos más graves de enfermedad, reducción en la neutralización por anticuerpos generados previamente, así como una menor eficacia de tratamientos o vacunas y dificultad de diagnóstico; las VOI incluyen a las variantes con menor neutralización por anticuerpos generados previamente, menor respuesta eficaz a tratamientos o pruebas de diagnóstico y un aumento previsto en la transmisibilidad o gravedad de la enfermedad; las VUM se centran en los linajes que han tenido impacto en las medidas médicas disponibles para contrarrestarlos, también incluyen linajes que solían causar formas más graves de la enfermedad o transmisión pero que ya no se detectan, linajes con una cantidad inusualmente grande de mutaciones antigénicas y presencia en diferentes países, así como linajes que habían sido designados como VOI, VOC o VOHC y que actualmente se encuentran en circulación a muy bajos niveles. (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2023). Inicialmente se consideró como VOC a las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P1), Ómicron (B.1.1.529) y Delta (B.1.617.2). Mientras que las catalogadas como VOI incluían a Epsilon (B.1.427 y B.1.429), Kappa

(B.1.617.1), Mu (B.1.621), Eta (B.1.525), Zeta (P.2), Theta (P.3), Iota (B.1.526) y Lambda (C.37) (Polatoğlu et al., 2023).

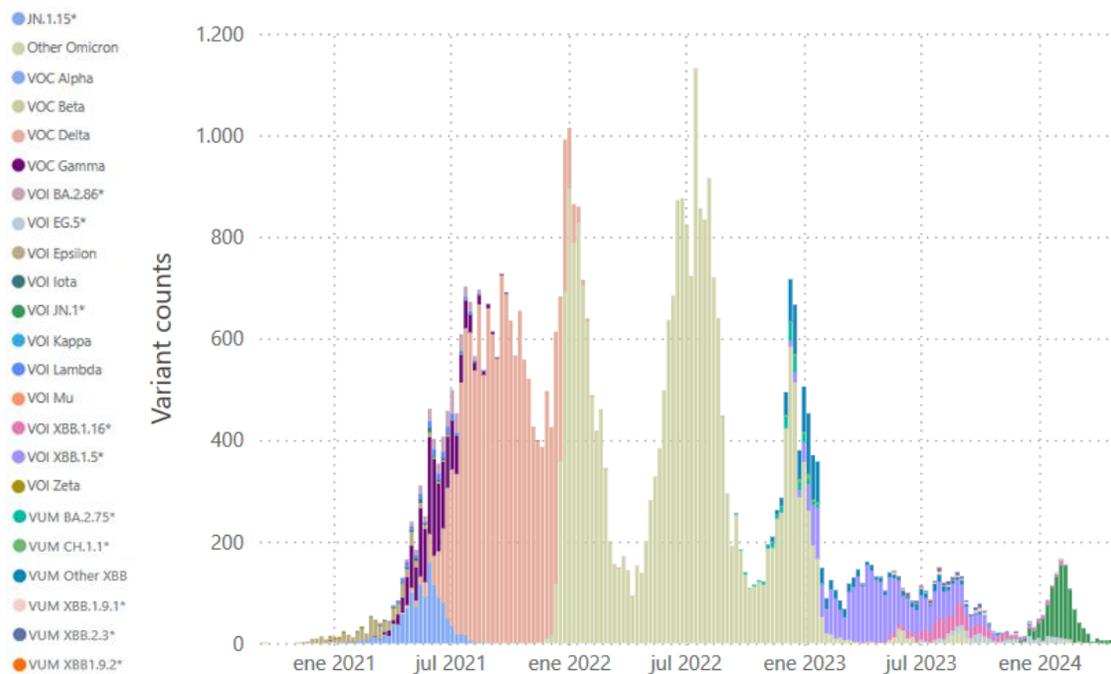
Durante 2021, se reportó la existencia de deleciones (además de mutaciones) en las secuencias codificantes para las proteínas S1-RBD y S2 de distintas variantes del SARS-CoV-2. Algo que llamó la atención fue una combinación aparentemente única, perteneciente a la variante Delta (del/ D614G/ E484Q), la cual se relaciona con una mayor infectividad y transmisibilidad, así como una potencial reducción de la respuesta frente a vacunas (Liu et al., 2021). En combinación con lo anterior, la variante Delta presenta niveles disminuidos o medios de morbilidad y mortalidad. De acuerdo con Papanikolaou et al., (2022), es posible que esta variante intente sobrevivir modificando su fuerza en un nivel bajo de actividad.

A partir de noviembre de 2021, comenzó a reportarse que la transmisión de la variante Ómicron aumentó dramáticamente respecto a las otras variantes (Figura 1), probablemente debido a una mayor capacidad para evadir el sistema inmune, en lugar de a un aumento en la producción de carga viral, como sucedió con otras variantes (Puhach et al., 2022). La variante Ómicron presenta una serie de deleciones y una inserción ( $\Delta 69-70$ ,  $\Delta 143-145$ ,  $\Delta 211-212$ , ins214EPE), así como un panorama mutacional aumentado en las mismas proteínas que la variante Delta: S1-RBD y S2 (Papanikolaou et al., 2022).

Durante la última revisión (Febrero, 2024), se encontró que tanto las VOC como las VOI que circulan actualmente son sublinajes de la variante Ómicron, los cuales han sido nombrados con base en su filogenia, siguiendo la nomenclatura Pango (Rambaut et al., 2020). De entre éstas resaltan XBB.1.5 y JN.1, consideradas las variantes más transmisibles hasta la fecha (World Health Organization, 2024b).

Según sus características genéticas, inmunológicas y estimaciones de crecimiento, XBB.1.5 puede continuar circulando a nivel mundial, aunque a niveles bajos, ya que la

prevalencia ha seguido disminuyendo y no se han observado aumentos en la gravedad de la COVID-19. De acuerdo con la información publicada por la OMS, no se considera que XBB.1.5 pudiera generar riesgos adicionales para la salud pública con relación a los otros linajes circulantes descendientes de Ómicron (World Health Organization, 2023).



**Figura 1.** Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2 en México. Recuento de variantes desde enero 2021 hasta enero 2024 en territorio mexicano. Rosa claro: VOC Delta; Gris claro: Ómicron (Pan American Health Organization [PAHO], 2024)

Actualmente, JN.1 es la variante del SARS-CoV-2 con más prevalencia en todo el mundo. Sin embargo, el riesgo hacia la salud aún se considera bajo, por lo que es poco probable que la propagación de esta variante aumente, en comparación con otros sublinajes de Ómicron (World Health Organization, 2024a). La mayoría de las mutaciones tienen un impacto mínimo en las propiedades del virus, sin embargo, algunas podrían influir provocando cambios en la tasa de propagación o en la gravedad

de la enfermedad y sus síntomas. Además, la eficacia de los fármacos terapéuticos y las vacunas podría alterarse (Polatoğlu et al., 2023).

### **2.3 Estructura del SARS-CoV-2**

El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica para dieciséis proteínas no estructurales (NSP1–NSP16) como la helicasa y la ARN polimerasa dependiente de ARN, que son responsables de la replicación y traducción del virus (Naqvi et al., 2020). También se han encontrado siete proteínas accesorias (ORF3a–ORF8), además de cuatro proteínas estructurales: Espícula (S), Envoltura (E), Membrana (M) y Nucleocápside (N).

La superficie del virus está cubierta por proyecciones de glicoproteína S, que contiene a las subunidades S1 y S2. Estas subunidades se organizan de manera que forman una estructura distintiva que se asemeja a una corona. Actualmente, la proteína S es el objetivo principal de las vacunas contra SARS-CoV-2. Se sabe que la proteína S permite al virus detectar los receptores de membrana en el hospedero y dar lugar a la fusión para ingresar a la célula (Nejat et al., 2023).

La subunidad S1 se encarga de modular el reconocimiento del receptor a través del Dominio de Unión al Receptor (RBD), así como de la interacción con él con ayuda del Dominio N-Terminal (NTD) y el Dominio C-Terminal (CTD). La subunidad S2 facilita la fusión de la membrana viral al momento de entrar en contacto con la célula hospedera e incluye el péptido de fusión (FP), el cual conecta las regiones HR1 y HR2 a modo de hélice (Rabaan et al., 2023).

La proteína S se presenta como un trímero, con tres RBD situados en su vértice. En su estado de pre-fusión "cerrado", los RBD no pueden unirse a hACE2. Durante la entrada del virus, los RBD cambian a una conformación "abierto" para poder unirse a hACE2. Después de la pérdida del dominio N-terminal (NTD), el trímero S adopta una

conformación post-fusión. La estabilidad de esta nueva conformación depende de la reorientación de CTD (Verma et al., 2022).

## **2.4 Patogénesis**

De acuerdo con investigaciones recientes, la manera de infectar del SARS-CoV-2 es a través de la interacción del RBD de la subunidad S1 con los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) ubicados en la membrana de las células epiteliales bronquiales y alveolares del hospedero (Jeyanathan et al., 2020). Esta entrada requiere de la proteasa transmembrana de tipo II TMPRSS2 para la activación proteolítica de la proteína S (Gusev et al., 2022; Ilona et al., 2011). De este modo, S1 se disocia al mismo tiempo que S2 se repliega, dejando expuesto a FP, lo que permite una correcta fusión a la membrana celular. La subunidad S2 se pliega después de que FP se inserta en la membrana (Wang et al., 2021).

Una vez dentro de la célula, el ARN del virus se traduce y se genera el complejo ARN replicasa-transcriptasa. Este complejo genera nuevas cadenas de ARN, las cuales codifican proteínas de importancia para el virus. El ARN y las proteínas estructurales son ensambladas como viriones en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi, para después ser transportados en vesículas y liberarse de las células hospederas por exocitosis. Estas nuevas partículas virales pueden propagarse a bronquios, alvéolos e incluso a tejidos extrapulmonares (Polatoğlu et al., 2023).

Durante la etapa temprana de la infección, el SARS-CoV-2 comienza a propagarse en las vías respiratorias superiores (nariz, senos paranasales, boca, faringe y laringe). Después, el virus migra al tracto respiratorio inferior (tráquea, pulmones, bronquios, bronquiolos y alveolos) (He et al., 2020). Cabe resaltar que en esta etapa los pacientes son altamente infecciosos, incluso si permanecen asintomáticos ya que son capaces de eliminar partículas virales mientras realizan actividades cotidianas, como exhalar,

hablar, comer, toser o estornudar. El punto máximo de carga viral generalmente se alcanza al inicio de los síntomas (He et al., 2020).

Las principales manifestaciones clínicas de la COVID-19 son parte de la respuesta innata regulada por citocinas e interferones antivirales, como fiebre, mialgias, tos y producción de esputo (Zhu et al., 2023). Se ha descrito (Anka et al., 2021) que, si la respuesta mediada por interferón es lo suficientemente fuerte, hay una alta probabilidad de controlar la replicación del virus y limitar la gravedad de la enfermedad. En cambio, si el paciente no puede erradicar al SARS-CoV-2, éste puede propagarse hasta las células epiteliales alveolares tipo II e incluso desarrollar el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), así como otras patologías como coagulación intravascular diseminada (CID) y embolia pulmonar. A este período se le conoce como fase clínica (Zhu et al., 2023).

La fase clínica durante una infección por SARS-CoV-2, se subdivide en tres fases más: fase aguda, fase de viremia y fase letal o recuperación. Durante la fase aguda, el paciente manifiesta síntomas como disnea, tos y producción de esputo, siendo este evidenciado mediante imagenología (Anka et al., 2021). Hay presencia de daño alveolar, descamación neumocitaria y mayor permeabilidad de la vasculatura pulmonar, lo que desencadena alteraciones en la difusión de oxígeno al resto del organismo (Zhu et al., 2023).

El inicio de la fase de viremia ocurre cuando el virus ingresa al torrente sanguíneo. En este punto de la infección, es posible llegar a una inflamación sistémica y fallo multiorgánico. Es común observar monocitos en piroptosis, un tipo de muerte celular caracterizada por la aparición de poros en la membrana celular, hinchazón y una consecuente ruptura de membrana, la cual se relaciona con la aparición de una fuerte respuesta inflamatoria (Sefik et al., 2022; Zhu et al., 2023).

Durante la fase letal, es posible observar un incremento exacerbado tanto de citocinas como de factores de coagulación en pacientes en estado grave. Además, se reporta un aumento en el daño tisular como consecuencia de la persistencia de apoptosis de células infectadas, así como la activación de macrófagos y neutrófilos capaces de desencadenar la cascada de coagulación (sobre todo en pulmones) (Zhu et al., 2023). Un estudio realizado por McGonagle et al. (2021) señala la presencia de trombosis en ciertas venas pulmonares encargadas de la filtración de coágulos. Este podría considerarse el origen de una microembolia sistémica, que podría desencadenar accidentes cerebrovasculares, lesión renal, isquemia intestinal, entre otros. Esta información resalta el hecho de que la COVID-19 no sólo afecta al sistema respiratorio, sino que podría considerarse una enfermedad multisistémica. Cabe aclarar que el tipo de manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes dependen en gran medida de la gravedad de la enfermedad (Zhu et al., 2023).

## **2.5 Respuesta inmune del hospedero de SARS-CoV-2**

Existe evidencia de la capacidad de la proteína S del SARS-CoV-2 para unirse a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de membrana, especialmente el receptor tipo Toll 4 (TLR4). En el aparato respiratorio, específicamente en los alveolos, un probable mecanismo es la unión de la proteína S al TLR4, que activa la señalización para aumentar la expresión de ACE2 en la superficie celular, facilitando así la penetración del SARS-CoV-2 en los alveolocitos tipo II. Esto contribuye a la destrucción celular, la inhibición de la producción de surfactante y al desarrollo del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) (Gusev et al., 2022).

Por otro lado, la activación de las células T por el SARS-CoV-2 comprende la activación de las células T colaboradoras (Th1) que secretan GM-CSF y conllevan a la producción de IL-17. Esta citocina inflamatoria se encarga de reclutar macrófagos y neutrófilos en el sitio de infección, estimulando la cascada de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6. La

IL-6 es responsable de desencadenar la tormenta de citocinas en pacientes con COVID-19 (Rawat et al., 2021).

