



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología



**Proyecto de Titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniera en Biotecnología**

**“Evaluación de la respuesta inmune adaptativa mediante la expresión génica en un modelo de
ratón BALB/c post infección de la proteína espiga (S) y el dominio de unión al receptor (RBD) del
SARS-CoV-2”**

Olmedo Karolys, Stefany Alejandra

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D.

Sangolquí, Agosto 2022



Contenido

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



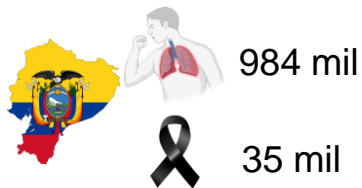
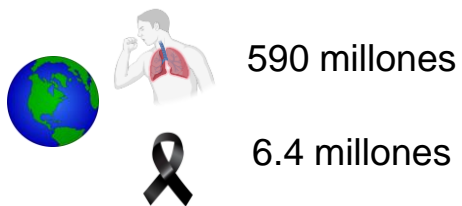
Recomendaciones



Introducción

COVID-19

Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2)



Dolor de cabeza



Fiebre



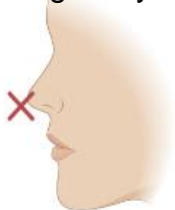
Tos



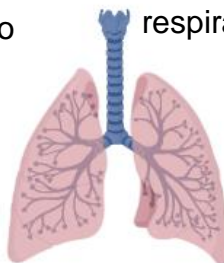
Vómito y diarrea



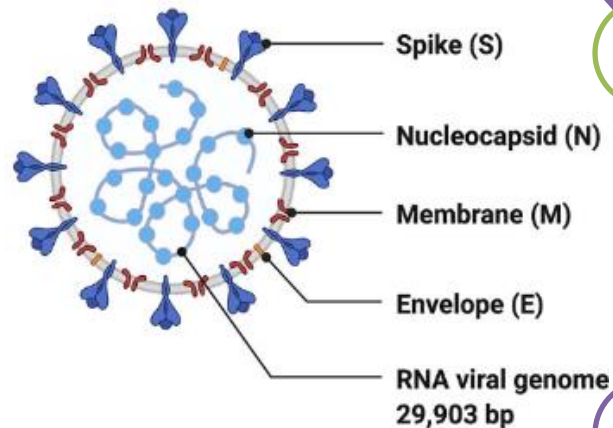
Pérdida de gusto y olfato



Dificultad respiratoria



Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA)

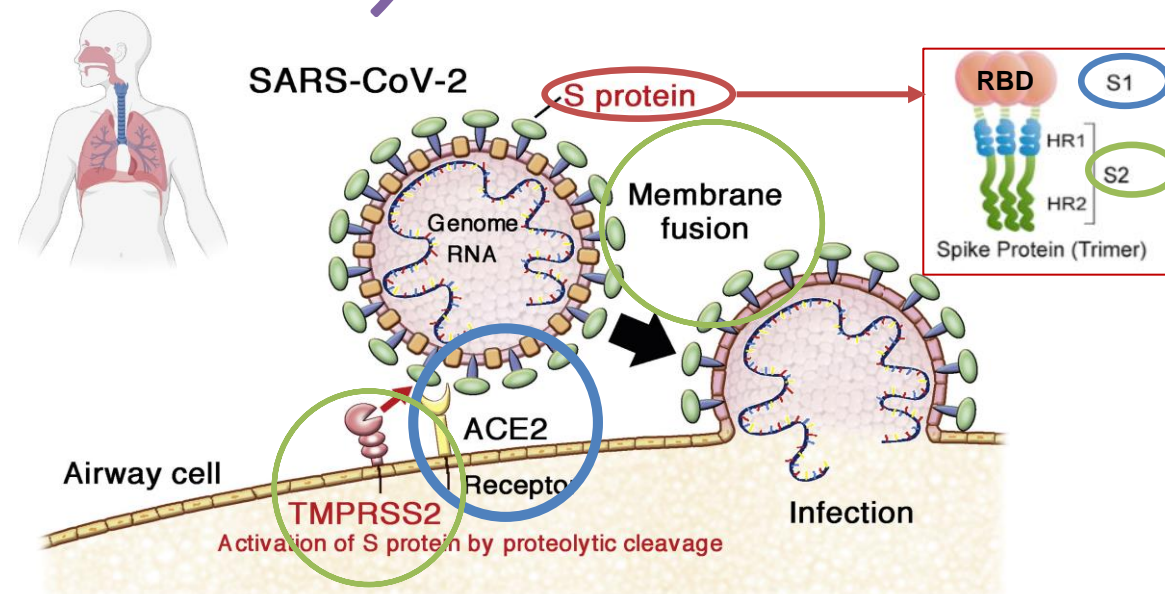


ARNmc (+) con envoltura

Género: *Betacoronavirus*

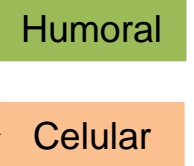
29 proteínas

Ómicron (B.1.1.529) y Delta (B.1.617.2)

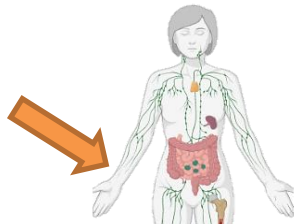
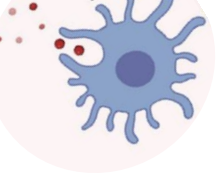


Introducción

Respuesta inmunitaria

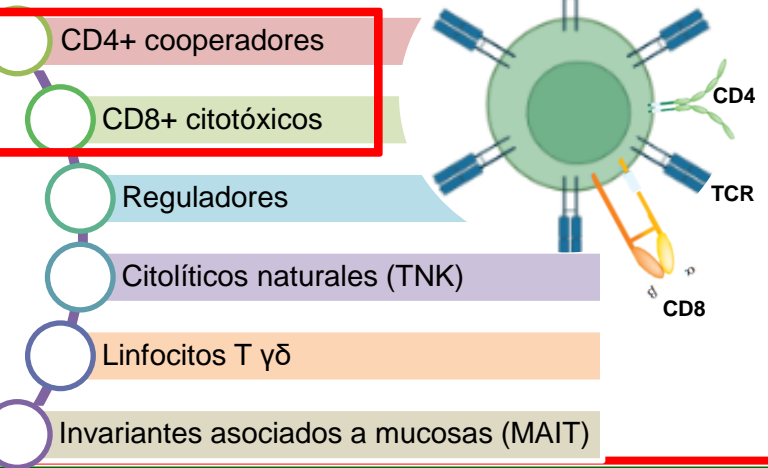


Células presentadoras de antígeno

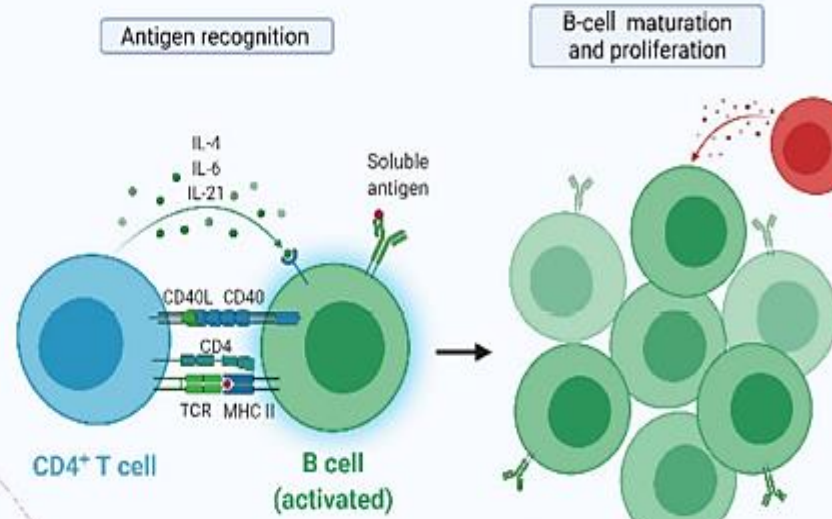
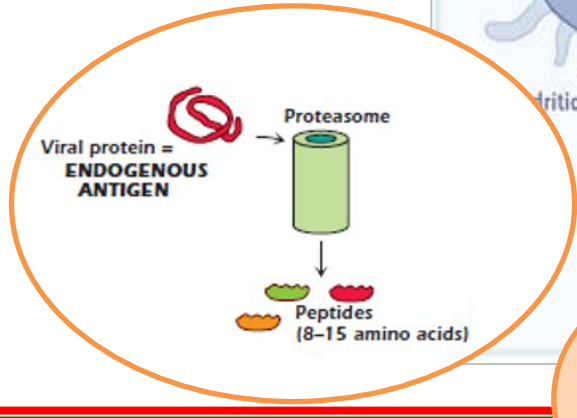
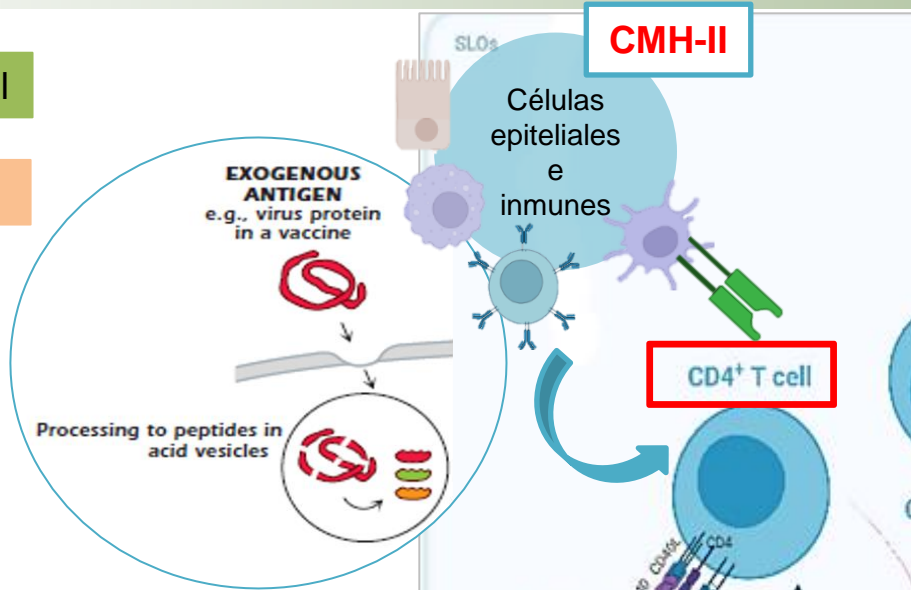


