



**Determinación de la inmunogenicidad de dos proteínas recombinantes S espiga (Spike)  
y RBD de SARS-CoV-2 en modelos animales**

Orozco Vega, Mishell Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel Ph. D

27 de enero del 2022

## Resultados del análisis Copyleaks



Identical Words	54
Words with Minor Changes	17
Paraphrased Words	35
Ommited Words	0

Firma



Firmado electrónicamente por:

**MARBEL  
TORRES**

**Torres Arias Marbel. PhD.**

C.C: 1802949154



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Determinación de la inmunogenicidad de dos proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD de SARS-CoV-2 en modelos animales**”, fue realizado por la señorita **Orozco Vega, Mishell Alejandra** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero 2022



Firma

Firmado electrónicamente por:

**MARBEL  
TORRES**

**Torres Arias Marbel. PhD.**

C.C: 1802949154



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Orozco Vega, Mishell Alejandra**, con cédula de ciudadanía N° 1719965145, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Determinación de la inmunogenicidad de dos proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD de SARS-CoV-2 en modelos animales”**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Firma

**Orozco Vega Mishell Alejandra**

C.C: 1719965145



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo, **Mishell Alejandra, Orozco Vega**, con cédula de ciudadanía N° 1719965145, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Determinación de la inmunogenicidad de dos proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD de SARS-CoV-2 en modelos animales”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Firma

**Orozco Vega Mishell Alejandra**

C.C: 1719965145

## DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi familia, a mis padres Carmen Vega y Marco Orozco , mis hermanos Camila y Andrés Orozco, mis abuelos Livia Gutiérrez y Telésforo Vega, mi tía abuela Teresa Gutiérrez, mis tías Susy, Dorothy y Galuth Vega, mi tíos Diego Gutiérrez, Guilmar Sisa, Juan Viteri y Scott Reese y mis primos Danny y Ariana Sisa, Mateo Gutiérrez y Andrés Osorio , quienes me han apoyado incondicionalmente en mi desarrollo personal y profesional enseñándome siempre a luchar por mis sueños y a superar los obstáculos con valentía.

*Mishell Alejandra Orozco Vega*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Carmen y Marco por brindarme su amor y paciencia en cada etapa de mi vida, por ser el mejor ejemplo de superación, por cada muestra de afecto y sobre todo por inculcar en mí los valores que hoy en día me han llevado a lograr todo lo que me he propuesto.

A mis abuelitos que son el mayor regalo que la vida me ha obsequiado y que se han dedicado en cuerpo y alma a mi crianza, gracias por su apoyo, por sus sabios consejos, por su cariño y por hacer mis días mejores.

A mis hermanos y primos, que me motivan a salir adelante y que me han regalado millones de aventuras y momentos inolvidables.

Al resto de mi familia ñaña Susy, mami Bu, mami Pochis, mami Tere, ñaño Diego, Juanito, ñaño Guilmar y Scott les agradezco por sus abrazos, sus besos, sus chistes, sus consuelos, su apoyo y protección. Cada uno de ustedes me llena de alegría y me da la fuerza necesaria para alcanzar mis metas.

A mis amigos Dome, Brandon y Gigi que son indudablemente personas maravillosas que se han cruzado en mi camino, gracias por todas las experiencias vividas, por las risas que nunca faltaron, por ser mi apoyo a nivel personal y académico, por todas las veces que me apapacharon y me dijeron que yo era capaz y que siguiera adelante. Simplemente no existen palabras que describan mi amor hacia ustedes y solo le pido a la vida que nos mantenga unidos para disfrutar más cosas maravillosas.

A la Dra. Marbel Torres por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, guiarme en la realización de este trabajo y por su paciencia, comprensión y generosidad al compartir su sabiduría conmigo.

Al Dr. Rachid Seqqat por su apoyo para el desarrollo de este trabajo al permitirme trabajar en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Fuerzas Armadas ESPE.

A Andrea Aluisa, Alex Gavilánez y Fernanda Toscano por su consejos y apoyo durante el tiempo que estuve en el laboratorio, y por la relación de amistad que hemos podido generar.

*Mishell Alejandra Orozco Vega*



## Índice de Contenidos

<b>Resultados del análisis Copyleaks</b> .....	2
<b>Certificación</b> .....	3
<b>Responsabilidad de Autoría</b> .....	4
<b>Autorización de Publicación</b> .....	5
<b>Dedicatoria</b> .....	6
<b>Agradecimientos</b> .....	7
<b>Índice de Contenidos</b> .....	9
<b>Índice de Tablas</b> .....	13
<b>Índice de Figuras</b> .....	13
<b>Listado de Abreviaturas</b> .....	15
<b>Resumen</b> .....	18
<b>Abstract</b> .....	19
<b>Capítulo I: Introducción</b> .....	20
<b>Antecedentes</b> .....	20
<b>Justificación</b> .....	22
<b>Objetivos Generales y Específicos</b> .....	23
<i>Objetivo General</i> .....	23
<i>Objetivos Específicos</i> .....	23
<b>Capítulo II: Revisión Bibliográfica</b> .....	24
<b>Enfermedad de coronavirus SARS-CoV-2</b> .....	24

	10
<i>Patología COVID-19</i> .....	24
<b>Coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)</b> .....	26
<i>Proteínas de SARS-CoV-2</i> .....	29
<b>Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2</b> .....	31
<b>Herramientas biotecnológicas</b> .....	34
<b>Proteínas recombinantes</b> .....	36
<i>Aplicaciones de las proteínas recombinantes</i> .....	36
<i>Producción de proteínas recombinantes</i> .....	37
<b>Obtención del Inserto de ADN</b> .....	38
<b>Diseño de Vectores de Expresión</b> .....	38
<b>Obtención de la Construcción de ADN Recombinante</b> .....	39
<b>Selección de las Plataformas de Producción de Proteínas Recombinantes o Huéspedes de Expresión</b> .....	40
<i>Bacterias</i> .....	40
<i>Levaduras</i> .....	41
<i>Líneas celulares de insectos</i> .....	41
<i>Líneas celulares de mamíferos</i> .....	41
<b>Transformación de los huéspedes y expresión de las proteínas recombinantes</b> .....	42
<b>Purificación de proteínas recombinantes</b> .....	43
<i>Procesos de cromatografía</i> .....	44

Verificación de la proteína recombinante.....	46
Inmunogenicidad.....	47
<i>Ensayos de inmunogenicidad</i> .....	49
<i>Factores que afectan la inmunogenicidad</i> .....	52
Modelos animales.....	53
<i>Modelos murinos</i> .....	53
<i>Manejo animal: Principio de las 3R</i> .....	55
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	57
Localización Geográfica.....	57
Obtención de las Proteínas Recombinantes.....	57
Purificación de Proteínas Recombinantes.....	57
<i>Dialísis</i> .....	57
<i>Filtración por Centrifugación</i> .....	58
<i>Purificación de proteínas por Cromatografía de Intercambio Iónico</i> .....	58
Western Blot de proteínas purificadas .....	61
Inoculación de ratones BALB/c con proteínas recombinantes.....	63
<i>Ensayo de inmunogenicidad a corto plazo</i> .....	64
<i>Ensayo de inmunogenicidad a largo plazo</i> .....	64
Obtención de suero de ratones BALB/c .....	64
Evaluación de la inmunogenicidad producida por las proteínas recombinantes .....	65
<i>Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (ELISAI)</i> .....	65

<b>Análisis Estadístico</b> .....	66
<b>Capítulo IV: Resultados</b> .....	67
<b>Obtención de proteínas recombinantes</b> .....	67
<b>Purificación de proteínas recombinantes</b> .....	67
<i><b>Rendimientos de los procesos de purificación</b></i> .....	67
<i><b>Análisis de pureza y especificidad de las fracciones purificadas</b></i> .....	69
<b>Modelo <i>in vivo</i></b> .....	72
<b>Evaluación de la tasa de supervivencia y peso corporal de ratones BALB/c</b>	73
<b>Evaluación de la inmunogenicidad mediada por anticuerpos IgG</b> .....	74
<b>Capítulo V: Discusión</b> .....	79
<b>Capítulo VI: Conclusiones</b> .....	91
<b>Capítulo VII: Recomendaciones</b> .....	92
<b>Bibliografía</b> .....	93
<b>Anexos</b> .....	116

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación taxonómica de SARS-CoV-2</i> .....	27
<b>Tabla 2.</b> <i>Herramientas Biotecnológicas</i> .....	35
<b>Tabla 3.</b> <i>Ensayos de producción de proteínas recombinantes</i> .....	38
<b>Tabla 4.</b> <i>Tipos de cromatografía</i> .....	45
<b>Tabla 5.</b> <i>Ventajas y Desventajas del uso de modelos murinos</i> .....	54
<b>Tabla 6.</b> <i>Preparación de geles de acuerdo al porcentaje de acrilamida</i> .....	61
<b>Tabla 7.</b> <i>Concentraciones de PrS1 y PrRBD1 en las etapas de purificación</i> .....	67
<b>Tabla 8.</b> <i>Porcentajes de pureza de las fracciones de PrS1 y PrRBD1 purificadas</i> ....	71

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Patología y fisiología del COVID-19</i> .....	26
<b>Figura 2.</b> <i>Estructura Genómica del virus SARS-CoV-2</i> .....	28
<b>Figura 3.</b> <i>Virus SARS-CoV-2</i> .....	29
<b>Figura 4.</b> <i>Estructura del virus SARS-CoV-2</i> .....	31
<b>Figura 5.</b> <i>Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2</i> .....	34
<b>Figura 6.</b> <i>Estructura general de un vector de expresión</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> <i>Esquema de producción de proteínas recombinantes</i> .....	44
<b>Figura 8.</b> <i>Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima</i> .....	51
<b>Figura 9.</b> <i>Columna DEAE Sepharose Fast Flow</i> .....	59
<b>Figura 10.</b> <i>Rendimientos del proceso de purificación de PrS1 y PrRBD1</i> .....	68
<b>Figura 11.</b> <i>Western Blot de las fracciones purificadas de PrS1</i> .....	69
<b>Figura 12.</b> <i>Western Blot de las fracciones purificadas de PrRBD1</i> .....	70

<b>Figura 13.</b> <i>Porcentaje de supervivencia de ratones Balb/c en ensayos de inmunogenicidad</i> .....	69
<b>Figura 14.</b> <i>Porcentaje de peso corporal de ratones Balb/c en ensayos de inmunogenicidad</i> .....	74
<b>Figura 15.</b> <i>Resultados ELISAI para ensayo de inmunogenicidad a corto plazo</i> .....	76
<b>Figura 16.</b> <i>Resultados ELISAI para ensayo de inmunogenicidad a largo plazo</i> .....	78

## Listado de Abreviaturas

A: Amperios

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BSA: Albúmina de suero bovino

CHO: Células de ovario de hámster chino

CTD: Dominio C-terminal

CpG: Citosina Fosfato Guanosina

DEAE: Dietilaminoetilo

E: Proteína de Envoltura

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima

FP: Péptidos de fusión

G: Gravedades

HEK 293: Células embrionarias humanas del riñón 293

His: Histidina

HRP: Peroxidasa de rábano picante

HR1 y HR2: Repeticiones 1 y 2 de heptada

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

INF: Interferón

Kb: Kilobases

KDa: KiloDaltons

M: Proteína de Membrana

mL: mililitro

mM: Milimolar

MSP: Ministerio de Salud Pública

MWCO: Cut off de peso molecular

N: Proteína de Nucleocápside

nm: nanómetros

nsp: proteínas no estructurales

NTD: Dominio N-terminal

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto

PAMP: Patrones moleculares asociadas a patógenos

PBS: Buffer Fosfato Salino

PES: Polietersulfona

PrRBD1: Proteína recombinante RBD

PrS1: Proteína recombinante Spike

RBD: Dominio de unión al receptor



RLR: Receptores tipo RIG

rpm: revoluciones por minuto

S: Spike

S1: Subunidad 1

S2: Subunidad 2

SARS-CoV-2: Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

SDS-Page: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

S-Trimer: Spike trimérica de SARS-CoV -2

TBS: Buffer Tris Salino

TTBS: Buffer Tris Salino + Tween 20

Th1: Linfocitos T helper 1

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformador beta

TLR: Receptores tipo Toll

TMB: Tetrametilbencidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

$\mu$ g: microgramos

$\mu$ m: micrómetros

UTR: Región no traducida

V: Voltios

## Resumen

COVID-19 es una enfermedad causada por una familia de virus denominados coronavirus SARS-CoV-2. La infección viral se caracteriza por diversa sintomatología como fiebre, tos, dificultad respiratoria, irritaciones gastrointestinales, neumonías, choque séptico, falla multiorgánica, acidosis metabólica, disfunción de la coagulación e inclusive la muerte. Estos síntomas han variado en relación a las mutaciones del virus. En Ecuador, se han reportado alrededor de 593.664 casos confirmados con un total de 34.189 fallecidos hasta la fecha enero 2022. La alta tasa de contagio ha provocado el colapso del sistema de salud, por lo tanto, resulta evidente la necesidad de desarrollar métodos de diagnósticos, tratamientos y vacunas efectivas para controlar la pandemia. En este estudio, se expresó y purificó las proteínas recombinantes Spike (PrS1) y RBD (PrRBD1) en huéspedes procariotas y eucariotas respectivamente, y se evaluó la inmunogenicidad de estos antígenos en ratones Balb/c. Se logró demostrar alta eficacia en la inducción de la respuesta humoral temprana del modelo animal pues se obtuvieron altos niveles de anticuerpos neutralizantes a partir de una sola dosis con 5 ug de antígeno. Además, la aplicación de una segunda dosis reforzó y prolongó la respuesta por un periodo de 42 días, y la utilización del adyuvante completo de Freund incrementó hasta tres veces la producción de anticuerpos neutralizantes específicos de las proteínas PrS1 y PrRBD1.

### Palabras Claves:

- **INMUNOGENICIDAD**
- **PROTEÍNAS RECOMBINANTES**
- **ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES**

## **Abstract**

COVID-19 is a disease caused by a family of viruses called SARS-CoV-2 coronaviruses. Viral infection is characterized by diverse symptoms such as fever, cough, respiratory distress, gastrointestinal irritations, pneumonia, septic shock, multiorgan failure, metabolic acidosis, coagulation dysfunction, and even death. These symptoms have varied in relation to those affected by the virus. In Ecuador, around 593,664 confirmed cases have been reported with a total of 34,189 deaths as of January 2022. The high rate of contagion has caused the collapse of the health system, therefore, the need to develop diagnostic methods, treatments and effective vaccines to control the pandemic is evident.

In this study, recombinant Spike (PrS1) and RBD (PrRBD1) proteins were expressed and purified in prokaryotic and eukaryotic hosts respectively, and the immunogenicity of these antigens was evaluated in Balb / c mice. It was possible to demonstrate high efficiency in the induction of the early humoral response of the animal model due to high levels of neutralizing antibodies were obtained from a single dose with 5ug of antigen. In addition, the application of a second dose strengthened and prolonged the response for a period of 42 days and the use of complete Freund's adjuvant increased up to three times the production of specific neutralizing antibodies for the PrS1 and PrRBD1 proteins.

### **Key words:**

- **IMMUNOGENICITY**
- **RECOMBINANT PROTEINS**
- **ANTIBODY NEUTRALIZERS**

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

La enfermedad COVID-19 fue reportada por primera vez en Wuhan, provincia de Hubei, China. El agente causal de la enfermedad es un nuevo coronavirus que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus denominó SARS-CoV-2 (Pastrian, 2020). Este virus ha demostrado ser altamente contagioso y transmisible entre los seres humanos y ha causado millones de casos de muerte a nivel mundial, por lo que la comunidad científica rápidamente ha dirigido sus esfuerzos hacia la búsqueda de opciones de tratamiento, métodos de diagnóstico y sobre todo al desarrollo de vacunas que controlen la pandemia (Firas et al., 2020).

El 11 de enero del 2020, se realizó el análisis genómico y estructural del virus SARS-CoV-2, lográndose así determinar la importancia de la proteína espiga o spike (S) en la entrada celular del virus a través de la interacción entre el dominio de unión al receptor (RBD) del virus y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) del huésped (Chung, Thone, & Kwon, 2021). Desde entonces S y RBD se convirtieron en proteínas de relevancia para el desarrollo de las vacunas COVID-19, gracias a su capacidad de inducir una respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes (Tong, Lin, & Tran, 2020).

En marzo del 2020, ya existía una lista de candidatos vacunales contra COVID-19 desarrollados a partir de plataformas convencionales como proteínas recombinantes, virus atenuados, virus inactivados y partículas similares a virus; y también nuevas plataformas como vacunas de ácidos nucleicos y de vectores virales (Urbiztondo, Borràs, & Mirada, 2020). Sin embargo, las proteínas recombinantes de las subunidades virales S y RBD han destacado por su estabilidad y escalabilidad (Silveira, Moreira, & Mendonca, 2021).

La tecnología de proteínas recombinantes nació en el siglo XX a partir de numerosos descubrimientos entre los que se incluyen el aislamiento de la enzima ADN ligasa por Geller en 1967, la identificación y aislamiento de enzimas de restricción por Werner Alber, Hamilton Smith y Daniel Nathans en 1970, el establecimiento del proceso de transformación de células bacterianas *Escherichia coli* con ADN foráneo por Cohen en 1971, el diseño del primer vector plasmídico para clonación por Cohen y Boyer en 1973, y la producción de insulina recombinante de uso comercial en humanos denominada humulina en 1977 (Thieman & Palladino, 2010).

Es así que las proteínas recombinantes surgieron como resultado de los avances en la ingeniería genética y proteómica, y hoy en día constituyen los principales productos de la industria biotecnológica y son aplicables en el sector alimenticio, textil, energético, ambiental y farmacéutico (Guevara et al., 2013).

Hasta el momento se han reportado 66 vacunas para COVID-19 basadas en antígenos proteicos recombinantes (Pollet, Chen, & Strych, 2021), y se han realizado numerosas publicaciones, por ejemplo, Yang et al. (2020) desarrollaron una vacuna con una proteína recombinante de los residuos 319-545 del RBD de la proteína S de SARS-CoV-2, la misma que fue expresada usando el sistema de baculovirus y que indujo una potente respuesta funcional de anticuerpos en ratones, conejos y primates no humanos. Así mismo, Liang et al. (2021), produjeron la proteína recombinante trimérica Spike de SARS-CoV -2 (S-Trimer) en células CHO y luego evaluaron la inmunogenicidad de estos antígenos en primates no humanos donde verificaron un alto nivel de anticuerpos neutralizantes y respuestas inmunes celulares sesgadas por una respuesta Th1.

## Justificación

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha reportado alrededor de 263.563.622 casos confirmados de COVID-19 y un total de 5.232.562 fallecidos. El mayor porcentaje de contagio se registra en la región de las Américas (36.93%), seguido por Europa (33.46%), Sudeste del Asia (16.92%), Mediterráneo oriental (6.38%), Pacífico Oeste (3,91%) y África (2.40%) (Organización Mundial de la Salud, 2021).

En Ecuador, según los datos reportados por el Ministerio de Salud Pública (MSP), se tienen cerca de 593.664 casos confirmados de COVID-19 y 34.189 fallecidos hasta enero 2022 (Servicio Nacional de Gestión de Riesgos y Emergencias, 2022). La necesidad de una vacuna resulta evidente para frenar los contagios, ya que los centros médicos han colapsado frente al aumento de casos en el país (Sarasty et al., 2020).

Las vacunas de subunidades recombinantes han mostrado ser seguras y rentables, sin embargo, suelen ser menos inmunogénicas, lo que se puede corregir con la adición de adyuvantes (Karch & Burkhard, 2016). La producción de proteínas recombinantes es una de las estrategias biotecnológicas de mayor uso ya que permite la obtención de grandes cantidades de proteínas de interés de forma rápida y fácil (Guevara et al., 2013). Las herramientas celulares y moleculares requeridas para la producción de estas proteínas son accesibles y se encuentran disponibles (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019), por lo cual el desarrollo de proteínas recombinantes que actúen como antígenos de SARS-CoV-2 son una plataforma de vacuna que puede ser implementada en el país a nivel de laboratorio.

Una vez obtenidos estos antígenos recombinantes es necesaria la aplicación de ensayos de inmunogenicidad que evalúen la capacidad de las proteínas para inducir una respuesta inmunitaria. Estos ensayos se realizan para cualquier tipo de

biomolécula, debido a que proporcionan información sobre los perfiles de eficacia y seguridad de las mismas (Pineda et al., 2016).

La importancia de la presente investigación radica en determinar si las PrS1 y PrRBD1 de SARS-CoV-2 producidas a nivel de laboratorio son capaces de inducir respuestas inmunitarias en ratones BALB/c de modo que se logre establecer una base para el futuro desarrollo de vacunas contra COVID-19 en el país ya que la evaluación de la inmunogenicidad es uno de los parámetros más relevantes al momento de aprobar los candidatos vacunales.

## **Objetivos Generales y Específicos**

### ***Objetivo General***

Determinar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD de SARS-CoV-2 en el modelo animal BALB/c.

### ***Objetivos Específicos***

- Determinar la especificidad y concentración óptima de las proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD.
- Inocular al modelo animal BALB/c con las dos proteínas recombinantes y realizar el respectivo seguimiento de los parámetros de bienestar animal.
- Evaluar el grado de inmunogenicidad generado por el modelo BALB/c frente a la inoculación con las dos proteínas recombinantes.

## Capítulo II: Revisión Bibliográfica

### Enfermedad de coronavirus SARS-CoV-2

La enfermedad COVID-19 apareció en diciembre del año 2019 en Wuhan, provincia de Hubei, China, constituyendo el tercer brote de coronavirus (CoV) en humanos en estas últimas décadas (Dhama et al., 2020). COVID-19 es provocada por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y se presenta en los seres humanos ya sea con infecciones asintomáticas o cuadros clínicos con síntomas que van desde resfriados comunes hasta enfermedades graves acompañadas de fiebre, tos, dificultad para respirar, irritaciones gastrointestinales, neumonías e inclusive la muerte (Sharma, Ahmad, & Lal, 2021).

Se conoce que aproximadamente el 30% de las personas infectadas con SARS-CoV-2 desarrollan síntomas, mientras que el 70% restante son pacientes asintomáticos. Así mismo, el 25% de la población infectada requiere hospitalización por sintomatología grave (Carbone et al., 2021). La tasa de letalidad de la enfermedad varía en cada país, pero, existen comorbilidades como diabetes, hipertensión, cáncer, enfermedades pulmonares obstructivas y enfermedades cardiovasculares que se asocian con un incremento en la mortalidad (Rastogi et al., 2020).