Al igual que el SARS-CoV y el MERS-CoV, el SARS-CoV-2 suprime la activación del sistema inmunológico innato, incluidas las células dendríticas, y atenúa las respuestas del interferón antiviral tipo I y tipo III (IFN-I-III) (Jeyanathan et al., 2020). La supresión de la actividad del IFN-I-III al inicio de la enfermedad es fundamental para la invasión viral ya que el IFN-I-III tiene la mayor eficacia antiviral durante este tiempo. La sobreproducción de IFN puede tener un efecto nocivo en las últimas y más graves etapas de la COVID-19, ya que también está implicado en la fisiopatología del fenómeno de la tormenta de citocinas y la inflamación sistémica asociada. Como resultado, se produce una forma grave de COVID-19 con el desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y un aumento del nivel de citocinas proinflamatorias en plasma, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , quimiocinas CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1) y CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). Esta forma grave de COVID-19 se caracteriza por niveles bajos de IFN-I en la sangre en una etapa temprana y niveles elevados de IFN-I en una etapa tardía (Gusev et al., 2022).

### ***2.5.1 Respuesta humoral***

La respuesta inmunológica humoral contribuye a limitar la infección por SARS-CoV-2 y evitar futuras reinfecciones. Se ha descrito que, durante el pico de carga viral en pacientes infectados por este coronavirus, coincide con la aparición de una respuesta de anticuerpos dirigidos principalmente contra la proteína S (Rawat et al., 2021). Se ha reportado que los anticuerpos IgM se mantienen hasta la semana 12, mientras que los anticuerpos IgG permanecen por tiempos más prolongados. Esto sugiere que los anticuerpos IgG podrían representar la principal respuesta inmune humoral contra varios tipos de coronavirus, entre ellos el SARS-CoV-2 (Gang et al., 2024).

También se ha observado que los anticuerpos que se unen al RBD bloquean la capacidad de éste para interactuar con ACE2. Además, aquellos capaces de unirse a otros sitios de las proteínas S1 y S2 pueden evitar el cambio conformacional de la proteína S y bloquear la fusión a la membrana del hospedero.

Por otro lado, estudios en ratones han identificado niveles elevados de anticuerpos IgG2a dirigidos contra la nucleoproteína (N). Este hallazgo sugiere la posibilidad de generar protección a través de funciones efectoras mediadas por Fc en lugar de neutralizar directamente el virus (Jeyanathan et al., 2020).

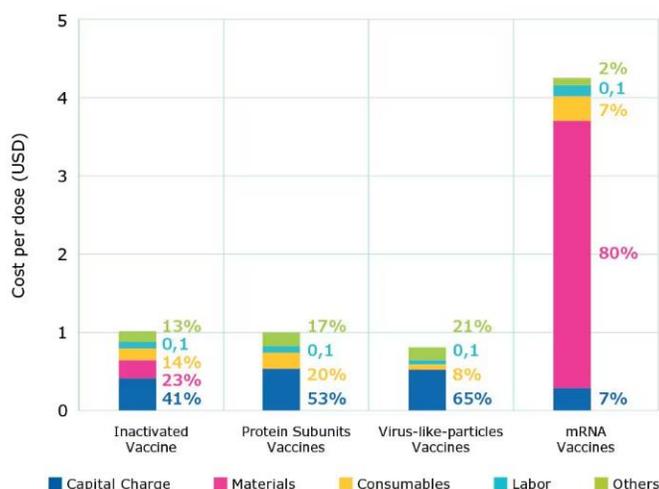
## **2.6 Vacunas aprobadas contra SARS-CoV-2**

Actualmente, se cuenta con una extensa lista de vacunas aprobadas contra el virus SARS-CoV-2: CanSino, Covaxin, Johnson & Johnson, Moderna, Oxford/AstraZeneca, Pfizer/BioNTech, Sinopharm, Sinovac, Sputnik Light, Sputnik V, Novavax, KoviVac/Chumakov, IMBCAMS, KCONVAC, Z2001, Abdala, Soberana Plus y 02, Sanofi/GSK, Corbevax, COVIran Barekat, QazVac y EpiVacCorona. La mayoría de estas vacunas se basan en tecnologías que se consideran tradicionales.

Sin embargo, las vacunas de Moderna/NIH y Pfizer/BioNTech se basan en ARNm encapsulados en lípidos y polímeros que codifican la proteína S. La vacuna de Sinovac está formulada con el virus inactivado. Las vacunas de AstraZeneca/Oxford, CanSino, Johnson & Johnson y Gamaleya Institute se basan en vectores adenovirales. La eficacia de estas vacunas varía entre el 60% y el 98%; sin embargo, la aparición de variantes con mutaciones en la proteína S (p. ej., B.1.1.7, B.1.315 y P.1) podría disminuir dicha eficacia. Además, el uso de vacunas basadas en adenovirus (AdV5 y AdV26) tiene el inconveniente de que la población en los países con una alta prevalencia de éstos porta anticuerpos neutralizantes contra ellos, lo que disminuye aún más la eficacia de la vacuna (Mast et al., 2010).

Respecto a las vacunas de subunidades, NVX-COV2373 tuvo una eficacia del 89-91,6% contra la cepa silvestre, del 86,3-93,2% contra la variante Alfa y del 60% contra la variante Beta. CoronaVac, BBIBP-CorV, Covaxin y Abdala tuvieron una eficacia del 50,6-92,3%, pero no se especificaron las cepas del SARS-CoV-2 (Fiolet et al., 2022). La fabricación de vacunas requiere de una alta inversión, y los costos a largo plazo están mayormente influenciados por factores económicos vinculados a su desarrollo y producción. A estos costos se añaden los relacionados con el proceso de producción, construcción y operación de instalaciones de fabricación, así como el debido cumplimiento de las regulaciones pertinentes, además de los costos de fabricación como materia prima, instalaciones, mantenimiento y mano de obra. Alcanzar una producción a gran escala y mejorar la estabilidad ayuda a reducir costos tanto en la investigación como en el desarrollo de vacunas (Plotkin et al., 2017).

Durante 2023 y 2024, Merck KGaA desarrolló un sistema de modelado de costos con la finalidad de comprender de mejor manera los procesos de fabricación de vacunas, considerando costos tanto directos como indirectos desde la investigación hasta el empaquetado y la distribución. Se reportó que las vacunas de subunidades y las vacunas de partículas similares a virus (VLP) presentan un menor costo de producción por dosis (Figura 2). El mayor porcentaje del presupuesto es empleado en equipos, instalaciones y ensayos de validación. Este costo es similar en otras plataformas vacunales, a excepción de las vacunas de ARNm, las cuáles dedican alrededor del 80% presupuesto a los materiales requeridos para la producción, razón principal del incremento en el costo total (Joséphine Cheng et al., 2023).



**Figura 2.** Contribución porcentual del costo por dosis por plataforma vacunal a escalas comerciales (Joséphine Cheng et al., 2023).

A pesar de la gran cantidad de vacunas disponibles contra SARS-CoV-2, muy pocas personas de países de bajos ingresos han podido recibirlas. Sin embargo, el desarrollo de vacunas de subunidades y su aprobación para uso de emergencia, ha contribuido al aumento de la tasa de vacunación en América Latina, Medio Oriente y el sur de Asia (Wong-Arce et al., 2024).

## 2.7 Vacunas de subunidades

Las formulaciones de vacunas de subunidades contienen componentes antigénicos definidos, generalmente junto con un potente adyuvante. El antígeno puede ser un polisacárido, un ácido nucleico o una proteína. En este último caso, la proteína puede ser purificada directamente de un patógeno, también puede tratarse de un péptido sintético o una proteína recombinante. Las proteínas recombinantes son producidas mediante una diversidad de plataformas de expresión, que van desde *Escherichia coli* hasta células de insecto y de mamíferos, las cuales garantizan que el antígeno se

produzca a gran escala y tenga una secuencia y pureza definidas, por lo que se da lugar a formulaciones altamente seguras (Bill, 2015).

Las proteínas o péptidos empleados en las vacunas de subunidades se consideran poco inmunogénicos por sí solos dado su bajo nivel de complejidad. Generalmente requieren no sólo de un adyuvante, sino también de un esquema de inmunización con varias dosis. La mayoría de las vacunas de subunidades contra SARS-CoV-2 contienen proteína S completa o partes de ella con el objetivo de inducir anticuerpos neutralizantes. Actualmente, se conoce que las vacunas de subunidades inducen principalmente respuestas de anticuerpos y células T CD4<sup>+</sup>. También se sabe que, por lo general, muestran una respuesta modesta de células T CD8<sup>+</sup> (Jeyanathan et al., 2020).

Las vacunas de subunidades poseen buena estabilidad y condiciones sencillas de almacenamiento. Esto las posiciona como una plataforma de vacunas prometedora para los países de bajos ingresos donde los problemas logísticos pueden obstaculizar la distribución local eficiente (Laotee et al., 2023).

## **2.8 *Escherichia coli* como plataforma de expresión génica**

La tecnología de expresión genética recombinante se desarrolló hace 41 años en *E. coli*, dando paso a la síntesis recombinante de hormonas humanas (somatostatina en 1977 e insulina en 1979). Hoy en día, es posible producir una amplia gama de productos biofarmacéuticos recombinantes, incluidas hormonas, anticuerpos y vacunas. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado más de 150 productos biofarmacéuticos. Aproximadamente el 20% de estas proteínas son producidas en levaduras, el 30% en *E. coli* y el 50% en líneas celulares de mamíferos e hibridomas (Bill, 2015).

*E. coli* suele ser la primera opción como plataforma para producir proteínas recombinantes ya que es un organismo cuyo cultivo es rápido, económico y con

potencial de generar altos rendimientos. Además, los informes que utilizan *E. coli* como célula huésped describen con mayor frecuencia la caracterización inicial del antígeno recombinante y la demostración de inmunogenicidad en ratones (Bill, 2015).

A pesar de las ventajas que ofrece esta plataforma, es importante considerar algunas problemáticas durante la expresión en *E. coli*. Debido a la presencia de una membrana externa que no es permeable a las proteínas, generalmente *E. coli* no excreta proteínas al medio extracelular. Por lo tanto, se recomienda hacer uso de procedimientos como la alteración celular para llevar a cabo la recuperación de la proteína intracelular. También es importante considerar que el plegamiento inadecuado de proteínas sobreexpresadas conduce a la formación de agregados y cuerpos de inclusión, lo que reduce en gran medida (Jazini & Herwig, 2013)zini & Herwig, 2013).

Otro punto que considerar es el hecho de que, al igual que otras bacterias gramnegativas, *E. coli* produce niveles elevados de lipopolisacáridos (LPS), o endotoxinas, durante su ciclo de vida. Estas endotoxinas pueden activar respuestas inmunitarias y llevar al desarrollo de choque séptico en humanos. Por lo tanto, es esencial llevar a cabo una purificación exhaustiva de cualquier proteína con fines terapéuticos producida en *E. coli*, y así conducir a la endotoxina a niveles extremadamente bajos antes de su uso terapéutico (Wilding et al., 2019).

Existen otros factores que influyen en la expresión de una proteína soluble, bien plegada y activa al utilizar a *E. coli*. Por ejemplo, las propiedades del gen y la proteína a expresar. El ARNm de proteínas humanas contiene codones poco frecuentes, es decir, que los ARNt de *E. coli* correspondientes a ellos suelen ser menos abundantes, como aquellos para arginina, prolina, leucina e isoleucina. Esto aumenta la probabilidad de que la traducción presente fallas y la expresión se dé a un nivel bajo o incluso de manera incorrecta (Francis & Page, 2010).

Otro factor que considerar durante la expresión en *E. coli* es el tamaño de la proteína. Canaves et al. (2004) y Gräslund et al.(2008) concuerdan con que la probabilidad de expresar una proteína soluble en *E.coli* disminuye si el peso molecular es elevado. Considerándose un tamaño elevado a aquél por arriba de 60kDa. Esto contribuye a la teoría de (Francis & Page, 2010) donde se recomienda optar por la expresión de dominios proteicos individuales de interés, en lugar de una proteína completa.

De acuerdo con (Klock et al., 2008), los residuos tanto iniciales como finales del dominio de interés son capaces de afectar a la expresión y la solubilidad. Esto resalta la importancia de determinar los límites adecuados para la construcción del dominio de la proteína a expresar. La presencia de regiones de baja complejidad (LCR, por sus siglas en inglés) también afecta de manera negativa la expresión de proteínas solubles. Las LCR son regiones homopoliméricas, sobrerrepresentaciones de ciertos residuos de la proteína las cuales, según Peti & Page, (2007), deberían evitarse durante el diseño de una proteína.

El entorno reductor propio del citoplasma de *E. coli* entorpece la adecuada producción de proteínas ricas en disulfuro. Intentar expresar proteínas que presentan enlaces disulfuro generalmente resulta en la producción de proteínas insolubles, debido a que se presentan mal plegadas, por lo que terminan en cuerpos de inclusión (Francis & Page, 2010).

Con la finalidad de mejorar la expresión, se han desarrollado cepas de *E. coli* diseñadas para proteínas que contienen codones poco frecuentes, enlaces disulfuro o que son susceptibles a proteólisis. Un ejemplo es la cepa *E. coli* BL21 y sus derivados (cepas designadas como (DE3)), las cuales contienen una copia del gen de la ARN polimerasa T7 (el promotor más frecuentemente utilizado para producción de proteínas) en su cromosoma, esto posibilita una expresión sencilla y eficiente desde vectores de expresión basados en T7 (Francis & Page, 2010). Además, estas cepas

son deficientes de proteasas, específicamente *ompT* y *lon*, situación que conlleva a una mayor expresión y estabilidad protéica (Gottesman, 1990).

Existe también otro tipo de cepas, las cuales se han suplementado con codones poco frecuentes, es decir, se les han suministrado plásmidos que codifican ARNt poco frecuentes, con la finalidad de promover una expresión eficiente de genes con una alta tasa de codones de este tipo. Entre estas cepas, es posible encontrar a Rosetta, Rosetta-gami, BL21-RP y BL21-RIL. Rosetta-gami, además, facilita la formación de puentes disulfuro gracias a la presencia de mutantes *trxB/gor*.

