



“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

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.

08 de agosto de 2022

Análisis de similitud de contenido



Proyecto de titulación_Olmedo_Stefany_Copyleaks.pdf

Scanned on: 16:30 August 8, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	211
Words with Minor Changes	7
Paraphrased Words	260
Omitted Words	0



Website | Education | Businesses

Firma:

.....

Torres Arias Marbel, Ph.D.

Directora



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“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”** fue realizado por la señorita **Olmedo Karolys, Stefany Alejandra**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 08 de agosto de 2022

Firma:

.....
Torres Arias Marbel, Ph.D.

C. C.1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Olmedo Karolys, Stefany Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1754197463 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“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”**, 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, 08 de agosto de 2022

Firma:

Olmedo Karolys, Stefany Alejandra

C.C.: 1754197463



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Olmedo Karolys, Stefany Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1754197463, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"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"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 08 de agosto de 2022

Firma

Olmedo Karolys, Stefany Alejandra

C.C.: 1754197463

Dedicatoria

A mi mamá Cristina Karolys A., por ser el motor de mi vida, la luz que guía mi camino, por creer en mí todos los días, por darme su apoyo total e incondicional y por ser quien ha motivado todo mi esfuerzo y dedicación en este logro.

-Stefany Alejandra Olmedo Karolys-

Agradecimientos

Agradezco a mi madre Cristina Karolys A. por toda su dedicación, su paciencia y amor incondicional. Por enseñarme nuevas lecciones de vida y valores que hacen de mí un mejor ser humano cada día. Por ser mi paradigma de humildad, fortaleza, esfuerzo y trabajo. Por ser una madre ejemplar y la amiga más sincera, por brindarme sus consejos, compartir sus experiencias y su guía, gracias a las cuales he podido alcanzar este logro.

A mis hermanos, Edison y Daniela por brindarme su cariño y apoyo absoluto. Por impulsarme a ser una mejor persona. Por ser mis mejores amigos y compañeros de vida, con quienes deseo compartir éste y futuros triunfos.

A toda mi familia, a mis abuelitos Susanita y Luchito, a mi tía Mariana, tía Pili y a Carlitos E., por ser un soporte importante en mi vida, por todo su apoyo, sus enseñanzas y sus cuidados. A mi abuelita Fanny, tío Segundo y tío Marquito, que pese a su ausencia continúan formando una parte importante de mí.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por darme la oportunidad de formarme como profesional y por permitirme vivir muchas experiencias. A mis amigas y amigos con quienes compartí múltiples dificultades, alegrías, anécdotas y aprendizajes durante toda nuestra vida académica en la universidad.

A la Dra. Marbel Torres por otorgarme la oportunidad de integrarme en su laboratorio, por compartir su tiempo, sabiduría y experiencia conmigo. Por guiarme durante el desarrollo de mi proyecto de titulación y por motivarme con su ejemplo, a convertirme en una persona competente y profesional.

A Fernanda Toscano, Andrea Aluisa, Alex Gavilánez y Mishell Orozco, por compartir su tiempo, sus conocimientos y sus consejos durante la ejecución de mi proyecto de titulación en el laboratorio. Y a todos los chicos que formaron parte de LABIV durante mi estancia, por su simpatía y amistad.

Tabla de contenidos

Análisis de similitud de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	12
Listado de Abreviaturas	14
Resumen.....	18
Abstract	19
CAPÍTULO I: Introducción	20
Antecedentes	20
Justificación.....	22
Objetivos	23
<i>Objetivo General</i>	<i>23</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>23</i>
CAPÍTULO II: Marco teórico	24
Virus	24
Coronavirus	24

El virus SARS-CoV-2	26
<i>Replicación in vivo del virus SARS-CoV-2</i>	27
Proteína espiga (S)	30
<i>Subunidad S1</i>	32
<i>Subunidad S2</i>	32
Respuesta inmunológica	33
Respuesta inmunológica innata	33
Respuesta inmunológica adaptativa	34
<i>Respuesta inmune adaptativa humoral</i>	35
<i>Respuesta inmune adaptativa celular</i>	35
<i>Clasificación de los linfocitos</i>	36
<i>Origen de los linfocitos T</i>	38
<i>Maduración de los linfocitos T</i>	38
<i>Activación de los linfocitos T</i>	41
Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)	47
Respuesta inmune frente al SARS-CoV-2	50
Vacunas	53
<i>Plataformas de vacunas</i>	55
Vacunas vivas atenuadas	55
Vacunas enteras inactivadas	56
Vacunas de partículas similares a virus	56

Vacunas de péptidos sintéticos.....	56
Vacunas basadas en vectores virales.....	57
Vacunas de ácidos nucleicos.	57
<i>Vacunas para COVID-19.....</i>	<i>57</i>
Desarrollo de proteínas recombinantes en el laboratorio	59
Proteínas recombinantes del SARS-CoV-2.....	59
Expresión génica <i>in vivo</i>	60
Ensayos de inmunidad en modelos murinos	62
Técnicas moleculares	63
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	<i>64</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).....</i>	<i>64</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).....</i>	<i>65</i>
CAPÍTULO III: Materiales y métodos	66
Localización geográfica	66
Técnicas y procedimientos de laboratorio	66
<i>Diseño de primers.....</i>	<i>66</i>
<i>Extracción de ARN.....</i>	<i>68</i>
<i>Determinación de la concentración y calidad del ARN</i>	<i>69</i>
<i>Purificación de ARN.....</i>	<i>69</i>
<i>Síntesis de ADNc.....</i>	<i>70</i>
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.....</i>	<i>71</i>

<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	71
<i>Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR</i>	72
Cuantificación absoluta	73
Cuantificación relativa	74
Análisis estadístico de datos	74
CAPÍTULO IV: Resultados	75
Extracción y purificación de ARN	75
Síntesis de ADNc	77
PCR punto final y análisis densitométrico	77
Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR	82
<i>Cuantificación absoluta</i>	82
<i>Cuantificación relativa</i>	84
CAPÍTULO V: Discusión	86
CAPÍTULO VI: Conclusiones	98
CAPÍTULO VII: Recomendaciones	99
Referencias	100

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica del SARS-CoV-2</i>	26
Tabla 2 <i>Funciones de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2</i>	29
Tabla 3 <i>Clasificación de los linfocitos y sus principales características</i>	37
Tabla 4 <i>Características de Primers para PCR punto final y qPCR</i>	67
Tabla 5 <i>Tratamientos aplicados a los modelos de experimentación</i>	68
Tabla 6 <i>Reacciones para la síntesis de ADNc</i>	70
Tabla 7 <i>Reactivos para qPCR – Reacción 1X</i>	72

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Clasificación de los virus según Baltimore</i>	25
Figura 2 <i>Organización genómica del SARS-CoV-2</i>	27
Figura 3 <i>Estructura de la cápside del SARS-CoV-2</i>	28
Figura 4 <i>Ciclo de replicación del virus SARS-CoV-2</i>	30
Figura 5 <i>Estructura de la proteína S del SARS-CoV-2</i>	31
Figura 6 <i>Maduración de los linfocitos T</i>	40
Figura 7 <i>Esquema del complejo TRC y correceptores CD4 y CD8 de linfocitos T</i>	42
Figura 8 <i>Mecanismo de activación de los linfocitos T</i>	44
Figura 9 <i>Activación y respuesta de los linfocitos T</i>	46
Figura 10 <i>Presentación de antígenos por CMH</i>	49
Figura 11 <i>Respuesta inmune adaptativa específica frente al antígeno SARS-CoV-2</i>	52
Figura 12 <i>Mecanismo de acción de las vacunas</i>	54
Figura 13 <i>Vacunas para COVID-19 en etapa clínica de desarrollo</i>	58
Figura 14 <i>Expresión génica in vivo</i>	61