Órganos linfáticos secundarios

Linfocitos T



Presentación de antígeno



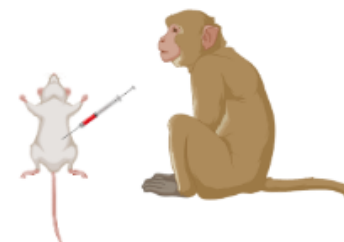
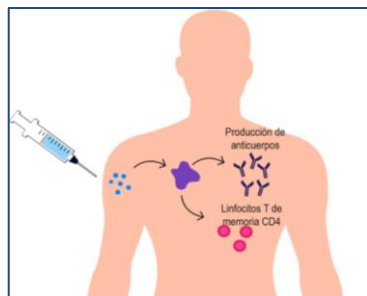
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



(Arshad et al., 2022) (Coico & Sunshine, 2015) (Rich et al., 2019).

Introducción

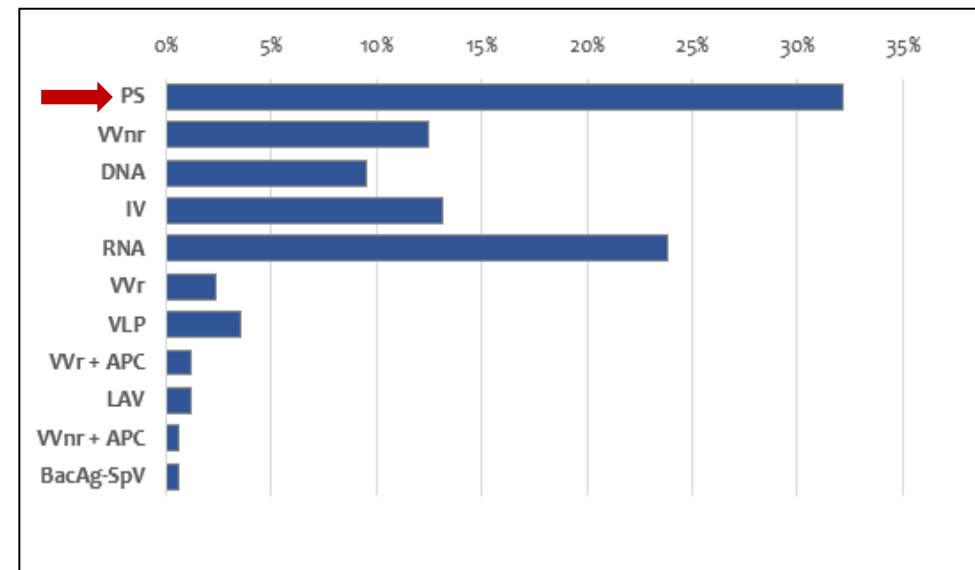
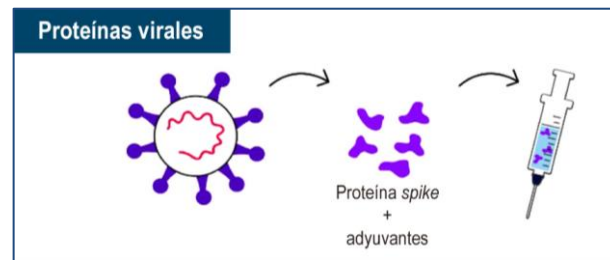
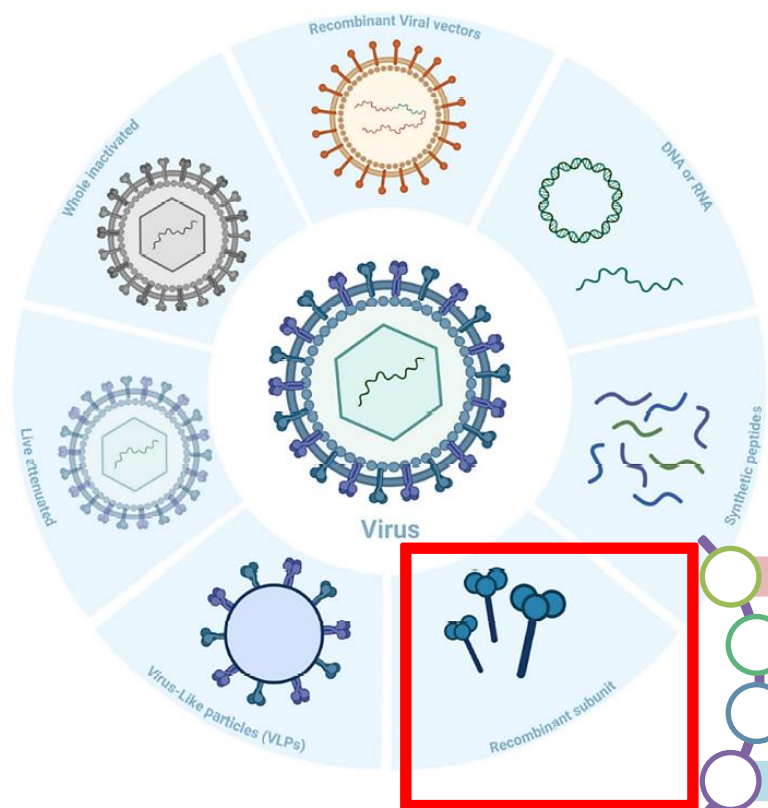
Vacunas



OMS

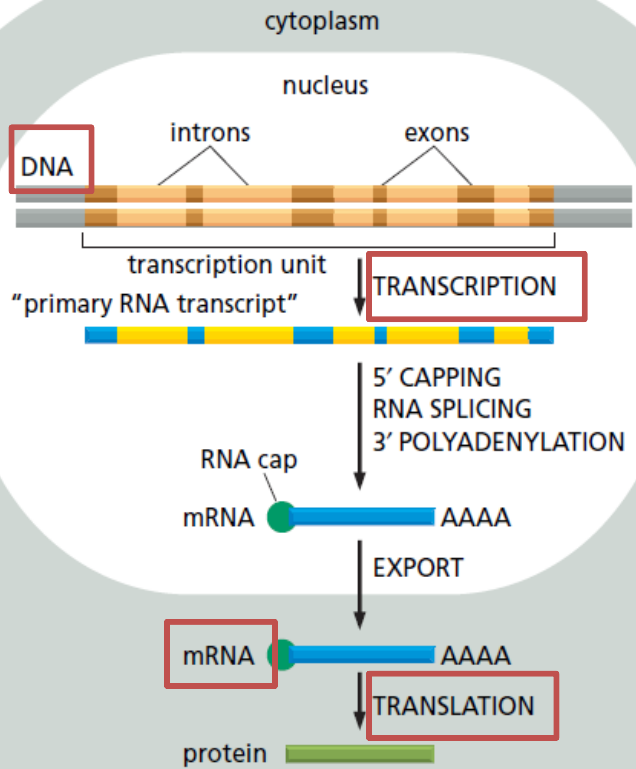
198
Ensayos preclínicos

169
Ensayos clínicos



- Fácil procesamiento
- Seguridad
- Epítipo inmunogénico
- Requiere adyuvante

Expresión génica *in vivo*



Modelos animales



Homología
Adaptación
Fácil manipulación



Normativa
Bioética



Técnicas moleculares

PCR

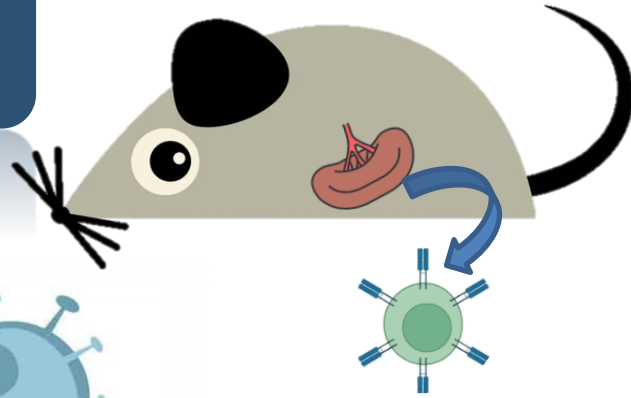
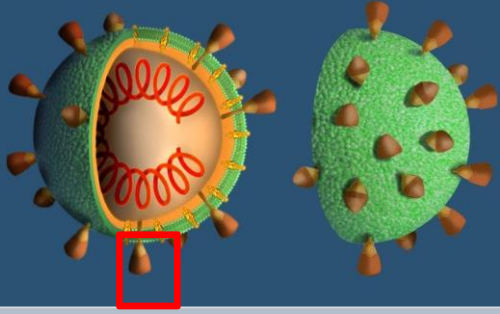
RT-PCR

qPCR



Justificación

SARS-CoV-2 (Covid-19)



Hipótesis

El procesamiento de ARN extraído a partir de tejido de bazo de ratón BALB/c inoculado con la proteína espiga y el dominio de unión al receptor recombinantes del SARS-CoV-2 (PrS1 y PrRBD1), mediante RT-qPCR cuantitativa, revela niveles de expresión significativos de CMH-I, CMH-II, CD4 y CD8 asociadas a la respuesta inmune adaptativa celular.