Existen cepas con mutaciones en los genes que codifican para las proteínas tiorredoxina reductasa (*trx/B*) y glutatión reductasa (*gor*) que se encargan de mantener un ambiente reductor dentro del citosol de *E. coli*. Este ambiente favorece la formación de puentes disulfuro, lo que permite el adecuado plegamiento de las proteínas producidas y se ha demostrado que aumenta los rendimientos de producción (Bessette et al., 1999). Sin embargo, se recomienda utilizar a estas cepas solamente cuando la proteína de interés necesite de la formación de puentes disulfuro. De lo contrario, estos puentes podrían formarse entre proteínas, generando agregados proteicos de alto peso molecular (Francis & Page, 2010).

Otros factores que influyen directamente en la solubilidad de las proteínas expresadas son las condiciones de cultivo. La temperatura es uno de los principales factores. Al manejar temperaturas bajas (15 °C a 25 °C), disminuye la velocidad de crecimiento bacteriano, lo que permite un plegamiento adecuado de las proteínas y, en consecuencia, una disminución en la formación de cuerpos de inclusión. En este sentido, a altas temperaturas (30 °C a 37 °C), existe mayor probabilidad de obtener proteínas insolubles y mal plegadas (Baneyx & Mujacic, 2004).

El uso de promotores adecuados también es de suma importancia para la expresión eficiente de proteínas solubles. Como se mencionó anteriormente, el promotor T7 es

uno de los más utilizados ya que es altamente efectivo. Sin embargo, en algunas ocasiones puede ser necesario modularlo para prevenir la formación de agregados proteicos. Otros promotores inducibles como lac, tac y araBAD mantienen un control más preciso de la expresión, permitiendo ajustar los niveles de expresión a condiciones que favorezcan la solubilidad de la proteína de interés (Makino et al., 2011).

El tipo de inductor utilizado también influye en la solubilidad de la proteína producida. El isopropil-  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es un inductor comúnmente utilizado para el promotor lac. La desventaja que presenta es que tanto su concentración como el tiempo de inducción deben estandarizarse para cada sistema en específico. Existen otros inductores como la arabinosa, para el promotor araBAD, que puede ofrecer un mejor control de expresión y una mayor proporción de proteínas solubles en el cultivo (Terpe, 2006).

Además de los factores mencionados, la composición del medio de cultivo y la presencia de agentes estabilizadores son de gran importancia para la producción de proteínas en *E. coli*. La adición de chaperonas moleculares y proteínas que contribuyen al replegamiento, como la disulfuro isomerasa, puede mejorar significativamente el adecuado plegamiento de las proteínas debido a la correcta formación de puentes disulfuro. Estas condiciones contribuyen a la obtención de proteínas solubles y activas (Studier, 2005).

La optimización del medio de cultivo es otro punto esencial. El empleo de sales como NaCl y KCl es fundamental para mantener la osmolaridad y equilibrio iónico en el medio. Sin embargo, a concentraciones excesivas o insuficiente, es posible afectar la estabilidad celular y, por lo tanto, la producción de la proteína de interés. Además, las sales pueden influir en el comportamiento de las proteínas chaperonas y las asociadas al adecuado plegamiento proteico (Studier, 2005). El pH también es de gran importancia, pues si se encuentra alejado de los valores óptimos, es capaz de afectar

la eficiencia del metabolismo celular y el plegamiento de la proteína. Los nutrientes presentes en el medio de cultivo, como las fuentes de carbono, nitrógeno y vitaminas también son esenciales (Burgess & Fraenkel-Conrat, 1990). Una formulación adecuada del medio de cultivo que proporcione todos los nutrientes necesarios es vital para maximizar la producción de proteínas solubles. Por el contrario, la deficiencia de nutrientes clave, puede limitar la proliferación bacteriana (Sambrook & Russell, 2001). Además, la aireación y la agitación del cultivo son importantes para asegurar una adecuada distribución tanto de nutrientes como de oxígeno (Studier, 2005). La adición de agentes estabilizadores como detergentes o proteínas estabilizadoras puede prevenir la formación de agregados insolubles, permitiendo que las proteínas mantengan una conformación adecuada (Rosano & Ceccarelli, 2014).

## **2.9 Importancia de los adyuvantes en el desarrollo de vacunas**

Para que una vacuna sea considerada eficaz debe inducir títulos elevados de anticuerpos neutralizantes. En un estudio realizado en 2022 donde, al aplicar a un grupo de individuos la vacuna BNT162b2, y tras una infección irruptiva por Ómicron BA.1, se descubrió que la mayoría de los sueros obtenidos neutralizan de manera robusta los VOC previos del SARS-CoV-2, incluidos BA.1 y BA.2. Esto sugiere que la infección por Omicron BA.1 en personas vacunadas activa las células B de memoria, que generan anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los epítomos de la proteína S conservados en las variantes del SARS-CoV-2 hasta Omicron BA.2. (Quandt et al., 2024). Sin embargo, para que esto suceda, podría requerirse de múltiples dosis o ayuda de otras moléculas inmunoestimulantes. Además, es crucial que una vacuna pueda inducir niveles protectores de anticuerpos de manera rápida, empleando la mínima cantidad de antígeno necesaria (Coffman et al., 2010). Esto no solo disminuye los costos asociados con la producción de la vacuna (Joséphine Cheng et al., 2023), sino que también la hace más asequible. La inclusión de un adyuvante adecuado en la vacuna contra el SARS-CoV-2 puede cumplir con estas exigencias.

La mayoría de los adyuvantes inmunoestimulantes actúan como ligandos para los PRR y conducen a la secreción de citocinas al mejorar directamente una vía de activación. Los adyuvantes pueden dirigirse a casi todas las familias de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Esto incluye a los TLR, que reconocen lípidos, lipoproteínas, ácidos nucleicos y proteínas; los receptores tipo NOD (NLR), que responden a múltiples ligandos como peptidoglicano, flagelina, toxinas y ATP; las helicinas (receptores tipo RIG-I, RLR), activadas por ARN citoplasmático; y los receptores de lectina tipo C (CLR), que reconocen carbohidratos y lípidos. (Coffman et al., 2010).

Los PRR emiten señales a través de vías que incluyen moléculas adaptadoras y sustancias intermedias como MyD88, TRIF, RIP2, CARD9 e IPS-1. Estas vías influyen en el resultado de la interacción entre el receptor y el ligando. Las vías de señalización activan dos rutas transcripcionales clave, involucrando los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, IRF-3 e IRF-7. Las interacciones entre receptores y ligandos llevan a la expresión de genes que codifican citocinas, quimiocinas y moléculas coestimulantes. Estas moléculas son cruciales para preparar, expandir y polarizar las respuestas inmunitarias (O'Neill & Bowie, 2010). La formación de depósitos, el reclutamiento de células inmunes, la activación del inflamosoma, la mejora de la presentación de antígenos por las moléculas MHC y la inmunomodulación son diferentes modos de acción de los adyuvantes (Bastola et al., 2017).

El adyuvante más utilizado en las vacunas humanas autorizadas es el hidróxido de aluminio ( $Al(OH)_3$ ), conocido comercialmente como Alum, y es uno de los adyuvantes más antiguos que se conocen (Moyer et al., 2020). Actualmente, algunas vacunas dirigidas contra Difteria, Tétanos, tos ferina, IPV, hepatitis A y B, VPH, meningococo y neumococo hacen uso de este adyuvante (Pasquale et al., 2015). Incluso, algunas vacunas aprobadas contra SARS-CoV-2 también lo emplean, tales como CoronaVac, BBIBP-COV, Coviran Barkat y Covaxin (virus inactivados) (Fiolet et al., 2022), así como Abdala y Soberana 02 (Instituto Finlay de Vacunas, 2021).

El  $\text{Al}(\text{OH})_3$  tiene grupos hidroxilo en su superficie y se muestra como una estructura cristalina compuesta de nanopartículas en forma de aguja, que tienden a agregarse hasta un diámetro promedio de 10  $\mu\text{m}$  (Corrado et al., 2024). En la formulación de la vacuna, a pH neutro, el Alum tiene una carga positiva, lo cual puede llegar a influir en las propiedades de adsorción y el comportamiento del antígeno con el que se trabaja (Corrado et al., 2024).

Se ha demostrado que el  $\text{Al}(\text{OH})_3$  actúa como un buen adyuvante mediante la formación de depósitos en el lugar de la inyección, permitiendo una liberación lenta del antígeno. Esto prolonga el tiempo de interacción entre el antígeno y las células presentadoras de antígeno (APC). Además, convierte antígenos solubles en formas particuladas que se fagocitan fácilmente. A nivel celular, el  $\text{Al}(\text{OH})_3$  estimula directamente a los monocitos para que produzcan citocinas proinflamatorias que activen las células T. Las células Th2 activadas liberan IL-4, que a su vez puede inducir un aumento en la expresión de moléculas del MHC de clase II en los monocitos. (Gupta & Gupta, 2020).

Las vacunas con adyuvantes tienden a causar una mayor reacción en el lugar de la inyección en comparación con las vacunas sin adyuvantes, dado que estos aumentan la capacidad de respuesta del sistema inmunológico a los antígenos, pero también pueden provocar efectos adversos. Estos efectos incluyen desde inflamación en el área de la inyección y formación de abscesos, hasta fiebre e inflamación en las articulaciones y ojos. Aunque hay muchos productos que podrían funcionar como adyuvantes, solo unos pocos están oficialmente aprobados y se emplean de manera efectiva (Bastola et al., 2017).

## **2.10 Proteína TTC-RBD**

### **2.10.1 La fracción C de la toxina tetánica**

La toxina del tétanos es una enzima del tipo tentoxilisina peptidasa, producida por la bacteria *Clostridium tetani*, que es anaeróbica y forma esporas. Consiste en un polipéptido de cadena única con una longitud de 1315 aminoácidos, el cual se procesa de manera endógena para dar lugar a una cadena ligera de 52 kDa (457 aa) y una cadena pesada de 98 kDa (858 aa). Estas cadenas se unen mediante un puente disulfuro para formar una proteína dimérica de 150 kDa. La toxina ejerce su efecto tóxico al unirse a receptores específicos en las células nerviosas motoras presinápticas, lo cual inhibe la liberación de neurotransmisores, afectando así el sistema nervioso motor y autónomo (Brandt et al., 2021).

El fragmento de la cadena pesada de la toxina del tétanos es notable por sus propiedades que desencadenan respuestas inmunológicas. Este fragmento es particularmente eficaz para inducir la producción de anticuerpos cuando se combina con antígenos no relacionados (Brandt et al., 2021).

Se ha reportado que la fracción C de la Toxina Tetánica (también conocida como TTC) contiene epítomos universales para los linfocitos T CD4+ humanos, los cuales son de vital importancia para la memoria inmunológica (Bayart et al., 2022). Un epítomo de interés es el péptido TT830-843, el cual se une a las proteínas MHC y se presenta en la superficie de las células presentadoras de antígenos. El complejo TT830-843/MHC interactúa con el receptor de las células T y activa una respuesta de linfocitos T. El uso de un epítomo adyuvante universal como el TT830-843 puede mejorar la respuesta inmunitaria en el desarrollo de vacunas y terapias (Brandt et al., 2021). Además, TTC induce la producción de IFN- $\gamma$  y CD69, ambos implicados en la modulación de la respuesta inmune. Por tanto, una alternativa para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno blanco es la fusión genética a TTC, aumentando no sólo su complejidad sino

el sumar los mecanismos específicos ya mencionados para abonar a la respuesta inducida hacia el antígeno no relacionado (Bayart et al., 2022).

### **3 Justificación**

A pesar de que se ha logrado contener la pandemia de COVID-19, esta enfermedad sigue considerándose un problema de salud a nivel mundial dado que el SARS-CoV-2 se ha establecido como un patógeno estacional que continuamente genera variantes. El desarrollo de vacunas dirigidas contra el SARS-CoV-2 debe considerarse como una herramienta de primera línea en la protección contra este virus. Aunque existen un conjunto de vacunas aprobadas en el combate contra la COVID-19, esta pandemia dejó claro que los países deben asegurar su autonomía en el desarrollo y producción de vacunas. Por esta razón es necesario mejorar las estrategias de diseño, evaluación y producción de vacunas, de modo que éstas sean más asequibles y cubran en tiempo récord la necesidad de vacunar a toda la población.

Las vacunas de subunidades son una alternativa en este campo que ofrece alta estabilidad y seguridad, así como una producción relativamente sencilla. Otro elemento atractivo es la posibilidad de diseñar antígenos quiméricos que permitan acompañar a la secuencia antigénica de interés de un acarreador que mejore su capacidad inmunogénica. Tal es el caso del fragmento C de la toxina tetánica. En términos de las plataformas de producción, el uso de *E. coli* recombinante se ha consolidado como un enfoque conveniente en países en desarrollo, en términos de costo accesible en comparación con las plataformas de células eucariontes, lo cual facilita su implementación en plantas industriales bajo buenas prácticas de manufactura.

## **4 Hipótesis**

La proteína TTC-RBD será expresada eficientemente en *Escherichia coli*, resultando en una proteína inmunogénica en ratones BALB/c, capaz de inducir una respuesta humoral específica.

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Producir en un sistema de *E. coli* recombinante la proteína TTC-RBD y evaluar su inmunogenicidad en un modelo murino.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Realizar ensayos de expresión de la proteína TTC-RBD en *E. coli* recombinante.
- Purificar la proteína TTC-RBD mediante técnicas de solubilidad diferencial y cromatográficas.
- Confirmar la integridad, grado de pureza y antigenicidad de la proteína TTC-RBD obtenida.
- Evaluar en ratones BALB/c la inmunogenicidad de la proteína TTC-RBD obtenida, en términos de la inducción de respuestas humorales.