Figura 15 <i>Ajuste de la curva estándar para la cuantificación absoluta mediante qPCR.....</i>	73
Figura 16 <i>Integridad del ARN</i>	76
Figura 17 <i>Gel de agarosa al 1.5% con amplicones correspondientes a muestras del Ensayo a corto plazo</i>	79
Figura 18 <i>Gel de agarosa al 1.5% con amplicones correspondientes a muestras del Ensayo a largo plazo</i>	80
Figura 19 <i>Análisis densitométrico.....</i>	81
Figura 20 <i>Curvas estándar de la cuantificación absoluta de la expresión génica</i>	83
Figura 21 <i>Cuantificación absoluta de la expresión génica asociada a la respuesta inmune celular.....</i>	84
Figura 22 <i>Cuantificación relativa de la expresión génica asociada a la respuesta inmune celular</i>	85

Listado de Abreviaturas

%E: Porcentaje de eficiencia

$2^{-\Delta\Delta Ct}$: Relación de expresión relativa normalizada

°C: Grados Celsius

µg: Microgramos

µL: Microlitros

18S: Subunidad pequeña o menor del ARNr medida en unidades Svedberg

28S: Subunidad grande o mayor del ARNr medida en unidades Svedberg

ACE2: Receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNbc – RT: ADN bicatenario retrotranscrito

ADNbc: ADN bicatenario

ADNc: ADN complementario

ADNmc: ADN monocatenario

Adv: Adyuvante

AIRE: Regulador autoinmune

APC: Célula presentadora de antígeno

ARN: Ácido ribonucleico

ARNbc: ARN bicatenario

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNmc – RT: ARN monocatenario retrotranscrito

ARNmc (-): ARN monocatenario de sentido negativo

ARNmc (+): ARN monocatenario de sentido positivo

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

CC: quimiocinas

CD: Clúster de diferenciación

CDR: regiones determinantes de la complementariedad

CMH-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

CMH-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

COVID-19: Enfermedad causada por coronavirus 2019

Ct: Cq, ciclo umbral donde se acumula suficiente amplicón para producir una señal fluorescente detectable en un ensayo qPCR.

CT: dominio del citoplasma

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNasa: Desoxirribonucleasas

dNTP: Deoxiribonucleosido trifosfato

DTT: Ditioneitol

E: Proteína de envoltura

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FP: Péptido de fusión

HLA: Sistema de antígenos leucocitario humano

HR: Dominio de repetición de heptapéptido

HSC: Células troncales hematopoyéticas

HSC: Células troncales hematopoyéticas

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

INF: Interferón

ITAM: Motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

Log₁₀: Logaritmo en base 10

LPS: Lipopolisacárido

M: Concentración molar

M: Proteína de membrana

mA: Miliamperios

MERS-CoV: Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio

mL: Mililitro

mM: milimolar

M-MLV RT: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

Mpro: Proteasa viral principal

N: Proteína de nucleocápside

n: tamaño de la muestra

nm: Nanómetros

ns: No significativo

NTD: Dominio N-terminal

ORF: Marco de lectura abierto

PAM: Patrones asociados a patógenos

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLpro: Proteasa viral similar a la papaína

PPR: Receptores de reconocimiento de patrones

PrRBD1: Proteína RBD recombinante del virus SARS-CoV-2

PrS1: Proteína S recombinante del virus SARS-CoV-2

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

R²: Coeficiente de determinación

RBD: Dominio de unión al receptor

RCF: Fuerza centrífuga relativa o Gravedades

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RFU: Unidad de fluorescencia relativa

RNasa: Ribonucleasa

RPM: revoluciones por minuto

RTC: Complejo de replicación-traducción

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

S: Proteína espiga

SARS-CoV: Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus

SARS-CoV-2: Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2

SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

SEM: Error estándar de la media

SI: Sinapsis Inmunitaria (SI)

SP: Péptido señal

Sq: Starting Quantity o número de copias del ácido nucleico

TCR: Receptor de las células T

Tfh: Linfocito T cooperador folicular

Th: Linfocito T cooperador

TLR: Receptor tipo Toll

TM: Dominio transmembrana

Tm: Temperatura de Melting

TMPRSS2: proteasa transmembrana serina 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

U: Unidades de enzima

V: Voltios

Resumen

La pandemia ocasionada por la enfermedad COVID-19 ha sido responsable de millones de muertes a nivel mundial, particularmente de aquellas personas más vulnerables. En Ecuador se han reportado más de 975 mil casos y más de 35 mil muertes a causa de COVID-19, desde el año 2020 hasta agosto de 2022. COVID-19 es una enfermedad infecciosa respiratoria causada por el virus SARS-CoV-2, mismo que ha demostrado ser altamente infeccioso y capaz de mutar con gran velocidad; convirtiéndose en uno de los agentes patógenos más preocupantes en la actualidad. Muchos investigadores y empresas farmacéuticas han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de estrategias para enfrentar y controlar la infección recurrente ocasionada por SARS-CoV-2, una de ellas la vacunación. El estudio de la respuesta humoral y celular frente al SARS-CoV-2 ha impulsado el desarrollo de diversas plataformas vacunales, incluyendo a aquellas basadas en proteínas recombinantes.

En este estudio se extrajo ARN a partir del bazo de ratones BALB/c, previamente inmunizados con una plataforma de vacunación basada en las proteínas S y RBD recombinantes del virus SARS-CoV-2. El ARN se analizó mediante RT-qPCR con el fin de evaluar la activación de las diferentes poblaciones de linfocitos T, mediante la expresión de las proteínas de superficie TCR, CD4 y CD8, y sus respectivos presentadores de antígeno CMH-I y CMH-II. Se logró evidenciar que CMH-II y los linfocitos T CD4⁺ fueron significativamente más estimulados que CMH-I y los linfocitos T CD8⁺. Además, de que el tratamiento dado por la proteína S recombinante y suplementado con adyuvante, así como el esquema de vacunación compuesto por dos dosis; fueron los más estimulantes para las células efectoras y de memoria asociadas a la inmunidad celular.

Palabras clave: Expresión génica, Presentación de antígeno, Gen endógeno, Inmunidad adaptativa celular.

Abstract

The pandemic caused by the COVID-19 disease has been responsible for millions of deaths worldwide, particularly among the most vulnerable people. In Ecuador, more than 975 thousand cases and more than 35 thousand deaths due to COVID-19 have been reported, from 2020 to August 2022. COVID-19 is a respiratory infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, same that has proven to be highly infectious and capable of mutating with great speed; becoming one of the most worrying pathogens today. Many researchers and pharmaceutical companies have focused their efforts on developing strategies to confront and control the recurrent infection caused by SARS-CoV-2, one of them being vaccination. The study of the humoral and cellular response against SARS-CoV-2 has promoted the development of various vaccine platforms, including those based on recombinant proteins.

In this study, RNA was extracted from the spleen of BALB/c mice, previously immunized with a vaccination platform based on the recombinant S and RBD proteins of the SARS-CoV-2 virus. The RNA was analyzed by RT-qPCR in order to evaluate the activation of the different populations of T lymphocytes, through the expression of the TCR surface proteins, CD4 and CD8, and their respective antigen presenters MHC-I and MHC-II. It was shown that MHC-II molecule and CD4+ T lymphocytes were significantly more stimulated than MHC-I molecule and CD8+ T lymphocytes. In addition, that the treatment given by recombinant protein S and supplemented with adjuvant, as well as the vaccination scheme consisting of two doses; were the most stimulating for effector and memory cells associated with cellular immunity.

Keywords: Gene expression, antigen presentation, Endogenous gene, Cellular adaptive immunity.

CAPÍTULO I: Introducción

Antecedentes

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es el agente causal de la enfermedad viral denominada como COVID-19, cuyo primer caso fue detectado en la ciudad de Wuhan, China en diciembre de 2019 y luego se propagó por todo el mundo (Alamri et al., 2021; Gusev et al., 2022; L. Singh et al., 2021). Desde el año 2020 se han reportado más de 567 millones de casos y 6.3 millones de muertes a nivel global; y en el Ecuador más de 956 mil casos y 35 793 muertes a causa de esta enfermedad (World Health Organization, 2022).