### ***Patología COVID-19***

El SARS-CoV-2 actúa de diferente manera en cada paciente de acuerdo a su predisposición genética, estado inmunológico y enfermedades asociadas (Rastogi et al., 2020). Sin embargo, de manera general las manifestaciones clínicas de los pacientes con COVID-19 incluyen fiebre, tos seca, fatiga, dificultad para respirar, dolores musculares, diarrea, náuseas, disnea, leucopenia, linfopenia, trastornos del olfato y gusto, y altos niveles de citocinas en plasma. En los casos críticos se presenta el síndrome de dificultad respiratoria, insuficiencia respiratoria, choque séptico, falla



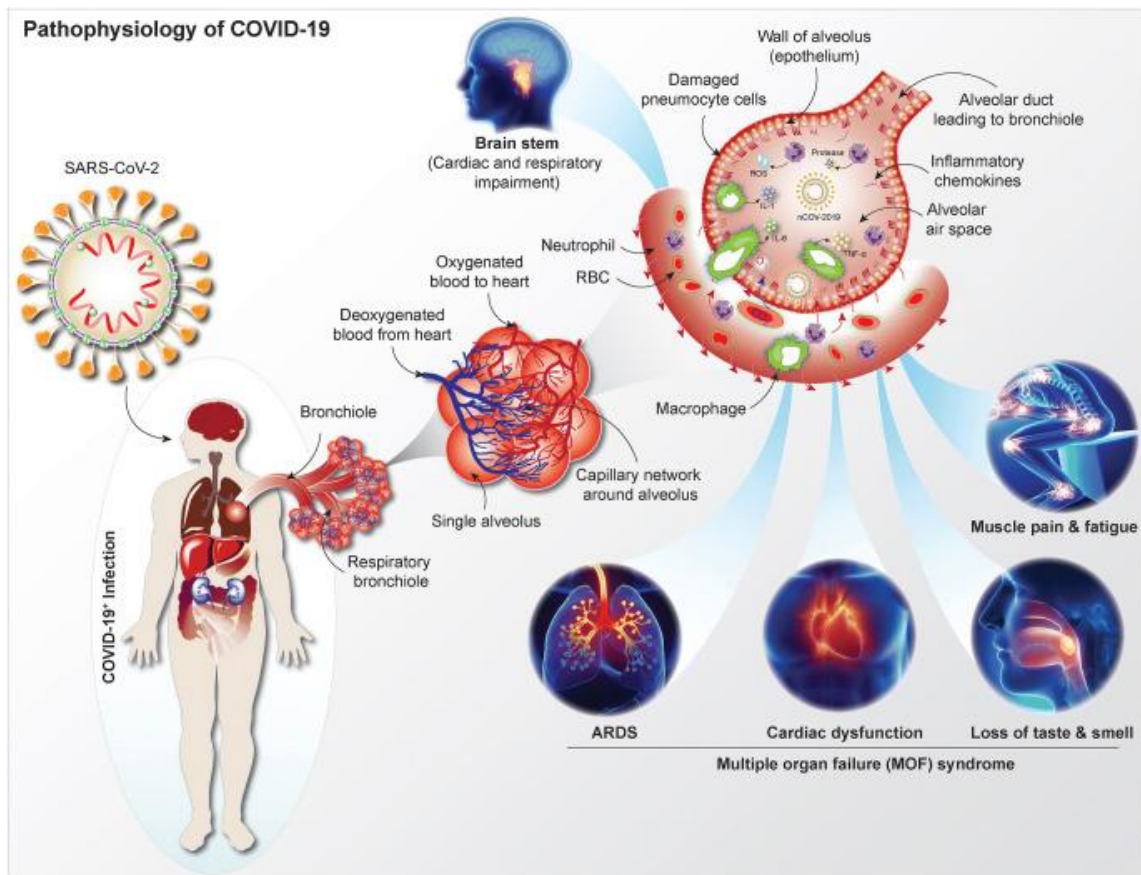
multiorgánica, acidosis metabólica, disfunción de la coagulación y muerte (Wang et al., 2020).

Los sistemas afectados durante la enfermedad COVID-19 incluyen el sistema respiratorio pulmonar, neurológico, gastrointestinal, cardíaco, renal y vascular mostrando variada sintomatología según el grado de enfermedad (Machhi et al., 2020). En cuanto a la patología pulmonar se han reportado tejidos pulmonares con descamación de neumocitos, membranas hialinas, edemas, infiltrados inflamatorios mononucleares intersticiales, lesiones microvasculares y microtrombos (Calabrese et al., 2020).

COVID-19 afecta a niños, adultos y adultos mayores, sin embargo, el riesgo de muerte incrementa en pacientes mayores de 60 años (Tiruneh et al., 2021). Los pacientes en un rango de edad de 0 y 17 años han mostrado menor frecuencia y gravedad de la enfermedad, mientras que aquellos en el rango de 65 a 85 años tienen un nivel más alto de inflamación por citoquinas lo que conduce a una expresión grave de la enfermedad (Chauhan, Soni, & Jain, 2021). En la Figura 1 se observa un esquema de la patología y fisiología de la enfermedad COVID-19.

Figura 1

## Patología y fisiología del COVID-19



*Nota.* Tomado de “The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections” (p.372), por Machhi et al., 2020, *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 15(3).

### Coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario no segmentado de sentido positivo de aproximadamente 30 Kb causante de la enfermedad COVID-19 (Kim et al., 2020). La clasificación taxonómica del virus SARS-CoV-2 se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1***Clasificación taxonómica de SARS-CoV-2*

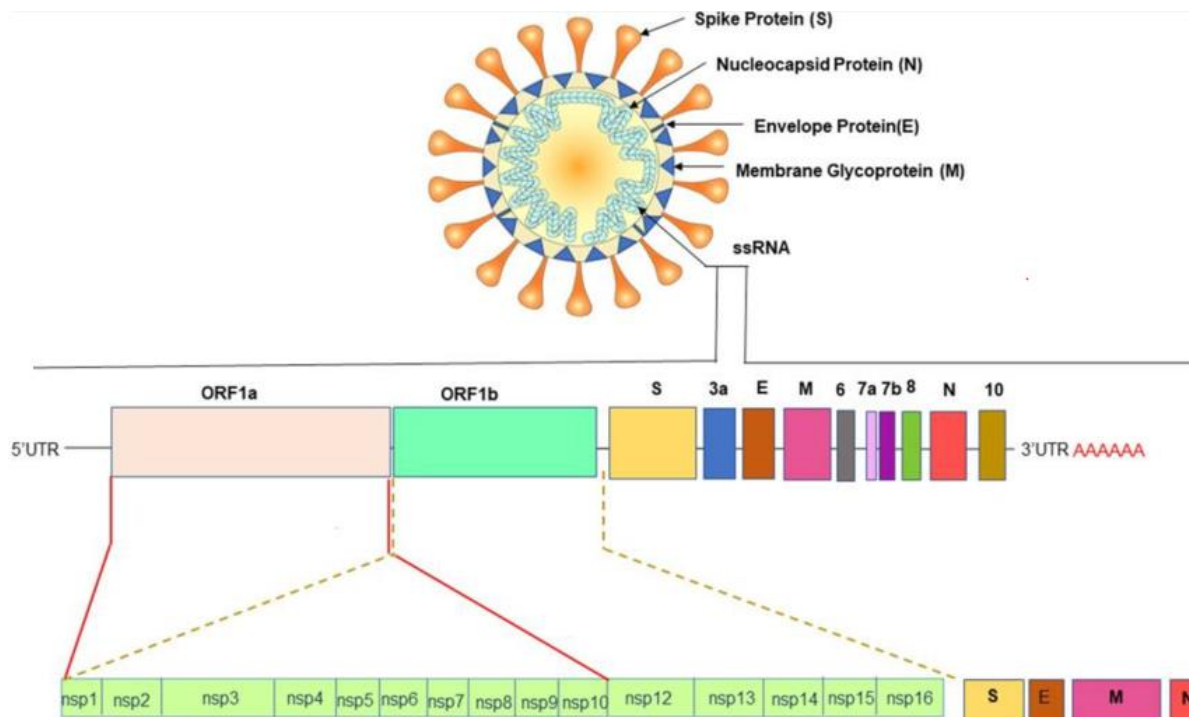
<b>Coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)</b>	
<b>Dominio</b>	Riboviria
<b>Grupo</b>	IV (Virus ARN monocatenario positivo)
<b>Reino</b>	Orthornavirae
<b>Filo</b>	Pisuviricota
<b>Clase</b>	Pisoniviricetes
<b>Orden</b>	Nidovirales
<b>Familia</b>	Coronaviridae
<b>Subfamilia</b>	Orthocoronavirinae
<b>Género</b>	Betacoronavirus
<b>Subgénero</b>	Sarbecovirus
<b>Especie</b>	Coronavirus relacionado con SARS

*Nota.* Adaptado de “Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2”, por Schoch CL et al., 2020, *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*, Taxonomy ID: 2697049

El virus SARS-CoV-2 cuenta con 14 marcos de lectura abiertos (ORF) y genómicamente está compuesto por una región no traducida 5' (UTR), complejo de replicación (ORF1a y ORF1b), gen de proteína espiga o spike (S), gen de proteína de envoltura (E), gen de la membrana (M), gen de la nucleocápside (N), región no traducida 3', ORF estructurales no identificados y cola poli A (Rastogi et al., 2020). En la Figura 2 se detalla la organización del genoma del virus SARS-CoV-2.

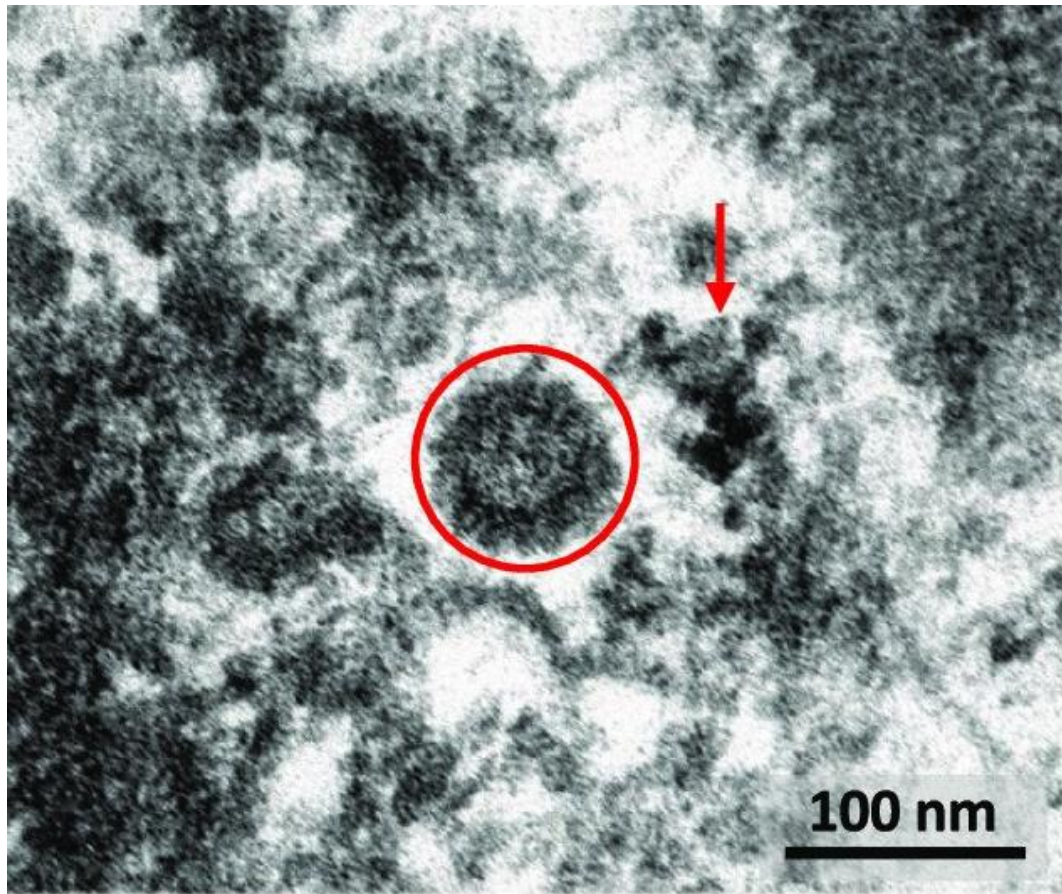
## Figura 2

### Estructura Genómica del virus SARS-CoV-2



*Nota.* Tomado de “SARS coronavirus 2: from genome to infectome” (p.318), por Rastogi et al., 2020, *Respiratory research*, 21(1).

Las fotografías tomadas con microscopía electrónica han revelado que SARS-CoV-2 tiene forma esférica con diámetros de 60 a 140 nm. Está rodeado por una envoltura que contiene a las nucleocápsides virales dispuestas en simetría helicoidal. Así mismo, las proteínas espigas que miden de 9 a 12 nm se encuentran ancladas a la envoltura dando la apariencia de una corona solar (Dhama et al., 2020). En la Figura 3 se muestra una fotografía del virus SARS-CoV-2 con microscopía electrónica de transmisión.

**Figura 3***Virus SARS-CoV-2*

*Nota.* Micrografía electrónica de primer plano de la partícula viral del coronavirus SARS-CoV-2 en células endoteliales. Tomado de “SARS-CoV-2 identified by transmission electron microscopy in lymphoproliferative and ischemic intestinal lesions of COVID-19 patients with acute abdominal pain: two case reports.” (p.3), por Cardona et al., 2021, *BMC Gastroenterol*, 334 (2021).

***Proteínas de SARS-CoV-2***

SARS-CoV-2 consta de cuatro proteínas estructurales, las glicoproteínas espigas (S) que median la entrada del virus a la célula del huésped por medio de interacciones con receptores celulares, la proteína de membrana (M) que forma parte de la membrana viral y permite la unión del genoma del virus con la superficie interna de

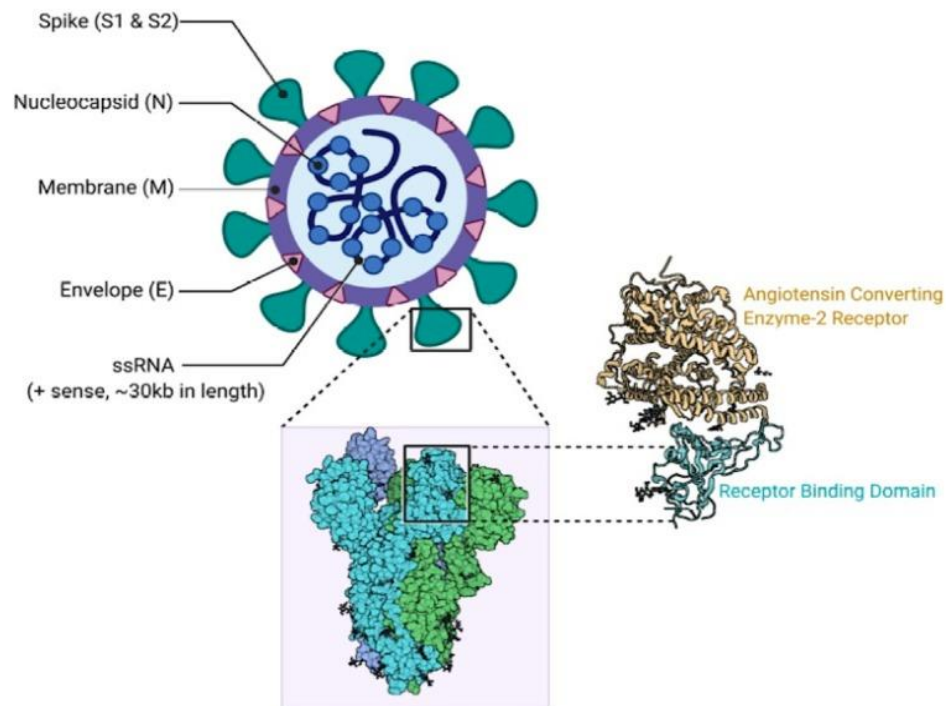
la membrana de la célula huésped, la proteína nucleocápside (N) que favorece la replicación del ARN ya que participa en la formación de complejos con genoma viral, ayuda al ensamblaje del virión y mejora la transcripción viral, y la proteína de envoltura (E) que actúa en el ensamblaje, liberación y patogénesis viral (Chung, Thone, & Kwon, 2021) y dieciséis proteínas no estructurales (nsp1-nsp16) implicadas en los procesos de replicación del virus (Wang et al., 2020).

La glicoproteína Spike de 180 kDa se compone de dos subunidades (S1 y S2) (Poland, Ovsyannikova, & Kennedy, 2020). La subunidad S1 con el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (CTD) que contiene al dominio de unión al receptor (RBD) capaz de unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la célula huésped permitiendo la entrada del virus, y la subunidad S2 que se compone de los péptidos de fusión (FP), las repeticiones 1 y 2 de heptada (HR1 y HR2), la hélice central (CH) y el dominio conector (CT) que permiten la fusión de las membranas del virus y del huésped (Walls et al., 2020).

Por otro lado, el dominio de unión al receptor (RBD) se compone de dos subdominios, el subdominio central estructurado por 5 láminas  $\beta$  antiparalelas con enlaces disulfuro entre ellas y los subdominios externos formados por bucles con enlaces disulfuro (Wang et al., 2020). Tanto la proteína S como su dominio RBD se consideran moléculas objetivo para el desarrollo de vacunas COVID-19 por su participación en el ingreso del virus (Yang et al., 2020). La morfología y proteínas de SARS-CoV-2 se pueden visualizar en la Figura 4.

## Figura 4

### Estructura del virus SARS-CoV-2



*Nota.* Tomado de “Coronaviruses and SARS-COV-2” (p.550), por Hasöksüz, Kiliç, & Saraç, 2020, *Turkish journal of medical sciences*, 50(1).

### Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 al igual que otros coronavirus ha desarrollado varias estrategias para evadir la respuesta inmunitaria como por ejemplo los bajos niveles de citosina-fosfato-guanosina (CpG) en el genoma, la glicosilación de elementos esenciales para la infección, la protección del ARN y la generación de proteínas virales que impiden la respuesta del interferón. A pesar de esto, la unión e ingreso de SARS-CoV-2 por medio de ACE2 activan las vías de señalización inmunitaria (Amor, Fernández, & Baker, 2020).

El virus de ARN puede ser detectado por los receptores tipo Toll (TLR7 y TLR8) o el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) de los receptores RLR, lo que a su vez

desencadena inmediatamente la respuesta innata del huésped mediada por la señalización con interferón tipo I (INF-I) (Triggle et al., 2021). La respuesta innata busca restringir la replicación viral, generar un estado antiviral con el reclutamiento de las células como macrófagos, neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales (NK) y mastocitos, y además promover la inmunidad adaptativa a través de la presentación de los antígenos con células dendríticas (Sette & Crotty, 2021).

Por otro lado, ante la infección por SARS-CoV-2, el sistema inmunológico adaptativo produce una respuesta tardía con las células B productoras de anticuerpos neutralizantes específicos para SARS-CoV-2, células T CD4+ y células T CD8+ (Sette & Crotty, 2021). Cuando los macrófagos se infectan comienzan la presentación del antígeno a las células T, lo que a la vez conduce a su respectiva activación y diferenciación y sobretodo inducen la producción de varias citocinas IL-2, IL-7, IL-10, TNF $\alpha$  que también activan cascadas inflamatorias y contribuyen a la patogénesis (García, 2020).

En los pacientes con COVID 19, la respuesta humoral mediada por los anticuerpos IgM tempranos e IgG tardíos va dirigida a las glicoproteínas de superficie S y N del virus y se evidencia entre los 6 y 28 días de la infección; mientras que la respuesta celular de T CD4+, CD8+ y las células asesinas naturales muestran actividad citotóxica contra las células del huésped infectadas (Triggle et al., 2021) y comienza entre los 7 a 10 días post-infección con SARS-CoV-2. Las respuestas de las células T durante la infección por COVID19 se ha caracterizado por la predominante diferenciación hacia linfocitos T helper 1 (Th1) con alta producción de interferón lambda (IFN $\gamma$ ), interleucina IL-2 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Poland, Ovsyannikova, & Kennedy, 2020).

Así mismo, la activación de la respuesta del organismo puede manifestarse con el síndrome de tormenta de citocinas que consiste en una liberación desregulada de



estas proteínas lo que conlleva al reclutamiento de células inmunes necesarias para la autodefensa (Machhi et al., 2020).

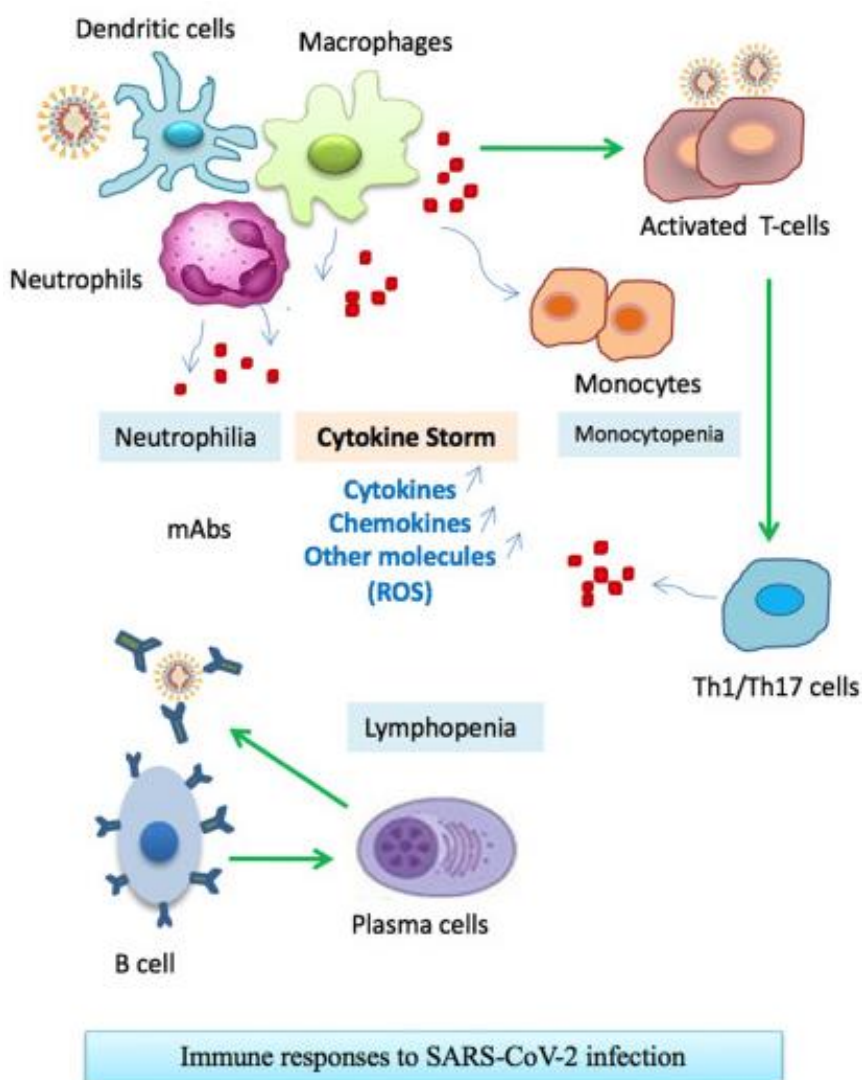
La cascada de señalización provocada por el virus induce la secreción de citocinas proinflamatorias como IFN I, INF III, TNF $\alpha$ , factor de crecimiento transformador beta (TGF $\beta$ ), interleucina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) y quimiocinas como ligandos 2, 3 y 5 de quimiocina con motivo C-C (CCL2, CCL3, CCL5) y ligandos 8, 9 y 10 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL8, CXCL9 y CXCL10). El problema de la tormenta de citocinas es la respuesta inflamatoria excesiva en los órganos infectados, lo que puede conducir al síndrome de dificultad respiratoria aguda e insuficiencia orgánica múltiple en los pacientes (Rastogi et al., 2020).

Amor, Fernández, y Baker (2020), han indicado que las respuestas inmunitarias que ocasiona SARS-CoV-2 incluyen: 1) La activación de la vía de complemento de lectina por los glucanos del virus que también son reconocidos por DC-SING para mediar la captura del virus por células dendríticas. 2) Las células infectadas inician las respuestas inmunitarias innatas ya que liberan moléculas asociadas a patógenos (PAMPS) y moléculas asociadas a daño celular (DAMPs). 3) Los virus de ARN desencadenan las respuestas guiadas por los receptores TLR, por ejemplo, en ensayos in vitro la proteína S es reconocida por TLR-2 activando la vía de NF- $\kappa$ B y la producción de IL-8. 4) Así mismo el análisis de sangre periférica y tejidos post-mortem en casos graves de COVID-19 mostraron altos niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, monocitos CD14 que puede ser un indicador de la activación de la vía del inflamasoma NLRP3 por los receptores similares a NOD.