## **6 Materiales y Métodos**

### **6.1 Cepas, materiales y medios de cultivo**

La construcción que permitió la expresión del antígeno TTC-RBD se basa en el plásmido pET15b, en el cual fue clonado un gen sintético optimizado codificante de la quimera que se constituye del fragmento C de la toxina tetánica y el dominio de unión al receptor de SARS-CoV-2 fusionado en su extremo C terminal. El vector fue

confirmado mediante perfiles de restricción y secuenciación, y posteriormente transferido a la cepa Rosetta (DE3) de *E. coli*. Se cultivó una clona de expresión en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 70 mL de medio LB (10% bacto-peptona, 5% extracto de levadura y 10% NaCl) suplementado con ampicilina (100 mg/L) y cloranfenicol (40 mg/L), a 37 °C y 180 rpm. Para inducir la expresión de la proteína TTC-RBD, las células se cultivaron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 – 0.8 a 600 nm (OD<sub>600</sub>), agregando lactosa (15 g/L) e incubando a 28 °C durante 16 h.

## **6.2 Extracción de proteína**

La biomasa bacteriana se recolectó por centrifugación a 7000 rpm, durante 10 min, a 4 °C y se resuspendió en una solución hipertónica fría (100 mM de Tris-HCl, sacarosa al 20% (p/v) y pH 7.4). Se uso una relación de 0.2 mL de esta solución por 20 mg de biomasa. Las células se recuperaron por centrifugación a 7000 rpm durante 15 min (4°C). La pastilla celular se resuspendió en agua filtrada (solución hipotónica), a razón de 0.5 mL por cada 20 mg de biomasa. El rompimiento celular se realizó con los tubos de ensayo en baño de hielo aplicando 6-9 ciclos de 30 s en modo encendido y 30 s en modo apagado usando ultrasonificación (dispositivo GEX130PB, Twinsburg, OH, EUA) a una amplitud del 70%. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min (4°C) para recuperar por un lado una pastilla compuesta por cuerpos de inclusión y componentes celulares insolubles, y por otro lado el sobrenadante que corresponde a la fracción de proteína soluble. El sobrenadante se recuperó y fue almacenado a -20°C hasta su posterior análisis. La pastilla (fracción de proteína insoluble) se resuspendió en el mismo volumen de solución hipotónica. Enseguida, se centrifugó a 7000 rpm por 15 min a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces más, con la finalidad de completar tres lavados. La pastilla se recuperó y almacenó a -20°C.

### **6.3 Extracción de cuerpos de inclusión**

La fracción insoluble obtenida tras la ruptura celular fue sometida a varios procedimientos de lavado. Durante esta sección del protocolo se consideró un mismo volumen de resuspensión, el cual equivale a 2.5 mL de buffer por cada 50 mL de cultivo inicial. Primeramente, se realizaron tres lavados con agua filtrada y centrifugaciones a 7000 rpm durante 10 min (4°C). A continuación, la pastilla se resuspendió en PBS 1x + Tritón X-100 1%. La suspensión se llevó a ultrasonificación (dispositivo GEX130PB, Twinsburg, OH, EUA) en baño de hielo, aplicando 6-9 ciclos de 30 s en modo encendido y 30 s en modo apagado a una amplitud del 70%. Al terminar los ciclos, la muestra se incubó en hielo durante 20 min. Este ciclo de lavado se repitió una vez más con PBS 1x + Tritón X-100 1% y otra con PBS 1x. Estos lavados se realizaron con la finalidad de eliminar componentes celulares y solubilizar proteínas contaminantes. La pastilla lavada se resuspendió en un buffer solubilizante que contenía 4 M Urea + 20 mM fosfato, pH 7.4. La nueva suspensión se llevó a ultrasonificación (bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente). Enseguida se incubó en hielo durante 30 min. Tras una centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos (4°C), se recuperó el sobrenadante y se almacenó bajo la etiqueta de "S4". A la pastilla remanente le fue añadido un buffer de 8 M urea, 20 mM fosfato, 500 mM NaCl, pH 7.4. Siguiendo con los mismos ciclos de centrifugación y sonicación, se obtuvo la fracción "S5" a partir del sobrenadante generado. Como último paso, la pastilla resultante se resuspendió en buffer solubilizante (8 M Urea, 20 mM fosfato, 500 mM NaCl, pH 7.4) y se llevó a sonicación. Posteriormente, se dejó en contacto con el buffer durante la noche a 4°C. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min para recuperar el sobrenadante con proteína recombinante solubilizada, etiquetado como "S6". Esta muestra fue almacenada junto con el resto a -20°C para futuros ensayos.

### **6.4 Purificación**

Se realizó la separación de proteínas por cromatografía IMAC utilizando una columna de 2 mL llena de Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotechnology,

Estocolmo, Suecia). El adsorbente se cargó con iones  $\text{Ni}^{2+}$  y se equilibró con buffer de unión. Se aplicaron 3 inyecciones de 1 mL del extracto proteico obtenido previamente (fracciones S5 y S6) al sistema cromatográfico, con un flujo de 0.25 mL/min. Después del lavado de la columna, la elución de la proteína de interés se logró alimentando el buffer de desorción (fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, urea 8 M, pH 7.1). Las fracciones que contenían la proteína de interés con menos impurezas correspondieron a aquellas derivadas de la proteína no unida a la resina, como consecuencia de que fueron varias proteínas contaminantes las que se unieron a los iones inmovilizados ( $\text{Ni}^{2+}$ ). El replegamiento se realizó mediante diálisis empleando una membrana de 6-8 kDa de corte. Los buffers utilizados para lograr el replegamiento, en orden secuencial, fueron: buffer 1 (fosfato 20 mM + urea 4 M a pH 7.1), buffer 2 (carbonato 50 mM + glicerol 10% (v/v) + Tween 0.01% (v/v) a pH 9.2) y buffer 3 (sacarosa 10% (p/v) + Tween 20 a 0.01% (v/v)).

## **6.5 Análisis SDS-PAGE y Western Blot**

Las muestras de proteína se mezclaron con buffer de carga 5x (DTT 500 mM, Tris-HCl 250 mM, SDS 10% (p/v), glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0.1%(p/v), pH 6,8) y se hirvieron durante 10 min. Las proteínas se separaron utilizando un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% (150 V, 1 hora) y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

Para el análisis de Western blot, las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 h a 500 mA utilizando una cámara de transferencia electroforética (Biorad, Hercules, CA, EUA). La membrana se incubó durante la noche en buffer de bloqueo (5% de leche en polvo descremada disuelta en PBS + 0.05% (v/v) Tween 20). La membrana se lavó posteriormente tres veces con PBS + 0.05% (v/v) Tween 20 y se incubó con anticuerpo contra la toxina tetánica (Anti-TTC, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) a una dilución 1:1000. La membrana se lavó e incubó con un anticuerpo

secundario anti-IgG de conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano a dilución 1:2000 (Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) durante 2 h a temperatura ambiente. La detección del antígeno se realizó mediante la incubación de las membranas con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, EUA).

## 6.6 Evaluación de inmunogenicidad

Para evaluar la inmunogenicidad de TTC-RBD se establecieron 3 grupos de ratones BALB/c (machos y hembras de 7 semanas de edad). Los ratones de cada grupo fueron inmunizados los días 1, 14 y 28 por vía subcutánea (s.c.) con una formulación de 200  $\mu$ L. Los tratamientos se enlistan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** *Descripción de los grupos experimentales.* Los ratones fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos descritos. El adyuvante de aluminio (Al (OH)<sub>3</sub>) se utilizó en una proporción de 1:5 (G Biosciences, St. Louis, MO, EUA, cat no. 786-1215).

<b>Grupo</b>	<b>Formulación</b>
<b>1</b>	1 $\mu$ g TTC-RBD + Al (OH) <sub>3</sub> + Vehículo
<b>2</b>	2 $\mu$ g TTC-RBD + Al (OH) <sub>3</sub> + Vehículo
<b>3</b>	Vehículo (10% sacarosa, 0.01% Tween 20)

### 6.6.1 Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción en la cola los días 0, 27, 42 y 56. Después de la formación del coágulo, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 6 min. Los sueros obtenidos se almacenaron a -40 °C hasta la determinación de anticuerpos.

Esta metodología se realizó siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Ética Institucional (CEID-2020-07R1).

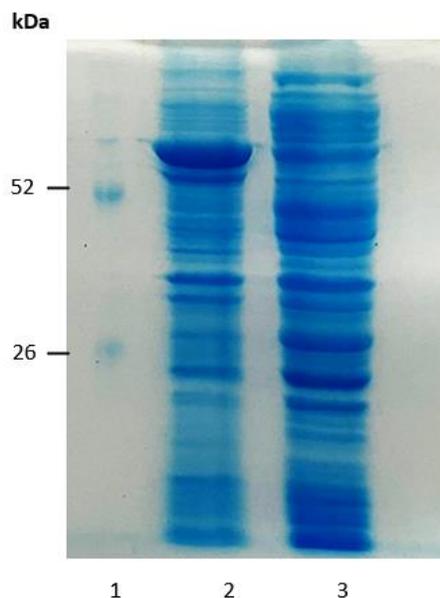
## **6.7 Determinación de títulos de anticuerpos mediante ELISA**

La técnica de ELISA se realizó con la finalidad de medir anticuerpos de unión al RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Las placas de poliestireno (96 pozos) se sensibilizaron durante la noche a 4°C con la proteína RBD (100 ng/pozo, Sino biological cat. no. 40589-V08H4) en buffer de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM, pH 9.6). Antes de cada uno de los siguientes pasos, las placas se lavaron tres veces con PBS 1x, utilizando el lavador de microplacas Wellwash™ (Thermo Scientific™, Cat. No. 5165000). Las placas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en PBS 1x. Se agregaron diluciones de sueros (1:100–1:500) en PBS 1x y se incubaron a 37°C durante 1 h. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario, pudiendo ser IgM, IgG2a o IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), que comprendió una incubación de 2 h a 25 °C. Finalmente, se añadió una solución de sustrato ABTS (0.6 mM de ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) + peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y se midieron los valores de OD a 405 nm después de 60 min utilizando un equipo MultiskanR FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Los títulos de anticuerpos IgG se determinaron como el recíproco de la dilución más alta de sueros con un valor medio de OD por encima del valor de OD del grupo tratado con el vehículo solo (control negativo) más 2 veces el valor de la desviación estándar.

## 7 Resultados

### 7.1 La proteína TTC-RBD se produce en cuerpos de inclusión

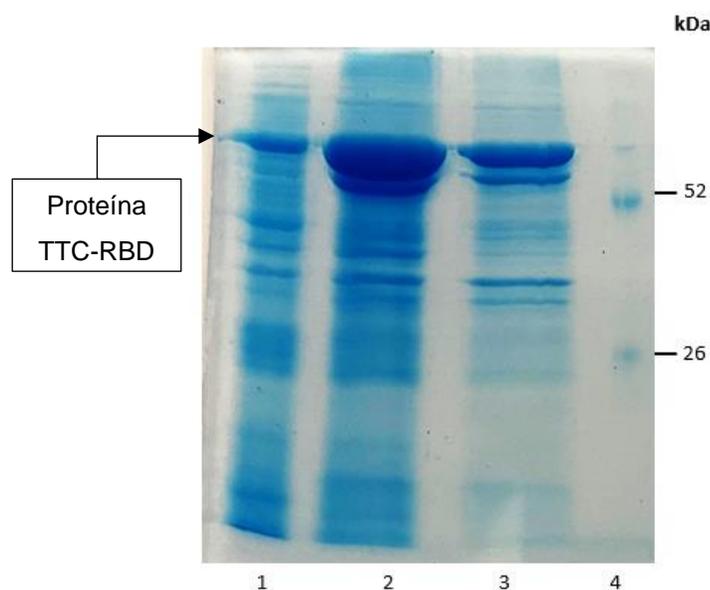
La expresión de TTC-RBD se realizó en un sistema de matraz (*E. coli* Rosetta-pET21b) y se evaluó utilizando 15 g/L de lactosa como inductor, bajo un período de 16 h, a 28 °C y 180 rpm. Tras realizar el análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble, se detectó la proteína TTC-RBD, la cual tiene un peso molecular de 70 kDa, en la fracción insoluble (Figura 3).



**Figura 3.** Análisis SDS-PAGE de los extractos de proteína recuperados tras la expresión de TTC-RBD en *E. coli*. Carriles: 1,  $\gamma$ -globulina de sangre humana como marcador de peso; 2, fracción insoluble de cultivo inducido; 3, fracción soluble de cultivo inducido.

## 7.2 La proteína TTC-RBD puede solubilizarse con urea 8 M

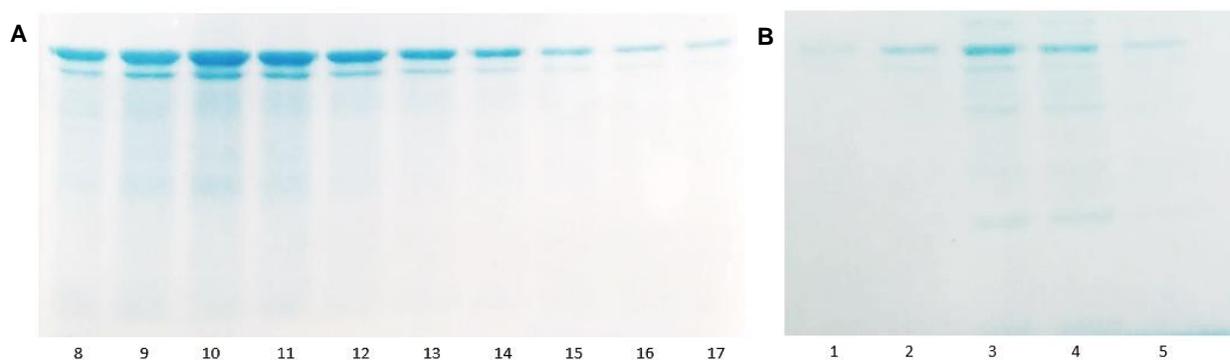
La proteína TTC-RBD se recuperó de los cuerpos de inclusión, los cuales se sometieron a una serie de lavados y etapas de solubilización con buffers a diferentes concentraciones de urea. Se obtuvieron las fracciones S4, S5 y S6 (Figura 4), de las cuales S5 presentó una mayor cantidad de proteína recombinante, mientras que la fracción S6 tiene aparentemente una menor presencia de impurezas. Estas dos últimas fracciones se seleccionaron para llevar a cabo la purificación por cromatografía. En ambas se utilizó buffer de urea 8 M como agente solubilizante.