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario, con polaridad positiva y con una longitud aproximada de 30000 ribonucleótidos. Posee una envoltura con un diámetro cercano a 125 nm y pertenece al género *Betacoronavirus* donde se incluyen otros virus de ARN responsables de importantes epidemias, como lo son el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) causado por el SARS-CoV en el año 2002 y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) por MERS-CoV en el año 2012 (Boechat et al., 2021; Harbour et al., 2021; Pachetti et al., 2020).

Múltiples investigaciones sugieren que esta enfermedad se originó por una infección de tipo zoonótica a partir de coronavirus que infectan al murciélago de herradura (*Rhinolophus affinis*) y al pangolín malayo (*Manis javanica*), pues se ha detectado un 96.2 y 92.4% de identidad con SARS-CoV-2, respectivamente (Banerjee et al., 2021). Su curso clínico es variable, pudiendo presentarse desde una enfermedad leve o asintomática hasta una enfermedad muy grave como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), seguido de neumonía grave, insuficiencia multiorgánica y muerte (Sternberg & Naujokat, 2020; Toor et al., 2021; Yu et al., 2021).

Se ha determinado que los síntomas de COVID-19 surgen durante los 14 días posteriores a la exposición al virus, estos pueden incluir fiebre, tos, dolor de cabeza, fatiga, diarrea, arritmias cardíacas, malestar general, vómitos, mialgias, dificultad para respirar y

pérdida del gusto o el olfato (Gusev et al., 2022; L. Singh et al., 2021). Sin embargo, al tratarse de un virus de ARN la tasa de mutación es significativamente alta, lo que influye directamente con la modulación de la virulencia y con la capacidad de evolución, características que mejoran la adaptación del virus en cualquier ambiente y que podrían modificar la sintomatología de la enfermedad (Van Dorp et al., 2020). La recombinación genética de SARS-CoV-2 ha generado dos variantes de gran relevancia para la salud pública, la variante Delta (B.1.617.2) y la variante Ómicron (B.1.1.529); que destacan por su mayor transmisibilidad tanto presintomática como asintomática (Alexandridi et al., 2022; Soraci et al., 2022).

Como estrategia para la lucha contra la pandemia de COVID-19 se han acelerado los procesos para desarrollar vacunas eficientes. Las vacunas consisten en preparados biológicos que proporcionan inmunidad adquirida activa frente a un determinado antígeno. Actualmente existen 198 vacunas candidatas en ensayos preclínicos y 169 en etapas clínicas de desarrollo; de las cuales 54 corresponden a vacunas de subunidades producidas mediante técnicas de proteínas recombinantes (Ndwandwe & Wiysonge, 2021; World Health Organization, 2022).

La respuesta inmunitaria adaptativa es fundamental para combatir las infecciones virales en los seres humanos. De Alwis et al. (2021) reportaron la generación de una respuesta adaptativa celular robusta caracterizada por una alta expresión de linfocitos T CD8⁺ específicos del antígeno viral, al analizar mediante citometría de flujo el bazo de ratones C57BL/6J inoculados con una vacuna basada en ARN de autotranscripción y replicación de la proteína espiga del SARS-CoV-2.

Harbour et al. (2021) informaron hallazgos similares, al inocular la proteína S recombinante del SARS-CoV-2 en ratones C57BL/6N y observar una respuesta sólida de linfocitos T CD8⁺, una respuesta detectable de linfocitos T CD4⁺ y títulos altos de anticuerpos neutralizantes IgG, dirigidos principalmente al dominio S1 de la proteína S. Además, registraron que la conjugación del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) con el extremo carbono terminal de la proteína S provoca la degradación del antígeno viral.

Justificación

La rápida propagación del virus SARS-CoV-2 alrededor de todo el mundo, la alta tasa de mutagenicidad del virus, el elevado índice de contagios y fallecidos a causa de COVID-19; en conjunto hoy en día constituyen una de las mayores preocupaciones para la salud pública mundial (Acurio-Páez et al., 2021). La investigación de la enfermedad y su agente causal es fundamental para construir una base de conocimientos que permitan el desarrollo de medicamentos y vacunas que contrarresten sus efectos negativos (De Alwis et al., 2021).

El virus del SARS-CoV-2 es inusualmente eficaz para evadir la activación de respuestas inmunes innatas tempranas, por lo que se ha optado por enfocar las investigaciones en la respuesta inmunitaria adaptativa. La respuesta inmunitaria adaptativa implica la coordinación de las células inmunitarias T y B para controlar y erradicar las infecciones virales causantes de enfermedades en los seres humanos, además de promover una respuesta inmunitaria duradera y eficaz (Echeverría et al., 2021; Sette & Crotty, 2021).

Investigaciones previas han determinado que la secuencia codificante para la proteína espiga (S) del SARS-CoV-2 está altamente conservada en todos los coronavirus que infectan al ser humano (Huang et al., 2020). Además, dicha proteína cumple un rol fundamental en la patogénesis, transmisión y virulencia de este antígeno, debido a que el dominio de unión al receptor (RBD) de la subunidad S1 interactúa con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina del huésped (ACE2) y se une a la membrana celular para inicial la infección (Kumavath et al., 2021).

El bazo es un órgano de gran interés para el estudio de la respuesta inmune adaptativa, pues se conoce que es el órgano linfoide secundario más grande del cuerpo y que desempeña una amplia gama de funciones inmunológicas como la activación y regulación de la respuesta de las células T y B mediante la interacción con las células presentadoras de antígeno (APC), además de otros procesos como la hematopoyesis y depuración de glóbulos rojos (Abbas et al., 2018; Lewis et al., 2019).

El éxito de las vacunas depende de la respuesta y la memoria inmunitaria; por lo que es crucial comprender el mecanismo de acción de la respuesta adaptativa frente al virus del SARS-CoV-2 (Jordan, 2021). En Ecuador todavía no se han desarrollado estudios relacionados con la inmunidad adaptativa celular en huéspedes murinos, que permitan establecer una base científica para el desarrollo de vacunas. Por lo que este estudio es de carácter exploratorio y permitirá diagnosticar aspectos esenciales relacionados con el tema.

Dada la importancia de la proteína S y el rol esencial de RBD en la replicación viral del SARS-CoV-2, así como del protagonismo del bazo en la respuesta inmune adaptativa del huésped, se ha planteado el presente proyecto para proporcionar un punto de referencia que permita comprender los desafíos que enfrenta el sistema inmune adaptativo y direccionar estudios futuros relacionados con el desarrollo de vacunas para prevenir la propagación continua y la recurrencia estacional de COVID-19 en el Ecuador.

Objetivos

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.

CAPÍTULO II: Marco teórico

Virus

Los virus son entidades simples, compuestas por complejos supramoleculares que les permiten llevar a cabo diversas actividades biológicas. Pueden presentarse como viriones en forma de partículas orgánicas estáticas, inactivas y latentes por largos períodos de tiempo, cuando no han establecido contacto con una célula huésped; o como virus activos cuando han entrado en contacto con la célula huésped por lo que adquieren la capacidad de autorreplicarse (Wang-Shick, 2017).

En el año de 1971 se propuso un método sencillo y lógico para clasificar a los virus, denominado “Clasificación de Baltimore”. Este método se fundamentó en la naturaleza genómica y mecanismo de replicación de los virus, para categorizarlos en siete grupos, como se observa en la Figura 1: Grupo I de virus de ADN bicatenario (ADNbc), Grupo II de virus de ADN monocatenario (ADNmc), Grupo III de virus de ARN bicatenario (ARNbc), Grupo IV de virus de ARN monocatenario de sentido positivo (ARNmc +), Grupo V de virus de ARN monocatenario de sentido negativo (ARNmc -), Grupo VI de virus de ARN monocatenario retrotranscrito (ARNmc - RT) y Grupo VII de virus de ADN bicatenario retrotranscrito (ADNbc - RT) (Tennant et al., 2018).