En la Figura 5 se muestra un esquema resumido de la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2.

## Figura 5

Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2



*Nota.* Tomado de "Update of the current knowledge on genetics, evolution, immunopathogenesis, and transmission for coronavirus disease 19 (COVID-19)" (p.2909), por Tizaoui et al., 2020, *International journal of biological sciences*, 16(15).

## Herramientas biotecnológicas

Se puede definir como herramientas biotecnológicas al conjunto de técnicas, procedimientos y métodos multidisciplinarios que se emplean en la rama de la Biotecnología para la creación o modificación de productos o procesos de interés

humano (Thieman & Palladino, 2010). Las herramientas biotecnológicas han revolucionado los sectores industriales permitiendo la producción de biofarmacéuticos y vacunas, el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico, el incremento en la productividad de cultivos agrícolas, la remediación ambiental y sobretodo la optimización en la obtención de productos de importancia industrial (Gupta et al., 2016). En la Tabla 2 se detallan las características de las herramientas biotecnológicas.

**Tabla 2**

*Herramientas Biotecnológicas*

<b>Herramienta Biotecnológica</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
Técnicas de cultivo celular	Permiten el aislamiento de tipos específicos de células que luego se cultivan en ambientes controlados que promueven su división, crecimiento, multiplicación y diferenciación. Son útiles para el estudio de la actividad intracelular y la producción de metabolitos de interés	(Tavira et al., 2009)
Técnicas moleculares	Sirven para agregar, eliminar o modificar genes de organismos alterando la información proteica. Han sido de gran utilidad en la obtención de proteínas recombinantes.	(Gupta et al., 2016)
Técnicas inmunológicas	Se basan en la afinidad entre antígeno y anticuerpo por lo que se han usado para la detección y cuantificación de moléculas a través de diferentes ensayos.	(Otero, 2010)
Técnicas ómicas	Estas tecnologías permiten el estudio detallado de una variedad de moléculas. Se han beneficiado del desarrollo de equipos que identifican y miden las moléculas de interés, y softwares que analizan los datos, almacenan información y permiten la creación de redes de interacción. Dentro de las ómicas, se incluyen la genómica, transcriptómica, proteómica, metagenómica, metatranscriptómica y metabolómica.	(Frigolet & Gutiérrez, 2017)

## **Proteínas recombinantes**

El descubrimiento de la tecnología de ADN recombinante permitió el desarrollo en la producción de proteínas recombinantes (Stryjewska et al., 2013). Las proteínas recombinantes son las proteínas resultantes de la expresión de un gen previamente insertado en un vector de expresión y transformado en un huésped diferente al que produce naturalmente dicha proteína (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

Las ventajas que ofrece la producción de proteínas recombinantes incluyen la obtención rápida y fácil de grandes cantidades de proteínas de interés que comparten características similares a las proteínas producidas naturalmente y la capacidad de otorgar o eliminar características de las proteínas al modificar secuencias de aminoácidos con técnicas de mutagénesis dirigida (Guevara et al., 2013).

### ***Aplicaciones de las proteínas recombinantes***

Las proteínas recombinantes se han expandido en la mayoría de ramas industriales incluyendo la farmacéutica, ambiental, alimentaria, energética y textil (Guevara et al., 2013).

En el ámbito farmacéutico, estas proteínas pueden usarse como agentes terapéuticos para múltiples enfermedades como, por ejemplo, en la producción de insulina humana, hormonas de crecimiento, factores de coagulación, entre otros (Stryjewska et al., 2013) o componentes de vacunas como es el caso de la vacuna contra hepatitis B elaborada con el antígeno de superficie HBsAg producido en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Karch & Burkhard, 2016).

Así mismo, se ha dado especial interés en la producción de enzimas recombinantes para su uso industrial. Por ejemplo, la producción de fitasas recombinantes en *Pichia pastoris* y su posterior aplicación en la elaboración de piensos

para aves y cerdos (Guerrero, Rodríguez, & Viader, 2007) ; la producción de progalina B en *Pichia pastoris* con características similares a los coagulantes utilizados en la industria láctea (Feijoo et al., 2018) o la síntesis de lipasas y fosfolipasas recombinantes que pueden usarse como biocatalizadores en la producción de biodiesel, industria de cuero o papel y estrategias de biorremediación (Borrelli & Trono, 2015).

### ***Producción de proteínas recombinantes***

Drago y Sainz (2006), plantearon un esquema general para la producción de proteínas recombinantes que consiste en el diseño del vector de expresión y la obtención de la secuencia de ADN codificante o inserto de ADN, la inserción del segmento de ADN de interés en el vector de expresión obteniéndose la construcción, la transformación de células huésped o sistemas de expresión por métodos físicos o químicos, la expresión del gen de la proteína, la recuperación y purificación de la proteína recombinante, el control de calidad y validación del producto y finalmente el acondicionamiento y almacenamiento de la proteína recombinante.

El rendimiento de la producción de proteínas recombinantes es variado y depende de la complejidad de las proteínas y de los factores que afectan al huésped y su maquinaria de síntesis. En la Tabla 3 se detallan los resultados del rendimiento de proteína recombinante de varios estudios.

**Tabla 3***Ensayos de producción de proteínas recombinantes*

<b>Proteína recombinante</b>	<b>Plataforma de expresión</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Referencia</b>
Glicoproteínas			
humanas (FcγRIIIa, ST6Gall, inmunoglobulina humana G1 )	Líneas celulares HEK293F y HEK293S	In vitro 95-120 mg/L	Subedi et al. (2015)
Anticuerpo de fragmento variable de cadena única (scFv).	<i>Escherichia coli</i>	In vitro 25 mg/L	Sarker, Rathore, y Gupta (2019)
Albúmina de suero humano (HSA)	<i>Pichia pastoris</i>	In vitro 1,6 g/L Fermentador 8,86 g/L	Zhu et al. (2018)
Proteína -L1 de HPV16	Línea celular de insecto Sf9	In vitro 1,44-1,6 g/L	Kiasari (2020)

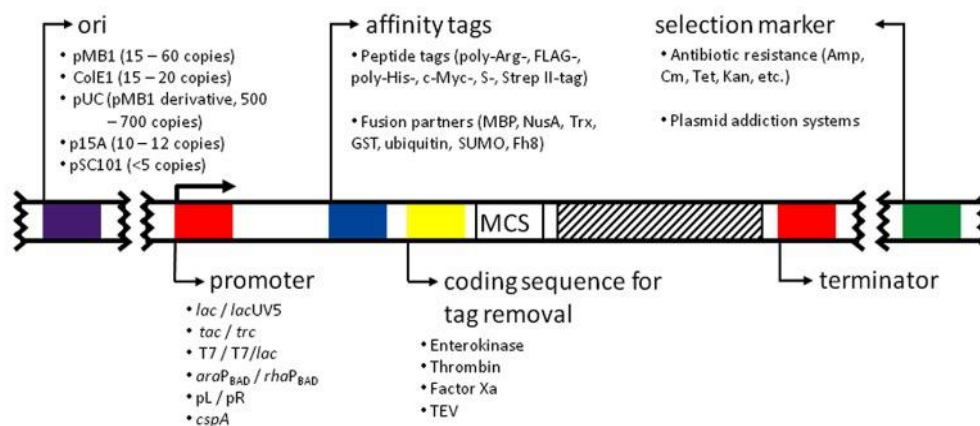
**Obtención del Inserto de ADN.** El inserto de ADN corresponde a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de interés que será producida por el nuevo huésped (Thieman y Palladino, 2010). Estas secuencias genéticas pueden encontrarse disponibles en bases de datos como el Banco de Genes (GenBank), el banco de datos de proteínas (PBD), la base de estructuras de proteínas del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NHI), y la base de datos SPINE del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) (Guevara et al., 2013).

**Diseño de Vectores de Expresión.** Los vectores de expresión se definen como moléculas de ADN capaces de replicarse de manera autónoma a la de los cromosomas celulares (Bolívar, 2007). Se pueden emplear vectores plasmídicos bacterianos, bacteriófagos, cósmidos y cromosomas artificiales (Thieman & Palladino, 2010).

Estos vectores se componen de elementos necesarios para la replicación en la célula huésped, transcripción y traducción del inserto de ADN (González & Fillat, 2018). La estructura general de un vector de expresión incluye el origen de replicación que le permite al plásmido obtener varias copias del mismo dentro de la célula huésped, el promotor donde inicia la transcripción del gen codificante de la proteína de interés, el sitio de clonación múltiple que favorece la inserción de la secuencia de ADN en el vector gracias a la diversidad de sitios de restricción, marcadores de resistencia a antibióticos o genes reporteros que simplifican la tarea de selección de las colonias celulares transformadas con el vector (Guevara et al., 2013). En la Figura 6 se muestran los componentes del vector de expresión

**Figura 6**

*Estructura general de un vector de expresión*



*Nota.* Tomado de “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges” (p.2), por Rosano y Ceccarelli, 2014, *Frontiers in microbiology*, 5(172).

**Obtención de la Construcción de ADN Recombinante.** Se denomina construcción a la molécula híbrida o recombinante que se obtiene de la introducción del inserto de ADN dentro del sitio de clonación múltiple del vector de expresión mediante procesos de corte y ligación enzimática (Guevara et al., 2013).

Las enzimas de restricción o tijeras moleculares reconocen secuencias específicas en el material genético ya sea el inserto de ADN o el vector de expresión y cortan el ADN de doble cadena generando extremos cohesivos. Luego los extremos de ambas moléculas de ADN cortadas con la misma enzima de restricción se alinean por emparejamiento de bases a través de enlaces de hidrógeno y finalmente la enzima ADN ligasa cataliza la formación de enlaces covalentes para que se produzca la molécula de ADN recombinante (Thieman & Palladino, 2010).

**Selección de las Plataformas de Producción de Proteínas Recombinantes o Huéspedes de Expresión.** Los huéspedes de expresión son aquellos organismos procariotas o eucariotas que prestarán su maquinaria de síntesis de proteínas para la producción de la proteína recombinante y que serán transformados con el vector de expresión (Rosano & Ceccarelli, 2014). Las células hospederas deben ser deficientes en proteasas naturales, mantener la estabilidad del vector de expresión, contener los elementos genéticos para la expresión, crecer rápidamente en medios simples, y sobre todo no ser células patogénicas (García et al., 2013). Se puede emplear como huésped de expresión a las bacterias, levaduras, células de insecto, células de mamífero, plantas y animales transgénicos (Tripathi & Shrivastava, 2019).

**Bacterias.** *Escherichia coli* fue la primera plataforma para la producción de proteínas recombinantes y es un sistema ampliamente usado por los altos rendimientos de proteínas y biomasa, cultivos celulares de rápido crecimiento, bajos costos de producción y fácil manipulación genética (Assenberg et al., 2013). Sin embargo, *E. coli* puede presentar ciertas desventajas como la falta de expresión de proteínas extracelulares, la formación de cuerpos de inclusión y la carencia de maquinaria para modificaciones postraduccionales (Francis & Page, 2010).



Dentro de las líneas B de *E. coli*, la cepa BL21 (DE3) es la más empleada en la producción de proteínas recombinantes gracias a sus altas tasas de crecimiento, baja producción de acetato, deficiencia en sistemas proteolíticos Lon u OmpT, capacidades de secreción superiores y control de la expresión por el sistema basado en la ARN polimerasa del fago T7 donde la proteína se expresa por inducción con IPTG (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

**Levaduras.** Las levaduras pueden constituir una alternativa efectiva frente a *E. coli* para la producción de proteínas eucariotas. *Pichia pastoris* es un huésped metilotrófico muy popular en el ámbito industrial por su rápido crecimiento, capacidad de realizar modificaciones postraduccionales sencillas, ausencia de contaminación por endotoxinas y bacteriófagos, y expresión extracelular. Se ha empleado en la producción de proteínas terapéuticas como interferón, eritropoyetina y anticuerpos monoclonales (Karbalaeei, Rezaee, & Farsiani, 2020).

**Líneas celulares de insectos.** Existen más de 940 líneas de insectos disponibles, sin embargo, las líneas más utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes se derivan de lepidópteros como la línea Tn y Sf, y de dípteros como la línea Dm (Geisler & Jarvis, 2018). Estos sistemas generalmente ocupan el vector de expresión de baculovirus y las proteínas obtenidas se emplean en investigaciones. Las ventajas de este sistema son los patrones de glicosilación más avanzados y su escalabilidad a grandes volúmenes (Contreras et al., 2014).

**Líneas celulares de mamíferos.** Las líneas celulares de mamíferos han sido ampliamente usadas en la producción de proteínas recombinantes de mamíferos debido a su fácil manipulación, cultivos escalables, altos rendimientos, adecuado plegamiento y ensamblaje con proteínas complejas y su capacidad de modificaciones postraduccionales (Rue et al., 2019). Las líneas celulares de ovario de hámster chino

(CHO) y células 293 de riñón embrionario humano (HEK-293) son las plataformas eucariotas de mayor uso (Assenberg et al., 2013).

La línea celular HEK293 es un sistema de expresión que surgió de la transformación de células de riñón embrionario humano con fragmentos de ADN de adenovirus humano tipo 5 lo que permitió la inmortalización de la línea celular. Esta línea celular es robusta, cuenta con una maquinaria bioquímica que permite realizar procesamientos postraduccionales y plegamientos óptimos, fácil de mantener y de rápido crecimiento, por lo que se usa ampliamente en investigación y producción de proteínas recombinantes (Thomas & Smart, 2005).

Para la producción de proteínas recombinantes bioterapéuticas, la línea celular de mamíferos CHO es la más empleada. Las células CHO se obtuvieron a partir de la biopsia del ovario de hámster chino, presentan un crecimiento robusto en medios químicamente definidos y libres de suero, y es un sistema muy seguro que permite la expresión de proteínas con modificaciones postraduccionales de tipo humano (Hunter et al., 2019). Algunos de los problemas que se presentan con el uso de células CHO son el mayor tiempo de cultivo y la heterogeneidad fenotípica de los clones (Wang & Guo, 2020).

### **Transformación de los huéspedes y expresión de las proteínas**

**recombinantes.** La transformación es el proceso mediante el cual se introduce la construcción de ADN recombinante en células competentes con el objetivo de que la célula huésped emplee su maquinaria para la expresión del mismo (Serrano, Hernández, & Fando, 2013). La transformación puede darse por métodos químicos como el uso de soluciones de cloruro cálcico ya que los cationes impactan sobre la pared celular generando agujeros que permiten la entrada del ADN foráneo o métodos físicos como la electroporación donde a través de un choque eléctrico el material

genético ingresa a la célula huésped (Thieman & Palladino, 2010). Una vez obtenidas las células transformadas con la secuencia de interés se deben establecer las condiciones de expresión que aseguren la estabilidad de la proteína, el mayor rendimiento y la facilidad en procesos posteriores de purificación. Se debe seleccionar el medio de cultivo de las células, las condiciones de crecimiento como temperatura y pH, el sistema de cultivo y los parámetros de inducción de la expresión (González & Fillat, 2018).

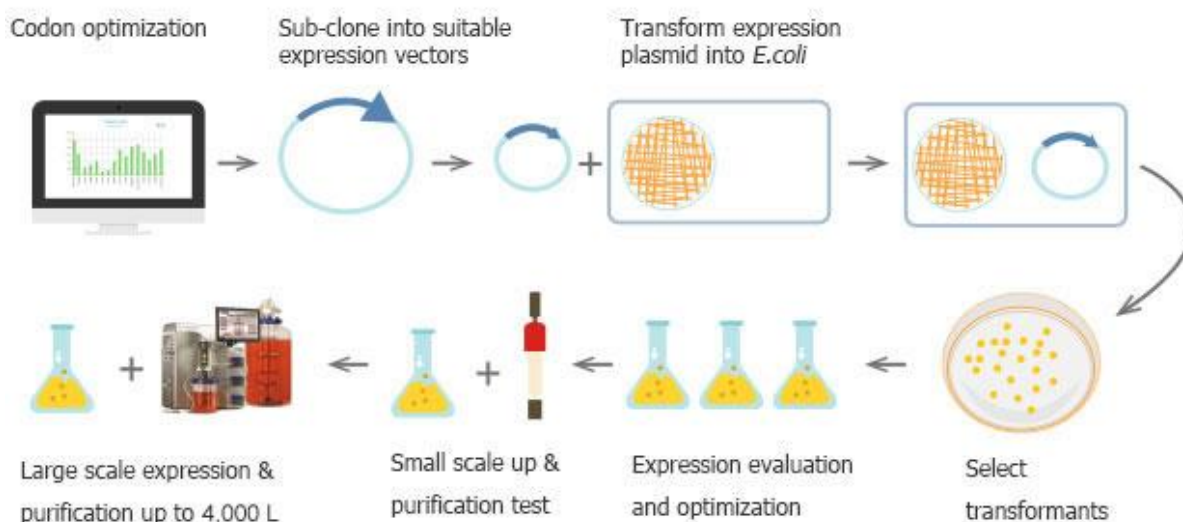
**Purificación de proteínas recombinantes.** Los procesos de purificación permiten la separación de la proteína recombinante de interés del resto de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y de otras proteínas. La elección del método de purificación dependerá de la localización de la proteína recombinante y de sus características. En el caso de las proteínas intracelulares, el proceso de purificación inicia con la recolección de la biomasa celular, mientras que para las proteínas extracelulares se recoge el medio de cultivo (Thieman & Palladino, 2010). Las proteínas recombinantes se purifican con procesos de ruptura celular, etapas de centrifugación, cromatografía y filtración (Tripathi & Shrivastava, 2019).

Existen procesos como la precipitación de proteínas donde se emplean soluciones como sulfato de amonio, etanol, isopropanol, acetona o dietil éter para precipitar las proteínas y separarlas de componentes no proteicos (Thieman & Palladino, 2010), y procesos de filtración como la centrifugación, filtración por membrana, microfiltración y ultrafiltración donde las moléculas se separan en base a su tamaño y densidad o etapas de diafiltración y la diálisis donde las proteínas pasan de zonas muy concentradas a otras menos concentradas a través de membranas semipermeables hasta alcanzar el equilibrio (Thieman & Palladino, 2010).

En la Figura 7 se esquematizan las etapas de producción de proteínas recombinantes que se han mencionado anteriormente.

### Figura 7

#### *Esquema de producción de proteínas recombinantes*



*Nota.* Esquema de producción de proteínas recombinantes con las etapas de diseño de vectores, obtención del constructo de ADN recombinante, transformación de las células huésped, optimización de la expresión de la proteína de interés, escalado de producción y purificación de la proteína. Tomado de *E. coli Expression*, por Company ABclonal, Inc 2022, ABclonal (<https://abclonal.com/bacterial-system/>).

**Procesos de cromatografía.** Las etapas de cromatografía se fundamentan en la separación selectiva de los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria que corresponde a una resina y a una fase móvil donde se mueve la proteína de interés (Thieman & Palladino, 2010). En la Tabla 4 se detallan los tipos de cromatografía.

Tabla 4

## Tipos de cromatografía

Tipo de cromatografía	Fundamento	Características	Referencia
<b>Cromatografía de Afinidad</b>	Unión de las moléculas de interés a ligandos específicos	<p>- Las etiquetas de afinidad son enzimas, dominios proteicos o polipéptidos que se adicionan a la molécula diana en su extremo N-terminal o C-terminal y que se unen a carbohidratos, biomoléculas, quelatos de metales o anticuerpos garantizando una purificación rápida, sencilla y eficiente. Por ejemplo, las etiquetas His-tag son secuencias de 6 o más residuos de histidina que permiten la purificación de las proteínas mediante columnas inmovilizadas con iones metálicos como Ni<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>.</p> <p>- La carga de las moléculas diana se modifica según las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de sales.</p>	Thieman & Palladino (2010); Zhao, Li, & Liang (2013); Priestersbach et al. (2015)
<b>Cromatografía de Intercambio Iónico</b>	Separación de las moléculas según la carga y las interacciones de tipo electrostático que se producen con el material de la fase estacionaria	<p>- Permite la remoción de productos de la célula huésped, compuestos del medio de cultivo, endotoxinas, virus, ADN restante, entre otros.</p> <p>- Los factores que rigen este proceso son el modelo de operación, el modelo de elución, la elección de la fase estacionaria y la fase móvil, las velocidades de flujo y las dimensiones de la columna.</p> <p>- Existen dos tipos de cromatografía de intercambio iónico: <b>Cromatografía de intercambio aniónico</b> con matrices de grupos funcionales cargados positivamente como dietilaminoetilo (DEAE) y amonio cuaternario (Q). <b>Cromatografía de intercambio catiónico</b> con matrices de grupos funcionales de carga negativa como carboximetilo (CM), sulfometilo (S) o sulfopropilo (SP).</p>	Coskun (2016); Tripathi & Shrivastava (2019); Sánchez et al. (2021); Cummins, Rochfort, & O'Connor (2017)

Tipo de cromatografía	Fundamento	Características	Referencia
<b>Cromatografía de interacción hidrofóbica</b>	Separación de las moléculas basándose en las propiedades de hidrofobicidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La fase estacionaria está cubierta de moléculas hidrófobas que interaccionan con los aminoácidos hidrófobos de la proteína de interés.</li> <li>- La fuerza iónica es el factor clave que modifica la hidrofobicidad de la molécula.</li> </ul>	Thieman & Palladino (2010); Tripathi & Shrivastava (2019)
<b>Cromatografía de exclusión por tamaño</b>	Separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño molecular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se emplea en la determinación de pesos moleculares de las proteínas o en la reducción de concentraciones de sal en la muestra.</li> <li>- La fase estacionaria consta de moléculas inertes con pequeños poros y las moléculas proteicas migran a diferentes velocidades en función de su peso molecular</li> </ul>	Coskun (2016); Thieman & Palladino (2010)

**Verificación de la proteína recombinante.** La verificación de la presencia de la proteína recombinante luego de los pasos de purificación es una etapa importante en la producción. La técnica más utilizada para la separación analítica de las proteínas es SDS-PAGE o electroforesis en gel de acrilamida (Thieman & Palladino, 2010). Esta técnica consiste en la desnaturalización de las proteínas y la adición de un detergente aniónico como el dodecilsulfato sódico que otorga a las proteínas una carga negativa proporcional a la masa molecular. Luego, se somete a la mezcla de proteínas a una electroforesis vertical en gel de acrilamida permitiendo la migración de las proteínas de acuerdo a su masa y finalmente se puede detectar la proteína de interés con técnicas de inmunotransferencia como el Western Blot (Nowakowski, Wobig, & Petering, 2014).

Western Blot es el método más empleado para el análisis de proteínas y consiste en la transferencia e inmovilización de las proteínas del gel de acrilamida en membranas de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno y el sondeo de las proteínas

diana mediante reacciones de unión antígeno-anticuerpo que pueden ser detectadas a través de señales quimioluminiscentes o fluorescentes y analizadas mediante diferentes softwares (Mishra, Tiwari, & Gomes, 2017).