**Figura 4.** Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas a partir del proceso de extracción de cuerpos de inclusión. Carriles: 1, fracción S4 (fracción insoluble de TTC-RBD solubilizada durante 30 min con 4 M Urea + 20 mM fosfato, pH 7.4); 2, fracción S5 (fracción insoluble de TTC-RBD solubilizada durante 30 min con 8 M urea, 20 mM fosfato, 500 mM NaCl, pH 7.4); 3, fracción S6 (fracción insoluble de TTC-RBD solubilizada durante una noche con 8 M urea, 20 mM fosfato, 500 mM NaCl, pH 7.4); 4,  $\gamma$ -globulina de sangre humana utilizada como marcador de peso molecular.

### 7.3 TTC-RBD no se adsorbe de manera importante a la columna IMAC

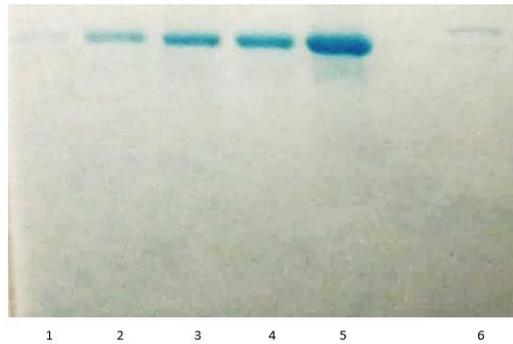
La purificación de TTC-RBD se realizó mediante IMAC empleando una columna de cargada con iones  $\text{Ni}^{2+}$ . Se colectaron fracciones de la proteína no adsorbida a la columna (Figura 3), en las que eluyeron proteínas contaminantes junto con la proteína de interés; sin embargo, se presentaron fracciones que contenían a ésta con alta pureza. Las fracciones seleccionadas correspondieron a S5 debido a que mostró un mejor comportamiento respecto a S6 (Figura 5). Se seleccionaron las fracciones 16 y 17 (con mayor pureza) de la cromatografía para llevar a cabo el replegamiento de TTC-RBD.



**Figura 5.** Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras la purificación de TTC-RBD mediante IMAC. **A)** Fracciones de proteína no adsorbida obtenidas a partir de S5, colectadas tras el lavado de la columna. **B)** Fracciones de proteína adsorbida, obtenidas a partir de S5.

## 7.4 Cuantificación de TTC-RBD

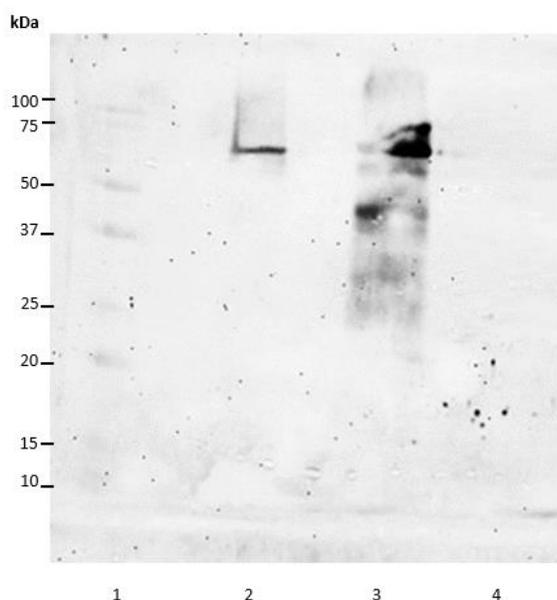
La proteína TTC-RBD replegada se cuantificó mediante densitometría (Figura 6) empleando una curva estándar de BSA (50-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y un análisis con el software ImageJ. La concentración de TTC-RBD fue de 51.93  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con un rendimiento de 194.7  $\mu\text{g}$  de proteína replegada pura por litro de cultivo.



**Figura 6.** Densitometría para determinar la concentración de TTC-RBD. Carriles: 1–5, curva estándar de BSA (50, 100, 150, 200, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente); 6, muestra recuperada tras la purificación y replegamiento de la proteína.

## 7.5 Análisis por Western Blot

La proteína TTC-RBD purificada y replegada fue reconocida por el anticuerpo contra la toxina de *Clostridium tetani*. Al realizarse un ensayo de Western blot, en el que se observó la banda inmunoreactiva de aproximadamente 70 kDa, lo cual corresponde al peso teórico de la proteína TTC-RBD (Figura 7). Este resultado comprueba la integridad de la proteína y el reconocimiento de determinantes antigénicos del acarreador.

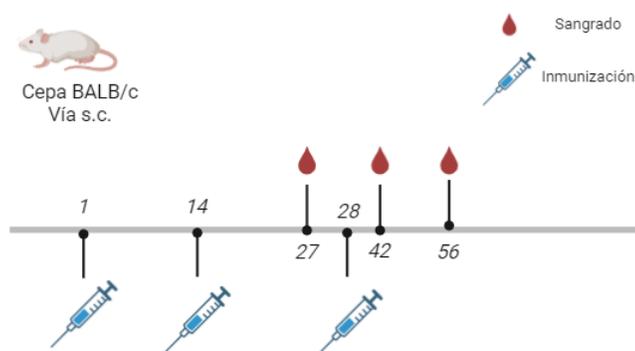


**Figura 7.** Análisis por Western blot de la proteína TTC-RBD purificada. Se empleó un anticuerpo anti-TTC. Carriles: 1, marcador de peso molecular; 2, proteína TTC-RBD purificada y replegada; 3, fracción S5 obtenida tras la extracción de cuerpos de inclusión; 4, control negativo.

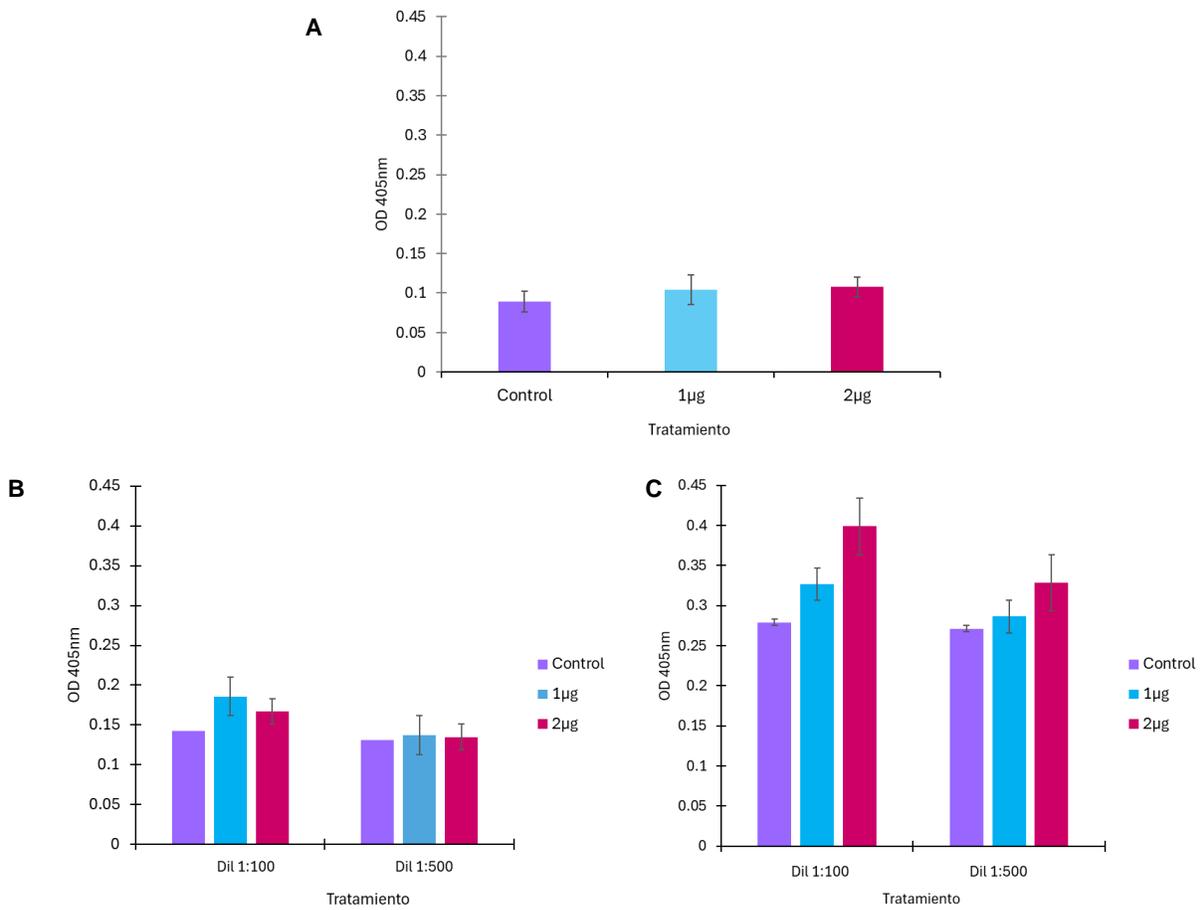
## 7.6 Pruebas de inmunogenicidad

La inmunogenicidad de TTC-RBD fue determinada después de administrar a ratones BALB/c formulaciones que correspondieron a 200  $\mu$ L de una dosis de 1  $\mu$ g o 2  $\mu$ g de antígeno, empleando Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante (Figura 8). Al evaluar los niveles de IgG anti-RBD, se observó la ausencia de respuesta de IgG tras las primeras dos dosis (día 27), independientemente del uso de Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante (Figura 9-C). Por el contrario, el análisis de los niveles de anticuerpos al día 42, tras haber recibido 3 inmunizaciones, revela una respuesta humoral positiva contra RBD, la cual fue de mayor magnitud para el grupo que recibió la dosis de 1  $\mu$ g (Figura 9-A). Por otro lado, se encontró una respuesta más alta de IgG anti-RBD en el grupo de 2  $\mu$ g al día 56 (Figura 9-B).

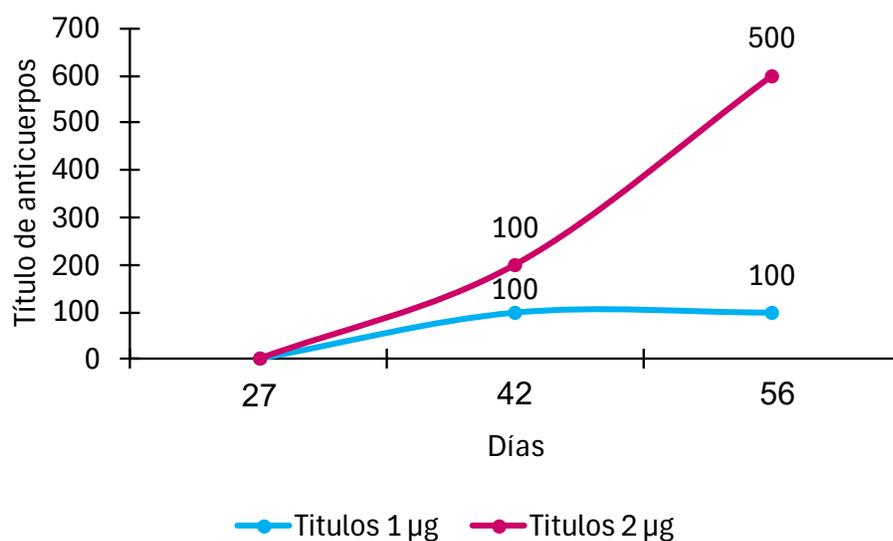
La Figura 10 muestra los títulos de anticuerpos IgG anti-RBD medidos durante los tres períodos de sangrado. Se observa que el grupo evaluado con dosis de 2  $\mu$ g alcanzó títulos de 500 en el día 56, es decir, dos semanas después de haber concluido el esquema de inmunización.



**Figura 8.** Esquema de inmunización para determinar la inmunogenicidad de TTC-RBD en un modelo murino. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea a los días 1, 14 y 28, y se extrajeron muestras de sangre los días 27, 42 y 56.



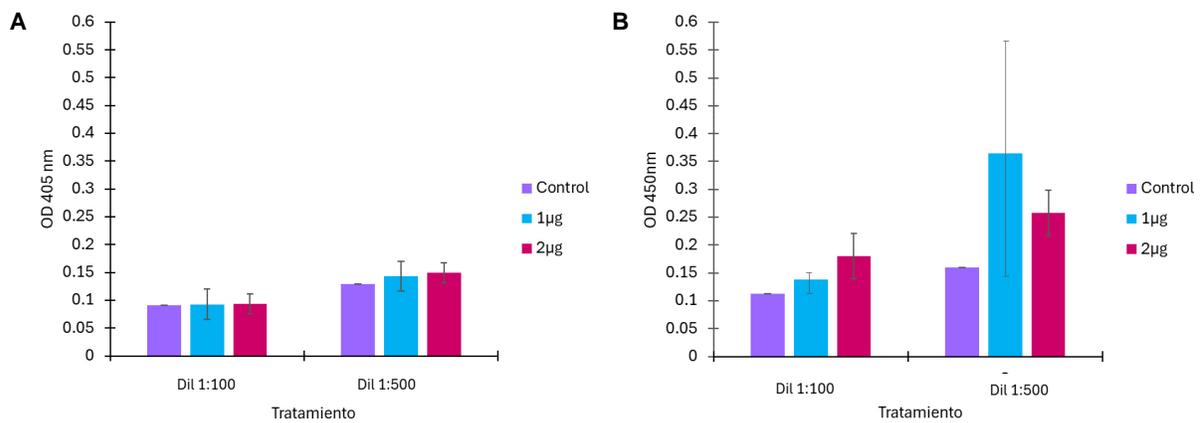
**Figura 9.** **A)** Muestras obtenidas el día 27; **B)** Muestras obtenidas el día 42; **C)** Muestras obtenidas el día 56. Los niveles de IgG se midieron mediante ELISA utilizando RBD como antígeno diana. Los tratamientos para cada grupo experimental se describen en la Tabla 1.