Coronavirus

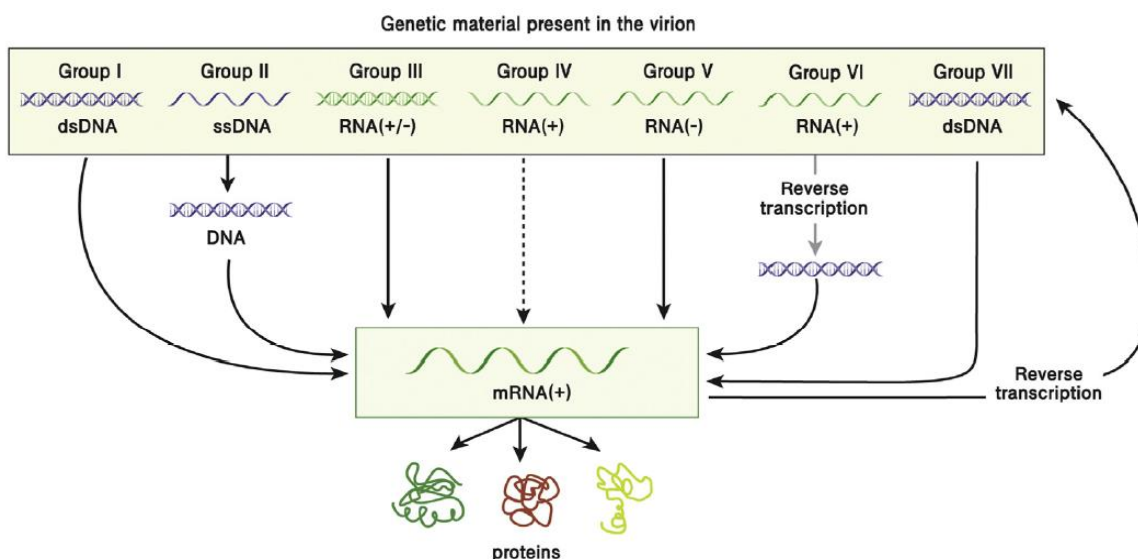
Los coronavirus están categorizados en el Grupo IV de la clasificación de Baltimore, debido a que poseen ARNmc de sentido positivo con envoltura. Estructuralmente se caracterizan por poseer glicoproteínas en forma de picos que se proyectan desde la superficie de su envoltura y un genoma de hasta 33.5 kilobases (kb), considerado uno de los más grandes entre los virus de ARN (Kaye et al., 2021). Los coronavirus pueden derivarse en una subfamilia denominada *Orthocoronavirinae*, que consta de cuatro géneros designados como *alfa*, *beta*, *gamma* y *deltacoronavirus* (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

Los *alfacoronavirus* y los *betacoronavirus* infectan exclusivamente a especies de mamíferos, mientras que los *gammacoronavirus* y los *deltacoronavirus* infectan huéspedes aviares. Además, se conoce que las infecciones por coronavirus tanto en humanos como en animales, se asocian con enfermedades respiratorias y entéricas (V'kovski et al., 2021).

Algunos coronavirus como HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, son causantes de resfriados leves y estacionales en seres humanos. Sin embargo, otros como SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 han demostrado ser más alarmantes al ser capaces de causar patologías respiratorias graves y potencialmente mortales, cuando infectan células epiteliales bronquiales, neumocitos y células del tracto respiratorio superior (V'kovski et al., 2021; Yan et al., 2022).

Figura 1

Clasificación de los virus según Baltimore



Nota. La relación del genoma (ADN o ARN) de cada grupo de virus con el ARNm se indica mediante una línea continua (transcripción) o una línea de puntos (sin transcripción). ss: cadena simple, ds: cadena doble, (+): polaridad positiva, (-): polaridad negativa y RT: Transcripción inversa. Adaptado de “*Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*” (p. 13), por Wang-Shick, R., 2017, Elsevier.

El virus SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, con envoltura que pertenece a la familia *Coronaviridae*, su taxonomía se describe en la Tabla 1. Comparte su organización genómica con otros virus del mismo género que han sido responsables de importantes epidemias en años pasados, un 79% de identidad de secuencia con el SARS-CoV y un 50% con el MERS-CoV (B. Hu et al., 2021). Su genoma posee un tamaño de 29903 pb, con 14 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican 9860 aminoácidos y estos a su vez dan lugar a 29 proteínas tanto estructurales como no estructurales, ilustradas en la Figura 2 (Barreto-Vieira et al., 2022; Huang et al., 2020).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del SARS-CoV-2

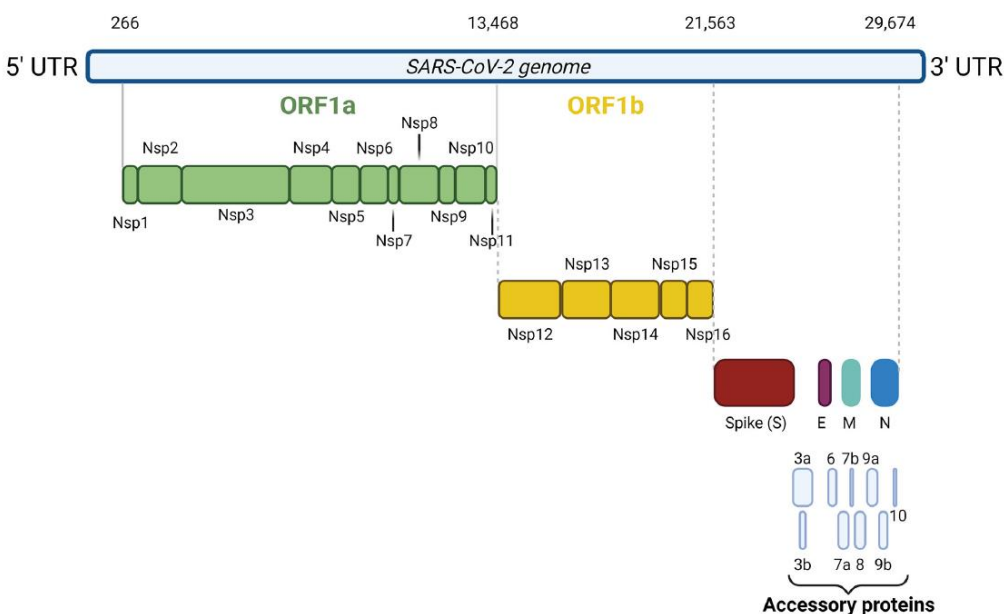
Categoría	Descripción
Dominio	<i>Riboviria</i>
Grupo	IV (ARNmc +) según Baltimore
Reino	<i>Orthornavirae</i>
Filo	<i>Pisuviricota</i>
Clase	<i>Pisoniviricetes</i>
Orden	<i>Nidovirales</i>
Suborden	<i>Cornidovirineae</i>
Familia	<i>Coronaviridae</i>
Subfamilia	<i>Orthocoronavirinae</i>
Género	<i>Betacoronavirus</i>
Subgénero	<i>Sarbecovirus</i>
Especie	<i>Coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo grave</i>
Subespecie	<i>Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave</i>

Nota. Adaptado de "The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus:

Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2" (p.539) por Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020, *Nature Microbiology*, 5(4).

Figura 2

Organización genómica del SARS-CoV-2



Nota. UTR: Regiones no traducidas del genoma. ORF: Marcos de lectura abiertos. Nsp: Proteína no estructural. Adaptado de “SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions” (p. 4), por Pizzato et al., 2022, *Frontiers in Virology*, 1(815388).