### **Inmunogenicidad**

Se denomina inmunogenicidad a la capacidad que tienen las moléculas exógenas de generar una respuesta inmune del organismo contra sí misma o con moléculas endógenas (Jarvi & Balu-Iyer, 2021). La respuesta coordinada de las células, tejidos y moléculas del sistema inmunitario frente a microbios patógenos y otras moléculas ajenas al organismo se denomina respuesta inmunitaria (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

La respuesta inmune contra proteínas exógenas puede desencadenarse por dos mecanismos. Una respuesta inmune clásica que surge ante la primera exposición del organismo a la proteína reconocida como ajena y se caracteriza por la presencia de anticuerpos; y la respuesta producida por exceder los límites de tolerancia inmunológica que se da por la administración repetida de proteínas homólogas a las proteínas endógenas del organismo haciendo que se vuelvan inmunogénicas y provoquen respuestas autorreactivas (Dingman & Balu-Iyer, 2019).

La generación de anticuerpos es una respuesta de tipo humoral producida por los linfocitos B que se originan y maduran en la médula ósea (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015). Las células B se originan de una célula madre hematopoyética que luego se transforma en un progenitor linfoide común y posteriormente en el progenitor linfoide 2 que actúa como precursor del linaje de las células B (Anaya et al., 2013). A partir de este estadio, las células B se desarrollan hasta células B inmaduras a través de diferentes etapas que se caracterizan por variados patrones de expresión de

marcadores celulares y el reordenamiento de los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas.

Las células B inmaduras migran al bazo en un estadio de transición T1, luego en el interior del bazo pasan a ser células B T2 que se diferencian en células B maduras foliculares y células B de la zona marginal. Además, existe otra población de células B denominadas células B1 que se originan en el hígado fetal y que se ubican en la cavidad peritoneal y pleural (Anaya et al.,2013). Posteriormente se da la activación de las células B maduras a partir del reconocimiento del antígeno lo que induce la síntesis de nuevos receptores, la expansión clonal y la diferenciación en células efectoras que secretan anticuerpos para eliminar el antígeno y células de memoria que mediaran respuestas rápidas y potenciadas en infecciones futuras (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

La respuesta de anticuerpos se da a partir de mecanismos dependientes e independientes de células T. En una respuesta dependiente, las células T se activan por el antígeno y se diferencian en linfocitos T cooperadores que migran a su encuentro con linfocitos B que han reconocido el mismo antígeno y lo han interiorizado por endocitosis. Luego en la zona extrafolicular, los linfocitos B activan a los linfocitos T cooperadores a través de la presentación de péptidos del antígeno asociados a moléculas de la clase II, lo que a su vez produce que el ligando CD40L de las células T cooperadoras se una a su receptor CD40 en los linfocitos B induciendo la generación de células plasmáticas de vida corta y el cambio rápido de isotipo de los anticuerpos. Algunas de las células B migran nuevamente a los folículos y proliferan formando centros germinales donde se produce mutación somática, cambios de isotipo y selección de células de alta afinidad que se diferencian en linfocitos B de memoria que recirculan en la sangre y órganos



linfáticos, y células secretoras de anticuerpos de vida larga que se dirigen a la médula ósea (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015; Janeway et al., 2001).

Las células B de la zona marginal y las células B1 presentan una respuesta de anticuerpos independientes de linfocitos T. Los antígenos como polisacáridos, glucolípidos y ácidos nucleicos son reconocidos por el receptor de las células B lo que produce su activación y diferenciación a células plasmáticas sin el apoyo de las células T cooperadoras. Los anticuerpos producidos por estas células tienen menor afinidad por el antígeno y un limitado cambio de isotipo (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

En los mamíferos se diferencian cinco clases de anticuerpos de acuerdo a la cadena pesada que los compone. Los anticuerpos IgA que actúan como línea defensiva en las superficies mucosas, IgD que favorecen la selección y homeostasis de los linfocitos B vírgenes ya que actúa como receptor del antígeno, IgE que aparecen ante infecciones con parásitos y son los causantes de la sintomatología en reacciones alérgicas, IgG que es la inmunoglobulina más abundante en sangre y activa una respuesta inmunitaria mediada por el sistema de complemento, la citotoxicidad de macrófagos y neutrófilos, y la inmunidad innata al pasar de madre a feto por medio de la placenta, e IgM que actúa como receptor de los linfocitos B en su etapa de desarrollo y que además activa el sistema de complemento (Alberts et al., 2002).

### ***Ensayos de inmunogenicidad***

La inmunogenicidad puede evaluarse a partir de un enfoque gradual donde se aplican ensayos de cribado que determinan la presencia o ausencia de anticuerpos, ensayos de confirmación que determinan la especificidad y ensayos de caracterización y neutralización de anticuerpos que evalúen su funcionalidad. Es de gran importancia evaluar la inmunogenicidad que causan determinados compuestos, por ejemplo, en el caso de productos biofarmacéuticos, la inmunogenicidad puede afectar las

características de eficacia y seguridad de los mismos (Pineda et al., 2016). La inmunogenicidad puede evaluarse mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* (De Groot & Scott, 2007).

Los ensayos *in vitro* son necesarios para identificar los epítomos de mayor riesgo inmunogénico y para comprender los mecanismos de respuesta del sistema inmunitario. Las técnicas que se suelen usar incluyen el mapeo de epítomos, ensayos de unión al complejo mayor de histocompatibilidad, modelados de las interacciones de la respuesta innata y adaptativa en líneas celulares y ensayos con células T donde se puede evaluar su proliferación, expresión de citocinas intracelulares y la presencia de marcadores de superficie celular (Dingman & Balu-Iyer, 2019). Así mismo, en este tipo de ensayos destaca la bioinformática que ha permitido el modelamiento computacional de las respuestas inmunitarias de los organismos permitiendo la predicción de la inmunogenicidad de moléculas diana (Serrano, 2013). Existen programas bioinformáticos que permiten predecir la estructura y función de las proteínas, identificar proteínas patógenas por modelos de homología, analizar secuencias genéticas, seleccionar inmunoepítomos y predecir las propiedades inmunogénicas de las proteínas (Srivastava et al., 2021).

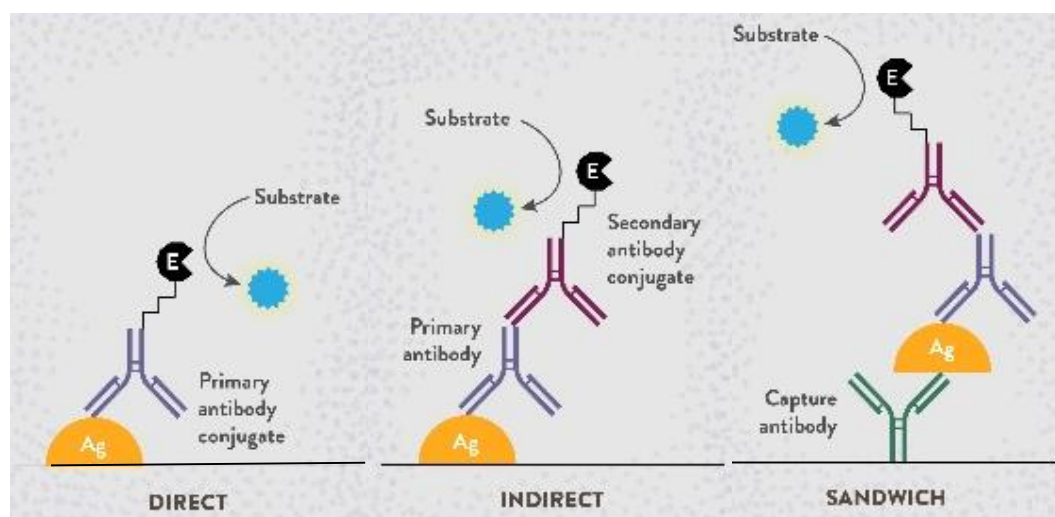
Por otra parte, los ensayos *in vivo* consisten en la exposición de un organismo vivo a la molécula problema y se analiza la respuesta de células T y la cantidad de anticuerpos neutralizantes producidos (De Groot & Scott, 2007). Para estos estudios se han empleado modelos animales como ratones, ratones transgénicos, primates, entre otros; sin embargo el uso de ratones es más frecuente gracias a las facilidades de reproducción, alojamiento y manipulación genética (Dingman & Balu-Iyer, 2019).

La inmunogenicidad puede describirse en términos de la respuesta de los anticuerpos específicos producidos contra la molécula extraña, por lo tanto, es importante la detección, cuantificación y caracterización de la misma (Mire et al., 2004). Los ensayos más empleados para la detección de anticuerpos son los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de electroquimioluminiscencia (ECL) y pruebas de unión a antígenos (Pineda et al., 2016).

ELISA es un ensayo inmunoenzimático que se fundamenta en la detección de antígenos por medio de anticuerpos marcados con enzimas denominados anticuerpos conjugados que tienen una función inmunológica y enzimática permitiendo la unión antígeno-anticuerpo y la generación de un producto detectable y cuantificable como el cambio de coloración (Colque, 2014). En la Figura 8 se observa el esquema del ensayo ELISA.

### Figura 8

*Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima*



*Nota:* Tomado de *Introducción al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas - Prueba ELISA*, por Steward, 2021, News Courier (<http://www.news->

courier.com/analysis/articles/an-introduction-to-the-enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa-test-350024).

Los ensayos de electroquimioluminiscencia (EQL) se basan en la emisión de luz como producto de reacciones electroquímicas. La luz se produce por la generación de moléculas que emiten fotones cuando pasan de un estado excitado a su estado fundamental. La electroquimioluminiscencia se puede producir por tres mecanismos, EQL de aniquilación donde se da transferencia de electrones entre iones radicales de carga opuesta, EQL con correactante que por oxidación o reducción generan compuestos intermedios que reaccionan con un luminóforo produciendo una especie excitada, EQL catódica donde los fotones se producen a partir de electrodos de metal durante la reducción de sustancias como peróxido de hidrógeno u oxalato (Ballesta, 2009).

Otras pruebas de unión a antígeno son la contrainmunolectroforesis que permite el contacto entre la muestra y los anticuerpos específicos a través de su difusión en un gel de agarosa y empleando un campo eléctrico, técnicas de aglutinación donde los antígenos se agrupan si se encuentran en la muestra por la presencia de anticuerpos unidos a otras moléculas como látex, inmunocromatografía basada en la migración de las muestras a través de una membrana de nitrocelulosa y la detección de antígenos con anticuerpos conjugados (Alonso et al., 2005).

### ***Factores que afectan la inmunogenicidad***

Durante la evaluación de la inmunogenicidad se deben considerar tres factores que se clasifican en factores asociados al tratamiento como la ruta de administración, el tiempo de duración del ensayo o la frecuencia de administración, factores asociados al individuo de estudio como el estado de su sistema inmunológico o estado genético y los factores asociados a las propiedades de la molécula de estudio y a su diseño como el

sistema de expresión donde se produjo, patrones de glicosilación o pureza (Barbosa et al., 2012; Jarvi & Balu-lyer, 2021).

### **Modelos animales**

Los modelos animales corresponden a especies no humanas empleadas en la investigación científica gracias a sus características genéticas y fisiológicas. Estos modelos animales han permitido recabar información sobre diferentes patologías, estrategias de prevención, técnicas de diagnóstico y posibles tratamientos (Maldonado, 2016).

### **Modelos murinos**

Los modelos murinos se usan ampliamente en estudios de inmunología (Cleary et al., 2020), estudios preclínicos de vacunas (Wang et al., 2021) y en el modelamiento de numerosas enfermedades humanas (Benavides & Guenet, 2001). Alrededor del 65% de las investigaciones científicas se han realizado en ratón *Mus musculus* a nivel global. En Estados Unidos se estima un 90% de roedores utilizados en experimentación, mientras que en el Reino Unido se determinó un total de 77% de ensayos con modelos murinos (CONICYT, 2009). Las ventajas y desventajas del uso de modelos murinos en la experimentación animal se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5***Ventajas y Desventajas del uso de modelos murinos*

	<b>Descripción</b>	<b>Referencias</b>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil adaptación a la vida en bioterios.</li> <li>- Manejo y manipulación sencilla.</li> <li>- Ciclos de reproducción rápidos y número elevado de progenie.</li> <li>- Bajos costos de mantenimiento ya que no tienen requerimientos nutricionales específicos.</li> <li>- Secuencia genómica conocida y procedimientos de alteración genética definidos.</li> <li>- Numerosas líneas consanguíneas y congénicas de ratones disponibles.</li> </ul>	Benavides & Guenet (2001); Wang et al., (2021)
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta similitud genética con el ser humano</li> <li>- No imitan con precisión el fenotipo de las enfermedades humanas dificultando el estudio del origen y desarrollo de las mismas. Así mismo, en estudios de cáncer se ha observado que el origen y cariotipo de los tumores difiere entre humanos y ratones.</li> </ul>	Rangarajan & Weinberg (2003)

Los ratones BALB/c son una cepa consanguínea de ratones albinos producidos por primera vez en 1913 por Halsey J. Bagg. Estos ratones se caracterizan por tener su pelaje blanco, ojos color rosa, sensibilidad a la luz, susceptibilidad al estrés y ansiedad, y altos rendimientos reproductivos. Gracias a sus características se emplean generalmente en las investigaciones de inmunología y enfermedades infecciosas (Nakamura, 2013).

Los ratones Balb/c son homocigotos en los genes marrón *Tyr<sup>pl</sup>*<sup>b</sup> y albino *Tyr<sup>c</sup>* (Hedrich & Bullock, 2004). Además, el 95% de los genes de ratón son homólogos a los genes de los seres humanos (Barré & Montagutelli, 2015). Estos ratones tienen 20

pares de cromosomas, de los cuales 19 corresponden a autosomas y 1 par a cromosomas sexuales. Genéticamente se compone de 23000 genes identificados con 27000000000 pares de bases y un número de centimorgans de 1500 (The Jackson Laboratory, 2009).

Se han empleado ratones Balb/c en diferentes estudios, por ejemplo, Saha et al. (2020), utilizó este modelo murino para evaluar la respuesta de homeostasis de hierro y su influencia en las respuestas inflamatorias. Por su parte, Wu et al. (2018), han realizado ensayos de xenoinjerto tumoral derivados de pacientes en ratones Balb/c de modo que se logre obtener información sobre las características biológicas y rasgos patológicos de tumores y con ello asegurar tratamientos personalizados. Así mismo, esta cepa se ha caracterizado por su participación en ensayos de inmunogenicidad donde han permitido evaluar respuestas de la inmunidad adaptativa como la producción de citocinas proinflamatorias e inmunosupresoras y anticuerpos antifármacos (Jiskoot et al., 2016).

### ***Manejo animal: Principio de las 3R***

La experimentación animal garantiza el desarrollo de la ciencia para mejorar el futuro del ser humano y de otros seres vivos, siempre y cuando se maneje bajo un enfoque ético (Kirk, 2018). Ante la necesidad de un adecuado manejo de los animales antes, durante y después de los ensayos se estableció el concepto de las 3R en 1959 por Russell y Burch (Singh, 2012). La cultura de las 3R en investigaciones con modelos animales ha mejorado considerablemente la fiabilidad, validez y reproducibilidad de los ensayos, así como también han beneficiado el cuidado animal (Aske & Waugh, 2017).

Las 3R representan un concepto de reemplazo, reducción y refinamiento de los ensayos animales. El reemplazo hace referencia a evitar el uso de animales de investigación y optar por ensayos alternativos como métodos *in vitro* con tejidos y

células, modelos matemáticos e informáticos como simulaciones, o estudios con animales menos desarrollados incluyendo microorganismos, anfibios, insectos, entre otros. La reducción busca establecer estrategias que minimicen el número de animales empleados en el ensayo y la cantidad de pruebas realizadas en los mismos, para ello es necesario optimizar la metodología y la muestra estadística, coordinar la investigación con otros científicos para intercambiar datos y muestras animales y evitar repetir ensayos similares. Finalmente, el refinamiento significa adecuar los ensayos para que se disminuya el dolor o estrés que puedan sentir los animales durante la investigación, para lo cual es necesario brindar todas las condiciones de bienestar animal durante el alojamiento y crianza de los animales, usar anestésicos o analgésicos para evitar sufrimiento, y entrenar a los animales para su participación en los ensayos (Sneddon, Halsey, & Bury, 2017).



## Capítulo III: Materiales y Métodos

### Localización Geográfica

El presente proyecto de investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en Av. General Rumiñahui S/N y Ambato, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, en las coordenadas 0°18'53.5"S 78°26'36.5"W, el mismo que cuenta con el aforo necesario y tiene la guía de bioseguridad respectiva para la realización del trabajo.

### Obtención de las Proteínas Recombinantes

Las proteínas PrS1 y PrRBD1 se obtuvieron a partir de los plásmidos pGBW-m4136464 y pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his y se expresaron en células bacterianas (cepa BL21) y en las células de mamíferos (HEK293) respectivamente. Este procedimiento fue realizado con anterioridad en el Laboratorio de Inmunología y Virología bajo el proyecto “Generación de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 como prospecto de desarrollo de vacuna” 2020-PICV-019-INV.

### Purificación de Proteínas Recombinantes

PrS1 y PrRBD1 con tamaños de 180 KDa y 40 KDa respectivamente se purificaron a través de los procesos de diálisis, filtración por centrifugación y una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. El manejo de las proteínas se realizó bajo condiciones estériles y con cadena de frío para evitar contaminación y degradación de las proteínas.

### *Diálisis*

El proceso de diálisis se llevó a cabo en tubos de diálisis de celulosa regenerada (Fisherbrand) con MWCO de 12000-14000 Da, para lo cual, se hidrató la membrana

previo a su uso durante 20 minutos en agua destilada, se colocó la pinza en la parte inferior y se adicionó 6 mL de muestra PrS1 y 2 mL de PrRBD1 al interior, luego se colocó la pinza y el flotador en la parte superior y finalmente se sumergió la membrana en buffer PBS 1X (Invitrogen) durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

### ***Filtración por Centrifugación***

Se recuperó 6 mL de muestra PrS1 y 2 mL de PrRBD1 de la membrana de diálisis y se colocó en unidades de filtración centrifuga Ultra-4 Amicon® (Merck) de 100000 MWCO para PrS1 y 50000 MWCO para PrRBD1, se centrifugó a 5000 G y 4°C durante 15 minutos en centrífuga refrigerada Universal 320R (Hettich) y luego se recuperó 3,5 mL de PrS1 y 0,3 mL de PrRBD1, y se almacenó en tubos de 0.6 mL y 2 mL (Eppendorf) en hielo hasta los procesos de cromatografía. Estas unidades de filtración son capaces de retener proteínas con pesos moleculares de hasta dos veces el tamaño del límite de peso molecular MWCO.

### ***Purificación de proteínas por Cromatografía de Intercambio Iónico***

Inicialmente, se procedió con el empaquetamiento de la columna en el tubo de una jeringa de 10 mL adicionando 8 mL de la resina DEAE Sepharose Fast Flow (Sigma-Aldrich), se dejó decantar la resina durante 2 horas y se retiró el sobrenadante de la parte superior con micropipeta. Después, la columna se almacenó a 4°C durante toda la noche en posición vertical y al siguiente día se armó el sistema con filtro de jeringa PES 0.22 µm (Thermo Scientific) y regulador de flujo, que se utilizó más adelante para la recuperación de las fracciones purificadas. En cada etapa de purificación se obtuvo 0,4 mL de PrS1 y 0,6 mL de PrRBD1. En la Figura 9 se muestra la columna DEAE Sepharose Fast Flow empleada en la purificación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico.

**Figura 9***Columna DEAE Sepharose Fast Flow*

A continuación, se prepararon las soluciones que se detallan en el Anexo 1 para proceder con la purificación de las proteínas PrS1 y PrRBD1. Estas soluciones se prepararon en cámara de bioseguridad tipo II AC2-3S2 (ESCO) utilizando agua destilada estéril, se ajustó el pH a 7.5 y luego se filtraron las soluciones con filtros de jeringa PES 0.22  $\mu\text{m}$  (Thermo Scientific).

Se acondicionó la columna de DEAE Sepharose Fast Flow a temperatura ambiente para evitar la formación de burbujas de aire durante la purificación de las proteínas recombinantes y se preparó la muestra adicionando la proteína en el buffer de inicio (Buffer Tris HCl 20mM (Invitrogen) pH=7.5) en relación v/v de 1:5 para acondicionarla al pH y fuerza iónica esperados. Posteriormente, se lavó la columna con 12 mL de agua destilada estéril y filtrada, luego se equilibró la columna con 12 mL de buffer de inicio y se agregó el volumen total de muestra preparada. Después se procedió con el gradiente de elución lineal haciendo lavados de 12 mL con los buffers de elución del 1 al 6 (Buffer Tris HCl 20mM pH=7.5 con NaCl 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1M

(Fisher Chemical)), se recolectó las diferentes fracciones en tubos estériles y se cuantificaron empleando el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) con una longitud de onda de 280 nm. Finalmente se lavó la columna con 12 mL de la solución de lavado ( $H_2O_d$  con NaCl 2M) y 12 mL de etanol al 20% (Haymankimia), y se almacenó nuevamente a 4°C en posición vertical hasta su posterior uso.

Las fracciones de lavado que mostraron concentraciones más altas de proteína se sometieron a filtración por centrifugación y se utilizaron como muestra para la siguiente etapa de purificación.

#### ***Purificación de proteínas por Cromatografía de afinidad***

Esta etapa de purificación se llevó a cabo en la columna de sefárosa inmovilizada con níquel HisTrap™ HP 5 mL (Cytiva), para lo cual se preparó las soluciones detalladas en el Anexo 2. Estas soluciones se prepararon en cámara de bioseguridad tipo II AC2-3S2 (ESCO) utilizando agua destilada estéril, se ajustó el pH a 7.4 y luego se filtraron las soluciones con filtros de jeringa PES 0.22  $\mu$ m (Thermo Scientific).

Así mismo se preparó la muestra a purificar en un tubo estéril adicionando 600  $\mu$ L de fosfato de sodio 0.1 M (Fisher Chemical), 300  $\mu$ L de cloruro de sodio 5 M (Fisher Chemical), 30  $\mu$ L de imidazol 3 M (Sigma Aldrich), el volumen de proteína recuperada en la cromatografía de intercambio iónico y el volumen restante de agua destilada estéril y filtrada hasta completar un volumen final de 3 mL. Las proteínas PrS1 y PrRBD1 se adicionó por goteo para evitar la formación de precipitados y se ajustó el pH a 7.4 antes y después de colocar las proteínas.

Posteriormente, se lavó la columna con 20 mL de agua destilada estéril y filtrada, luego se equilibró con 25 mL de buffer de unión (Fosfato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 30 Mm), se adicionó la muestra previamente preparada y

filtrada con filtro PES 0.22  $\mu\text{m}$  (Thermo Scientific), y se realizaron lavados con 25 mL de buffer de unión, después se lavó la columna con 25 mL de buffer de elución A (Fosfato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 500 mM, Imidazol 500 mM) y 25 mL de buffer de elución B (Fosfato de sodio 50 mM, Cloruro de sodio 300 mM, Imidazol 250 mM). Al finalizar, se adicionó 20 mL de etanol al 20% para retirar la proteína restante de la columna y se almacenó a 4°C en posición vertical. Se cuantificaron las proteínas PrS1 y PrRBD1 en cada paso de lavado y se realizó filtración por centrifugación de las fracciones que mostraron mayor concentración. Las muestras se colocaron en tubos de 0.6 mL (Eppendorf) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### Western Blot de proteínas purificadas

La técnica de Western Blot se empleó para determinar la presencia y especificidad de las PrS1 y PrRBD1 obtenidas luego del proceso de purificación. Se prepararon las soluciones detalladas en el Anexo 3.