Contenido

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones

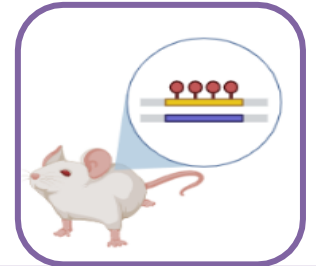


Recomendaciones

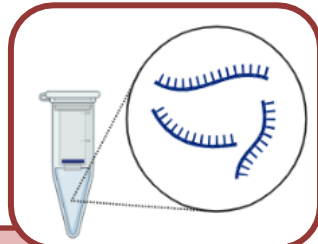


Objetivo General

Evaluar la respuesta inmune adaptativa mediante la expresión génica en un modelo de ratón BALB/c post infección de la proteína espiga (S) y el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2.



Objetivos Específicos



Extraer ARN a partir de tejido de bazo de ratón BALB/c previamente inoculado con la proteína S y RBD recombinantes del virus SARS-CoV-2 (PrS1 y PrRBD1).



Cuantificar la expresión génica del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-I y CMH-II) y moléculas CD4 y CD8 responsables de la respuesta inmune adaptativa mediante RT-qPCR cuantitativa.

Evaluar los niveles de expresión de CMH-I, CMH-II, CD4 y CD8 durante la respuesta inmune adaptativa en ratones BALB/c infectados con PrS1 y PrRBD1.

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones

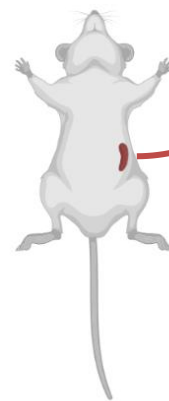
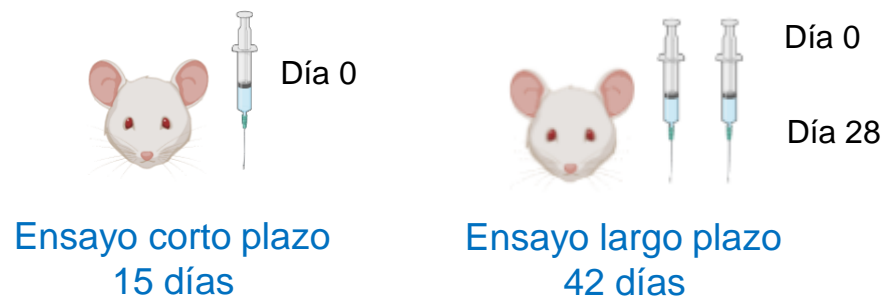


2020-PICV-019-INV

Generación de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 como prospecto de desarrollo de vacuna



Dosis → 5 µg de PrS1 o PrRBD1 en 200 µL



Unidad experimental

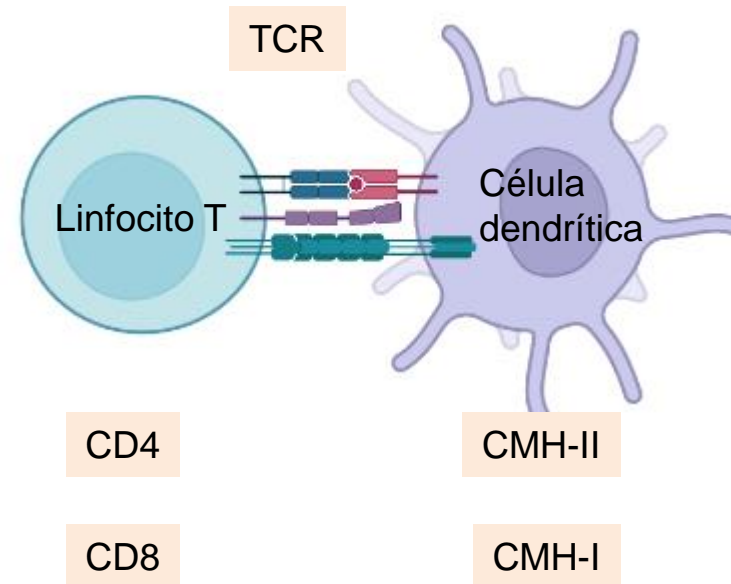


700 uL de Trizol
- 80°C

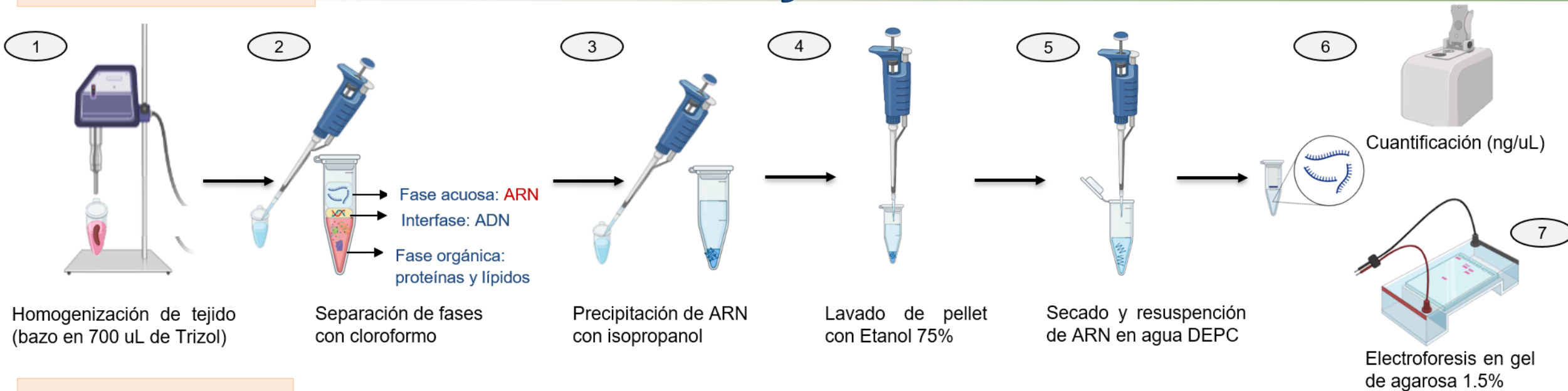
Órgano linfático secundario donde se desencadena la activación del linfocito T

Tratamientos aplicados a los modelos de experimentación

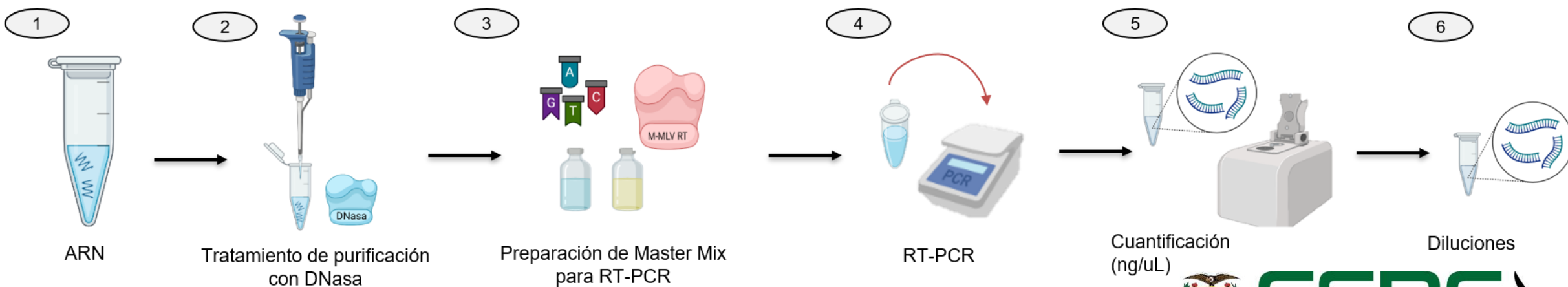
Tratamiento	Ensayo corto plazo	Ensayo largo plazo
PrS1 + PBS + Adv	n=6	n=5
PrRBD1 + PBS + Adv	n=6	n=5
PrS1 + PBS	n=6	n=5
PrRBD1 + PBS	n=6	n=5
PBS + Adv	n=9	n=4
PBS	n=4	n=2