Replicación in vivo del virus SARS-CoV-2

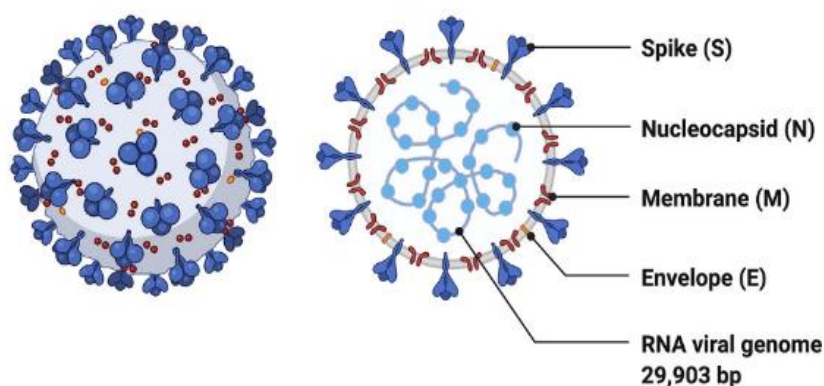
La infección de SARS-CoV-2 ocurre principalmente en células epiteliales linfáticas de la mucosa nasal, neumocitos alveolares tipo II, células conjuntivales de superficie y enterocitos en el intestino (Bartleson et al., 2021). El ingreso del antígeno al huésped estimula la secreción de interferones (IFN) que activan tanto la respuesta inmune innata como la expresión de la proteína ACE2 que es un receptor de membrana celular. La interacción de ACE2 con la proteína espiga (S) del virus, induce una escisión proteolítica mediada por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), la catepsina L o la furina, enzimas propias del huésped que permiten la fusión de la membrana plasmática del virus con la célula y facilita el ingreso del virus a su interior, dejando a su disposición la maquinaria de replicación (Pizzato et al., 2022; Yan et al., 2022).

Los ORF se dividen en dos partes, ORF1a y ORF1b dispuestos en los primeros dos tercios del genoma viral en sentido 5' a 3' como se indica en la Figura 2, mismos que se traducen directamente por acción de ribosomas celulares, en dos poliproteínas pp1a y pp1ab. A continuación, pp1a y pp1ab son procesadas por la proteasa viral similar a la papaína (PLpro) y la proteasa viral principal (Mpro), generando 16 proteínas no estructurales (Nsps1-Nsps16) que en conjunto constituyen el complejo de replicación-traducción (RTC) (V'kovski et al., 2021).

El tercio restante del genoma es expresado por la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y los ARNm subgenómicos utilizan los sistemas de transcripción y traducción del huésped, para sintetizar proteínas estructurales y accesorias. Las proteínas estructurales son proteína espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N), descritas en la Tabla 2 e ilustradas en la Figura 3, mientras que las proteínas accesorias incluyen a ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10; cuya función se asocia con la modulación de la respuesta inmune del huésped y patogenicidad viral (Gusev et al., 2022; Yang & Rao, 2021).

Figura 3

Estructura de la cápside del SARS-CoV-2



Nota. Adaptado de “Pathogenesis, Symptomatology and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure” (p. 3), por Rando et al., 2021, *MSystems*, 6(5).

Tabla 2*Funciones de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2*

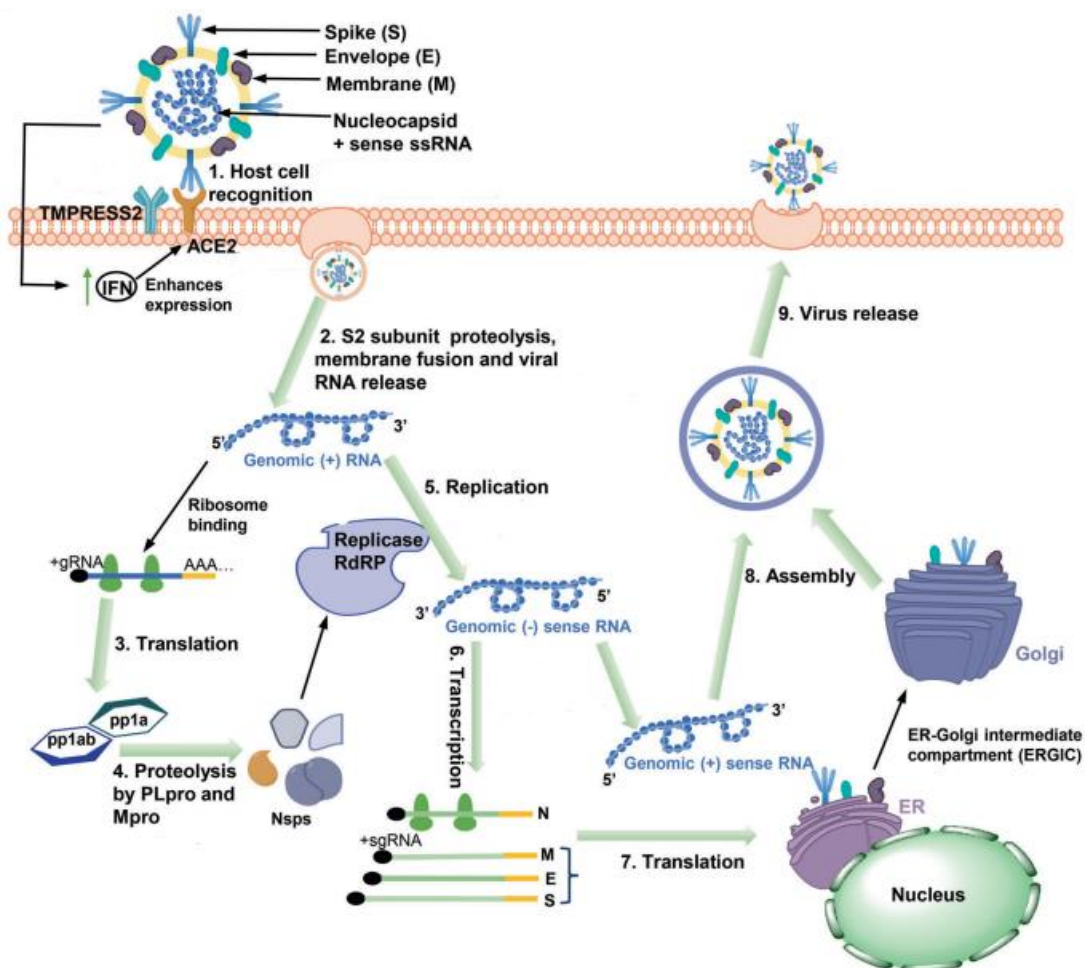
Proteína estructural	Función
Proteína S	Interacción con el receptor ACE2 de la célula huésped y entrada del virus.
Proteína M	Incorporación de componentes virales en el ensamblaje del virión. Contribuye a la estabilización de la proteína N. Deteriora la asociación de MAVS con SNX8, alterando la respuesta inmune del huésped.
Proteína E	Formación de la envoltura, ensamblaje y gemación del virión.
Proteína N	Interviene en el empaquetamiento y autoensamblaje del genoma viral. Altera la fosforilación de STAT1/STAT2, IRF3 y la translocación nuclear. Evita la inhibición de la traducción del ARNm viral. Impide la escisión de GSDMD por caspasa-1. Obstaculiza la síntesis de gránulos de estrés.

Nota. MAVS: Señalización antiviral mitocondrial. SNX8: Nexin 8 que es un regulador positivo de la inducción desencadenada por virus de ARN y de la respuesta inmune innata. STAT1/STAT2: Transductor de señal y activador de transcripción 1 y 2 respectivamente, son mediadores de señalización de INF de tipo I y III. IRF3: Factor regulador de interferón 3. GSDMD: Gasdermin D. Adaptado de “SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions” (p. 3), por Pizzato et al., 2022, *Frontiers in Virology*, 1(815388).

El genoma y proteínas virales se ensamblan en el compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, luego la partícula viral se fusiona con la membrana de la célula que lo contiene y se libera por exocitosis para continuar con el proceso de infección y aumento de la progenie viral dentro del organismo huésped, finalizando así el ciclo de replicación como se ilustra en la Figura 4 (Yan et al., 2022).

Figura 4

Ciclo de replicación del virus SARS-CoV-2



Nota. Adaptado de “Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies” (p. 2), por Yan W., et al., 2022, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1).