Se ensambló el sistema de polimerización del equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) y se prepararon los geles de concentración (upper) al 4% de acrilamida y geles de separación (lower) al 8% para PrS1 y al 12% para PrRBD1 de acuerdo a la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Preparación de geles de acuerdo al porcentaje de acrilamida*

	Gel (%)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> (mL)	Acrilamida/bis 37.5:1 40% (mL)	Buffer Lower o Upper (mL)	APS 10% (uL)	TEMED (uL)
<b>Gel de concentración</b>	4	3.2	0.5	1.25	25	5
<b>Gel de separación</b>	8	5.4	2	2.5	50	10
	12	4.4	3	2.5	50	10

Así mismo, se prepararon las muestras bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras para ello se calculó el volumen de proteína correspondiente a 20 y 25 ug en masa de la PrS1 y PrRBD1 de acuerdo a la ecuación 1. Se colocó el volumen de proteína en tubos de PCR y se adicionó el volumen restante de buffer de carga 4x hasta completar el volumen total de solución.

$$V_{muestra} = \frac{\text{Cantidad de proteína (ug)}}{\text{Concentración (ug/uL)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Luego se colocaron las placas en el tanque de electroforesis vertical, se añadió el buffer de electroforesis 1X, se cargó 10 uL de las muestras previamente preparadas y se hizo migrar las proteínas PrS1 y PrRBD1 en el gel de acrilamida con una corrida electroforética de 120V durante 1 hora y 45 minutos.

Se cortó la membrana de nitrocelulosa (Whatman) y el papel Whatman en dimensiones de 8.5 cm de ancho y 5.5 cm de largo, luego se retiró el gel de separación y se sumergieron en buffer de transferencia Towbin durante 10 minutos. Después se transfirieron las proteínas desde el gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa en medio semi seco empleando el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) programado para tres ciclos de transferencia de 2.5 A, 25 V y 7 minutos. Tras la transferencia, se procedió a teñir la membrana de nitrocelulosa con solución de rojo Ponceau (Sigma Aldrich) durante 15 minutos con agitación, luego se realizaron tres lavados con agua destilada hasta observar bandas definidas.

El inmunomarcaje de las proteínas inició con el lavado de la membrana de nitrocelulosa con buffer TBS 1X en agitación por 10 minutos, seguido de la incubación de la membrana con solución de bloqueo (Buffer TTBS, BSA 5% (Sigma Aldrich)) a temperatura ambiente durante 1 hora y agitación constante, luego se realizaron lavados

de 10 minutos cada uno con buffer TTBS y agitación. Se incubó nuevamente la membrana con solución de anticuerpo primario (Buffer TTBS, BSA 3%, suero de ratón de los ensayos de inmunogenicidad 1:500) durante toda la noche a 4°C y con agitación constante.

Al siguiente día se lavó la membrana y se incubó con solución de anticuerpo secundario (Buffer TTBS, Anti-mouse IgG de cabra conjugada con HRP (Invitrogen) 1:20000) por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, agitación y protegido de la luz. Finalmente se realizaron los lavados y se adicionó 800 uL de la solución de sustrato (Peróxido y luminol del Kit Clarity ECL western Substrate (Bio-Rad) 1:1) sobre toda la superficie de la membrana, se dejó incubar por 5 minutos en oscuridad, luego se reveló en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad) y se analizaron las bandas con el software ImageLab (Bio-Rad).

### **Inoculación de ratones BALB/c con proteínas recombinantes**

En el estudio se emplearon 61 ratones hembras y machos del género *Mus musculus* cepa BALB/c de aproximadamente 8 semanas de edad obtenidos del bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Durante los ensayos, los ratones se alojaron en jaulas certificadas (Tecniplast) con comida y agua a su disposición y se aseguró las condiciones de temperatura, humedad, ciclo de luz y asepsia adecuadas para el bienestar animal.

Se trabajó con 6 grupos correspondientes a los tratamientos con adyuvante PrS1 Completo (PrS1 + Adyuvante + PBS) y PrRBD1 Completo (PrRBD1 + Adyuvante + PBS), tratamientos sin adyuvante PrS1+PBS y PrRBD1+PBS, y tratamientos control Adyuvante + PBS y PBS. Se realizó el marcaje de los ratones por medio de la técnica de perforación en las orejas y se pesó a los animales, luego se inocularon las soluciones de acuerdo al tratamiento por vía subcutánea en los ratones Balb/c.

Se realizaron dos ensayos de inoculación para evaluar la inmunogenicidad a corto y largo plazo.

### ***Ensayo de inmunogenicidad a corto plazo***

Este ensayo a corto plazo tuvo una duración de 15 días y se inoculó 33 ratones (6 ratones con PrS1 Completo, 6 ratones con PrRBD1 Completo, 6 ratones con PrS1 + PBS, 6 ratones con PrRBD1 + PBS, 5 ratones con Adyuvante + PBS y 4 ratones con PBS) aplicando una sola dosis de 200 uL de solución a cada ratón con 5 ug de la PrS1 y PrRBD1 respectivamente. Se empleó el adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) y PBS 1X estéril para la preparación de las soluciones que luego se filtraron con filtros de jeringa PES 0.22 µm (Thermo Scientific).

### ***Ensayo de inmunogenicidad a largo plazo***

Este ensayo tuvo una duración de 42 días y se inoculó 28 ratones (6 ratones con PrS1 Completo, 5 ratones con PrRBD1 Completo, 5 ratones con PrS1 + PBS, 5 ratones con PrRBD1 + PBS, 4 ratones con Adyuvante + PBS y 3 ratones con PBS). Se aplicaron dos dosis de 200 uL de solución a cada ratón con 5 ug de la PrS1 y PrRBD1 respectivamente en el día 0 y el día 28 del ensayo. En la primera inoculación se empleó adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) y en la segunda inoculación el adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).

### **Obtención de suero de ratones BALB/c**

La toma de muestra de sangre se realizó a partir del seno venoso submandibular de los ratones BALB/c. Se recolectó aproximadamente 150 a 200 uL de sangre (5 gotas) de 2 ratones de cada grupo seleccionados al azar, luego se limpió la zona de punción con torundas de algodón y se revisó que los ratones estuvieran en buen estado de salud. Posteriormente se dejó reposar las muestras de sangre durante toda la noche a temperatura ambiente y se recuperó el suero en tubos de 0.6 mL (Eppendorf) que se



almacenaron a 4°C. En el ensayo a corto plazo, la toma de muestras sanguíneas se realizó los días 1, 7 y 15, mientras que, en el ensayo a largo plazo, se realizó los días 14, 28 y 42. Al finalizar los ensayos, se extrajo sangre de todos los individuos de experimentación.

### **Evaluación de la inmunogenicidad producida por las proteínas recombinantes**

La evaluación de la respuesta inmunitaria generada por las PrS1 y PrRBD1 inoculadas en el modelo animal BALB/c se realizó a partir de la técnica inmunológica ELISA indirecto aplicada a los sueros de los ratones del ensayo.

#### ***Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (ELISAI)***

El ensayo ELISAI se realizó para determinar la presencia de anticuerpos en las muestras de suero recuperadas de los ratones en los diferentes ensayos.

Para sensibilizar las placas high binding de 96 pocillos (COSTAR), se preparó la solución de antígeno (desde 0.2 ug/pocillo) disolviendo las PrS1 y PrRBD1 en la solución de sensibilización (Buffer Carbonato-Bicarbonato de Sodio). Luego se dispensó 100 uL/pocillo de la solución de antígeno PrS1 y PrRBD1 de acuerdo al plan de placa, se selló la placa con parafilm y se incubó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día, se eliminó la solución de antígeno por inversión y se realizaron lavados de la placa con 180 uL/pocillo de solución de lavado (PBS 1X estéril (Invitrogen), Tween 20 0.05% (Sigma Aldrich)). A continuación, se dispensó 200 uL/pocillo de solución de bloqueo (leche descremada (ChemCruz)) de acuerdo al plan de placa y se incubó la placa sellada con parafilm en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora y 30 minutos.

Posteriormente se eliminó la solución de bloqueo por inversión y se realizaron nuevamente lavados de la placa, luego se dispensó 100 uL/pocillo de solución de anticuerpo primario (suero de ratón de los ensayos de inmunogenicidad o sueros

control) de acuerdo al plan de placa y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas. Así mismo, al finalizar el periodo de incubación se eliminó la solución de anticuerpo primario restante y se lavó las placas, después se colocó 100 uL/pocillo de solución de anticuerpo secundario (Anti-mouse IgG de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich)) de acuerdo al plan de placa y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Post incubación se eliminó la solución de anticuerpo secundario y se lavó la placa, se añadió 50 uL/pocillo del sustrato TMB T0440 (Sigma Aldrich) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos protegido de la luz. Finalmente se midió las absorbancias en un espectrofotómetro a 370 nm y se analizó los datos con el software GraphPad Prism. Se emplearon controles del ensayo ELISAi para verificar la validez de la técnica y controles negativos para establecer el cut off (valor límite de detección de las muestras positivas y negativas).

### **Análisis Estadístico**

Los datos de las concentraciones de PrS1 y PrRBD1 obtenidas en las diferentes etapas de purificación y los datos de los niveles de anticuerpos específicos para PrS1 y PrRBD1 en los sueros de ratones inoculados se expresaron en términos de media  $\pm$  SD (desviación estándar).

Para determinar la diferencia significativa entre los distintos tratamientos aplicados en los ensayos de inmunogenicidad a corto y largo plazo se aplicó la prueba paramétrica ANOVA de una sola vía. Así mismo, las comparaciones múltiples de los distintos tratamientos se realizaron mediante el método de Tukey. En ambos métodos se trabajó con un nivel de significancia de 0.05 y un nivel de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism.

## Capítulo IV: Resultados

### Obtención de proteínas recombinantes

Las proteínas PrS1 y PrRBD1 fueron expresadas en plataformas procariotas y eucariotas respectivamente. Las células *E. coli* BL21 produjeron la proteína S de forma intracelular por lo que se aplicó un protocolo de ruptura celular que permitió la recuperación de la PrS1 con rendimientos de  $16.34 \pm 1.93$  mg de PrS1 / L de medio de cultivo, mientras que las células HEK 293 expresaron extracelularmente la PrRBD1 con rendimientos de  $71.23 \pm 13.62$  mg de PrRBD1 / L de medio de cultivo.

### Purificación de proteínas recombinantes

#### *Rendimientos de los procesos de purificación*

PrS1 y PrRBD1 se sometieron a los procesos de diálisis, filtración por centrifugación, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. En cada etapa se cuantificó las concentraciones de proteína, las mismas que se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7**

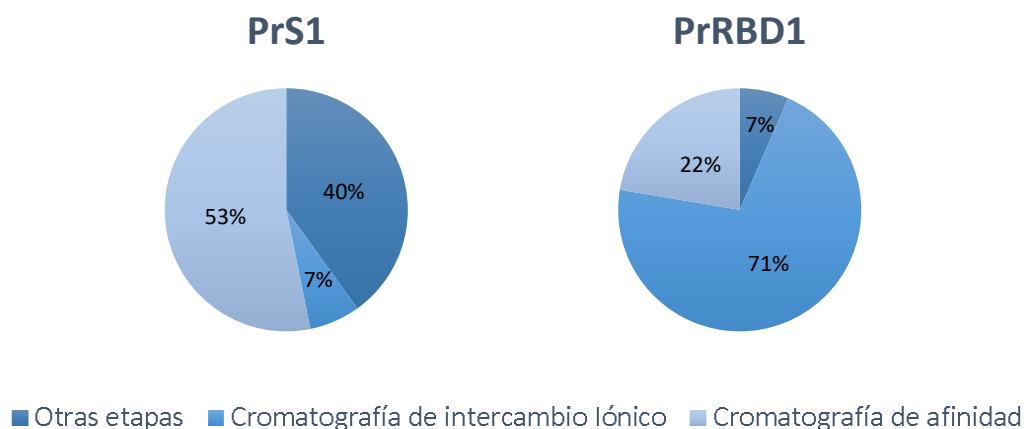
*Concentraciones de PrS1 y PrRBD1 en las etapas de purificación*

<b>Etapas de purificación</b>	<b>Concentración de PrS1 (mg/mL)</b>	<b>Concentración de PrRBD1 (mg/mL)</b>
<b>Proteína sin purificar</b>	$3.32 \pm 1.04$	$4.89 \pm 0.18$
<b>Diálisis</b>	$2.15 \pm 0.46$	$3.44 \pm 0.54$
<b>Filtración centrífuga</b>	$2.60 \pm 1.07$	$27.35 \pm 7.15$
<b>Cromatografía de intercambio iónico</b>	$2.20 \pm 0.30$	$7.88 \pm 3.12$
<b>Cromatografía de afinidad</b>	$1.49 \pm 0.28$	$4.72 \pm 2.72$

En la Figura 10 se muestran los porcentajes de rendimiento calculados en función de la masa de proteína recuperada de las etapas de purificación con cromatografía de intercambio iónico y de afinidad.

### Figura 10

*Rendimientos del proceso de purificación de PrS1 y PrRBD1*



*Nota.* Valores porcentuales de los rendimientos calculados en función de la masa de proteína PrS1 y PrRBD1 de las etapas de purificación con cromatografía de intercambio iónico y de afinidad.

Se puede observar que el proceso de diálisis para PrS1 y PrRBD1 produjo una reducción inferior al 50% de la concentración inicial de las muestras. Por otro lado, en el proceso de filtración por centrifugación, la PrRBD1 se concentró hasta 7 veces su valor inicial, mientras que la PrS1 mantuvo valores homogéneos de concentración durante todas las etapas.

Además, se identificó que el protocolo de cromatografía de intercambio iónico resultó ser más efectivo en la purificación de PrRBD1 con un rendimiento de 71.11% (4.21 mg) en comparación a PrS1 que obtuvo 6.77% (0.26 mg). Por el contrario, el protocolo de cromatografía de afinidad en columna de níquel permitió una mayor

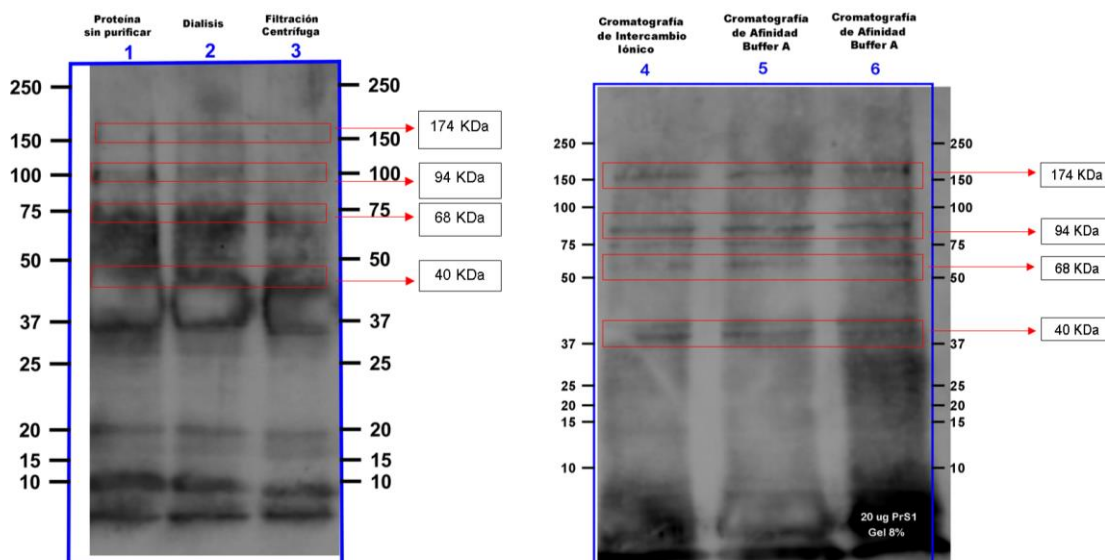
recuperación de PrS1 con el 53.18% (0.30 mg) de rendimiento en contraste a la recuperación de PrRBD1 con 22.36% (0.98 mg).

### ***Análisis de pureza y especificidad de las fracciones purificadas***

Posterior al proceso de purificación de PrS1 y PrRBD1, se realizó Western Blot de las fracciones purificadas. En el caso de la PrS1, se obtuvieron bandas de 174, 94, 68 y 40 KDa correspondientes a la proteína S de longitud completa, subunidad S1, subunidad S2 y RBD respectivamente en todas las fracciones como se indica en la Figura 11.

### **Figura 11**

*Western Blot de las fracciones purificadas de PrS1*



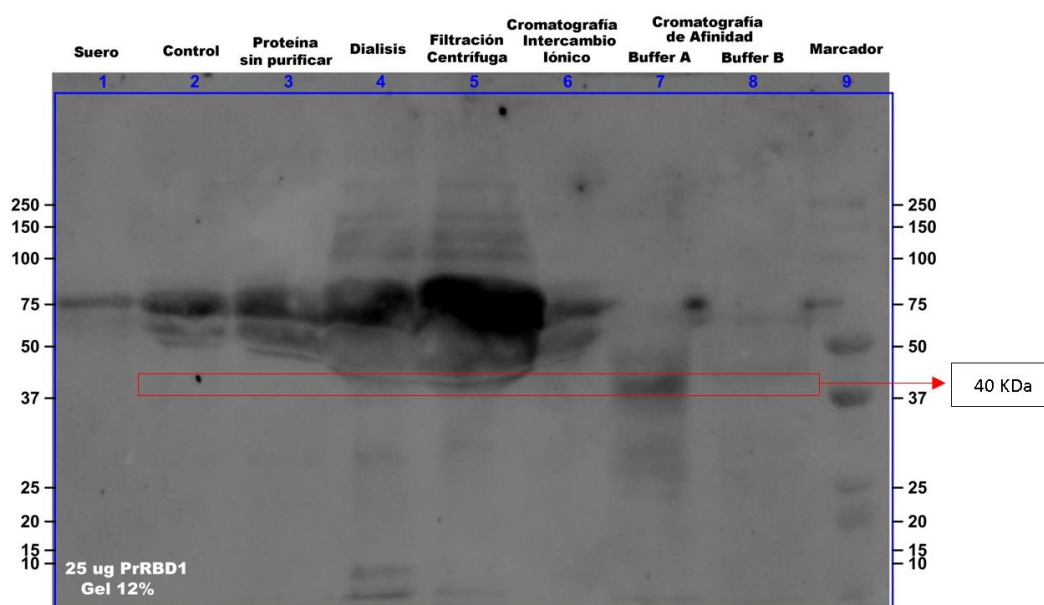
*Nota:* Western Blot de fracciones de PrS1 en gel de separación al 8% de acrilamida. Se cargó 20 ug de PrS1 y la membrana se incubó con suero de ratón inoculado con tratamiento PrS1 Completo (Día 42) como anticuerpo primario. PrS1 sin purificar (carril 1), PrS1 luego del proceso de diálisis (carril 2), PrS1 luego de filtración centrífuga en tubos amicon (carril 3), PrS1 luego de cromatografía de intercambio iónico en columna

DEAE Sefarosa (carril 4), PrS1 luego de cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa inmovilizada con níquel eluida con buffer A (carril 5) y buffer B (carril 6).

Por su parte, las fracciones purificadas de PrRBD1 mostraron patrones de bandas diferentes en cada carril como se indica en la Figura 12, sin embargo, la banda de 40 KDa corresponde a RBD.

## Figura 12

*Western Blot de las fracciones purificadas de PrRBD1*



*Nota:* Western Blot de fracciones de PrRBD1 en gel de separación al 12% de acrilamida. Se cargó 25 ug de PrRBD1 y la membrana se incubó con suero de ratón inoculado con tratamiento PrRBD1 Completo (Día 42) como anticuerpo primario. Suero Bovino Fetal (carril 1), Control: Medio DMEM + Antibiótico (carril 2), PrRBD1 sin purificar (carril 3), PrRBD1 luego del proceso de diálisis (carril 4), PrRBD1 luego de filtración centrífuga en tubos amicon (carril 5), PrRBD1 luego de cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE Sefarosa (carril 6), PrRBD1 luego de cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa inmovilizada con níquel eluida con buffer A (carril 7) y buffer B (carril 8), marcador Protein Dual Color Bio-Rad (carril 9).

El análisis de pureza de la PrS1 y PrRBD1 en sus distintas etapas de purificación se realizó con el Software ImageLab, donde se obtuvieron los valores del porcentaje de pureza que se detallan en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Porcentajes de pureza de las fracciones de PrS1 y PrRBD1 purificadas*

<b>Etapas de purificación</b>	<b>Porcentaje de pureza de PrS1 (%)</b>	<b>Porcentaje de pureza de PrRBD1 (%)</b>
<b>Proteína sin purificar</b>	31.71	42.30
<b>Diálisis</b>	49.79	27.50
<b>Filtración centrífuga</b>	42.41	20.90
<b>Cromatografía de intercambio iónico</b>	71.33	34.64
<b>Cromatografía de afinidad Buffer A</b>	47.34	88.27
<b>Cromatografía de afinidad Buffer B</b>	30.08	54.60

Antes de la aplicación del protocolo de purificación, ambas proteínas mostraron porcentajes de pureza por debajo del 50%. Luego de dializar las muestras, la PrS1 incrementó su pureza en un 18%, mientras que PrRBD1 disminuyó un 15%. Así mismo, la aplicación de las etapas de filtración centrífuga y cromatografía de intercambio iónico fueron más eficaces en la purificación de la PrS1 donde se mostraron porcentajes de 42.42% y 71.33%, en comparación a la PrRBD1 con valores de 20.90% y 34.64% respectivamente.

Por el contrario, la etapa de cromatografía de afinidad con columna de níquel mostró mayor eficiencia en la purificación de la PrRBD1 con porcentajes de 88.27% y 54.60%, a diferencia de PrS1 donde los porcentajes de pureza fueron de 47.34% y

30.08% para los buffers de elución A y B respectivamente. En ambas proteínas se obtuvo mayor pureza al eluir la proteína con el buffer A de mayor concentración de Imidazol.

### **Modelo *in vivo***

La especificidad y la concentración óptima de las proteínas se determinaron a partir de ensayos de inmunogenicidad y afinidad de unión descritos en otras investigaciones. Bayarri et al. (2021) evaluaron la especificidad de unión del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína Spike (S) con el receptor de angiotensina 2 de las células huésped (ACE-2) a partir de interferometría de biocapa y lograron determinar una constante de afinidad de  $3,34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y constante de disociación de  $5,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para las proteínas de tipo salvaje. Tian et al. (2021), también evaluaron la interacción de la proteína RBD con ACE2 a través de ensayos de unión a la superficie celular mediante citometría de flujo de fluorescencia, y obtuvieron una constante de afinidad  $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y una constante de disociación de  $2.10 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Así mismo, Yang et al. (2020) mostró que la proteína recombinante RBD purificada tuvo una constante de afinidad  $1.33 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y una constante de disociación de  $2.05 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  a partir de ensayos de resonancia de plasmón superficial.

La dosis de PrS1 y PrRBD1 aplicadas a los ratones BALB/c en este ensayo fue de 5 ug de las proteínas recombinantes. Yang et al. (2020), en su ensayo de inmunogenicidad de proteína RBD recombinante probó un intervalo de dosis de 0,1 -20 ug en ratones, y logró demostrar que la dosis de 5 ug inducía una respuesta humoral fuerte con anticuerpos neutralizantes de alta efectividad. De igual manera, la vacuna NVX-CoV2373 (Novavax) que es una vacuna de proteínas recombinantes de Spike de longitud completa y está aprobada para su uso en humanos ha mostrado eficiencias de hasta el 89.7% aplicando este esquema de dosis (Heath et al.,2021).