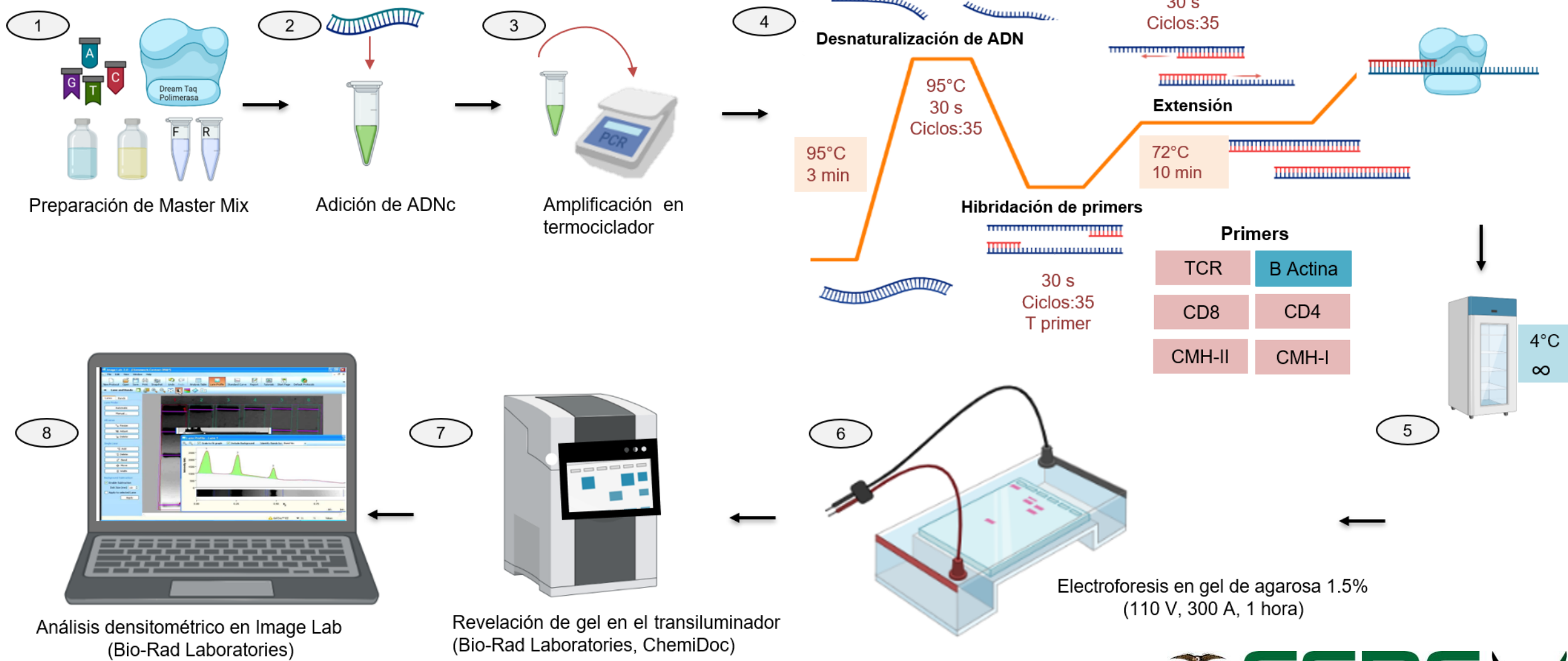
Extracción de ARN



Síntesis de ADNc



PCR punto final y densitometría



Materiales y métodos

qPCR

1 Go Taq qPCR Master Mix, 2X



TCR	B Actina
CD8	CD4
CMH-II	CMH-I

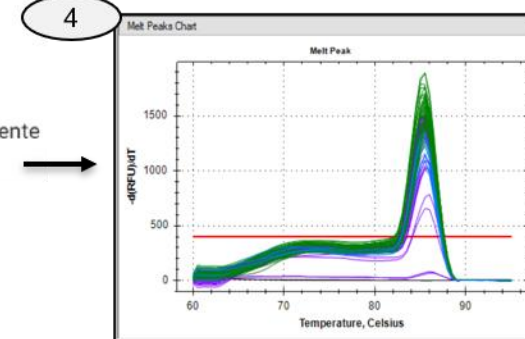
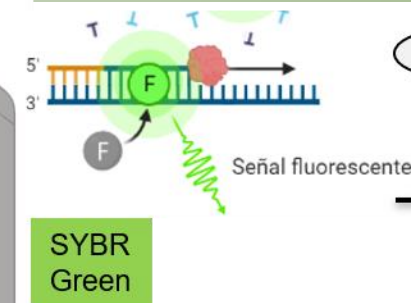
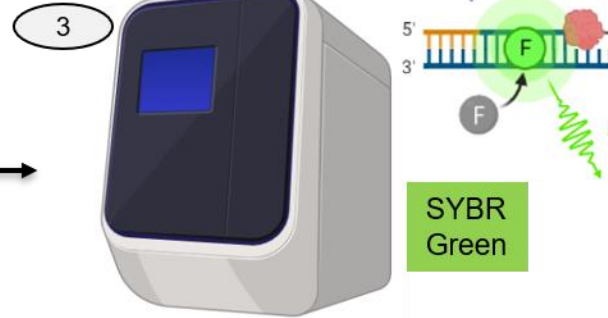
2 Adición de Master Mix, ADNc y gamma estándar

LPS

1	1/10	5	25	12,5	6,25	3,13
		100	1000	1000	1000	1000

Gamma estándar

Adición de Master Mix, ADNc y gamma estándar



Curva de Melting
58 a 95°C, 0.5 °C/ciclo



ns $p \leq 0.1$
 * $p \leq 0.033$
 ** $p \leq 0.002$
 *** $p \leq 0.001$.

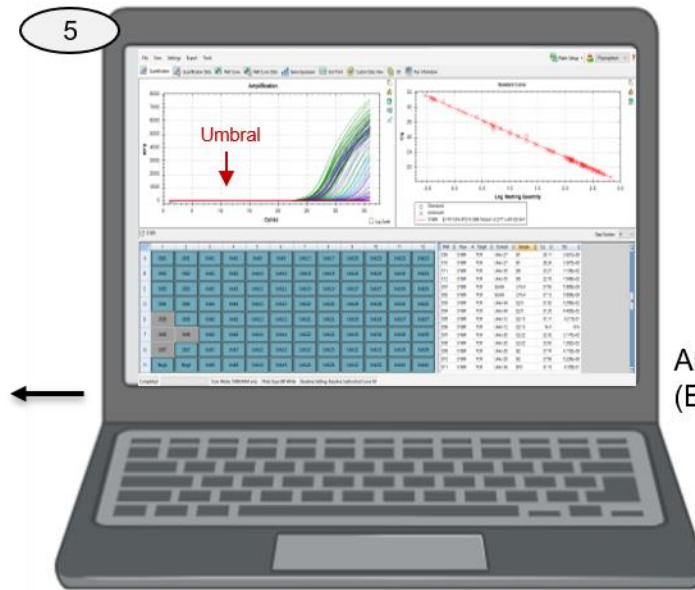
6 Cuantificación absoluta

$$y = mx + b$$

$$\% E = (10^{-\frac{1}{m}} - 1) * 100\%$$

$$Sq = 10^x$$

donde: $y = Cq = Ct$; $m = \text{slope}$; $b = y - \text{intercept}$; $x = \text{Log}_{10}(Sq)$



Análisis en CFX Maestro
(Bio-Rad Laboratories)

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



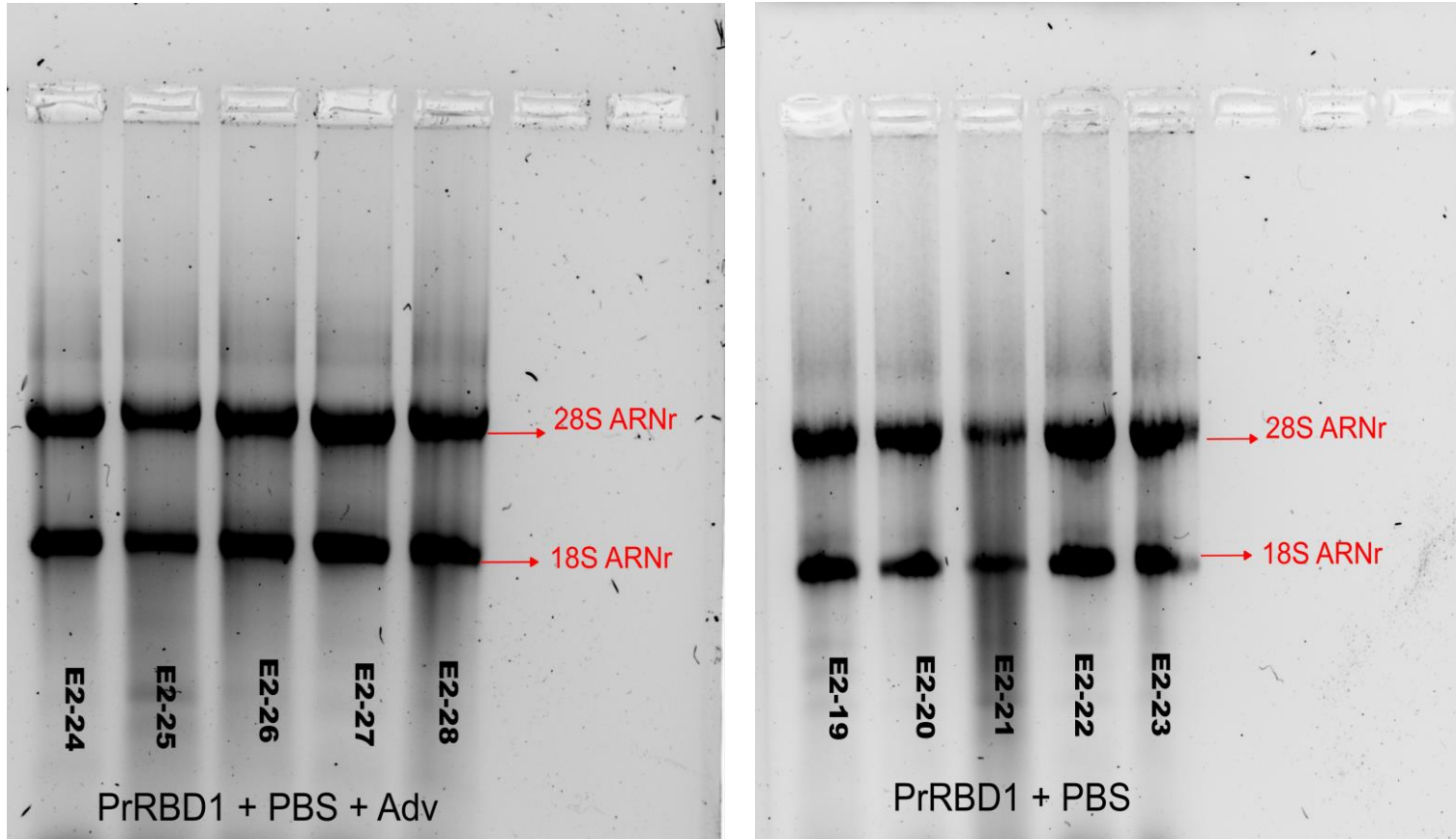
Recomendaciones



Extracción de ARN

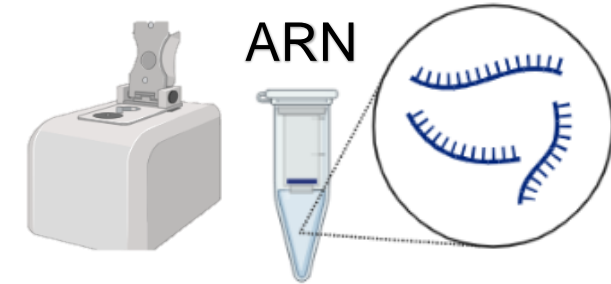
80 - 85% → ARNr
1 - 5% → ARNm

Integridad



Gel de agarosa al 1.5% con colorante SYBR Safe

Rango óptimo de pureza
 $260/280 \sim (2.0 \text{ a } 2.2)$



Ratio de pureza

$260/280 \sim 2.04$

Rango de concentración

1285.58 ± 158.52 a
 6237.36 ± 1224.45
(ng/ μ L)