Proteína espiga (S)

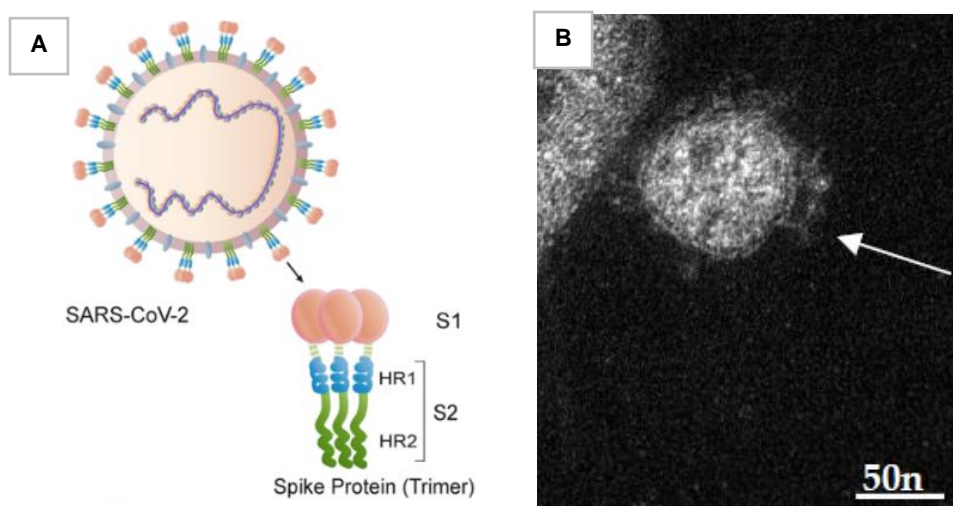
La proteína S es una glicoproteína homotrimérica transmembrana que posee un tamaño de 1273 aminoácidos y un peso molecular de 180 a 200 kDa, pertenece a las proteínas de fusión viral de clase I, está compuesta por un extremo N-extracelular, un dominio transmembrana anclado en la membrana viral y un segmento C-terminal intracelular corto (Sternberg & Naujokat, 2020).

La proteína S del SARS-CoV-2 se encuentra recubierta con moléculas de polisacáridos que sirven para camuflarla del sistema inmunológico del huésped. Naturalmente esta proteína existe en una conformación de prefusión metaestable e inactiva; misma que al interactuar con las proteasas de la célula diana del huésped, experimenta un reordenamiento estructural que permite la fusión del virus con la membrana celular (Huang et al., 2020).

Su estructura ha sido estudiada mediante microscopía crioelectrónica a nivel atómico, revelando que la proteína S está conformada por las subunidades funcionales denominadas S1 y S2, que forman la cabeza y tallo de un halo bulboso en forma de corona que rodea a la partícula viral en el exterior, como se observa en la Figura 5 (Kumavath et al., 2021).

Figura 5

Estructura de la proteína S del SARS-CoV-2



Nota. **A:** Se observa el halo bulboso en forma de corona constituido por la proteína S que contiene a la partícula viral del SARS-CoV-2. Adaptado de “Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antivirus drug development for COVID-19” (p. 1142), por Huang et al., 2020, *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9). **B:** Microscopía electrónica HAADF-STEM de la partícula de SARS-CoV-2 donde se identifica la proteína S. Adaptado de “SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an *In Vitro* System” (p.10) por Barreto-Vieira et al., 2022, *Viruses*, 14(2).

Subunidad S1

La subunidad S1 corresponde a la sección desde el aminoácido 14 al 685 de la longitud total de la proteína S, su función principal es la unión al receptor de la célula huésped. Está comprendida por un péptido señal en el extremo N (SP), un dominio N-terminal (NTD) conformado desde el residuo 14 al 305 y tres dominios de unión al receptor (RBD) conformados desde el residuo 319 al 541 (Huang et al., 2020).

El péptido señal (SP) consta de los primeros 13 aminoácidos con residuos altamente hidrofóbicos que forman una estructura helicoidal, cuya función es guiar a la proteína S hacia su destino en la membrana de la célula huésped. Los dominios RBD, son responsables de la unión con la región de la aminopeptidasa N del receptor celular huésped ACE2. Mientras que el dominio NTD es clave para la interacción con ACE2, pues tiene una alta susceptibilidad a mutaciones que mejoran la unión con el receptor (Xia, 2021).

Subunidad S2

La subunidad S2 está conformada desde el aminoácido 686 al 1273 de la longitud total de la proteína S, su rol principal es la fusión de membrana entre el virus y la célula huésped luego de que se ha establecido la unión. Esta subunidad posee un péptido de fusión (FP) desde el residuo 788 al 806, dos dominios de repetición de heptapéptido 1 y 2 (HR1 y HR2) que ocupan los residuos desde 912 al 984 y desde 1163 al 1213 respectivamente, seguidos del dominio transmembrana (TM) desde el residuo 1213 al 1237 y el dominio del citoplasma (CT) desde el residuo 1237 al 1273 (Huang et al., 2020).

El FP se transforma en IFP cuando ocurre la escisión de la proteína S del SARS-CoV-2, este péptido sirve para penetrar la membrana de la célula diana e instalar un anclaje en su interior, mientras que los dominios TM y CT forman un ancla dentro del virión. Dado que la proteína S es un homotrímero, hay tres HR1 y tres HR2 que en conjunto forman un haz de seis hélices perpendiculares a la membrana viral. Estos se encargan de regular la fusión,

procurando que el virus y la membrana de la célula huésped se acerquen lo suficiente para que logren fusionarse (Xia, 2021).

La fusión de membrana requiere que exista un cambio conformacional en la proteína S, lo cual es efectuado por un evento de escisión que ocurre en la superficie celular a pH neutro o en el interior de un endosoma a pH reducido. Ambos eventos constituyen las dos vías de entrada del SARS-CoV-2 al huésped, la vía de la membrana-TMPRSS2 y la vía del endosoma-catepsina L respectivamente (Rando et al., 2021; Xia, 2021).

El cambio conformacional inicia mediante una señal clara de la proximidad entre un virus y una célula diana o entre una célula infectada y una célula diana. La señal más probable es la activación de proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) expresada en la superficie celular del huésped, pero si este no es el caso entonces ocurre una infección a través de endocitosis por la vía endosoma-catepsina L (Li et al., 2021; Xia, 2021).

Respuesta inmunológica

El sistema inmunológico cumple un rol fundamental en el combate de antígenos extraños presentes en la piel, tejidos, tracto gastrointestinal, vías respiratorias y fluidos corporales como la sangre (Glick et al., 2014). Se compone de dos líneas de defensa conocidas como sistema inmunológico innato o general y sistema inmunológico adaptativo o especializado; los cuales están estrechamente relacionados, pero cada uno de ellos consta de diferentes tipos de células con funciones específicas (Institute for Quality and Efficiency in Health Care, 2020).

Respuesta inmunológica innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a un antígeno extraño, es un mecanismo inmediato que utiliza el huésped para combatir una infección. Los elementos que la componen están disponibles antes del inicio de la infección e incluyen barreras físicas como la piel, membranas mucosas, células fagocíticas, sustancias inflamatorias, además de mediadores bioquímicos (Actor, 2019).

La respuesta inmune innata es independiente del antígeno y carece de memoria inmunológica; por lo tanto es inespecífica e incapaz de reconocer el mismo patógeno en el futuro (Marshall et al., 2018). Sin embargo, la activación molecular y contacto entre los componentes de la respuesta inmune innata con la adaptativa, juega un rol importante y complementario para el control exitoso de una infección (Pérez-Galarza et al., 2021).

Respuesta inmunológica adaptativa

El sistema inmunológico adaptativo es fundamental cuando el nivel de activación de la inmunidad innata es ineficaz frente a un agente infeccioso que ha logrado establecerse dentro del organismo. Es la segunda línea de defensa del huésped, cuyas funciones principales son el reconocimiento de antígenos extraños específicos, generación de vías inmunológicas efectoras enfocadas a eliminar inmediatamente a un patógeno y el desarrollo de la memoria inmunológica capaz de reconocer y erradicar un antígeno en particular durante una infección futura (Marshall et al., 2018).