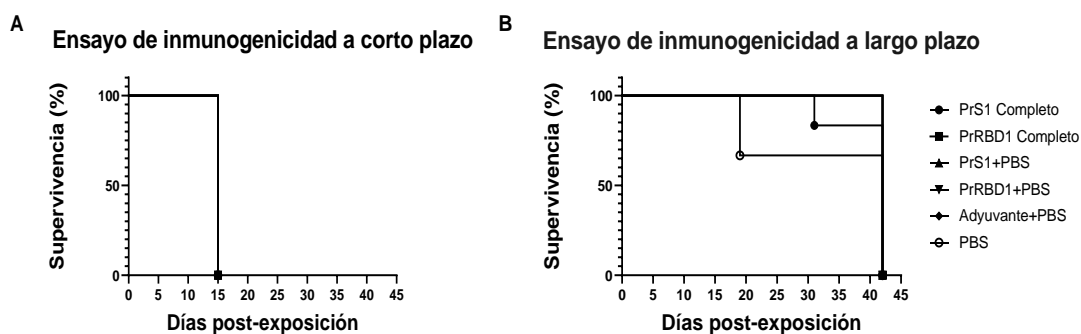


### Evaluación de la tasa de supervivencia y peso corporal de ratones BALB/c

En el ensayo de inmunogenicidad a corto plazo se observa para todos los tratamientos, una tasa de supervivencia de los ratones BALB/c del 100% hasta finalizar el ensayo en el día 15 post-exposición donde todos los animales fueron sacrificados (Figura 13 A). Por otro lado, en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo se observan porcentajes de supervivencia del 100% para los tratamientos PrRBD1 Completo, PrS1 + PBS, PrRBD1 + PBS y Adyuvante + PBS durante todo el ensayo, mientras que los tratamientos PrS1 Completo y PBS muestran valores de supervivencia del 83.33% al día 31 post-exposición y 66.67% al día 19 post-exposición respectivamente. Así mismo, al finalizar el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo se sacrificaron todos los animales en el día 42 post-exposición (Figura 13 B).

### Figura 13

*Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c en ensayos de inmunogenicidad*



*Nota: A* Representación gráfica del porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c en el ensayo de inmunogenicidad a corto plazo (15 días post-exposición).

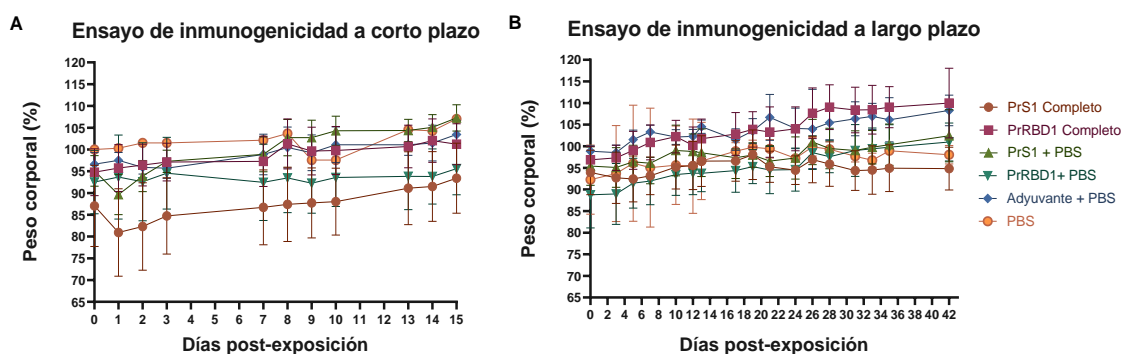
*B* Representación gráfica del porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo (42 días post-exposición).

En cuanto al peso corporal de los ratones, se observa un incremento en el porcentaje de peso corporal para todos los tratamientos aplicados en ambos ensayos de inmunogenicidad a corto y largo plazo. En el ensayo de inmunogenicidad a corto

plazo, los tratamientos PrS1 Completo, PrRBD1 Completo, PrS1 + PBS, PrRBD1 + PBS, Adyuvante + PBS y PBS mostraron incrementos de peso neto de 6.35%, 6.45%, 11.97%, 3.08%, 6.80% y 7.01% respectivamente (Figura 14 A). De forma similar, en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo se obtuvieron incrementos de peso neto de 0.88%, 13.14%, 7.02%, 12.22%, 9.43% y 5.75% para los tratamientos aplicados respecto del peso inicial de los animales (Figura 14 B). Estos resultados evidenciaron que no existió toxicidad de las PrS1 y PrRBD1 en ninguno de los grupos experimentales durante el ensayo.

### Figura 14

*Porcentaje de peso corporal de ratones BALB/c en ensayos de inmunogenicidad*



*Nota:* **A** Representación gráfica del porcentaje de peso corporal de ratones BALB/c en el ensayo de inmunogenicidad a corto plazo (15 días post-exposición).

**B** Representación gráfica del porcentaje de peso corporal de ratones BALB/c en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo (42 días post-exposición).

### Evaluación de la inmunogenicidad mediada por anticuerpos IgG

Se evaluó la inmunogenicidad de las PrS1 y PrRBD1 en los días 1, 7 y 15 después de la inmunización de ratones BALB/c. Se observa que no hubo generación de anticuerpos IgG para ninguna de las proteínas recombinantes en el día 1 (Figura 15 A y D). Sin embargo, la respuesta de IgG incrementó sustancialmente en los días

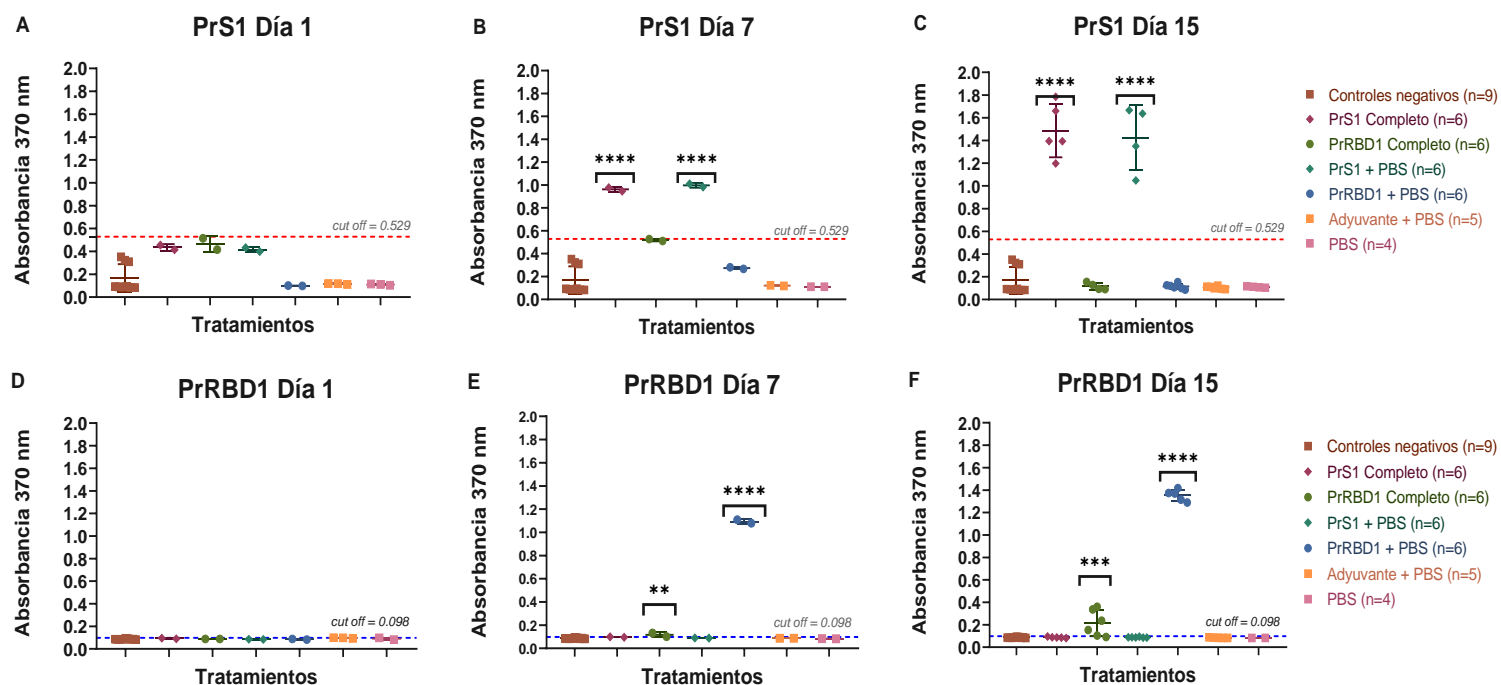
posteriores obteniéndose para el día 7, valores medios de lectura de absorbancia de  $0.962 \pm 0.023$  OD y  $0.997 \pm 0.021$  OD para los tratamientos PrS1 Completo y PrS1 + PBS en el caso del ELISAI sensibilizado con PrS1, los mismos que mostraron ser significativamente superiores a los controles negativos y a los tratamientos control Adyuvante + PBS y PBS con un p valor  $< 0.0001$ . Por el contrario, en el ELISAI sensibilizado con PrRBD1 se obtuvieron valores de  $0.116 \pm 0.022$  OD y  $1.094 \pm 0.021$  OD para los tratamientos PrRBD1 Completo y PrRBD1 + PBS que fueron superiores a los controles negativos y tratamientos control con p valor de  $0.0037$  y  $< 0.0001$  respectivamente (Figura 15 B y E).

A los 15 días post inoculación, se observó en las placas ELISAI sensibilizadas con PrS1 valores medios de  $1.486 \pm 0.234$  OD y  $1.425 \pm 0.289$  OD para PrS1 Completo y PrS1 + PBS y en las placas ELISAI sensibilizadas con PrRBD1 valores medios de  $0.214 \pm 0.117$  OD y  $1.353 \pm 0.051$  OD para PrRBD1 Completo y PrRBD1 + PBS. Estos valores fueron significativamente superiores a los controles negativos y tratamientos control con p valores  $< 0.0001$  para los tratamientos PrS1 Completo, PrS1 + PBS, PrRBD1 + PBS y  $0.0002$  para PrRBD1 Completo (Figura 15 C y F).

A partir de estos resultados podemos identificar que la producción de anticuerpos neutralizantes específicos para S y RBD incrementa con el tiempo post inoculación, también se observa que el uso del adyuvante incompleto de Freund no potencia la respuesta inmune de los individuos de estudio ya que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de Proteína + Adyuvante + PBS y los tratamientos Proteína +PBS. Por otra parte, no existe reactividad cruzada entre los anticuerpos dirigidos a Spike y los anticuerpos dirigidos a RBD pues existen diferencias significativas entre las medias de tratamientos que emplean PrS1 y PrRBD1 con p valor  $< 0.0001$ .

Figura 15

Resultados ELISAI para ensayo de inmunogenicidad a corto plazo



*Nota:* **A, B y C** Valores de absorbancia del ensayo ELISAI en placas sensibilizadas con PrS1 e incubadas con sueros de ratones del ensayo de inmunogenicidad a corto plazo tomadas los días 1, 7 y 15 respectivamente (cut off = 0.529). **D, E y F** Valores de absorbancia del ensayo ELISAI en placas sensibilizadas con PrRBD1 e incubadas con sueros de ratones del ensayo de inmunogenicidad a corto plazo tomadas los días 1, 7 y 15 respectivamente (cut off = 0.098). \*\* p = 0.0003, \*\*\* p = 0.0002, \*\*\*\* p < 0.0001

En el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo se evaluó la respuesta inmune en los días 14, 28 y 42 post inoculación. Los resultados para placas ELISAI sensibilizadas con PrS1 (Figura 16 A, B y C) mostraron valores medios de absorbancias para los tratamientos PrS1 Completo y PrS1 + PBS de  $0.245 \pm 0.011$  OD y  $0.266 \pm 0.045$  OD (Día 14),  $0.57 \pm 0.042$  OD y  $0.322 \pm 0.090$  OD (Día 28 post segunda dosis) y  $0.683 \pm 0.177$  OD y  $0.636 \pm 0.149$  OD (Día 42). Ambos tratamientos fueron

estadísticamente superiores a los controles negativos y tratamientos control con p valor  $< 0.0001$  durante todos los días evaluados.

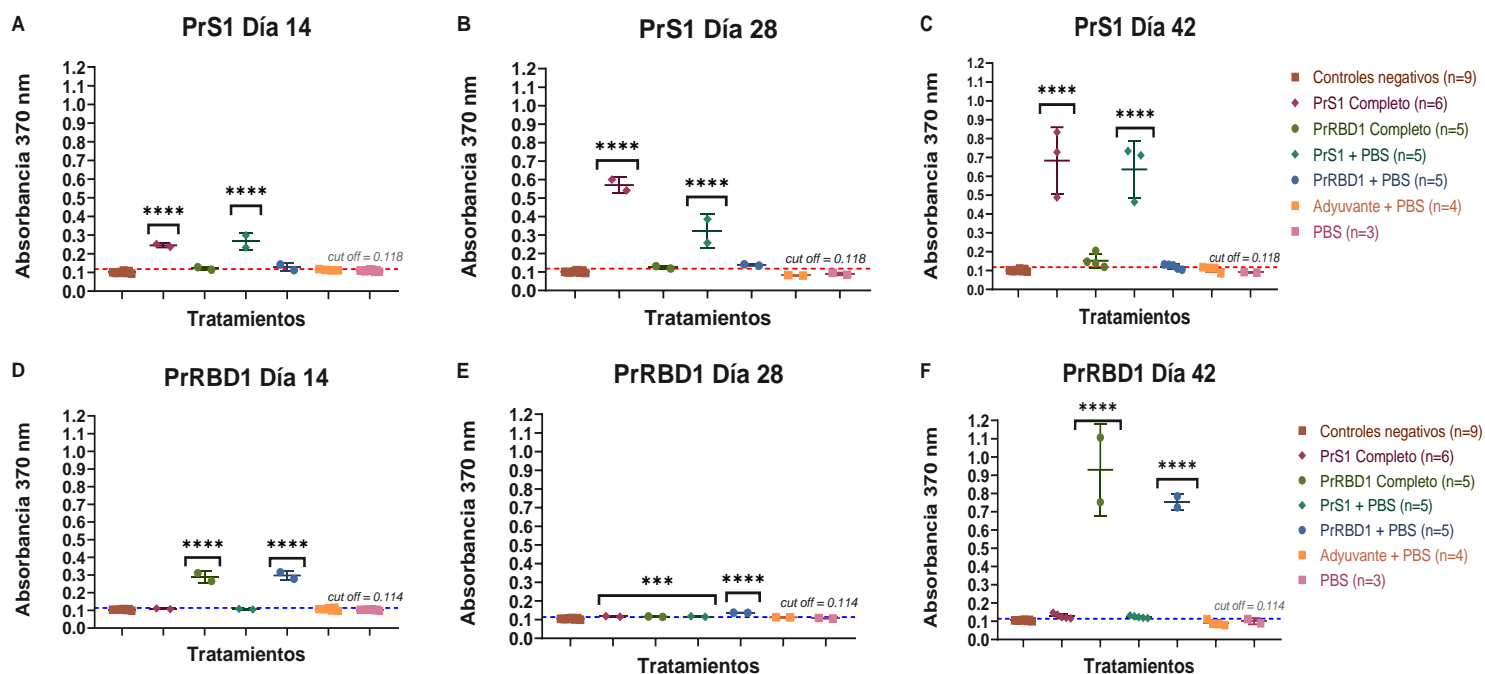
En contraste, las placas ELISAI sensibilizadas con PrRBD1 (Figura 16 D, E y F) mostraron valores medios de absorbancias para los tratamientos PrRBD1 Completo y PrRBD1 + PBS de  $0.288 \pm 0.032$  OD y  $0.297 \pm 0.027$  OD (Día 14) y  $0.929 \pm 0.25$  OD y  $0.754 \pm 0.043$  OD (Día 42), sin embargo, los resultados en el día 28 muestran una reducción significativa de la respuesta inmune obteniéndose valores medio de  $0.137 \pm 0.001$  OD para PrRBD1 + PBS,  $0.116 \pm 0.002$  OD para PrRBD1 Completo,  $0.117 \pm 0.003$  OD en PrS1 Completo y  $0.116 \pm 0.003$  OD en PrS1 + PBS. Estos tratamientos mostraron valores superiores a los controles negativos con p valor  $< 0.0001$ ,  $0.0008$ ,  $0.0003$  y  $0.0006$  respectivamente.

Los resultados indican que la adición de una segunda dosis ayuda a mantener e incrementar la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgG en los ratones por un periodo de 42 días, así mismo, el adyuvante completo de Freund empleado en la segunda inoculación potencializa la respuesta inmunitaria en los tratamientos con ambas proteínas a diferencia del adyuvante incompleto de Freund en el ensayo de inmunogenicidad a corto plazo, ya que los resultados en los días 28 y 42 muestran diferencias significativas con p valor  $< 0.0001$  entre los tratamientos con y sin adyuvante.

Además, en los sueros del día 28 para ELISAI sensibilizado con PrRBD1 se muestra una respuesta cruzada con los anticuerpos dirigidos a Spike lo que se debería a que la subunidad RBD también forma parte de la proteína Spike y por tanto puede ser reconocida por los anticuerpos de RBD.

Figura 16

Resultados ELISAI para ensayo de inmunogenicidad a largo plazo



*Nota:* **A, B y C** Valores de absorbancia del ensayo ELISAI en placas sensibilizadas con PrS1 e incubadas con sueros de ratones del ensayo de inmunogenicidad a largo plazo tomadas los días 14, 28 y 42 respectivamente (cut off = 0.118). **D, E y F** Valores de absorbancia del ensayo ELISAI en placas sensibilizadas con PrRBD1 e incubadas con sueros de ratones del ensayo de inmunogenicidad a largo plazo tomadas los días 14, 28 y 42 respectivamente (cut off = 0.114). \*\*\*  $p = 0.008$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

## Capítulo V: Discusión

La enfermedad viral COVID 19 causada por el coronavirus SARS-CoV-2 representa un problema de salud pública a nivel mundial. La ausencia de tratamientos y vacunas conocidos para este tipo de infecciones empeora la situación, pues no existen mecanismos para frenar la propagación potencial del virus (Dhama et al., 2020). Ante esta problemática, la comunidad científica ha dirigido sus esfuerzos al desarrollo de vacunas contra COVID-19 que sean eficientes y seguras (Chung, Thone, & Kwon, 2021). La mayoría de candidatos vacunales que se han desarrollado hasta el momento utilizan plataformas convencionales como el uso de subunidades proteicas recombinantes (Urbiztondo, Borràs, & Mirada, 2020). En 2021, se reportaban alrededor de 72 candidatos vacunales de proteínas recombinantes de las cuales 16 se encuentran en fase clínica y 56 en fases preclínicas (Pollet, Chen, & Strych, 2021). Tres vacunas basadas en proteínas se encuentran aprobadas para fase, aquí se incluyen Novavax, vacuna Finlay del Instituto de Cuba y otra vacuna del instituto de Rusia (Lee et al., 2021).

SARS-CoV-2 cuenta con 4 proteínas estructurales S, N, M y E que actúan como epítomos de las células T y B, por tanto, son capaces de generar respuesta inmunitaria (García et al., 2021). Sin embargo, las proteínas S y su dominio RBD constituyen objetivos inmunodominantes que participan en la entrada del virus a las células huésped y han mostrado tener una respuesta específica de anticuerpos (Premkumar et al., 2020), por lo cual fueron seleccionados como proteínas recombinantes en este estudio. El problema de emplear estos antígenos como subunidades recombinantes surge por las múltiples mutaciones del virus SARS-CoV-2 en estas regiones (Chung, Thone, & Kwon, 2021), ya que se ha observado que dichas mutaciones le otorgan a las variantes

la capacidad de escapar de la respuesta inmunitaria inducida por las vacunas (Yang et al., 2021).

En la producción de proteínas recombinantes, uno de los principales objetivos es alcanzar altos niveles de expresión de las proteínas, para ello existen diferentes factores que influyen en el proceso, entre estos se incluyen el diseño del vector de expresión, las características del gen, el tipo de promotor, la elección del organismo huésped, el proceso de fermentación incluyendo el medio de cultivo y los parámetros de producción (García et al., 2013). En relación a la elección del organismo huésped, se han realizado numerosas investigaciones sobre la producción de las PrS1 y PrRBD1 de SARS-CoV-2 a partir de diferentes sistemas de expresión (Pollet, Chen, & Strych, 2021).

Esposito et al. (2020), reportó rendimientos de 5 mg de proteína Spike trimérica/L de medio de cultivo empleando como huésped a las células HEK293, mientras que García et al. (2021), obtuvo 15 mg de proteína S1/L de medio de cultivo con células Expi293. Así mismo, McGuire et al. (2021) obtuvo rendimientos de 100 mg de fragmentos de Spike de SARS-CoV-2/L de medio de cultivo al fusionar estas proteínas con módulos de unión a colinas (CBMs) y expresarlas en *Escherichia coli*. En este trabajo, se utilizó *E. coli* BL21 para la producción de la PrS1 y se obtuvo un rendimiento de  $16.34 \pm 1.93$  mg de PrS1/ L de medio de cultivo, lo que nos indica que la producción de PrS1 en sistemas procariotas resulta ventajosa en comparación al uso de sistemas eucariotas. Los altos rendimientos en los niveles de PrS1 puede relacionarse a la adición de la etiqueta His en el extremo N terminal, ya que este proceso favorece la síntesis de ARN y expresión proteica en sistemas bacterianos (Gräslund et al., 2008).

En cuanto a la PrRBD1, los ensayos realizados por García et al. (2021) mostraron rendimientos de 40 mg/L en células Expi293, mientras que Castro et al.



(2021), tuvo 90 mg/L en hospederos celulares humanos HEK293-E6 y Expi293F™. Al emplear plataformas como levaduras, los rendimientos de proteína RBD son mayores. Lee et al. (2021) durante la caracterización y evaluación de su vacuna RBD219-N1C1 obtuvieron 237 mg/L en *Pichia Pastoris*, así mismo, Zang et al. (2021) produjo un RBD monomérico recombinante con un rendimiento total de 200 mg/L. En este estudio, se obtuvieron valores de  $71.23 \pm 13.62$  mg de PrRBD1/L de medio de cultivo. Es importante destacar que a diferencia de los huéspedes bacterianos, la línea celular HEK293 se caracteriza por su facilidad de transfectabilidad, capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas y alta productividad de proteínas recombinantes (Tan et al., 2021), lo que permite la producción de proteínas con mayor similitud a las proteínas de mamíferos y así limita la influencia de las propiedades de la molécula de estudio en los ensayos de inmunogenicidad (Barbosa et al., 2012; Jarvi & Balu-lyer, 2021).

Una vez expresadas las proteínas es necesaria la aplicación de métodos de purificación que permitan eliminar compuestos biológicos ajenos a la proteína de interés (Thieman & Palladino, 2010). La elección de las etapas de purificación depende en gran medida de las características de la proteína como tamaño, solubilidad, ubicación, entre otras. Así mismo, estos procesos deben ofrecer altos rendimientos en la recuperación de la proteína y eficacia en la purificación (Tripathi & Shrivastava, 2019), ya que la pureza de las proteínas es un factor que puede influir directamente en los resultados de los ensayos de inmunogenicidad (Barbosa et al., 2012; Jarvi & Balu-lyer, 2021). En este estudio, se planteó un esquema de purificación de las PrS1 y PrRBD1 empleando los procesos de diálisis, filtración por centrifugación, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad esperando obtener altos rendimientos y pureza de las muestras.