**Figura 10. Títulos de anticuerpos.** Títulos de anticuerpos IgG anti-RBD obtenidos durante los días de sangrado 27, 42 y 56. La línea azul muestra los títulos generados en el grupo con dosis de 1 µg; la línea rosa muestra los títulos generados en el grupo con dosis de 2 µg. Los títulos de anticuerpos IgG se determinaron como el recíproco de la dilución más alta de sueros con un valor medio de OD por encima del valor de OD del grupo tratado con el vehículo solo (control negativo) más 2 X SD (Desviación estándar).

## 7.7 TTC-RBD muestra una mayor respuesta frente a la proteína S de la variante Delta

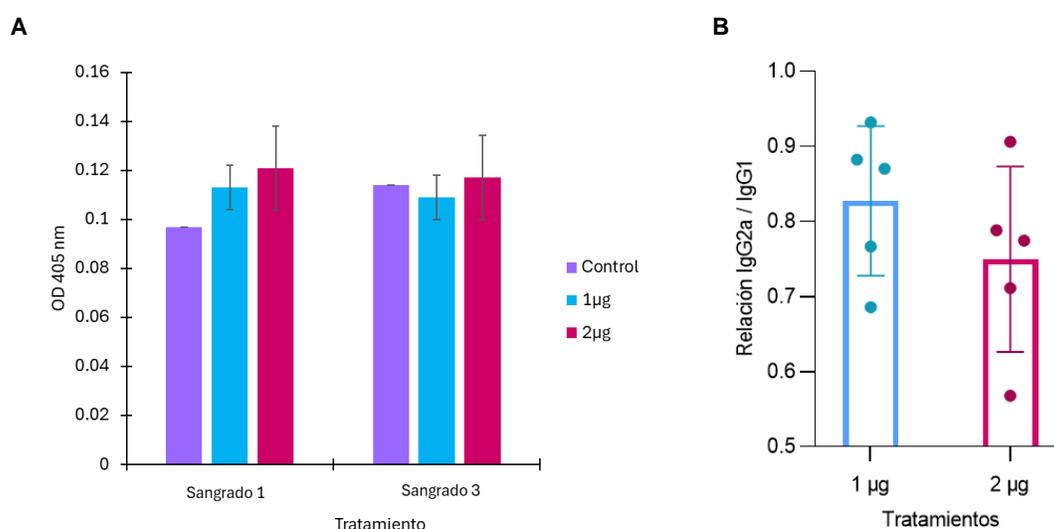
Se evaluó la capacidad del antígeno TTC-RBD para generar anticuerpos IgG capaces de reconocer a la proteína S, tanto de la variante Delta como de la variante Ómicron. TTC-RBD indujo una respuesta de IgG más alta frente a la proteína S – Delta (Figura 11).



**Figura 11. A)** Muestras obtenidas el día 42, donde se utilizó la proteína S, variante Ómicron, como antígeno diana; **B)** Muestras obtenidas el día 42, donde se utilizó la proteína S, variante Delta, como antígeno diana. Los niveles de IgG1 se midieron en muestras de suero a diluciones 1:100 y 1:500 mediante ELISA. Los tratamientos para cada grupo experimental se describen en la Tabla 1.

## 7.8 Análisis de IgM y subclases

Se evaluaron los niveles de IgM, así como de las subclases de IgG para evidenciar el tipo de respuesta inmune que TTC-RBD induce en ratones. La Figura 12-A muestra un decremento en los niveles de IgM entre los sangrados 1 y 3 (días 27 y 56). Al analizar la relación de subclases IgG2a / IgG1 se encontró que la relación IgG2a / IgG1 para la dosis de 1  $\mu\text{g}$  fue de 0.82, mientras que para la dosis de 2  $\mu\text{g}$  fue de 0.75 (Figura 12-B). Estos resultados sugieren la inducción de una respuesta inmune con sesgo Th2.



**Figura 12. A)** Niveles de IgM; **B)** Relación IgG2a / IgG1. El análisis se realizó en muestras de suero de los días 27 y 56 (dilución 1:100) mediante ELISA utilizando a la proteína S como antígeno diana. Los tratamientos para cada grupo experimental se describen en la Tabla 1.

## 8 Discusión

En este estudio se produjo en *E. coli* la proteína quimérica TTC-RBD como un enfoque para la obtención de un candidato vacunal contra SARS-CoV-2 de fácil producción en un sistema simplificado respecto a los enfoques empleados por otros grupos en los

que se realiza una conjugación química del antígeno con el acarreador, caso de la vacuna desarrollada en Cuba, denominada Soberana.

La proteína TTC-RBD se produjo en *E. coli* recombinante en forma de cuerpos de inclusión, lo cual es común cuando se utilizan plataformas bacterianas de expresión en combinación con promotores fuertes. Se ha descrito que cuando el nivel de expresión de proteínas supera el 2% del total de proteínas celulares ocurre la formación de cuerpos de inclusión (A. Singh et al., 2015). Además, otros factores que favorecen una alta tasa de expresión de proteínas recombinantes (como una temperatura de inducción elevada, altas concentraciones de inductor o presencia de un promotor fuerte) aumentan las posibilidades de que la proteína expresada se agregue (A. Singh et al., 2015).

Cuando una bacteria es forzada a producir proteínas recombinantes a altos niveles experimenta un alto estrés metabólico, lo que impide que la bacteria tenga la capacidad de plegar adecuadamente las grandes cantidades de proteína recombinante producida (S. M. Singh & Panda, 2005). La problemática tras la generación de cuerpos de inclusión es que estos impiden que la proteína expresada se pliegue correctamente, comprometiendo su actividad biológica. Lo anterior impone la necesidad de solubilizar los cuerpos de inclusión mediante el uso de altas concentraciones de sales caotrópicas como la urea, lo que resulta en una proteína desnaturalizada que debe ser sometida a un proceso de replegamiento (Baneyx & Mujacic, 2004), el cual requiere de un proceso de optimización para lograr que la proteína no se agregue nuevamente y más bien se logre su adecuado plegamiento para obtener una proteína estable y funcional (Park et al., 2018).

El RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 contiene cuatro enlaces disulfuro en su forma nativa, los cuales contribuyen a estabilizar su estructura (lámina  $\beta$ ) y conectar las asas al motivo de unión al receptor (RBM). Al momento de expresar RBD en *E. coli* es

posible observar enlaces disulfuro no nativos, los cuales conducen a una proteína mal plegada que termina expresándose en cuerpos de inclusión (Brindha & Kuroda, 2022).

Si bien, la cepa de *E. coli* utilizada (Rosetta (DE3)) está diseñada para mejorar la producción de proteínas a partir de genes diana clonados en vectores pET, siendo este el caso de la proteína TTC-RBD, existen otras cepas con la capacidad de producir proteínas mejor plegadas. En 2019 se realizó un estudio comparando a Rosetta (DE3) con otras cepas al producir la inmunotoxina DAB 389 IL-2 (Denileukin diftitox). En este estudio se explica que un enlace disulfuro puede otorgar propiedades estructurales, catalíticas y de señalización a una proteína específica. Sin embargo, la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) no puede formar enlaces disulfuro en su medio citoplasmático reductor, pero las cepas Rosetta-gami, Origami y Shuffle son cepas bacterianas adecuadas para la formación intacta de enlaces disulfuro en el citoplasma debido a las mutaciones presentes en las enzimas glutaredoxina reductasa ( $gor^-$ ) y tioredoxina reductasa ( $trxb^-$ ) (Zarkar et al., 2020). Otro grupo de investigación reportó la producción de la proteína RBD Omicron BA.5 del SARS-CoV-2 en *E. coli* T7 SHuffle a baja temperatura y con alta aireación, obteniendo una proteína con gran rendimiento, alta pureza, enlaces disulfuro correctos y propiedades bioquímicas y biofísicas similares a las nativas (Wongnak et al., 2023). Esto pone de relieve la importancia de experimentar con otras cepas para optimizar la producción de TTC-RBD.

Atendiendo a las problemáticas generadas por los cuerpos de inclusión, tras la expresión en *E. coli*, una alternativa a considerar es el empleo de otro tipo de plataformas de expresión. Se ha reportado que el empleo de organismos eucariotas, como las levaduras y las células de mamífero para la expresión de proteínas ofrece ventajas importantes en cuanto a modificaciones post-traduccionales, plegamiento, secreción y estabilidad, favoreciendo la actividad biológica y la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas y vacunas (Daly & Hearn, 2005; Khan, 2013). Un claro ejemplo es la vacuna SOBERANA02 que se basa en la proteína RBD conjugada con el toxoide tetánico (TT) (una construcción similar a TTC-RBD) producida en células CHO-K1 y

que mostró una respuesta humoral temprana, elevada y neutralizante, lo que permitió su avance a ensayos clínicos en humanos (Valdés Balbín et al., 2023).

En el caso de la vacuna Abdala, la proteína recombinante C-RBD-H6 PP fue producida en la levadura *Pichia pastoris*. Esta proteína se expresó de manera soluble, además de mostrar alta afinidad de unión al receptor de ACE2. C-RBD-H6 PP también mostró una alta reactividad con sueros de personas convalecientes y de vacunados de Pfizer-BioNTech o Sputnik V (Limonta-Fernández et al., 2022). Las levaduras han demostrado ser una plataforma de expresión prometedora, ofreciendo la posibilidad de producir proteínas solubles bajo los mínimos requerimientos de mantenimiento. Diversas vacunas aprobadas se han producido en este organismo, tal es el caso de la vacuna contra la Hepatitis B y la vacuna acaricida GAVAC aislada de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (García-Suárez, 2021).

La proteína RBD del SARS-CoV-2 es una proteína pequeña (aproximadamente 32 kDa) que posee una inmunogenicidad limitada cuando se utiliza por sí sola. Debido a esto se han diseñado estrategias para mejorar esta inmunogenicidad. La proteína TTC-RBD es una construcción en la que se incluye como acarreador al fragmento C de la Toxina Tetánica. Otros grupos de investigación se han dado a la tarea de fusionar al RBD con otros acarreadores y analizar la respuesta inmunológica que éstos inducen. La  $\alpha$ -hemolisina (Hla) es una toxina secretada por *Staphylococcus aureus* capaz de autoensamblarse a la membrana celular del huésped, provocando lisis y muerte celular. Se descubrió que un mutante de Hla (mHla) conserva la capacidad de autoensamblaje, pero sin la actividad biológica característica, lo que la convierte en una alternativa de estudio como proteína acarreadora de ayuda para el ensamblaje de antígenos, mejorando la inmunogenicidad y eficacia protectora (Zou et al., 2021). Otro ejemplo es la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli* que, en su forma pentamérica, se une a los receptores gangliósidos GM<sub>1</sub> presentes en la superficie de células de mamíferos. La unión a este tipo de receptores permite

incrementar la respuesta inmune en el organismo, así como la actividad de unión al receptor (Kaushik et al., 2013).

La evaluación de la inmunogenicidad de TTC-RBD realizada en ratones reveló que el antígeno es capaz de inducir una seroconversión hacia la proteína espícula tras la administración de 3 dosis usando  $\text{Al(OH)}_3$  como adyuvante. El hecho de requerir tres dosis para inducir seroconversión y de que la medida de los títulos fue de 500 indica que la inmunogenicidad de esta formulación es modesta. El  $\text{Al(OH)}_3$  se eligió como el adyuvante en esta evaluación inicial debido a que es ampliamente usado en vacunas aprobadas para su uso en humanos. Un estudio reveló la posibilidad de modificar las partículas de  $\text{Al(OH)}_3$  para administrar al antígeno unido a éstas y así asegurar una liberación sostenida hacia los ganglios linfáticos. Esto se logra al unir los inmunógenos a las partículas de  $\text{Al(OH)}_3$  mediante una técnica de introducción de enlaces peptídicos portadores de fosfato (Moyer et al., 2020).

Existen adyuvantes ya reportados que podrían mejorar la respuesta humoral inducida por TTC-RBD. Por ejemplo, (Nanishi et al. 2022) reportaron que la adición del adyuvante CpG-ODN 2395, el cual es un CpG agonista del TLR9, mejora la inmunogenicidad de una vacuna basada en el RBD producido en *P. pastoris*. Los TLR, presentes en varias células del sistema inmunológico, juegan un papel crucial en la respuesta inmunitaria innata al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como componentes de las paredes celulares bacterianas o ácidos nucleicos virales. Cuando un TLR se activa, desencadena una serie de señales que afectan la expresión de genes relacionados con la inmunidad y la inflamación, incluyendo la producción de citocinas. Esto permite regular de manera positiva tanto las respuestas inmunitarias innatas como adaptativas. Los agonistas de TLR se han integrado con éxito en vacunas contra el virus de la hepatitis B (TLR4 y TLR9) y el virus del papiloma humano (TLR4 y TLR9), así como en terapias inmunológicas contra el cáncer (TLR7/8) (Rudicell et al., 2019). Por lo tanto, una perspectiva clave es la

evaluación de una formulación que contenga tanto hidróxido de aluminio como un agonista de TLRs como adyuvantes.

## 9 Conclusiones

La aparición de la variante delta, que adquirió gran relevancia epidemiológica dada su marcada patogenicidad y transmisibilidad, impulsó a nuestro equipo de investigación a diseñar la proteína quimérica TTC-RBD que porta la variante delta. La expresión de este nuevo antígeno en *E. coli* resultó viable, y condujo a su recuperación como una proteína insoluble con rendimientos de 195 µg/L de cultivo inicial, en términos de proteína purificada replegada. Las condiciones previamente estandarizadas dentro del laboratorio permitieron replegar con éxito el antígeno TTC-RBD, lo que sugiere que los métodos desarrollados son sólidos y pueden replicarse. Sin embargo, es conveniente reevaluar puntos específicos de la metodología para mejorar los rendimientos de producción. Posiblemente escalar esta producción a un biorreactor contribuiría a mejorar esta problemática. La proteína TTC-RBD obtenida es inmunogénica, dado que fue capaz de generar respuestas de IgG específicas. Sin embargo, la inmunogenicidad de TTC-RBD es modesta dado que los títulos fueron de 1:500. La perspectiva para mejorar la inmunogenicidad es evaluar otros adyuvantes.