La respuesta inmunológica adaptativa es llevada a cabo por los linfocitos, que son las células más específicas del sistema inmune y representan alrededor del 25% de los glóbulos blancos en sangre. Los linfocitos se destacan por ser la única célula del organismo que expresa receptores distribuidos de forma clonal, específicos y muy diversos frente a muchos antígenos; lo cual es producto de un fenómeno de recombinación aleatoria de segmentos de ADN durante sus etapas de maduración (Abbas et al., 2018; Rich et al., 2019).

Los linfocitos se clasifican principalmente en linfocitos B y linfocitos T, propios de la respuesta adaptativa humoral y respuesta adaptativa celular, respectivamente. Además, la interacción entre ambas respuestas y sus células características, es llevada a cabo mediante proteínas solubles como las citoquinas y las quimiocinas (Actor, 2019).

La respuesta inmune adaptativa es lenta debido a que requiere de un proceso de selección y expansión de células específicas para un determinado antígeno, a partir de grandes grupos de células B vírgenes y células T dirigidas a diferentes estructuras y secuencias

moleculares. Este tipo de respuesta inmunitaria tarda alrededor de 6 y 10 días luego del cebado del antígeno. Sin embargo, una vez que ha terminado la diferenciación exponencial de células T y B, la infección es erradicada inmediata (Sette & Crotty, 2021).

Respuesta inmune adaptativa humoral

La inmunidad humoral se caracteriza por ser el principal mecanismo de defensa frente a antígenos extracelulares y sus toxinas; está mediada por las células B, quienes sintetizan y secretan anticuerpos en fluidos como la sangre y secreciones mucosas, con el fin de marcar y neutralizar al antígeno. Las células B se originan por hematopoyesis y maduran en la médula ósea; además se caracterizan por expresar un receptor de unión a antígeno único en su membrana que les permite reconocer partículas extrañas directamente, sin necesidad de las células presentadoras de antígeno (APC) (Abbas et al., 2018; Rich et al., 2019).

Los linfocitos B se activan por las células T colaboradoras, que inducen su diferenciación a gran escala. Algunos linfocitos B tienden a convertirse en células de memoria de larga duración que pueden intervenir en infecciones futuras, mientras que otros se transforman en células plasmáticas de vida corta, cuya función es la secreción de grandes cantidades de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) solubles para controlar la infección y luego sufren apoptosis. Además, en determinadas ocasiones, también actúan como APC para ayudar a las células T a reconocer un antígeno específico (Marshall et al., 2018).

Respuesta inmune adaptativa celular

La respuesta celular enfocada principalmente en el combate de antígenos intracelulares; está mediada por las células T, quienes se originan a partir de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea y luego se mueven a través del torrente sanguíneo hasta el timo para madurar. Cada célula T tiene la capacidad de proliferar y diferenciarse con rapidez al recibir una señal dada por una APC, como las células dendríticas y en algunos casos por otras células como macrófagos, células B, fibroblastos y células epiteliales que expresan un

grupo de proteínas denominado como complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Abbas et al., 2018; Pérez-Galarza et al., 2021).

Las células T expresan un receptor heterodimérico único de unión a antígenos en su membrana denominado receptor de células T (TCR), el cual forma un complejo de llave-cerradura con el antígeno específico. Las células T circulan por todo el cuerpo a través del sistema linfático y sanguíneo, por lo que tiene una alta probabilidad de interactuar con una APC que ha digerido un antígeno y reconocer los residuos de fragmentos unidos al complejo CMH específico. El complejo CMH-antígeno activa el TCR de la célula T e induce la secreción de citocinas que mejoran la respuesta inmune (Marshall et al., 2018).

Clasificación de los linfocitos

Existen subgrupos de linfocitos B y T con diferentes características tanto fenotípicas como funcionales. Dichos subgrupos pueden ser identificados por la expresión de proteínas en su superficie celular, determinadas con un número "CD" único. El CD se refiere al clúster o cúmulo de diferenciación, conformado por un conjunto de proteínas de superficie específicas para el fenotipo de una sola célula o linaje celular. Las proteínas CD se utilizan principalmente para determinar la función, medir la variación de la proporción e identificar la distribución de poblaciones celulares en pacientes sanos y con enfermedad (Abbas et al., 2018; Actor, 2019).

Los linfocitos B pueden ser foliculares, que son los más numerosos y activos; además de linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B-1. Mientras que los linfocitos T se clasifican en cooperadores CD4⁺ y citotóxicos CD8⁺. Cada subgrupo puede encontrarse en diferentes localizaciones anatómicas y en proporciones variadas. La Tabla 3 resume las principales características de los diferentes tipos de linfocitos (Marti et al., 2017; Rich et al., 2019).

Tabla 3

Clasificación de los linfocitos y sus principales características

Tipo de Linfocito	Función	Receptor para Antígeno	Especificidad	Marcador de fenotipo	Porcentaje de linfocitos totales (%)		
					Sangre	Ganglio linfático	Bazo
Linfocitos B foliculares	Producción de anticuerpos	Ig de superficie	Diversa frente a muchos tipos de moléculas	Receptor Fc, CMH II, CD19 ⁺ , CD23 ⁺	5-20	20-25	40-45
Linfocitos B de zona marginal	Producción de anticuerpos	Ig de superficie	Limitada frente a un limitado grupo de moléculas	IgM, CD27 ⁺	2-3	3-5	7-10
Linfocitos B-1	Producción de anticuerpos	Ig de superficie	Limitada frente a un restringido grupo de moléculas	IgM, CD43, CD20, CD27, pero no CD70	1-3	Inusual	Inusual
Linfocitos T CD4 ⁺ cooperadores	Activa linfocitos B y macrófagos Estimula la inflamación	Heterodímero αβ-TCR	Diversa frente a complejos péptido-CMH II	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻	35-60	50-60	50-60
Linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos	Mata células cancerosas o infectadas con antígenos intracelulares	Heterodímero αβ-TCR	Diversa frente a complejos péptido-CMH I	CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺	15-40	15-20	10-15
Linfocitos T reguladores	Suprime la función de otros linfocitos para mantener la tolerancia frente a lo propio	Heterodímero αβ-TCR	Frente a complejos péptido-CMH II de antígenos propios y algunos extraños	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , FoxP3 ⁺	Inusual	10	10
Linfocitos T citolíticos naturales (TNK)	Suprime o activa respuestas innatas y adaptativas	Heterodímero αβ-TCR	Limitada frente a complejos glucolípido-CD1	CD56 ⁺ , CD16 ⁺ , CD3 ⁺	5-30	Inusual	10
Linfocitos T γδ	Función cooperadora y citotóxica en la respuesta innata	Heterodímero γδ-TCR	Limitada frente a antígenos peptídicos y no peptídicos	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ y CD8 variable	Inusual	Inusual	Inusual
Linfocitos T invariantes asociados a mucosas (MAIT)	Función cooperadora y citotóxica en el intestino	Heterodímero αβ-TCR	Limita frente a metabolitos bacterianos	CD3 ⁺ y CD8 ⁺ la mayoría	5	Inusual	Inusual

Nota. Ig: Inmunoglobulina, CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad, CD: Clúster de diferenciación.

Adaptado de "Inmunología celular y molecular" (p. 22), por Abbas et al., 2018, Elsevier.

Origen de los linfocitos T

Los linfocitos al igual que todas las células sanguíneas se originan a partir de las células troncales multipotentes o mejor conocidas como células troncales hematopoyéticas (HSC), derivadas de órganos linfáticos generadores como la médula ósea y el hígado fetal. Las HSC maduran y se transforman en progenitores linfocíticos, capaces de generar células linfoides innatas, linfocitos B y linfocitos T. Los progenitores linfocíticos derivados de la médula ósea dan lugar a linfocitos B foliculares, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos T con receptores $\alpha\beta$. Mientras que los progenitores linfocíticos generados en el hígado fetal, antes del nacimiento, dan lugar a los linfocitos B-1 y linfocitos T con receptores $\gamma\delta$ (Rich et al., 2019).