El proceso de diálisis permite la separación de pequeñas moléculas a través del mecanismo de difusión empleando membranas permeables selectivas, lo que puede producir la dilución de la muestra hasta menos del 50% (Andrew, Titus, & Zumstein, 2002), este efecto se evidencia en la reducción de las concentraciones de ambas proteínas, por la cual se obtuvo concentraciones de  $2.15 \pm 0.46$  y  $3.44 \pm 0.54$  mg/mL en el proceso de diálisis aplicado a PrS1 y PrRBD1 respectivamente.

La filtración por centrifugación se realizó con unidades de filtración centrífuga Ultra-4 Amicon® (Merck). En el caso de la PrS1 se obtuvieron factores de concentración significativamente inferiores a los reportados por el fabricante. La PrS1 tuvo una concentración de  $2.60 \pm 1.07$  mg/mL, a diferencia de la PrRBD1 que obtuvo concentración de  $27.35 \pm 7.15$  mg/mL incrementando hasta 10 veces su concentración inicial. Los bajos rendimientos en la recuperación de la proteína pueden deberse a las características de la muestra, las condiciones de temperatura y pH a las que se expone la muestra y al tiempo de contacto con la superficie del filtro (Merck, 2018), ya que todos estos parámetros afectan considerablemente la estabilidad de la proteína. En relación a la pureza, se obtuvieron bajos porcentajes de pureza de PrS1 y PrRBD1 de 42.41% y 20.90% respectivamente. Estos resultados también se evidenciaron en la evaluación de estas unidades filtradoras por Johnsen et al. (2016), donde se identificó que estos filtros de centrifugación tienen una baja selectividad para muestras proteicas.

La cromatografía de intercambio iónico se emplea en la purificación de proteínas recombinantes porque elimina proteínas de la célula huésped, ADN restante, componentes del medio de cultivo, entre otros (Tripathi & Shrivastava, 2019). Se fundamenta en la separación de compuestos basándose en la carga electrostática (Coskun, 2016). Este tipo de cromatografía se ve influenciado por el tipo de matriz de resina, la naturaleza hidrofóbica de la superficie y el grado de solvatación producido

(Fritz, 2005). Así mismo, Urmann et al. (2011) mostraron la influencia de la masa molecular de las proteínas sobre la carga electrostática, de modo que las proteínas de mayor masa molecular tenían mayor tendencia a modificar su carga neta por influencia de la química de la fase estacionaria. Este aspecto podría explicar los bajos rendimientos en la recuperación de la PrS1 con peso molecular alto en comparación con la PrRBD1 donde se recuperó el 71.11% de la proteína.

La cromatografía de afinidad es una de las estrategias más aplicadas para la purificación de proteínas. Se fundamenta en la capacidad de retención de la proteína a partir de la interacción entre ligandos (Thieman & Palladino, 2010). La etiqueta de afinidad His-tag que se agregó a la proteína de interés ofrece un protocolo sencillo de purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados sin afectar las características y propiedades de la proteína de interés (Gräslund et al., 2008). En este estudio, se trabajó con una columna de sefarosa inmovilizada con níquel His Trap™ HP 5 mL (Cytiva) que tiene una afinidad de unión de 40 mg/mL reportada por el fabricante (GE Healthcare, 2022). Sin embargo, las proteínas PrS1 y PrRBD1 evidenciaron baja afinidad por la columna, pues se obtuvieron concentraciones en las fracciones de elución de  $1.49 \pm 0.28$  mg/mL y  $4.72 \pm 2.72$  mg/mL respectivamente.

Según Bornhorst & Falke (2000) la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados permite la recuperación de hasta un 90% de las proteínas etiquetadas. Así mismo, Farnós et al. (2020) reportó rendimientos superiores al 50% al emplear cromatografía de afinidad para la purificación de RBD recombinante. No obstante, en este estudio se obtuvieron bajos rendimientos de 53.18% para PrS1 y 22.36% para PrRBD1, lo que puede asociarse con la baja accesibilidad de la etiqueta His al momento de atravesar la columna debido al uso de agentes quelantes como Tris HCl (Block et al., 2009). En este estudio, se empleó el buffer Tris HCl en la etapa de cromatografía

anterior, debido a que el cloro es el contraión intercambiable que va unirse a la resina durante la fase de equilibrio y luego va a ser reemplazado por las proteínas con carga negativa (GE Healthcare, 2022).

Por otro lado, el ensayo Western Blot de las proteínas permitió identificar las bandas correspondientes a las PrS1 y PrRBD1 bajo condiciones desnaturalizantes, así como también el grado de pureza de cada fracción. El Western Blot de la PrS1 mostró 4 bandas características de 174, 94, 68 y 40 KDa correspondientes a la proteína S de longitud completa, subunidad S1, subunidad S2 y RBD respectivamente, mientras que en el western Blot de PrRBD1, se detectó una banda de 40 KDa que corresponde a RBD. Estos valores en pesos moleculares varían ligeramente de los reportados por Chen et al. (2017), Farnós et al. (2020) y García et al. (2021), lo que puede deberse a patrones de glicosilación de las proteínas.

El control de los productos recombinantes incluye la evaluación de la pureza, estabilidad, rendimientos e inocuidad de la proteína, ya que estas características son importantes para ensayos posteriores (Drago & Sainz, 2006). La cromatografía es un proceso que ofrece alta pureza y eficacia en la purificación de proteínas recombinantes (Tripathi & Shrivastava, 2019), por lo cual se aplicaron dos etapas de cromatografía para la purificación de las PrS1 y PrRBD1. Sin embargo, se obtuvieron bajos porcentajes de pureza en el proceso de cromatografía por afinidad para PrS1 (47.34% y 30.08%) y PrRBD1 (88.27% y 41.32%), en comparación a los resultados de Farnós et al. (2020), donde se obtuvieron porcentajes cercanos al 95% en la purificación de RBD. En todas las fracciones de PrS1 y PrRBD1 aparecieron bandas inespecíficas que reducen la eficiencia de la purificación, estas impurezas corresponden a proteínas de la célula huésped (Chen et al., 2017) o residuos del medio celular (Tripathi & Shrivastava, 2019). La contaminación de la proteína de interés puede deberse a que algunas

proteínas celulares tienen dos o más residuos de histidina en su estructura, lo que produce una unión no específica con la matriz de la columna de cromatografía. Este problema resulta más evidente al emplear sistemas de expresión de mamíferos en comparación al uso de *Escherichia coli* (Bornhorst & Falke, 2000).

Por otra parte, en relación a la utilización de PrS1 y PrRBD1 como componentes de futuras vacunas recombinantes, se puede mencionar, que la interacción entre RBD de la proteína S y su receptor ACE-2 en el huésped determina la entrada del virus SARS-CoV-2 a las células del huésped a través de la membrana celular, esto conlleva a la liberación de citocinas que activan a las células inmunitarias y posteriormente promueven la activación de linfocitos B generadores de anticuerpos (Fernández et al., 2021). Por tanto, la especificidad en la unión del antígeno con su receptor es un aspecto importante en el desarrollo de medidas preventivas, vacunas, y terapias contra COVID-19, pues la afinidad puede influir en la capacidad de transmisión del virus y evasión de las respuestas inmunitarias (Yang et al., 2021). En este estudio, se emplearon los epítotos S y RBD de SARS-CoV-2 gracias a su alta especificidad en la interacción con ACE-2, lo que se ha demostrado en otras investigaciones a partir de diferentes ensayos. Específicamente para la proteína RBD recombinante se han obtenido constantes de afinidad de  $1.33 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y constantes de disociación de  $2.05 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , indicando alta unión con el receptor (Yang et al. 2020).

Así mismo, la determinación de la dosis óptima y el esquema de dosis en este ensayo, se planteó en base a otros ensayos de inmunogenicidad, donde la dosis de 5 ug de proteína recombinante ha inducido alta producción de anticuerpos neutralizantes sin afectar a los organismos de estudio (Heath et al., 2021; Yang et al., 2020).

En relación a los parámetros de bienestar animal, en este ensayo se evaluó la tasa de supervivencia y el peso corporal de los ratones BALB/c. Se evidenció una tasa

de supervivencia del 100% en el ensayo de inmunogenicidad a corto plazo en todos los tratamientos, mientras que en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo, los tratamientos PrS1 Completo y PBS tuvieron supervivencia del 83.33% y 66.67% respectivamente. El deceso de los animales no se debió a la inoculación con las proteínas recombinantes, lo que indica que no mostraron toxicidad en la concentración empleada. Así mismo, se obtuvo un incremento en el peso corporal de los animales en todos los tratamientos para ambos ensayos de inmunogenicidad. Los resultados obtenidos indican que no hubo sufrimiento del animal por la aplicación de las proteínas PrS1 y PrRBD1 en el ensayo de acuerdo a los criterios de valoración humanitario descritos por Wolfensohn & Lloyd (1994), ya que no se observó cambios en la apariencia y postura del pelaje de los animales, comportamientos anormales como baja movilidad, estado de alerta, depresión y automutilación; o pérdida de peso superior al 15% debido a una baja ingesta de agua y alimento.

Para evaluar la inmunogenicidad de las PrS1 y PrRBD1, se optó por inocular ratones BALB/c y analizar los niveles de expresión de anticuerpos IgG mediante ensayos ELISAI. Tanto la proteína Spike como RBD son antígenos objetivos para el desarrollo de vacunas debido a su participación en la entrada del virus SARS-CoV-2 y a su capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que protejan a los individuos contra la infección (Law et al., 2021).

Los ensayos de inmunogenicidad mostraron resultados alentadores respecto del uso de estas proteínas en futuras vacunas de antígenos recombinantes PrS1 y PrRBD1. Entre los principales resultados se obtuvo: 1) PrS1 y PrRBD1 son capaces de generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes de manera temprana y con la aplicación de una única dosis de inmunización de 5 ug de proteína recombinante, ya que se obtuvieron valores medios de absorbancia de  $0.962 \pm 0.023$  OD y  $0.997 \pm 0.021$  OD

para los tratamientos PrS1 Completo y PrS1 + PBS en el caso del ELISAI sensibilizado con PrS1 y de  $0.116 \pm 0.022$  OD y  $1.094 \pm 0.021$  OD para los tratamientos PrRBD1 Completo y PrRBD1 + PBS en el ELISAI sensibilizado con PrRBD1. 2) La respuesta humoral de los individuos de estudio tuvo una duración de hasta 42 días al aplicar una segunda dosis de 5 ug de proteína recombinante, ya que se obtuvieron valores medios de absorbancia de  $0.683 \pm 0.177$  OD (Prs1 Completo) y  $0.636 \pm 0.149$  OD (PrS1 + PBS) en ELISA i de PrS1, y  $0.929 \pm 0.25$  OD (PrRBD1 Completo) y  $0.754 \pm 0.043$  OD (PrRBD1+PBS) en ELISA i de PrRBD1.3) El adyuvante completo de Freund potenció fuertemente la respuesta inmunitaria. 4) No existió reactividad cruzada entre los anticuerpos dirigidos a Spike y a RBD.

García et al. (2021) indicaron en su ensayo de inmunogenicidad con proteínas S1 y RBD la presencia de anticuerpos IgG a partir del día 20 post inoculación de ratones Balb/c. Mientras que, Yang et al. (2020) reportó una respuesta de anticuerpos neutralizantes a los 7 días de la aplicación de una sola dosis en ratones, conejos y primates no humanos. De manera similar, este ensayo evidenció una respuesta temprana con la detección de IgG al día 7 posterior a la inmunización de los ratones con PrS1 y PrRBD1. Estos resultados concuerdan con la producción de inmunoglobulinas en pacientes infectados con SARS-CoV-2 a partir de los 6 días posteriores a la exposición con el virus (Triggle et al., 2021). Además, nos indican que las PrS1 y PrRBD1 producidas a nivel de laboratorio son antígenos capaces de producir respuestas rápidas y específicas en el organismo con la aplicación de una sola dosis de 5 ug de proteína recombinante.

La aplicación de una segunda dosis de las proteínas prolongó la respuesta inmunitaria por un periodo de 42 días, donde hubo un incremento de hasta tres veces la producción de anticuerpos contra PrS1 y PrRBD1. García et al. (2021) y Liang et al.

(2021) también reportaron respuestas de IgG considerablemente elevadas a partir de la segunda inoculación. Así mismo, en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo existió una mayor respuesta para la PrRBD1 en comparación a la PrS1, lo que según Sun et al. (2021) se debe a la alta concentración de epítomos en el dominio RBD y a la participación primordial de la proteína en la interacción con el receptor ACE-2.

Por otro lado, en este ensayo se observó el efecto del adyuvante completo de Freund sobre la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Este factor puede resultar de gran importancia ya que permite trabajar con valores de dosis inferiores sin afectar la respuesta inmunológica en los individuos (Liang et al., 2021). La mayoría de ensayos que emplean adyuvante de Freund, formulan las soluciones en relación de volúmenes iguales con el antígeno como en el caso de Ren et al. (2020) y Liu et al. (2020) con sus proteínas S1-Fc y RBD-Fc respectivamente. Sin embargo, Li et al. (2020) realizaron las formulaciones con el 50% de volumen respecto de los antígenos RBD, S1 y S completa y obtuvieron títulos de anticuerpos altos evidenciando una respuesta inmunitaria mayor en comparación al uso de otros adyuvantes como adyuvante de aluminio.

Los adyuvantes son sustancias que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmunológica que genera una vacuna. Existen varios adyuvantes empleados en experimentación animal para mejorar la respuesta inmunitaria, sin embargo, los adyuvantes de Freund son bastante utilizados (Morris et al., 1999). El adyuvante incompleto de Freund se compone de una solución acuosa del antígeno, aceite mineral y manoleato, mientras que el adyuvante completo de Freund contiene adicionalmente una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor (Arias et al., 2007). Este tipo de adyuvantes se utiliza en ensayos de inmunogenicidad del antígeno en ratones y en el estudio de enfermedades autoinmunes, sin embargo, su uso en humanos es restringido porque induce granulomas, abscesos estériles y necrosis



ulcerosa en la zona de inoculación (Apostólico et al., 2016). En ratones, se sugiere emplear Adyuvante completo de Freund a una concentración  $< 0.1$  mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, y aplicar  $< 0.1$  mL si la aplicación es por vía subcutánea (NIH OACU, 2019).

El adyuvante completo de Freund tiene un mayor efecto adyuvante debido a los patrones moleculares asociados a microbios como el motivo muramil dipéptido y al lípido trehalosa-6-6-dimicolato que activan las respuestas mediadas por los receptores NOD2 y lectina tipo C respectivamente (Dubé et al., 2020). En tal sentido, se pudo evidenciar en el ensayo de inmunogenicidad a largo plazo, que la aplicación del adyuvante completo de Freund potencializa la respuesta inmunológica de los ratones inoculados ya que se observaron valores de OD superiores en los tratamientos con adyuvante en comparación a los tratamientos sin adyuvante. Liu et al. (2020), también obtuvieron una potente respuesta inmunitaria con altos títulos de IgG específicos en ratones Balb/c inmunizados con la proteína recombinante RBD-Fc combinada con adyuvante completo de Freund en relación volumen 1:1. Así mismo, Pape et al. (2021), mostraron que el uso de adyuvante completo de Freund en vacunas de ARN mensajero en ratones favorecía la proliferación de células B específicas de los antígenos S1 y RBD y, por tanto, producían anticuerpos IgM e IgG con mayor especificidad al virus.

Finalmente, respecto de la especificidad de los anticuerpos neutralizantes dirigidos a PrS1 y PrRBD1, no hubo reactividad cruzada con los sueros de control negativo empleados en el ensayo ELISAI, ni tampoco se evidenció la interacción del antígeno PrS1 con los sueros de los tratamientos PrRBD1 y viceversa a excepción del día 28 del ensayo de inmunogenicidad a largo plazo, donde se obtuvieron valores medios de absorbancia similares entre los tratamientos PrS1 y PrRBD1 en la placa ELISAI sensibilizada con antígeno PrRBD1. Estos resultados surgieron debido a que la

subunidad RBD forma parte de la subunidad S1 de Spike (Rodríguez & Sanz, 2020), por tanto este epítipo también puede ser reconocido por los anticuerpos dirigidos a PrS1. La interacción entre el antígeno y el anticuerpo se da por uniones no covalentes y reversibles, donde predominan los factores de afinidad y avidéz para que se den las funciones efectoras de los anticuerpos neutralizantes (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015). Chen et al. (2005), en su estudio identificaron que el dominio neutralizante de los anticuerpos generados por una vacuna de virus inactivado que expresa la proteína S de SARS-CoV se encontraba superpuesto en la región de unión a ACE-2, lo que indica que la mayoría de anticuerpos neutralizantes y monoclonales potentes se dirigen al dominio RBD. La proteína Spike generalmente se encuentra en un estado trimérico y la interacción entre los anticuerpos neutralizantes se da específicamente con RBD ya que es el sitio de unión al receptor ACE-2 y por tanto bloquea directamente el ingreso del virus a las células (Yin et al., 2021).

## Capítulo VI: Conclusiones

Las PrS1 y PrRD1 alcanzaron concentraciones de  $1.49 \pm 0.28$  mg/mL y  $4.72 \pm 2.72$  mg/mL luego de la aplicación del protocolo de purificación establecido en este estudio. Así mismo, mostraron alta especificidad en la interacción antígeno-anticuerpo en los ensayos Western Blot donde se logró identificar las proteínas S de longitud completa, subunidad S1, subunidad S2 y RBD con pesos moleculares de 174, 94, 68 y 40 KDa respectivamente.

La inoculación de ratones BALB/c con dosis de 5 ug de las PrS1 y PrRBD1 no afectó la supervivencia y el peso corporal de los animales de experimentación durante el periodo de duración de los ensayos de inmunogenicidad, lo que indica que los tratamientos aplicados no fueron tóxicos para los ratones BALB/c.

Los ensayos de inmunogenicidad con las PrS1 y PrRBD1 mostraron la capacidad de estos antígenos para generar respuestas de anticuerpos neutralizantes a partir del séptimo día post-inmunización. Así mismo se demostró que la aplicación de una sola dosis activa la respuesta inmunitaria del modelo animal, sin embargo, la adición de una segunda dosis es capaz de potenciar la respuesta inmune hasta 3 veces e incrementar su duración por un periodo de 42 días, por lo que es necesaria la aplicación de un esquema de inmunización con al menos dos dosis. Adicionalmente se pudo evaluar el efecto del uso de adyuvantes como el adyuvante completo de Freund en el aumento de los niveles de anticuerpos.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Aplicar etapas de purificación adicionales que ofrezcan valores de rendimiento y pureza superiores a los obtenidos en este ensayo. Entre los procesos de purificación se puede incluir filtración de flujo tangencial y etapas cromatográficas de mayor resolución como cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) empleando columnas de exclusión por tamaño, o cromatografía de interacción hidrofóbica que han mostrado eficiencia superior en la purificación de estas proteínas.

Establecer un ELISA cuantitativo que permita evaluar la respuesta humoral mediada por anticuerpos de forma analítica, ya sea a partir de una curva estándar con concentraciones de antígeno conocidas y patrones de densidad óptica, o empleando diferentes diluciones de los sueros de ratón para establecer el título de anticuerpos neutralizantes que arroja un resultado positivo.

Adicionalmente se puede evaluar la funcionalidad y reactividad cruzada de los anticuerpos generados por la aplicación de las PrS1 y PrRBD1 en ratones BALB/c frente a una gama de variantes de la proteína Spike de SARS-CoV-2 a partir de ensayos de neutralización con el objetivo de determinar la eficacia del candidato vacunal con las nuevas cepas del virus. También se recomienda estudiar la respuesta de tipo celular causada por las PrS1 y PrRBD1 a través de la identificación de marcadores como receptores CD4+ y CD8+ de los linfocitos T y B con técnicas moleculares o inmunohistoquímica.

## Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2020). *Inmunología Básica: Funciones y Trastornos del Sistema Inmunitario*. Elsevier.  
<https://www.elsevier.com/books/inmunologia-basica/abbas/978-84-9113-670-5>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
- Alonso, C., Bartolomé, R., Domínguez, J., Matas, L., & Rabella, N. (2005). *Técnicas rápidas de detección de antígeno*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf>
- Amor, S., Fernández, L., & Baker, D. (2020). Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clinical & Experimental Immunology*, 202(2), 193-209. <https://doi.org/10.1111/cei.13523>
- Anaya, J., Shoenfeld, Y., Rojas, A., Levy, R., & Cervera, R. (2013). *Autoimmunity*. Colombia: Editorial Universitaria El Rosario.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/>
- Andrew, S., Titus, J., & Zumstein, L. (2002). Dialysis and Concentration of Protein Solutions. *Current Protocols in Toxicology*, 10(1), A.3H.1-A.3H.5.  
<https://doi.org/10.1002/0471140856.txa03hs10>
- Apostólico, J., Lunardelli, V., Coirada, F., Boscardin, S., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*, 2016, 1459394. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>

- Arias, J., Sánchez, D., Vásquez, M., Fernández, C., & Parra, L. (2007). Evaluation of two adjuvants for the formulation of antitetanic vaccines. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 10(1), 129-138.  
<https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/575/497#:~:text=Adyuvantes%20de%20Freund%3A%20el%20adyuvante,de%20Mycobacterium%20muestras%20por%20calor>
- Aske, K., & Waugh, C. (2017). Expanding the 3R principles: More rigour and transparency in research using animals. *EMBO reports*, 18(9), 1490–1492.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201744428>
- Assenberg, R., Wan, P., Geisse, S., & Mayr, L. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 393-402. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.008>
- Ballesta, J. (2009). *La electroquimioluminiscencia en técnicas rápidas de análisis: biosensores ópticos y cromatografía a baja presión*. [Tesis de Grado, Universidad de Granada].  
<https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2160/17821381.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barbosa, M., Kumar, S., Loughrey, H., & Singh, S. (2012). Biosimilars and biobetters as tools for understanding and mitigating the immunogenicity of biotherapeutics. *Drug Discovery Today*, 17(24), 1282-1288.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.07.003>
- Barré, F., & Montagutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science*, 1(4), 1-3.  
<https://doi.org/10.4155/fso.15.63>

- Bayarri, R., Johnsen, L., Idorn, M., Reinert, L., Rosbjerg, A., Vang, S., . . . Skjoedt, M. (2021). The alpha/B.1.1.7 SARS-CoV-2 variant exhibits significantly higher affinity for ACE-2 and requires lower inoculation doses to cause disease in K18-hACE2 mice . *eLife*, 10, e70002. <https://doi.org/10.7554/eLife.70002>
- Benavides, F., & Guenet, J. (2001). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina*, 61(2), 215-231. <http://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., . . . Schäfer, F. (2009). Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). En *Guide to Protein Purification*, 463(2009), 439-473. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Bolívar, F. (2007). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Colegio Nacional. [https://www.academia.edu/37314198/Fundamentos\\_y\\_casos\\_exitosos\\_de\\_la\\_biotecnolog%C3%ADa\\_moderna](https://www.academia.edu/37314198/Fundamentos_y_casos_exitosos_de_la_biotecnolog%C3%ADa_moderna)
- Bornhorst, J., & Falke, J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, 326(2000), 245–254. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Borrelli, G., & Trono, D. (2015). Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International journal of molecular sciences* , 16(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Calabrese, F., Pezzuto, F., Fortarezza, F. H., Kern, I., Panizo, A., Von der Thusen, J., . . . Lunardi, F. (2020). Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*, 477(3), 359-372. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>