Resultados y discusión

PCR punto final

Ensayo corto plazo

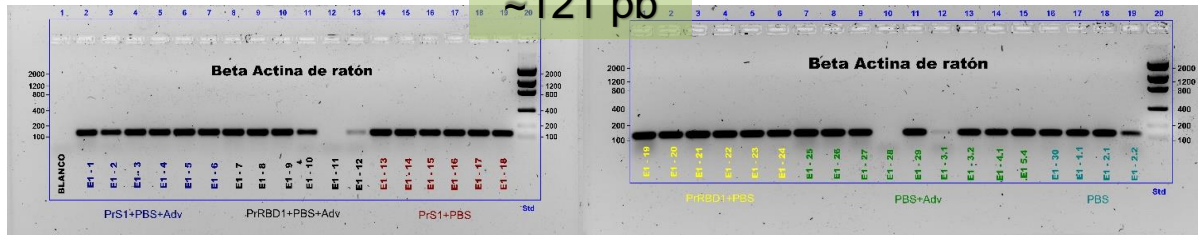
Primers



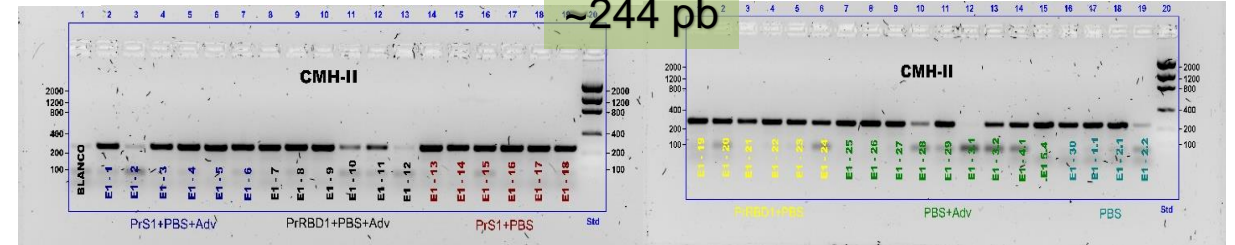
Temperatura



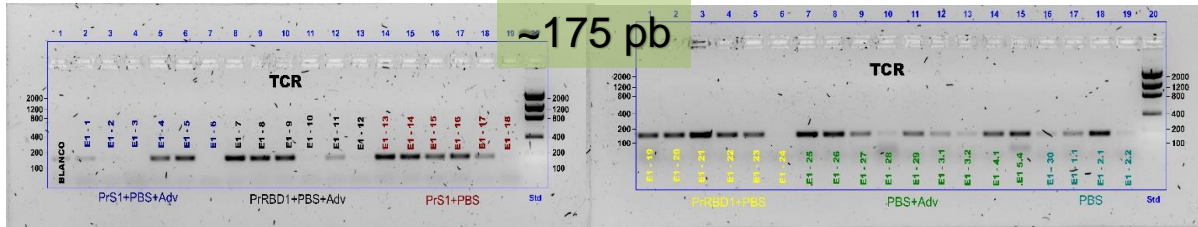
β - Actina
~121 pb



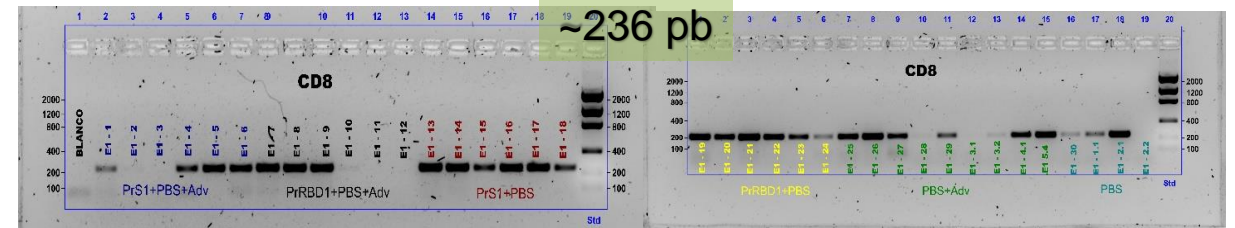
CMH-II
~244 pb



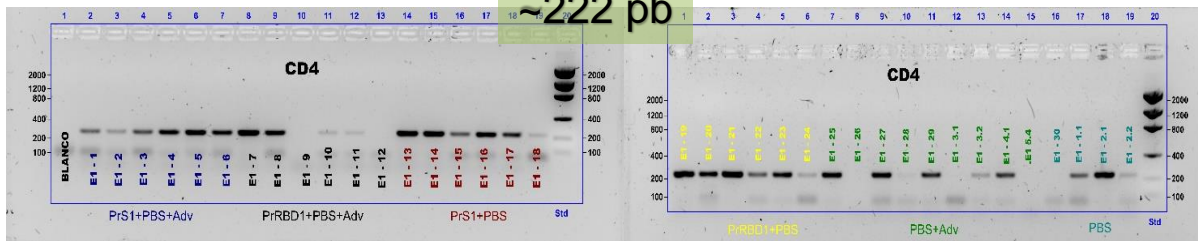
TCR
~175 pb



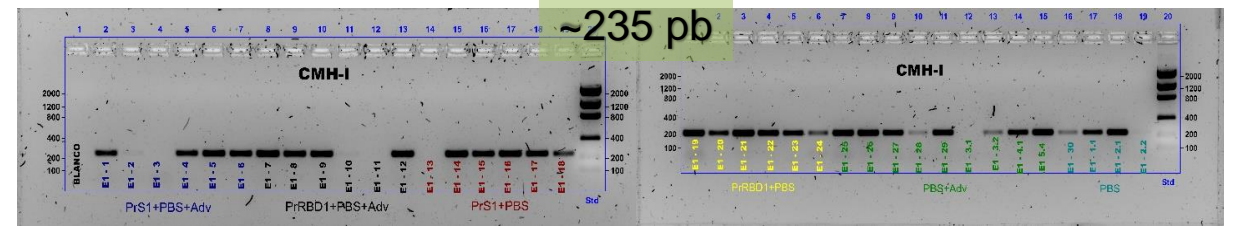
CD8
~236 pb



CD4
~222 pb



CMH-I
~235 pb



Geles de agarosa al 1.5 %

(Fraga et al., 2014).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Resultados y discusión

PCR punto final

Ensayo largo plazo

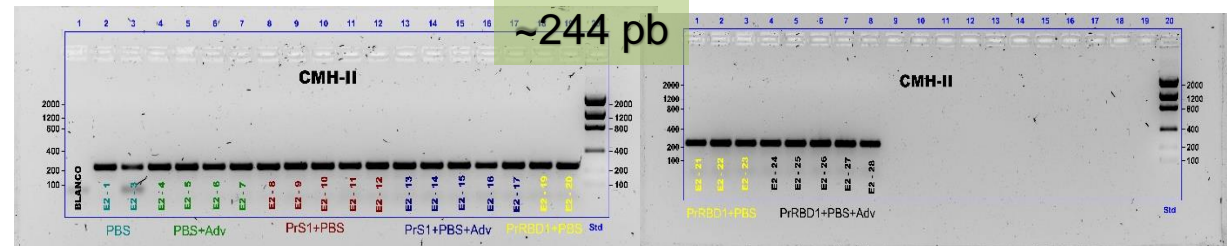
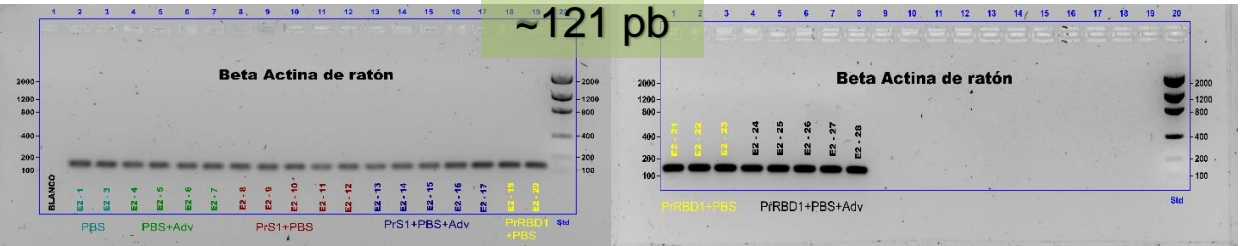