## 10 Bibliografía

1. Anka, A. U., Tahir, M. I., Abubakar, S. D., Alsabbagh, M., Zian, Z., Hamedifar, H., Sabzevari, A., & Azizi, G. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(4), e12998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/sji.12998>
2. Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>

3. Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J.-E., Choi, J., Oh, Y., Cho, Y., & Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, *40*(11), 1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
4. Bayart, C., Mularoni, A., Hemmani, N., Kerachni, S., Jose, J., Gouet, P., Paladino, J., & Le Borgne, M. (2022). Tetanus Toxin Fragment C: Structure, Drug Discovery Research and Production. *Pharmaceuticals*, *15*(6). <https://doi.org/10.3390/ph15060756>
5. Bessette, P. H., Åslund, F., Beckwith, J., & Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(24), 13703–13708. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13703>
6. Bill, R. M. (2015). Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *67*(3), 319–328. <https://doi.org/10.1111/jphp.12353>
7. Brandt, A. A. M. L., Rodrigues-da-Silva, R. N., Lima-Junior, J. C., Alves, C. R., & de Souza-Silva, F. (2021). Combining Well-Tempered Metadynamics Simulation and SPR Assays to Characterize the Binding Mechanism of the Universal T-Lymphocyte Tetanus Toxin Epitope TT830-843. *BioMed Research International*, *2021*(1), 5568980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/5568980>
8. Brindha, S., & Kuroda, Y. (2022). A Multi-Disulfide Receptor-Binding Domain (RBD) of the SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in E. coli Using a SEP-Tag Produces Antisera Interacting with the Mammalian Cell Expressed Spike (S1) Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031703>
9. Burgess, R. R., & Fraenkel-Conrat, H. (1990). *Protein purification: Principles and practice* (Springer, Ed.).
10. Canaves, J. M., Page, R., Wilson, I. A., & Stevens, R. C. (2004). Protein Biophysical Properties that Correlate with Crystallization Success in

- Thermotoga maritima: Maximum Clustering Strategy for Structural Genomics. *Journal of Molecular Biology*, 344(4), 977–991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.076>
11. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2023, septiembre). *Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2*. Revisado en febrero, 2024 en <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#>
  12. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud *Resumen de la situación*. (2024). [www.paho.org](http://www.paho.org)
  13. Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, 33(4), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
  14. Corrado, A., Toppazzini, M., Vadi, A., Malzone, C., Galasso, R., Donati, A., De Ricco, R., & Berti, F. (2024). Analytical Insights into Protein–Alum Interactions and Their Impact on Conformational Epitope. *Pharmaceutics*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030420>
  15. Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmr.687>
  16. Edouard Mathieu, Hannah Ritchie, Lucas Rodés-Guirao, Cameron Appel, Charlie Giattino, Joe Hasell, Bobbie Macdonald, Saloni Dattani, Diana Beltekian, Esteban Ortiz-Ospina, & Max Roser. (2020). *OurWorldInData.org*. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Revisado en febrero, 2024 <https://ourworldindata.org/coronavirus>
  17. Fiolet, T., Kherabi, Y., MacDonald, C.-J., Ghosn, J., & Peiffer-Smadja, N. (2022). Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(2), 202–221. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>

18. Fondo de las Naciones Unidas para los Niños [UNICEF]. (2020). *How COVID-19 is changing the world: a statistical perspective*.
19. Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in. *Current Protocols in Protein Science*, 61(1), 5.24.1-5.24.29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
20. Gang, L., Xuejuan, C., & Anlong, X. (2024). Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 508–509. <https://doi.org/10.1056/NEJM200307313490520>
21. García-Suárez, J. (2021). Usos de la levadura *Pichia pastoris* en la producción de proteínas recombinantes. En *VacciMonitor* (Vol. 30, Número 3). Revisado en junio, 2024 en [www.vaccimonitor.finlay.edu.cu](http://www.vaccimonitor.finlay.edu.cu):<https://orcid.org/0000-0003-2242-8318>LourdesZumalacárregui-de-Cárdenas2ORCID:<https://orcid.org/0000-0001-6921-737X>ZeilaSantana-Vázquez3ORCID:<https://orcid.org/0000-0002-1761-0652>
22. Gottesman, S. (1990). [11] Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. En *Methods in Enzymology* (Vol. 185, pp. 119–129). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85013-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85013-E)
23. Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., ... SPINE2-Complexes. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
24. Gupta, T., & Gupta, S. K. (2020). Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *International Immunopharmacology*, 86, 106717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>
25. Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshnev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>

26. He, X., Lau, E. H. Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., ... Leung, G. M. (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*, 26(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
27. Ilona, G., Stephanie, B., A, M. M., Paul, A., Elizabeth, S., Susanne, P., Imke, S., Solomon, T. T., Yuxian, H., Kerstin, G., Daniela, N., Heike, S., Christian, D., & Stefan, P. (2011). Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, 85(9), 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/jvi.02232-10>
28. Instituto Finlay de Vacunas. (2021). *Estudio Fase I, abierto, secuencial y adaptativo, para evaluar la seguridad, reactogenicidad y explorar la inmunogenicidad, del Candidato Vacunal profiláctico FINLAY-FR-2 anti SARS-CoV-2* Soberana 02. [https://rpcec.sld.cu/sites/default/files/Version%20Final%20IF\\_EC\\_Soberana02\\_3%20junio.pdf](https://rpcec.sld.cu/sites/default/files/Version%20Final%20IF_EC_Soberana02_3%20junio.pdf)
29. Instituto Mexicano del Seguro Social. (2021). *Algoritmos interinos para la atención del COVID-19*.
30. Jazini, M., & Herwig, C. (2013). Effects of temperature shifts and oscillations on recombinant protein production expressed in *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), 1571–1577. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0927-1>
31. Jeyanathan, M., Afkhami, S., Smail, F., Miller, M. S., Lichty, B. D., & Xing, Z. (2020). Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 615–632. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00434-6>
32. Joséphine Cheng, Jérôme Dalin, Cory Peterson, & Valentin Delor. (2023, mayo 1). *Cost Modeling Vaccine Manufacturing: Estimate Production Costs for mRNA and other Vaccine Modalities*. Revisado en julio, 2024 en

<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/vaccine-manufacturing/cost-modeling-vaccine-manufacturing>

33. Kaushik, H., Deshmukh, S., Dayal Mathur, D., Tiwari, A., & Garg, L. C. (2013). *Hypothesis Recombinant expression of in silico identified B-cell epitope of epsilon toxin of Clostridium perfringens in translational fusion with a carrier protein*. Revisado en abril, 2024 en [www.bioinformation.net](http://www.bioinformation.net)
34. Khan, K. H. (2013). Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
35. Klock, H. E., Koesema, E. J., Knuth, M. W., & Lesley, S. A. (2008). Combining the polymerase incomplete primer extension method for cloning and mutagenesis with microscreening to accelerate structural genomics efforts. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(2), 982–994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.21786>
36. Laotee, S., Duangkaew, M., Jivapetthai, A., Tharakhet, K., Kaewpang, P., Prompetchara, E., Phumiamorn, S., Sapsutthipas, S., Trisiriwanich, S., Somsaard, T., Roytrakul, S., Duangkhae, P., Ongpipattanakul, B., Limpikirati, P., Pornputtpong, N., & Arunmanee, W. (2023). CHO-produced RBD-Fc subunit vaccines with alternative adjuvants generate immune responses against SARS-CoV-2. *PLOS ONE*, 18(7), e0288486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288486>
37. Liljeqvist, S., & Ståhl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73(1), 1–33. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00107-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00107-8)
38. Limonta-Fernández, M., Chinea-Santiago, G., Martín-Dunn, A. M., Gonzalez-Roche, D., Bequet-Romero, M., Marquez-Perera, G., González-Moya, I., Canaan-Haden-Ayala, C., Cabrales-Rico, A., Espinosa-Rodríguez, L. A., Ramos-Gómez, Y., Andujar-Martínez, I., González-López, L. J., de la Iglesia,

- M. P., Zamora-Sanchez, J., Cruz-Sui, O., Lemos-Pérez, G., Cabrera-Herrera, G., Valdes-Hernández, J., ... Guillén-Nieto, G. (2022). An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *New Biotechnology*, 72, 11–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.08.002>
39. Liu, Z., VanBlargan, L. A., Bloyet, L.-M., Rothlauf, P. W., Chen, R. E., Stumpf, S., Zhao, H., Errico, J. M., Theel, E. S., Liebeskind, M. J., Alford, B., Buchser, W. J., Ellebedy, A. H., Fremont, D. H., Diamond, M. S., & Whelan, S. P. J. (2021). Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, 29(3), 477-488.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.014>
40. Makino, T., Skretas, G., & Georgiou, G. (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-32>
41. Martinez, S. (2023, febrero 7). *México cómo vamos. ¿Cómo vamos a tres años del COVID-19? Revisado en junio, 2024 en* <https://mexicocomovamos.mx/escuela-de-economia/mercado-laboral/2023/02/como-vamos-a-tres-anos-del-covid-19/>
42. Mast, T. C., Kierstead, L., Gupta, S. B., Nikas, A. A., Kallas, E. G., Novitsky, V., Mbewe, B., Pitisuttithum, P., Schechter, M., Vardas, E., Wolfe, N. D., Aste-Amezaga, M., Casimiro, D. R., Coplan, P., Straus, W. L., & Shiver, J. W. (2010). International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: Correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*, 28(4), 950–957. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.145>
43. McGonagle, D., Bridgwood, C., Ramanan, A. V., Meaney, J. F. M., & Watad, A. (2021). COVID-19 vasculitis and novel vasculitis mimics. *The Lancet Rheumatology*, 3(3), e224–e233. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30420-3](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30420-3)

44. Mohammed, R. N., Tamjidifar, R., Rahman, H. S., Adili, A., Ghoreishizadeh, S., Saeedi, H., Thangavelu, L., Shomali, N., Aslaminabad, R., Marofi, F., Tahavvori, M., Danshina, S., Akbari, M., & Ercan, G. (2022). A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00856-w>
45. Moyer, T. J., Kato, Y., Abraham, W., Chang, J. Y. H., Kulp, D. W., Watson, N., Turner, H. L., Menis, S., Abbott, R. K., Bhiman, J. N., Melo, M. B., Simon, H. A., Herrera-De la Mata, S., Liang, S., Seumois, G., Agarwal, Y., Li, N., Burton, D. R., Ward, A. B., ... Irvine, D. J. (2020). Engineered immunogen binding to alum adjuvant enhances humoral immunity. *Nature Medicine*, 26(3), 430–440. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0753-3>
46. Nanishi, E., Borriello, F., O'Meara, T. R., McGrath, M. E., Saito, Y., Haupt, R. E., Seo, H.-S., van Haren, S. D., Cavazzoni, C. B., Brook, B., Barman, S., Chen, J., Diray-Arce, J., Doss-Gollin, S., De Leon, M., Prevost-Reilly, A., Chew, K., Menon, M., Song, K., ... Dowling, D. J. (2024). An aluminum hydroxide:CpG adjuvant enhances protection elicited by a SARS-CoV-2 receptor binding domain vaccine in aged mice. *Science Translational Medicine*, 14(629), eabj5305. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj5305>
47. Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
48. Naseer, S., Khalid, S., Parveen, S., Abbass, K., Song, H., & Achim, M. V. (2023). COVID-19 outbreak: Impact on global economy. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1009393>
49. Nejat, R., Torshizi, M. F., & Najafi, D. J. (2023). S Protein, ACE2 and Host Cell Proteases in SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity; Is Soluble ACE2 a Two

- Blade Sword? A Narrative Review. *Vaccines*, 11(2).  
<https://doi.org/10.3390/vaccines11020204>
50. O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2010). Sensing and Signaling in Antiviral Innate Immunity. *Current Biology*, 20(7), R328–R333.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.044>
51. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2024). *Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud Resumen de la situación*. Revisado en febrero, 2024, en [www.paho.org](http://www.paho.org)
52. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Tan, T. S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., Suzuki, T., & Tokunaga, K. (2020). Naturally mutated spike proteins of SARS-CoV-2 variants show differential levels of cell entry. *bioRxiv*, 2020.06.15.151779. <https://doi.org/10.1101/2020.06.15.151779>
53. Pan American Health Organization [PAHO]. (2024, junio 28). *Situación del SARS-CoV2 en la región de las Américas*. Revisado en junio, 2024, en <https://www.paho.org/en/covid-19-weekly-updates-region-americas>
54. Papanikolaou, V., Chrysovergis, A., Ragos, V., Tsiambas, E., Katsinis, S., Manoli, A., Papouliakos, S., Roukas, D., Mastronikolis, S., Peschos, D., Batistatou, A., Kyrodimos, E., & Mastronikolis, N. (2022). From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. *Gene*, 814, 146134.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146134>
55. Park, A.-R., Jang, S.-W., Kim, J.-S., Park, Y.-G., Koo, B.-S., & Lee, H.-C. (2018). Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in E.coli. *PLOS ONE*, 13(7), e0201060.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201060>
56. Pasquale, A. Di, Preiss, S., Silva, F. T. Da, & Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320–343.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
57. Peti, W., & Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. *Protein Expression and*