- Carbone, M., Lednicky, J., Xiao, S. Y., Venditti, M., & Bucci, E. (2021). Coronavirus 2019 Infectious Disease Epidemic: Where We Are, What Can Be Done and Hope For. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *16*(4), 546–571.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.12.014>
- Cardona, A., Trull, J., González, R., Paraira, M., Andújar, X., Ramirez, P., . . . Esteve, M. (2021). SARS-CoV-2 identified by transmission electron microscopy in lymphoproliferative and ischemic intestinal lesions of COVID-19 patients with acute abdominal pain: two case reports . *BMC Gastroenterol*, *334*(2021), 1-10.  
<https://doi.org/10.1186/s12876-021-01905-3>
- Castro, R., Nobre, L., Eleutério, R., Thomaz, M., Pires, A., Monteiro, S., . . . Alves, P. (2021). Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: Impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance. *Biotechnology and bioengineering*, *118*(6), 2202–2219.  
<https://doi.org/10.1002/bit.27725>
- Chauhan, N., Soni, S., & Jain, U. (2021). Optimizing testing regimes for the detection of COVID-19 in children and older adults. *Expert review of molecular diagnostics*, *21*(10), 999-1016. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1962708>
- Chen, W., Chag, S., Poongavanam, M., Biter, A., Ewere, E., Rezende, W., . . . Hotez, P. (2017). Optimization of the Production Process and Characterization of the Yeast-Expressed SARS-CoV Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD219-N1), a SARS Vaccine Candidate. *Journal of pharmaceutical sciences*, *106*(8), 1961–1970. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.037>



- Chen, Z., Zhang, L., Qin, C., Ba, L., Yi, C., Zhang, F., . . . Ho, D. (2005). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *Journal of virology*, *79*(5), 2678–2688. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2678-2688.2005>
- Chung, J. Y., Thone, M. N., & Kwon, Y. J. (2021). COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Advanced drug delivery reviews*, *170*(2021), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011>
- Cleary, S., Pitchford, S., Amison, R., Carrington, R., Robaina, C., Magnen, M., . . . Page, C. (2020). Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *British journal of pharmacology*, *177*(21), 4851–4865. <https://doi.org/10.1111/bph.15143>
- Colque, N. (2014). *Evaluación de la sensibilidad y especificidad de dos métodos inmunoenzimáticos (quimioluminiscencia y ELISA) frente al estudio histopatológico, en la determinación del antígeno prostático específico, en pacientes de la Caja Petrolera de Salud*. [Tesis de grado, Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/3712>
- Company ABclonal Inc . (2022). *E. coli Expression*. ABClonal. <https://abclonal.com/bacterial-system/>
- CONICYT. (2009). *Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal*. Andros. <https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/10/Libro-4-Aspectos-Bio%C3%A9ticos-de-la-Experimentaci%C3%B3n-Animal.pdf>

- Contreras, A., Sánchez, A., García, F., Molina, E., & Chisti, Y. (2014). Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology progress*, 30(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/btpr.1842>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Cummins, P., Rochfort, K., & O'Connor, B. (2017). Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1485(2017), 209–223. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_11)
- De Groot, A., & Scott, D. (2007). Immunogenicity of protein. *Trends in Immunology*, 28(11), 482-490. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.011>
- Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y. S., . . . Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), e00028-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>
- Dingman, R., & Balu-Iyer, S. (2019). Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(5), 1637–1654. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.12.014>
- Drago, M., & Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(1), 38-44. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937106.pdf>
- Dubé, J., McIntosh, F., Zarruk, J., David, S., Nigou, J., & Behr, M. (2020). Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant. *Scientific reports*, 10(1), 5874. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62543-5>

- Esposito, D., Mehalko, J., Drew, M., Snead, K., Wall, V., Taylor, T., . . . Gillette, W. (2020). Optimizing high-yield production of SARS-CoV-2 soluble spike trimers for serology assays. *Protein expression and purification*, 174(2020), 105686. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105686>
- Farnós, O., Venereo, A., Xu, X., Chan, C., Dash, S., Chaabane, H., . . . Kamen, A. (2020). Rapid High-Yield Production of Functional SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain by Viral and Non-Viral Transient Expression for Pre-Clinical Evaluation. *Vaccines*, 8(4), 654. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040654>
- Feijoo, L., Rama, J., Sánchez, A., & Villa, T. (2018). Expression, activation and processing of a novel plant milk-clotting aspartic protease in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 268(2018), 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.006>
- Fernández, G., Oñate, M., Fernández, P., Velasco, M., Corral de la Calle, M., Franco, Á., . . . Cuchat, J. (2021). SARS-CoV-2: what it is, how it acts, and how it manifests in imaging studies. *Radiologia*, 63(2), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2020.10.006>
- Firas, R., Mazhar, A., Ghena, K., Dunia, S., & Amjad, A. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*, 9(3),231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science*, 61(1), 1-29. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>

- Frigolet, M., & Gutiérrez, R. (2017). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 18(7), 1-7.  
<http://revista.unam.mx/vol.18/num7/art54/index.html>
- Fritz, J. (2005). Factors affecting selectivity in ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1085(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.087>
- García, A. (2020). Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general, aplicabilidad para SARS-COV-2 e implicaciones terapéuticas. *Anales de pediatría*, 93(1), 61-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.04.016>
- García, J., Mendoza, J., Fernández, D., Roa, D., Filisola, J., Martínez, S., . . . Cedillo, L. (2021). Expresión de proteínas recombinantes y purificación de N, S1 y RBD de SARS-CoV-2 de células de mamíferos y sus posibles aplicaciones . *Diagnostics* , 11(10), 1808. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11101808>
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.  
<http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v22n2/vac06213.pdf>
- GE Healthcare. (2022). *Affinity Chromatography*.  
[https://research.fredhutch.org/content/dam/strip/hahn/methods/biochem/Affinity\\_Chromatography\\_Handbook-Specific\\_Groups\\_of\\_Biomolecules.pdf](https://research.fredhutch.org/content/dam/strip/hahn/methods/biochem/Affinity_Chromatography_Handbook-Specific_Groups_of_Biomolecules.pdf)
- GE Healthcare. (2022). *Recombinant Protein Purification Handbook*.  
[https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE\\_Protein\\_Purification\\_Handbooks/Recombinant\\_Protein\\_Purification\\_Handbook.pdf](https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE_Protein_Purification_Handbooks/Recombinant_Protein_Purification_Handbook.pdf)

- Geisler, C., & Jarvis, D. L. (2018). Adventitious viruses in insect cell lines used for recombinant protein expression. *Protein expression and purification*, 144(2018), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.002>
- González, A., & Fillat, M. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*, 37(1), 14-27. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B., Bray, J., Gileadi, O., . . . Gunsalus, K. (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Guerrero, M., Rodríguez, L., & Viader, J. (2007). Producción de una fitasa recombinante en *Pichia pastoris*. *Ciencia UANL*, 10(4), 413-418. <http://eprints.uanl.mx/1789/1/producciondeunafitasa.pdf>
- Guevara, E., López, A., Jiménez, L., & Sotelo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnia*, 15(3), 1-10. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/152>
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. (2016). An Introduction to Biotechnology . *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 4(2016), 1-21. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_1)
- Hasöksüz, M., Kılıç, S., & Saraç, F. (2020). Coronavirus and SARS-CoV-2. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(1), 550. DOI: 10.3906/sag-2004-127
- Heath, P., Galiza, E., Baxter, D., Boffito, M., Browne, D., Burns, F., . . . Toback, S. (2021). Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine . *The New*

*England journal of medicine*, 385(13), 1172–1183.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>

Hedrich, H., & Bullock, G. (2004). *The laboratory mouse*. Elsevier.

Hunter, M., Yuan, P., Vavilala, D., & Fox, M. (2019). Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current Protocols in protein science*, 95(1), 1-28.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30265450/>

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/>

Jarvi, N., & Balu-Iyer, S. (2021). Immunogenicity Challenges Associated with Subcutaneous Delivery of Therapeutic Proteins. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 35(2), 125–146.

<https://doi.org/10.1007/s40259-020-00465-4>

Jiskoot, W., Kijanka, G., Randolph, T., Carpenter, J., Koulov, A., Mahler, H., . . . Narhi, L. (2016). Modelos de ratón para evaluar la inmunogenicidad de proteínas:

lecciones y desafíos . *Revista de ciencias farmacéuticas*, 105(5), 1567-1575.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.031>

Johnsen, E., Brandtzaeg, O., Vehus, T., Roberg, H., Bogoeva, V., Ademi, O., . . .

Wilson, S. (2016). A critical evaluation of Amicon Ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120(2016), 106–111.

[doi:10.1016/j.jpba.2015.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.010)

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*, 235(9), 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Karch, C., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology*, 120(15), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>
- Kiasari, A. (2020). Comparative Evaluation of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein Expressed in Plasmid- and Baculovirus-Based Systems in Insect Cells. *Archives of Razi Institute*, 75(2), 187-195. <https://doi.org/10.22092/ari.2018.121095.1205>
- Kim, D., Lee, J., Yang, J., Kim, J., Kim, V., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *CellPress*, 181(4), 914-921. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kirk, R. (2018). Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Ciencia, tecnología y valores humanos*, 43(4), 622-648. <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>
- Law, J., Logan, M., Joyce, M., Landi, A., Hockman, D., Crawford, K., . . . Houghton, M. (2021). SARS-COV-2 recombinant Receptor-Binding-Domain (RBD) induces neutralizing antibodies against variant strains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1. *Vaccine*, 39(40), 5769–5779. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.081>
- Lee, J., Liu, Z., Chen, W., Wei, J., Kundu, R., Adhikari, R., . . . Bottazzi, M. (2021). Process development and scale-up optimization of the SARS-CoV-2 receptor binding domain-based vaccine candidate, RBD219-N1C1. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(10), 4153–4165. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11281-3>

- Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Wu, D., Xue, W., Xiong, H., . . . Xia, N. (2020). SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 2076-2090.  
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>
- Liang, J., Su, D., Song, T., Zeng, Y., Huang, W., Wu, J., . . . Liang, P. (2021). S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nature Communications*, 12(1), 1346.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21634-1>
- Liu, Z., Xu, W., Xia, S., Gu, C., Wang, X., Wang, Q., . . . Jiang, S. (2020). RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 282.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00402-5>
- Machhi, J., Herskovitz, J., Senan, A. M., Dutta, D., Nath, B., Oleynikov, M. D., . . . Kevadiya, B. D. (2020). The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 15(3), 359–386. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>
- Maldonado, J. (2016). Experiments biomodels animals in health sciences. *Avances en Biomedicina*, 5(3), 173-177.  
<https://www.redalyc.org/journal/3313/331349259008/html/>
- McGuire, B., Mela, J., Thompson, V., Cucksey, L., Stevens, C., McWhinnie, R., . . . Nano, F. (2021). Escherichia coli recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments. *bioRxiv*, 10(2021), 1-28.  
<https://doi.org/10.1101/2021.06.22.449540>



- Merck. (2018). *Fisherscientific*. Refine Protein Preparation Tools for better protein analysis. [http://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/EU/Merck-Millipore/brochures/2018-18518-RS\\_COBRAND\\_PB1455ENEU\\_Fisher.pdf?\\_ga=2.57422626.967719770.1641259093-775881934.1621218269](http://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/EU/Merck-Millipore/brochures/2018-18518-RS_COBRAND_PB1455ENEU_Fisher.pdf?_ga=2.57422626.967719770.1641259093-775881934.1621218269)
- Mire, A., Barrett, Y., Devanarayan, V., Koren, E., Liu, H., Maia, M., . . . Zuckerman, L. (2004). Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of immunological methods*, 289(2), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.06.002>
- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Morris, H., Martínez, C., Abdala, R., & Campos, D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. . *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 130-137. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03001999000200010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001999000200010)
- Nakamura, H. (2013). Ratón BALB / c. *Enciclopedia de genética de Brenner*, 10(2013), 290-292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>
- NIH OACU. (2019). *Guidelines for the Use of Adjuvants in Research*.OACU. [https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b8\\_adjuvants.pdf](https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b8_adjuvants.pdf)
- Nowakowski, A., Wobig, W., & Petering, D. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics : integrated biometal science* , 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>

- OMS. (03 de Diciembre de 2021). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.  
<https://covid19.who.int/>
- Otero, A. (2010). Los anticuerpos y su papel como herramientas analíticas en los ensayos inmunoenzimáticos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(2), 85-92. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=71567>
- Pape, K., Dileepan, T., Kabage, A., Kozysa, D., Batres, R., Evert, C., . . . Jenkins, M. (2021). High-affinity memory B cells induced by SARS-CoV-2 infection produce more plasmablasts and atypical memory B cells than those primed by mRNA vaccines. *Cell Reports*, 37(2021), 109823. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109823>
- Pastrian, G. (2020). Genetic and Molecular Basis of COVID-19 (SARS-CoV-2) Mechanisms of Pathogenesis and Immune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331-337. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Pineda, C., Castañeda, G., Jacobs, I., Alvarez, D., & Carini, C. (2016). Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs*, 30(3), 195-206.  
<https://doi.org/10.1007/s40259-016-0174-5>
- Poland, G., Ovsyannikova, I., & Kennedy, R. (2020). SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet (London, England)*, 396(10262), 1595–1606. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1).
- Poland, G., Ovsyannikova, I., & Kennedy, R. (2020). SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet*, 396(10262), 1595–1606.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1)

- Pollet, J., Chen, W., & Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced drug delivery reviews*, 170(2021), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>
- Premkumar, L., Segovia, B., Jadi, R., Martinez, D., Raut, R., Markmann, A., . . . Sette, A. (2020). Collins MH, Schmitz J, Baric RS, de Silva AM. Collins MH, Schmitz J, Baric RS, de Silva AM. El dominio de unión al receptor de la proteína de pico viral es un objetivo inmunodominante y altamente específico de anticuerpos en pacientes con SARS-CoV-2. *Inmunología científica*, 5(48), eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
- Rangarajan, A., & Weinberg, R. (2003). Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nature Reviews Cancer*, 3(2003), 952–959. <https://doi.org/10.1038/nrc1235>
- Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A., & Singh, S. K. (2020). SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory Research*, 21(1), 318. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z>
- Ren, W., Sun, H., Gao, G., Chen, J., Sun, S., Zhao, R., . . . Sun, L. (2020). Recombinant SARS-CoV-2 spike S1-Fc fusion protein induced high levels of neutralizing responses in nonhuman primates. *Vaccine*, 38(35), 5653-5658. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.066>
- Rodríguez, C., & Sanz, L. (2020). Inmunidad frente a SARS-CoV-2: caminando hacia la vacunación. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 33(6), 392–398. <https://doi.org/10.37201/req/086.2020>

- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges . *Frontiers in microbiology* , 5(172), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosano, G., Morales, E., & Ceccarelli, E. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *The protein society*, 28(2019), 1412-1422. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31219641/>
- Rue, S., Anderson, P., Gaylord, M., Miller, J., Glaser, S., & Lesley, S. (2019). A High-Throughput System for Transient and Stable Protein Production in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology* , 10(2019), 93-142. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9624-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9624-7_5)
- Saha, P., Xiao, X., Li, Y., Golonka, R., Abokor, A., Yeoh, B., & Vijay-Kumar, M. (2020). Distinta homeostasis del hierro en cepas de ratón C57BL/6 y Balb/c. *Informes fisiológicos*, 8(9), e14441. <https://doi.org/10.14814/phy2.14441>
- Sánchez, C., Flores, M., Enriquez, D., Rito, M., & Mayolo, K. (2021). Purification of Modified Therapeutic Proteins Available on the Market: An Analysis of Chromatography-Based Strategies. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9(717326), 1-25. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.717326>
- Sarasty, O., Carpio, C. E., Hudson, D., Guerrero-Ochoa, P. A., & Borja, I. (2020). The demand for a COVID-19 vaccine in Ecuador. *Vaccine*, 38(51), 8090–8098. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.013>
- Sarker, A., Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2019). Evaluation of scFv protein recovery from *E. coli* by in vitro refolding and mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1053-9>

- Schoch CL, e. a. (2020). *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=LinkOut&id=2697049&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock>
- Serrano, O. (2013). Inmunogenicidad de proteínas recombinantes comparada con el empleo de herramientas bioinformáticas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(3), 293-301. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=48506>
- Serrano, Y., Hernández, A., & Fando, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *CENIC Ciencias Biológicas*, 44(2), 1-6. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181227534009.pdf>
- Servicio Nacional de Gestión de Riesgos y Emergencias. (14 de Enero de 2022). *Informes de Situación e Infografías – COVID 19 – desde el 29 de Febrero del 2020*. Gobierno de la República del Ecuador.  
<https://www.gestionderiesgos.gob.ec/informes-de-situacion-covid-19-desde-el-13-de-marzo-del-2020/>
- Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
- Sharma, A., Ahmad, I., & Lal, S. K. (2021). COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, 13(2), 202. <https://doi.org/10.3390/v13020202>

- Silveira, M. M., Moreira, G., & Mendonca, M. (2021). DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life sciences*, 267(2021), 118919.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118919>
- Singh, J. (2012). El centro nacional para el reemplazo, refinamiento y reducción de animales en investigación. *Revista de farmacología y farmacoterapia*, 3(1), 87–89. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3284057/>
- Sneddon, L., Halsey, L., & Bury, N. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of experimental biology*, 220(17), 3007–3016. <https://doi.org/10.1242/jeb.147058>
- Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, 559(2015), 1-15.  
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- Srivastava, V., Kaushik, S., Bhargava, G., Jain, A., Saxena, J., & Jyoti, A. (2021). A Bioinformatics Approach for the Prediction of Immunogenic Properties and Structure of the SARS-COV-2 B.1.617.1 Variant Spike Protein. *BioMed Research International*, 8(2021),1-8. <https://doi.org/10.1155/2021/7251119>
- Steward, K. (25 de junio de 2021). *Introducción al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas - Prueba ELISA*. News Courier. <http://www.news-courier.com/analysis/articles/an-introduction-to-the-enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa-test-350024>
- Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T., & Lochyński, S. (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological reports*, 65(5), 1075–1085.  
[https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71466-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71466-x)

- Subedi, G. P., Johnson, R. W., Moniz, H. A., Moremen, K. W., & Barb, A. (2015). High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension. *Journal of Visualized Experiments*, 10(106), e53568. <https://doi.org/10.3791/53568>
- Sun, Y., Zhou, J., Zhu, H., Xu, F., Zhao, W., Lu, H., . . . Zhou, Z. (2021). Development of a Recombinant RBD Subunit Vaccine for SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(10), 1936. <https://doi.org/10.3390/v13101936>
- Tan, E., Chin, C., Lim, Z., & Ng, S. (2021). Línea celular HEK293 como plataforma para producir proteínas recombinantes y vectores virales. *Fronteras en bioingeniería y biotecnología*, 9(2021), 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tavira, C., Ortega, A., Davila, I., Estrada, S., & Meneses, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40(4), 35-46. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006>
- The Jackson Laboratory. (2009). *Handbook of Genetically Standardized Mice*. URM. <https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/animal-resource/forms/documents/JAX-Handbook-Genetically-Standardized-Mice.pdf>
- Thieman, W., & Palladino, M. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Pearson. [http://siar.minam.gob.pe/puno/sites/default/files/archivos/public/docs/copia\\_de\\_thiebiot.pdf](http://siar.minam.gob.pe/puno/sites/default/files/archivos/public/docs/copia_de_thiebiot.pdf)
- Thomas, P., & Smart, T. (2005). Línea celular HEK293: un vehículo para la expresión de proteínas recombinantes. *Revista de métodos farmacológicos y toxicológicos*, 51(3), 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>

- Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., . . . Zheng, P. (2021). N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *eLife*, *10*(2021), e69091. <https://doi.org/10.7554/eLife.69091>
- Tiruneh, S., Tesema, Z., Azanaw, M., & Angaw, D. (2021). The effect of age on the incidence of COVID-19 complications: a systematic review and meta-analysis. *Systematic reviews*, *10*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01636-2>
- Tizaoui, K., Zidi, I., Lee, K., Ghayda, R., Hong, S., Li, H., . . . Shin, J. I. (2020). Update of the current knowledge on genetics, evolution, immunopathogenesis, and transmission for coronavirus disease 19 (COVID-19). *International Journal of Biological Sciences*, *16*(15), 2906–2923. <https://doi.org/10.7150/ijbs.48812>
- Tong, P. B., Lin, L. Y., & Tran, T. H. (2020). Coronaviruses pandemics: Can neutralizing antibodies help?. *Life sciences*, *255*(2020), 117836. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117836>
- Triggle, C. R., Bansal, D., Ding, H., Islam, M. M., Farag, E., Hadi, H. A., & Sultan, A. A. (2021). A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. *Frontiers in immunology*, *12*(2021), 631139. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631139>
- Tripathi, N., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *7*(420), 1-35. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>



- Urbiztondo, L., Borràs, E., & Mirada, G. (2020). Vacunas contra el coronavirus [Coronavirus vaccines]. *Vacunas*, 21(1), 69–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.vacun.2020.04.002>
- Urmann, M., Hafner, M., & Frech, C. (2011). Influencia de las propiedades de las proteínas y de la fase estacionaria en la interacción proteína-matriz en la cromatografía de intercambio catiónico. *Revista de cromatografía A*, 1218(31), 5136-5145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.085>
- Walls, A., Young, J., Tortorici, M., Wall, A., McGuire, A., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10(2020) , 587269.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, S., Li, L., Yan, F., Gao, Y., Yang, S., & Xia, X. (2021). COVID-19 Animal Models and Vaccines: Current Landscape and Future Prospects. *Vaccines*, 9(10), 1-24.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines9101082>
- Wang, T., & Guo, X. (2020). Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(2020), 5673–5688. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10640-w>
- Wolfensohn, S., & Lloyd, M. (1994). *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. USA: Oxford University Press

- Wu, J., Zhang, J., Jiang, M., Zhang, T., Wang, Y., Wang, Z., . . . Li, W. (2018). Comparación entre ratones NOD/SCID y ratones BALB/c para el modelo de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Manejo e investigación del cáncer*, *10*(2018), 6695–6703. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S181272>
- Yang, J., Wang, W., Chen, Z., Lu, S., Yang, F., Bi, Z., . . . Wei, X. (2020). A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*, *586*(2020), 572-577. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>
- Yang, L., Li, J., Guo, S., Hou, C., Liao, C., Shi, L., . . . He, X. (2021). SARS-CoV-2 Variants, RBD Mutations, Binding Affinity, and Antibody Escape. *International journal of molecular sciences*, *22*(22),12114. <https://doi.org/10.3390/ijms222212114>
- Yin, V., Lai, S., Caniels, T., Brouwer, P., Brinkkemper, M., Aldon, Y., . . . Heck, A. (2021). Probing Affinity, Avidity, Anticooperativity, and Competition in Antibody and Receptor Binding to the SARS-CoV-2 Spike by Single Particle Mass Analyses. *ACS Central Science*, *7*(11), 1863–1873. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00804>
- Zang, J., Zhu, Y., Zhou, Y., Gu, C., Yi, Y., Wang, S., . . . Huang, Z. (2021). Yeast-produced RBD-based recombinant protein vaccines elicit broadly neutralizing antibodies and durable protective immunity against SARS-CoV-2 infection. *Cell discovery*, *7*(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00315-9>
- Zhao, X., Li, G., & Liang, S. (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of analytical methods in chemistry*, *10*(2013), 581093. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>

Zhu, W., Gong, G., Pan, J., Han, S., Zhang, W., Hu, Y., & Xie, L. (2018). High level expression and purification of recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 147(2018), 61-68.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.02.003>