ImageJ
Image Processing & Analysis in Java



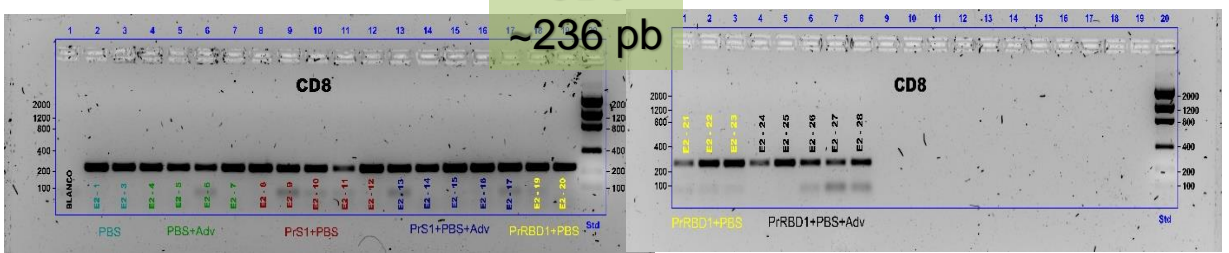
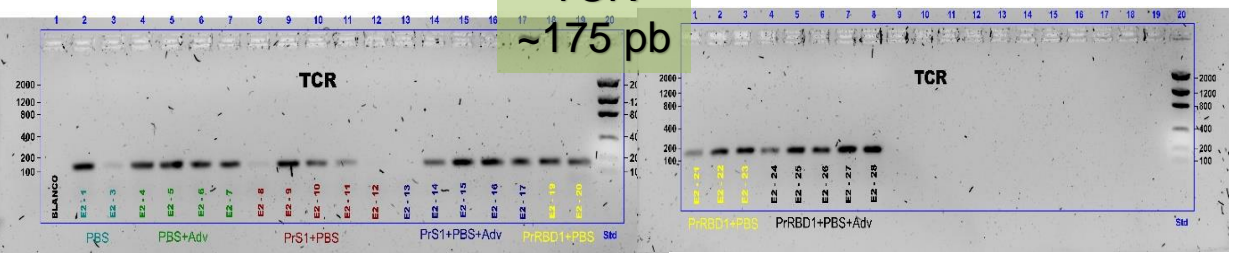
β - Actina
~121 pb

CMH-II
~244 pb



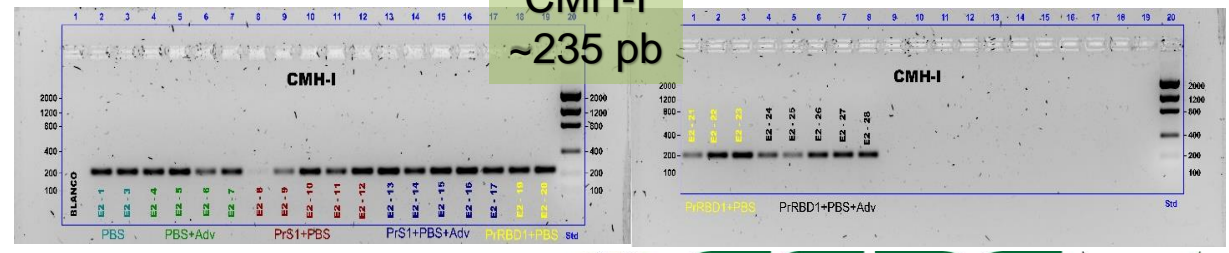
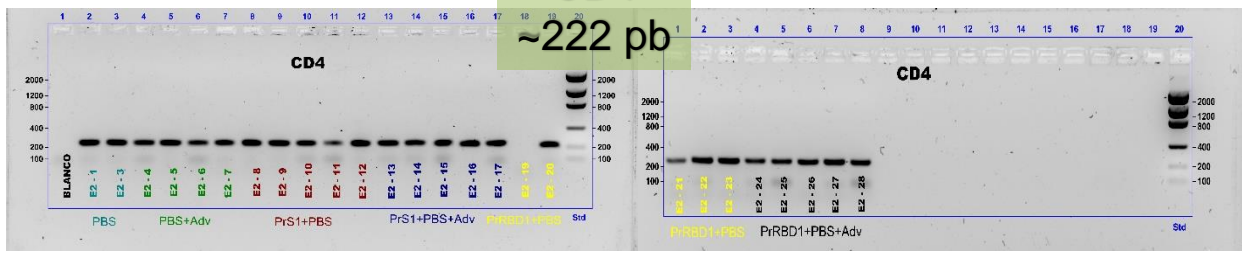
TCR
~175 pb

CD8
~236 pb



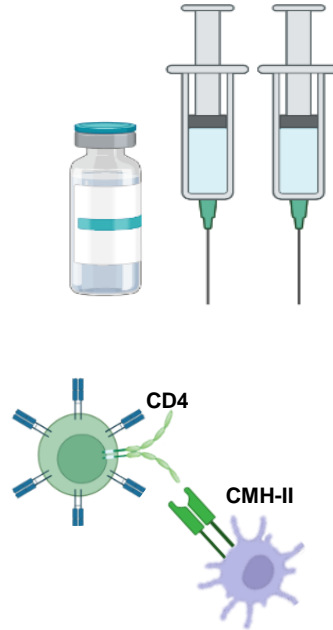
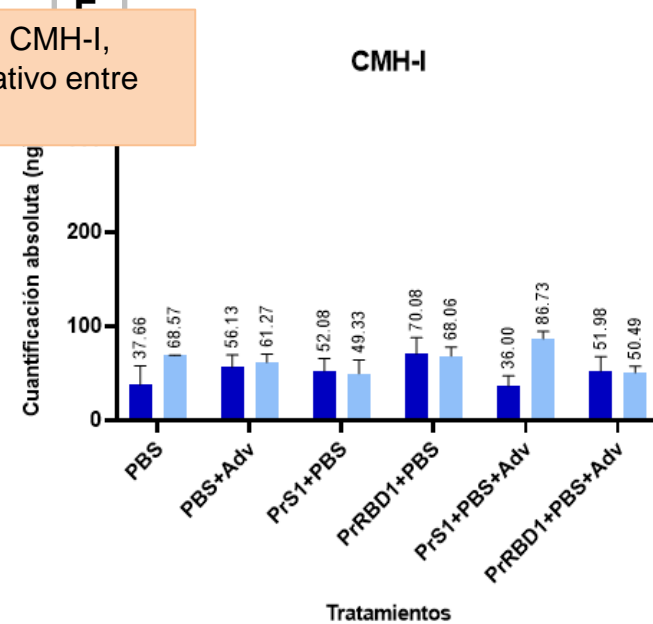
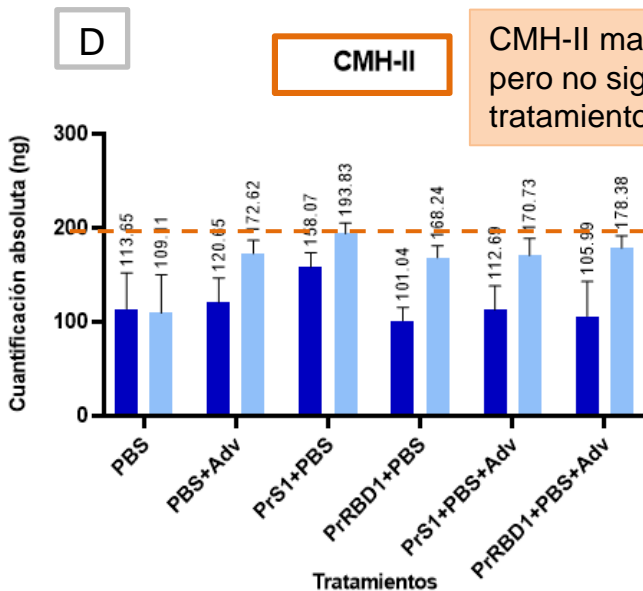
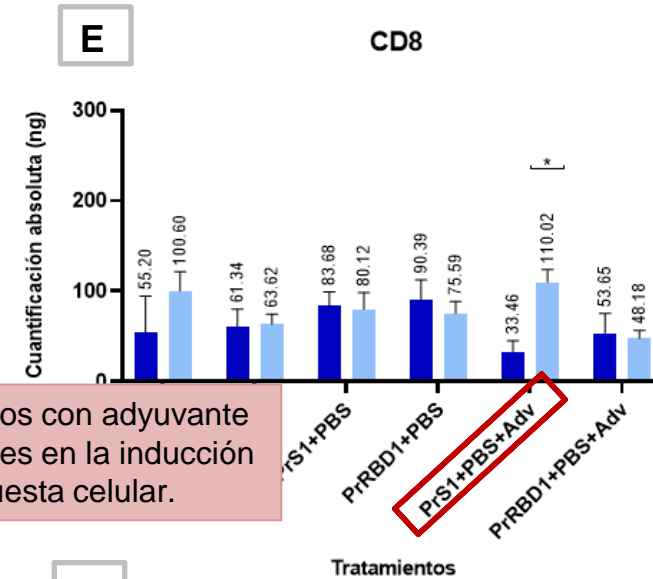
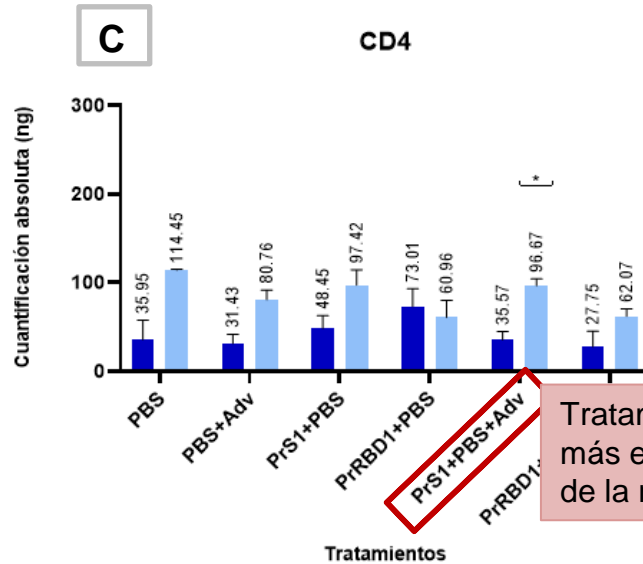
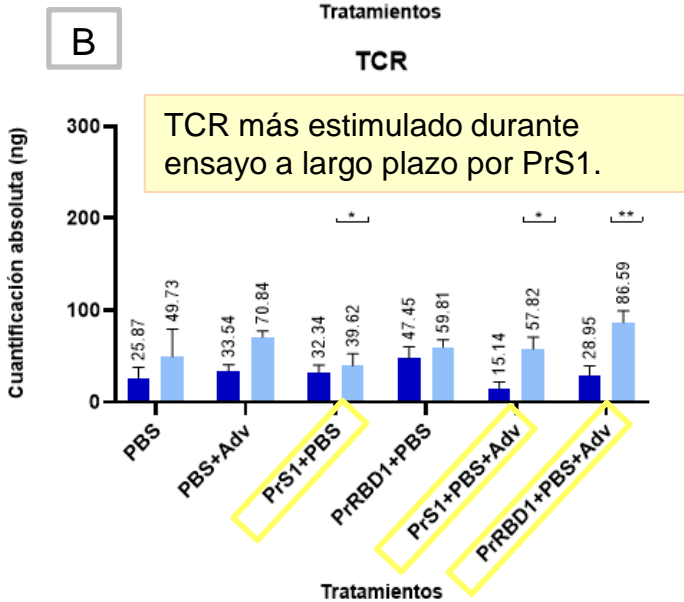
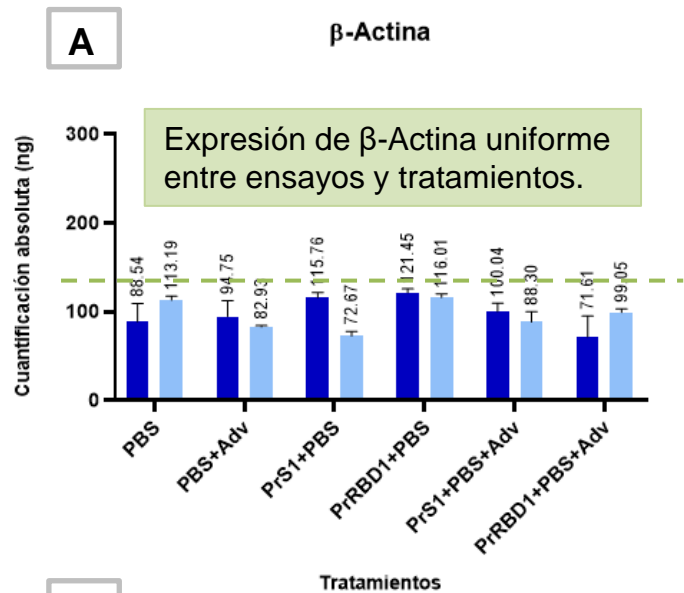
CD4
~222 pb