- Purification*, 51(1), 1–10.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.06.024>
58. Pinazo-Hernandis, S. (2020). Impacto psicosocial de la COVID-19 en las personas mayores: problemas y retos. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*, 55(5), 249–252. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2020.05.006>
59. Plotkin, S., Robinson, J. M., Cunningham, G., Iqbal, R., & Larsen, S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing – An overview. *Vaccine*, 35(33), 4064–4071.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.003>
60. Polatoğlu, I., Oncu-Oner, T., Dalman, I., & Ozdogan, S. (2023). COVID-19 in early 2023: Structure, replication mechanism, variants of SARS-CoV-2, diagnostic tests, and vaccine & drug development studies. *MedComm*, 4(2), e228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mco2.228>
61. Quandt, J., Muik, A., Salisch, N., Lui, B. G., Lutz, S., Krüger, K., Wallisch, A.-K., Adams-Quack, P., Bacher, M., Finlayson, A., Ozhelvaci, O., Vogler, I., Grikscheit, K., Hoehl, S., Goetsch, U., Ciesek, S., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2024). Omicron BA.1 breakthrough infection drives cross-variant neutralization and memory B cell formation against conserved epitopes. *Science Immunology*, 7(75), eabq2427.  
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq2427>
62. Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Albayat, H., Alwarthan, S., Alhajri, M., Najim, M. A., AlShehail, B. M., Al-Adsani, W., Alghadeer, A., Abduljabbar, W. A., Alotaibi, N., Alsalman, J., Gorab, A. H., Almaghrabi, R. S., Zaidan, A. A., Aldossary, S., Alissa, M., Alburaiqy, L. M., Alsalim, F. M., ... Dhawan, M. (2023). Variants of SARS-CoV-2: Influences on the Vaccines’s Effectiveness and Possible Strategies to Overcome Their Consequences. *Medicina*, 59(3). <https://doi.org/10.3390/medicina59030507>
63. Rambaut, A., Holmes, E. C., O’Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for

- SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
64. Rawat, K., Kumari, P., & Saha, L. (2021). COVID-19 vaccine: A recent update in pipeline vaccines, their design and development strategies. *European Journal of Pharmacology*, 892, 173751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173751>
65. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2014.00172>
66. Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 109, 102433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>
67. Rudicell, R. S., Garinot, M., Kanekiyo, M., Kamp, H. D., Swanson, K., Chou, T., Dai, S., Bedel, O., Simard, D., Gillespie, R. A., Yang, K., Reardon, M., Avila, L. Z., Besev, M., Dhal, P. K., Dharanipragada, R., Zheng, L., Duan, X., Dinapoli, J., ... Nabel, G. J. (2019). Comparison of adjuvants to optimize influenza neutralizing antibody responses. *Vaccine*, 37(42), 6208–6220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.030>
68. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.; 3rd Ed).
69. Sanchez, J. M. (2021, agosto 11). *Federal Reserve Bank of St. Louis*. COVID-19's Economic Impact around the World. <https://www.stlouisfed.org/about-us/contact-us>
70. Sanjuán, R., & Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
71. Sefik, E., Qu, R., Junqueira, C., Kaffe, E., Mirza, H., Zhao, J., Brewer, J. R., Han, A., Steach, H. R., Israelow, B., Blackburn, H. N., Velazquez, S. E., Chen, Y. G., Halene, S., Iwasaki, A., Meffre, E., Nussenzweig, M., Lieberman, J.,

- Wilén, C. B., ... Flavell, R. A. (2022). Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*, 606(7914), 585–593. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>
72. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
73. Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
74. Solis-Andrade, K. I., Gonzalez-Ortega, O., Govea-Alonso, D. O., Comas-Garcia, M., & Rosales-Mendoza, S. (2022). Production and Purification of LTB-RBD: A Potential Antigen for Mucosal Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/vaccines10101759>
75. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
76. Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
77. Torres-Cantero, A. M., Álvarez León, E. E., Morán-Sánchez, I., San Lázaro Campillo, I., Bernal Morell, E., Hernández Pereña, M., & Martínez-Morata, I. (2022). El impacto de la pandemia de COVID-19 sobre la salud. Informe SESPAS 2022. *Gaceta Sanitaria*, 36, S4–S12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.02.008>
78. United Nations, & Economic Commission for Latin America and the Caribbean [ECLAC]. (2020). *Report on the economic impact of coronavirus disease (COVID-19) on Latin America and the Caribbean*. Revisado en febrero, 2024

en <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/0a1dcb1c-f163-414e-803b-d3f57759de01/content>

79. Valdés Balbín, Y., Santana Mederos, D., Quintero Moreno, L. M., Fernández Castillo, S., Rodríguez Noda, L. M., Sánchez Ramírez, B., Pérez Nicado, R., Acosta Grogues, C. O., Méndez Gómez, Y., García Ricardo, M., Hernández García, T., Bergado Báez, G., Pi Estopiñán, F., Valdés Zayas, A., Carmenate Portilla, T., Ramírez González, U. J., Oliva Hernández, R., Soubal Mora, J. P., Garrido Arteaga, R., ... Verez Bencomo, V. G. (2023). Diseño, desarrollo y evaluación preclínica de SOBERANA®02: una vacuna cubana contra COVID-19. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 13.
80. Vasquez, M. (2020). STUDENT ESSAY The Disproportional Impact of COVID-19 on African Americans. *Health and Human Rights Journal*, 22/2, 299–307.
81. Verma, S., Patil, V. M., & Gupta, M. K. (2022). Mutation informatics: SARS-CoV-2 receptor-binding domain of the spike protein. *Drug Discovery Today*, 27(10), 103312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.06.012>
82. Wang, P., Casner, R. G., Nair, M. S., Wang, M., Yu, J., Cerutti, G., Liu, L., Kwong, P. D., Huang, Y., Shapiro, L., & Ho, D. D. (2021). Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, 29(5), 747-751.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.007>
83. Wilding, K. M., Hunt, J. P., Wilkerson, J. W., Funk, P. J., Swensen, R. L., Carver, W. C., Christian, M. L., & Bundy, B. C. (2019). Endotoxin-Free E. coli-Based Cell-Free Protein Synthesis: Pre-Expression Endotoxin Removal Approaches for on-Demand Cancer Therapeutic Production. *Biotechnology Journal*, 14(3), 1800271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.201800271>
84. Wong-Arce, A., Gonzalez-Ortega, O., Romero-Maldonado, A., Miranda-López, A., García-Soto, M., Farfán-Castro, S., Betancourt-Mendiola, L., Teeravechyan, S., Srisutthisamphan, K., Comas-García, M., Solís Andrade, K. I., & Rosales-Mendoza, S. (2024). Production and Immunogenicity Assessment of LTP50: An Escherichia coli-Made Chimeric Antigen Targeting

- S1- and S2-Epitopes from the SARS-CoV-2/BA.5 Spike Protein. *Pharmaceuticals*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/ph17030302>
85. Wongnak, R., Brindha, S., Yoshizue, T., Onchaiya, S., Mizutani, K., & Kuroda, Y. (2023). *E. coli* production of a multi-disulfide bonded SARS-CoV-2 Omicron BA.5 RBD exhibiting native-like biochemical and biophysical properties. *Biophysics and Physicobiology*, 20(4). <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v20.0036>
86. World Health Organization. (2023). *XBB.1.5 Updated Risk Assessment, 20 June 2023*. Revisado en Febrero, 2024, en [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/20230620xbb.1.5.pdf?sfvrsn=fff6f686\\_3](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/20230620xbb.1.5.pdf?sfvrsn=fff6f686_3)
87. World Health Organization. (2024a). *Updated Risk Evaluation of JN.1, 09 February 2024*. Revisado en Marzo, 2024, en [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/health-topics/sars/jn.1-9-february-2024.pdf?sfvrsn=9a39d825\\_3](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/health-topics/sars/jn.1-9-february-2024.pdf?sfvrsn=9a39d825_3)
88. World Health Organization. (2024b, febrero 9). *Tracking SARS-CoV-2 variants*. Tracking SARS-CoV-2 variants. Revisado en Febrero, 2024, en <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
89. Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
90. Yildirim, M., & Ashraf, F. (2023). Fear of COVID-19, Coronavirus Anxiety, COVID-19 Burnout, and Resilience: Examining Psychometric Properties of COVID-19 Burnout Scale in Urdu. *Journal of Asian and African Studies*, 0(0), 00219096231153161. <https://doi.org/10.1177/00219096231153161>
91. Young, B. E., Fong, S.-W., Chan, Y.-H., Mak, T.-M., Ang, L. W., Anderson, D. E., Lee, C. Y.-P., Amrun, S. N., Lee, B., Goh, Y. S., Su, Y. C. F., Wei, W. E., Kalimuddin, S., Chai, L. Y. A., Pada, S., Tan, S. Y., Sun, L., Parthasarathy, P., Chen, Y. Y. C., ... Ng, L. F. P. (2020). Effects of a major deletion in the SARS-

- CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: an observational cohort study. *The Lancet*, 396(10251), 603–611. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31757-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31757-8)
92. Zarkar, N., Nasiri Khalili, M. A., Khodadadi, S., Zeinoddini, M., & Ahmadpour, F. (2020). Expression and purification of soluble and functional fusion protein DAB389IL-2 into the E. coli strain Rosetta-gami (DE3). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(2), 206–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bab.1833>
93. Zhu, Y., Sharma, L., & Chang, D. (2023). Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116131>
94. Zou, J., Jing, H., Zhang, X., Liu, Y., Zhao, Z., Duan, L., Yuan, Y., Chen, Z., Gou, Q., Xiong, Q., Li, S., Yang, F., Zeng, H., Zou, Q., & Zhang, J. (2021).  $\alpha$ -Hemolysin-Aided Oligomerization of the Spike Protein RBD Resulted in Improved Immunogenicity and Neutralization Against SARS-CoV-2 Variants. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.757691>

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO  
QUIMÉRICO CONTRA EL SARS-COV-2 BASADO EN EL  
DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR Y EL FRAGMENTO C DE  
LA TOXINA TETÁNICA

---

INFORME DE ORIGINALIDAD

---

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD

---

## 11 Glosario

1. **Activación biológica:** Proceso por el cual una molécula biológica se convierte en activa y funcional. Es decir, que adquiere la capacidad de interactuar con sistemas biológicos y producir un efecto fisiológico o farmacológico. Esto puede

aplicarse a moléculas, fármacos, proteínas, enzimas, etc. que son capaces de desencadenar una respuesta a nivel celular, tisular u orgánico.

2. **Adyuvante:** Sustancia que al unirse a un antígeno o al ser inyectada simultáneamente con este, aumenta su inmunogenicidad.
3. **Antígeno:** Moléculas extrañas o ajenas al organismo (generalmente proteínas o polisacáridos), que son reconocidas como "no propias" por el sistema inmune, capaces de desencadenar una respuesta inmune específica en el organismo.
4. **Autoensamblaje:** Capacidad de ciertas proteínas para ensamblarse por sí mismas en estructuras más complejas.
5. **Caso confirmado:** Persona que ha sido diagnosticada oficialmente como portadora de una enfermedad específica, confirmada mediante pruebas adecuadas.
6. **Cepa:** Variante de un microorganismo que tiene características genéticas o fenotípicas distintas de otras cepas de la misma especie.
7. **Codificante:** Que contiene la información genética para la síntesis de una proteína específica.
8. **Epidemia:** Enfermedad que afecta a muchas personas en una comunidad o región durante un período específico.
9. **Epidemiología:** Rama de la medicina y la salud pública que estudia la distribución, frecuencia, patrones y causas de las enfermedades en poblaciones humanas.
10. **Espícula:** Estructura en forma de púa que sobresale de la superficie de ciertos virus, como el SARS-CoV-2.
11. **Estrategias sanitarias:** Conjunto de acciones planificadas y organizadas orientadas a proteger y mejorar la salud pública, así como prevenir y controlar enfermedades.
12. **Exocitosis:** Proceso celular por el cual las vesículas liberan su contenido al exterior de la célula.
13. **Expresión de proteínas:** Proceso por el cual la información genética contenida en un gen se traduce en la síntesis de una proteína funcional.

14. **Filogenia:** Estudio de las relaciones evolutivas entre organismos, especialmente a través del análisis de secuencias genéticas.
15. **Formulación:** Composición específica de una vacuna o fármaco, incluyendo antígenos, adyuvantes y otros componentes.
16. **Fragmento:** Parte pequeña o porción de algo más grande, en este contexto, una porción específica de una molécula de ADN o proteína.
17. **Fusión:** Combinación de dos o más elementos en uno solo, en el contexto biológico, puede referirse a la fusión de proteínas o secuencias genéticas.
18. **Gangliósidos:** Tipo de lípido complejo que contiene carbohidratos y se encuentra en las membranas celulares, participando en diversas funciones biológicas.
19. **Incubación:** Mantenimiento de una muestra biológica en condiciones controladas para permitir que ocurran ciertos procesos, como la incubación de cultivos bacterianos.
20. **Inducción:** Estimulación de una respuesta biológica o proceso en un organismo.
21. **Inmunogenicidad:** Capacidad de un antígeno para inducir una respuesta inmune en un organismo.
22. **Mutación:** Cambio en el material genético de un organismo, que puede ocurrir de manera natural o debido a factores externos como radiación o agentes químicos.
23. **Pandemia:** Propagación mundial de una nueva enfermedad infecciosa que causa brotes en múltiples regiones y continentes, afectando a un gran número de personas.
24. **Plásmido:** Molécula de ADN pequeña y circular que se encuentra en algunas bacterias y se puede replicar independientemente del ADN cromosómico.
25. **Post-traduccionales:** Modificaciones que ocurren en las proteínas después de su síntesis, como la fosforilación o glicosilación.
26. **Prevalencia:** Proporción de individuos en una población que presentan una enfermedad o condición específica en un momento dado.

27. **Quimera:** Construcción genética que combina elementos de diferentes especies o fuentes.
28. **Recombinante:** Producto obtenido mediante la manipulación genética de un organismo para expresar una proteína o molécula específica.
29. **Replicasa:** Enzima que cataliza la replicación del material genético de virus de ARN.
30. **Replegamiento:** Proceso mediante el cual una proteína desnaturalizada recupera su estructura tridimensional activa y funcional.
31. **Secuenciación:** Determinación del orden de nucleótidos o aminoácidos en una molécula biológica.
32. **Seroconversión:** Cambio de ser negativo a positivo en la detección de anticuerpos específicos en el suero sanguíneo, indicativo de respuesta inmune.
33. **Solubilizar:** Convertir en forma soluble una sustancia que normalmente es insoluble.
34. **Transcripción:** Proceso mediante el cual se sintetiza ARN a partir de una secuencia de ADN.
35. **Transmembrana:** Proteína o estructura que atraviesa la membrana celular, desempeñando funciones de transporte, señalización, etc.
36. **Transmisibilidad:** Capacidad de una enfermedad para ser transmitida de una persona a otra, generalmente a través de agentes infecciosos como virus o bacterias.