CMH-I
~235 pb



Geles de agarosa al 1.5 %





Mayor expresión de todos los genes luego de dos dosis de tratamiento.

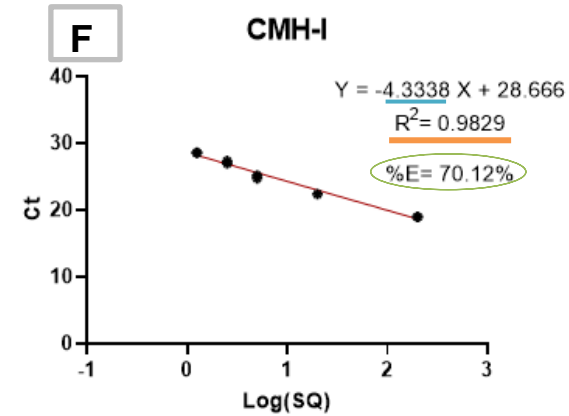
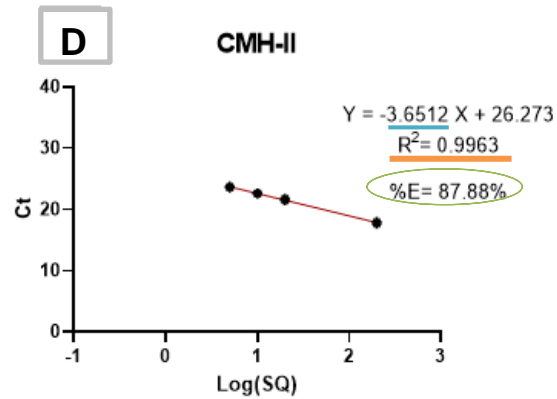
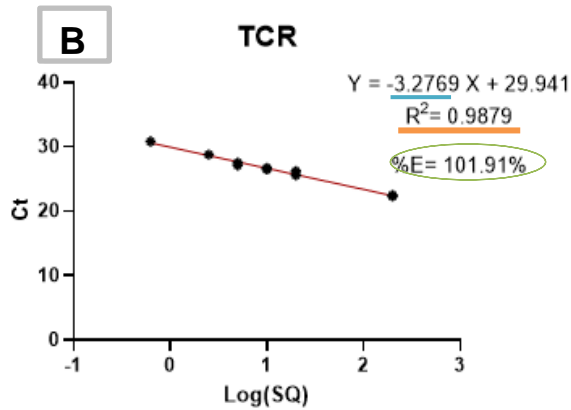
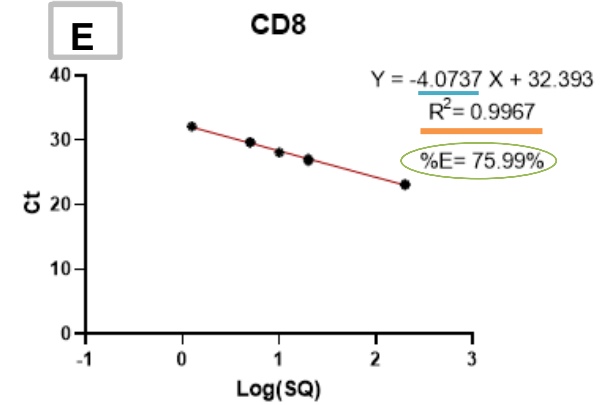
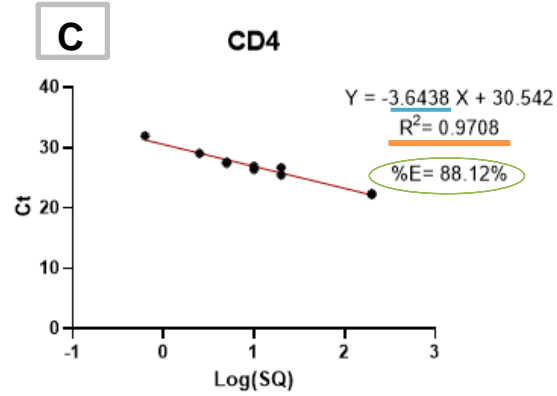
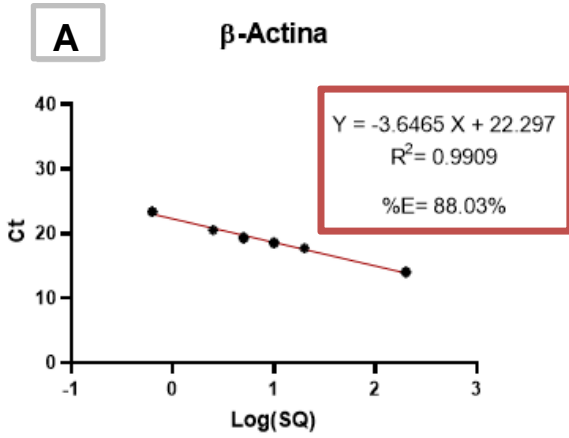
■ Ensayo a corto plazo
■ Ensayo a largo plazo

ns $p \leq 0.1$
* $p \leq 0.033$
** $p \leq 0.002$
*** $p \leq 0.001$



Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

Cuantificación absoluta



Modelo lineal

Pendiente=-3.1 y -3.6

$R^2 \sim 1$

$\%E = 90$ a 110%



Pendiente=-3.3 a -4.3

$R^2 \sim 1$

$\%E = 70.12$ a 101.91%

Resultados y discusión

Cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR

Expresión de β -Actina uniforme entre tratamientos.

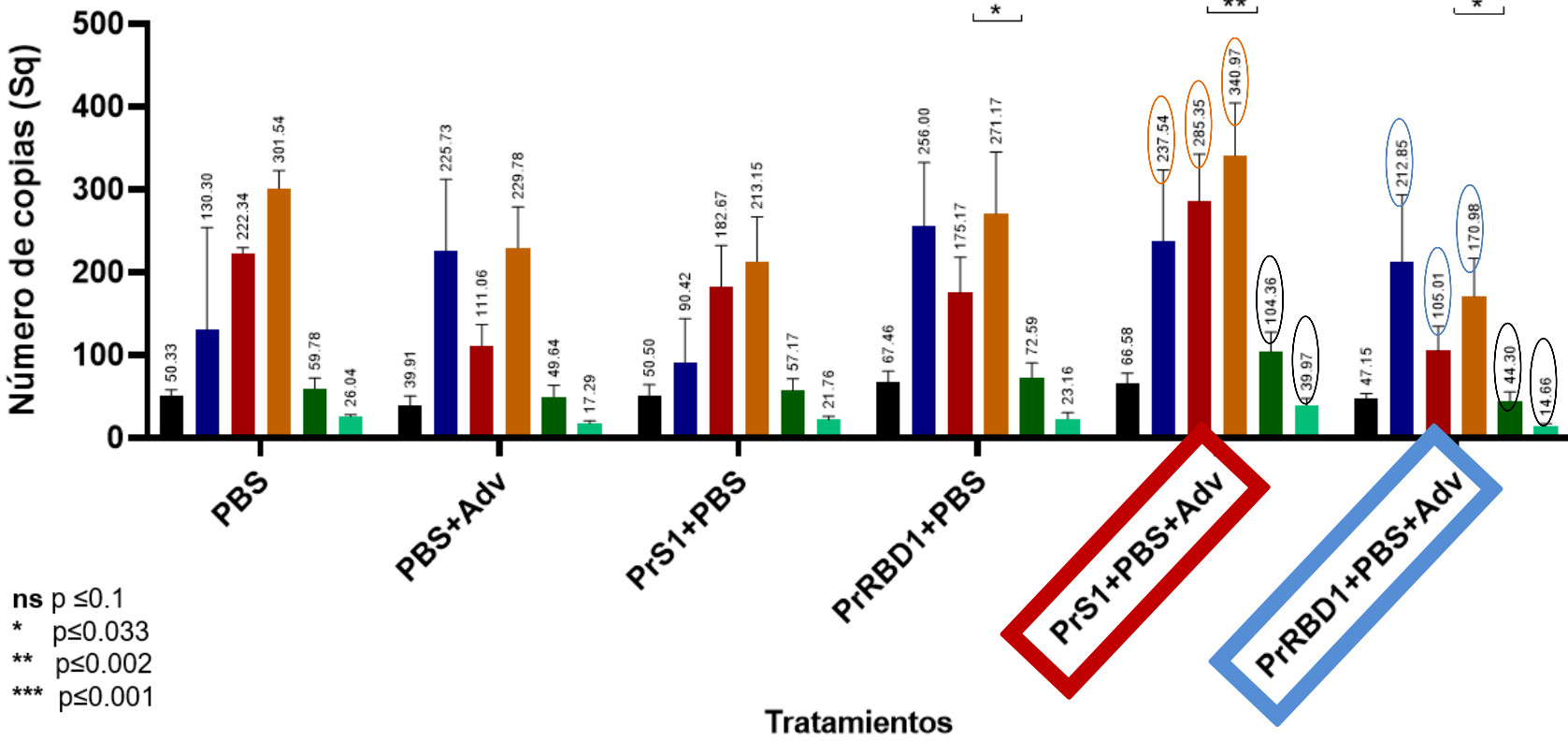
Expresión de TCR, CD4 y CMH-II fue la más alta, respecto a las demás moléculas estudiadas.

PrS1 más estimulante que PrRBD1 en combinación con adyuvante.

Menor estimulación de CD8 y CMH-I en todos los tratamientos.



Memoria inmunitaria de linfocitos T CD4+ detectada hasta 12 meses.



ns $p \leq 0.1$
 * $p \leq 0.033$
 ** $p \leq 0.002$
 *** $p \leq 0.001$



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión

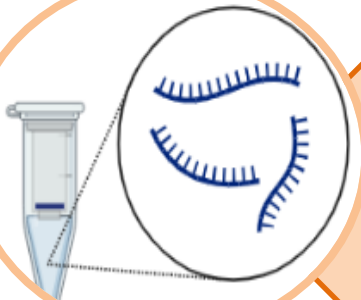


Conclusiones

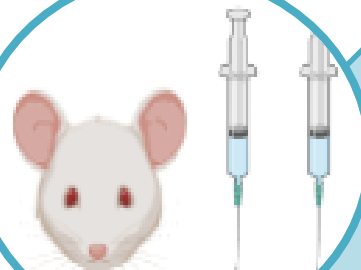


Recomendaciones

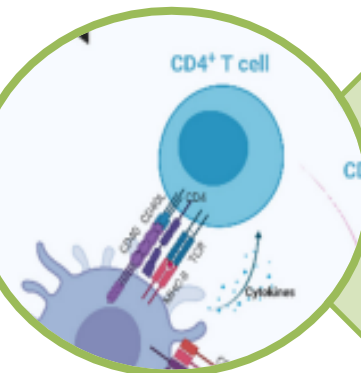




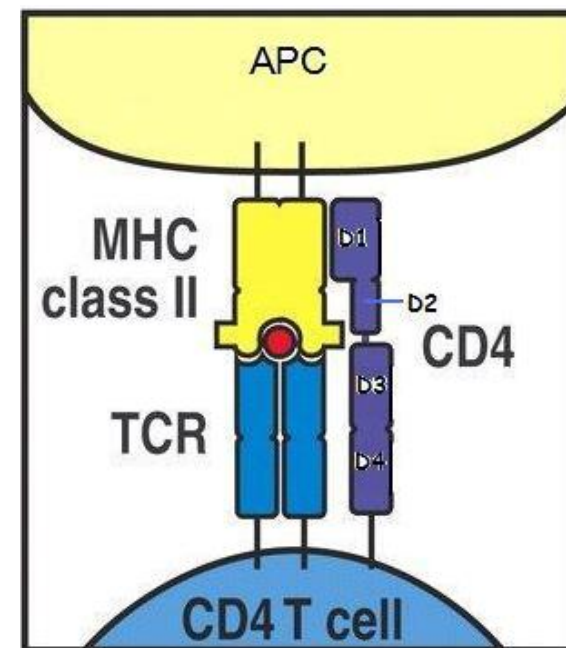
Concentración de ARN 1285.58 a 6237.36 ng/ μ L
Ratio de pureza 260/280 = 2.04



Expresión de 237, 285, 340, 104 y 40 copias de TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I respectivamente; inducidas por PrS1+PBS+Adv en el ensayo a largo plazo.



Dos dosis de PrS1 con adyuvante, estimularon significativamente a los linfocitos T (TCR), de tipo CD4⁺ cooperadores y CMH-II, cuya expresión fue aproximadamente 2, 3 y 4 veces más que el gen endógeno.



Tfh \rightarrow Humoral
Memoria inmunitaria

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



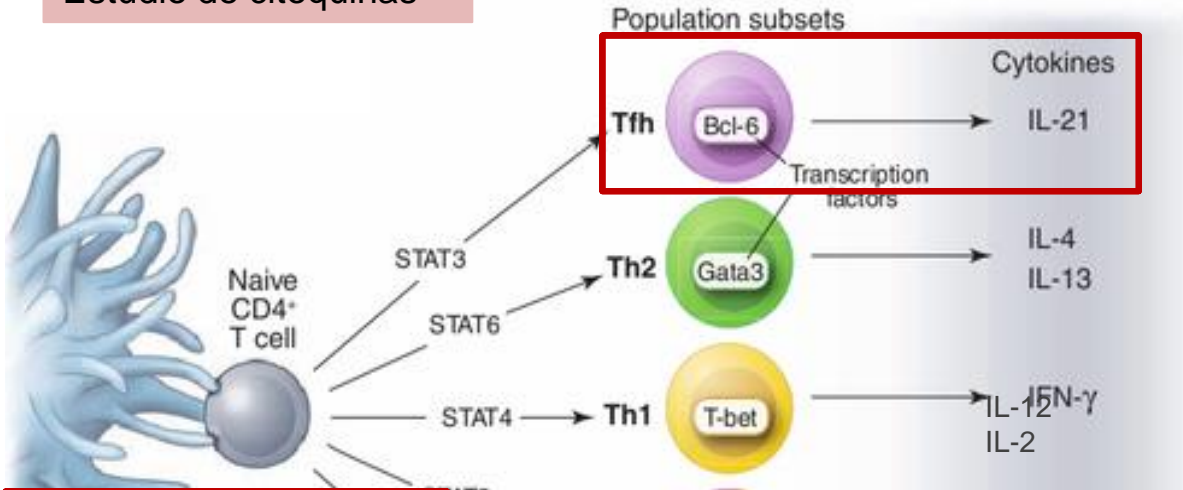
Conclusiones



Recomendaciones

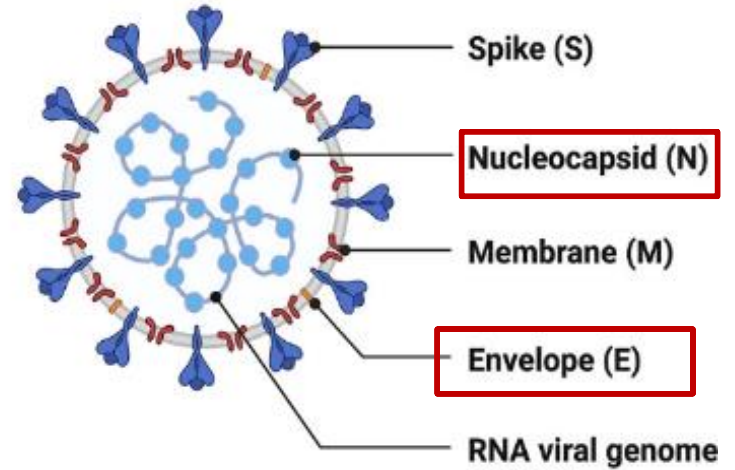


Estudio de citoquinas

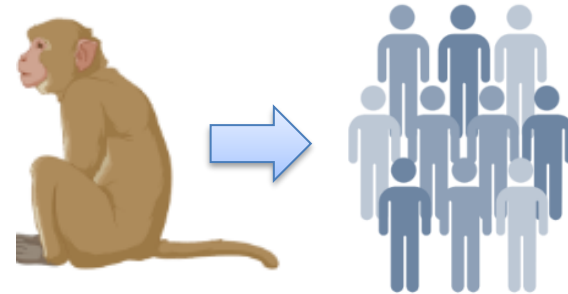


CD45RO
Linfocitos T de memoria

Investigar vacunación heteróloga y epítopos frente a nuevas variantes



Continuar con los ensayos preclínicos y clínicos de desarrollo



Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Generación de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 como prospecto de desarrollo de vacuna

2020-PICV-019-INV



Marbel Torres Ph.D.
Ing. Fernanda Toscano
Ing. Andrea Aluisa
Ing. Alex Gavilanes
Ing. Mishell Orozco



Familia y amigos



Gracias !
saolmedo2@espe.edu.ec



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