Los progenitores de los linfocitos B maduran en la médula ósea, mientras que los progenitores de los linfocitos T se trasladan y maduran en el timo. Durante su estancia en el timo, los linfocitos expresan receptores de antígeno y desarrollan capacidades funcionales, que dan lugar a células maduras y listas para recircular por el torrente sanguíneo hacia los órganos linfáticos secundarios (Abbas et al., 2018).

La primera etapa de diferenciación de HSC es el compromiso del linaje linfóide, el cual depende de varios factores como la señalización de células del estroma, factores de crecimiento, citoquinas, quinasas y moléculas de superficie como Notch-1. La acción conjunta de Notch-1 con GATA-3, promueve el desarrollo del linaje de linfocitos T con receptores principalmente $\alpha\beta$. Además, la interleucina 7 (IL-7) es clave para el desarrollo, proliferación y supervivencia de los progenitores celulares de los linfocitos T, debido a que es producida por las células del estroma de la médula ósea y por las células epiteliales del timo (Marti et al., 2017; Taniuchi, 2018).

Maduración de los linfocitos T

La maduración tímica es fundamental debido a que solo entre el 1 y 3% de progenitores celulares de los linfocitos T que ingresan al timo logran sobrevivir los pasos de selección y madurar completamente, la Figura 6 esquematiza dicho proceso. Inicialmente, los progenitores

de linfocitos T transportados por la sangre, atraviesan el endotelio de las vénulas postcapilares en la región de la unión corticomedular del timo. Los precursores de linfocitos T inmaduros o también denominados timocitos, colonizan el timo gracias a la unión de quimiocinas (CC) con receptores específicos. Los timocitos en este punto no expresan el TCR, CD3, CD4 ni CD8; por lo cual se los llama timocitos con doble negatividad (DN) en un estado de prolinfocito T de maduración. Luego de su llegada, los timocitos DN se mueven desde el seno subcapsular y región cortical externa, hacia la corteza del timo, gracias a la unión de la quimiocina CCL25 con el receptor CCR9 (Coico & Sunshine, 2015; Marti et al., 2017).

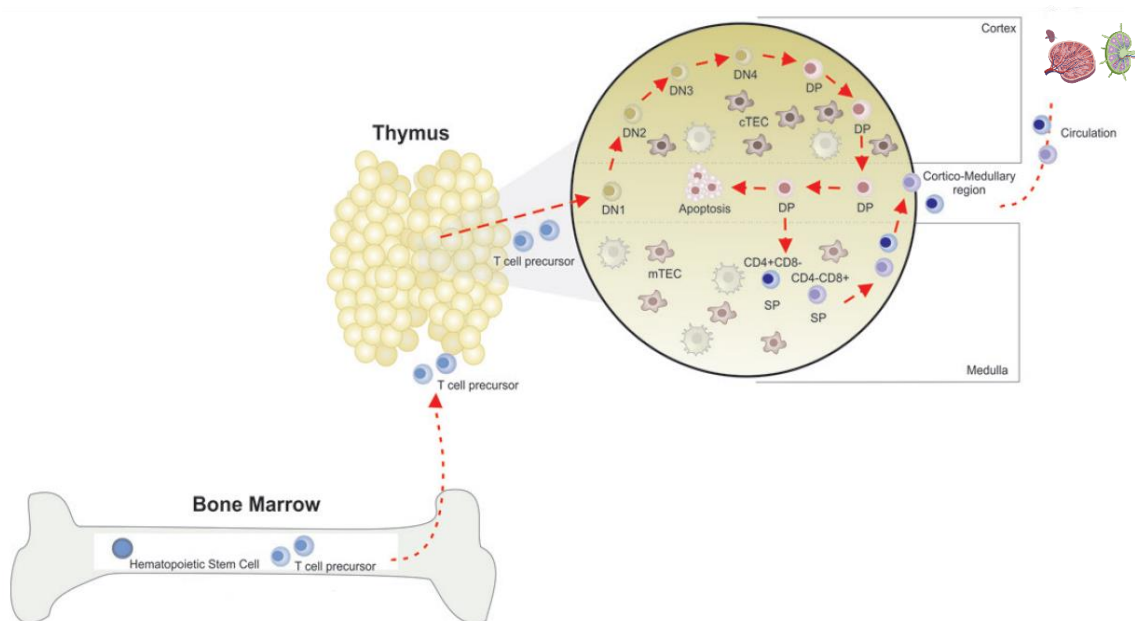
En la corteza ocurren los estados de maduración, que incluyen la expresión de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ por primera vez, seguido de la maduración de timocitos en linfocitos CD4⁺ o CD8⁺. Los timocitos (DN) pasan del estadio prolinfocito T al estadio prelinfocito T, cuando se producen recombinaciones productivas en procesos de reordenamiento génico, que en el 90% de los casos genera la subunidad β del receptor TCR. El complejo prelinfocito T emite señales que inhiben la formación de timocitos DN, eliminación de subunidades β con reordenamientos no productivos y promueve la transición de timocitos DN a timocitos con doble positividad (DP). Los timocitos DP expresan la subunidad α de TCR mediante reordenamiento génico y consecuentemente expresan heterodímeros $\alpha\beta$ -TCR totalmente formados (Taniuchi, 2018).

También en la corteza ocurre un proceso de selección positiva, en el cual se verifica que los receptores TCR de los timocitos DP puedan reconocer con avidez baja a los complejos de CMH unidos con péptidos propios. Los timocitos DP que reconozcan CMH-I se convertirán en timocitos de una sola positividad (SP) del linaje CD8⁺ y los que reconozcan CMH-II se convertirán en timocitos SP del linaje CD4⁺. Aquellos que no expresen un reordenamiento productivo de la subunidad α y aquellos que reconocen moléculas propias de CMH con alta avidez son considerados autorreactivos y son eliminados mediante un proceso de selección negativa que induce su apoptosis. Aunque, algunos de ellos son seleccionados por células dendríticas y macrófagos para convertirse en linfocitos T reguladores CD4⁺ cuya función será

evitar reacciones autoinmunitarias. A su vez, aquellos timocitos cuyos receptores no reconocen moléculas propias presentadas por CMH se los considera defectuosos y también mueren por apoptosis en un fenómeno denominado “muerte por abandono” (Hwang et al., 2020; Rich et al., 2019).

Figura 6

Maduración de los linfocitos T



Nota. Se muestra la ruta general de maduración de los linfocitos T desde el origen de los precursores linfocíticos en la médula ósea hasta el proceso de maduración en el timo y posterior recirculación a través de los órganos linfáticos secundarios. Adaptado de “*Lymphocyte Updates - Cancer, Autoimmunity and Infection: Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation*” (p.9) por Marti et al., 2017, InTech.

Los timocitos DP que logran superar los procesos de selección en la corteza y se transforman en timocitos SP, se trasladan a la médula del timo mediante la unión de las quimiocinas CCL21 y CCL19 con el receptor CCR7. En este punto, ocurre un segundo proceso de selección negativa mediado por el regulador autoinmune (AIRE) expresado por las proteínas

epiteliales medulares. Además, ocurren procesos de diferenciación funcional y fenotípica en linfocitos T (SP) $CD4^+ CD8^-$ o $CD8^+ CD4^-$. Finalmente, los linfocitos inmunológicamente competentes y maduros, abandonan la médula tímica, a través de un gradiente de 1-fosfato de esfingosina, para formar parte de los linfocitos periféricos e ingenuos, listos para ser activados por una APC (Marti et al., 2017; Taniuchi, 2018).

Activación de los linfocitos T

Los procesos de señalización e interacción celular durante la etapa de maduración en el timo, proporcionan al huésped un extenso repertorio de células T con receptores de antígeno únicos y específicos, originados por recombinación somática y capaces de reconocer una amplia gama de antígenos (Coico & Sunshine, 2015). Los linfocitos T maduros llegan a los órganos linfáticos secundarios o periféricos, que incluyen a los ganglios linfáticos, el bazo y tejidos mucosos; donde circulan en un estado de reposo a través de una red reticular de fibroblastos y pueden adquirir capacidades funcionales únicamente al ser activados por la interacción con una APC (Abbas et al., 2018).

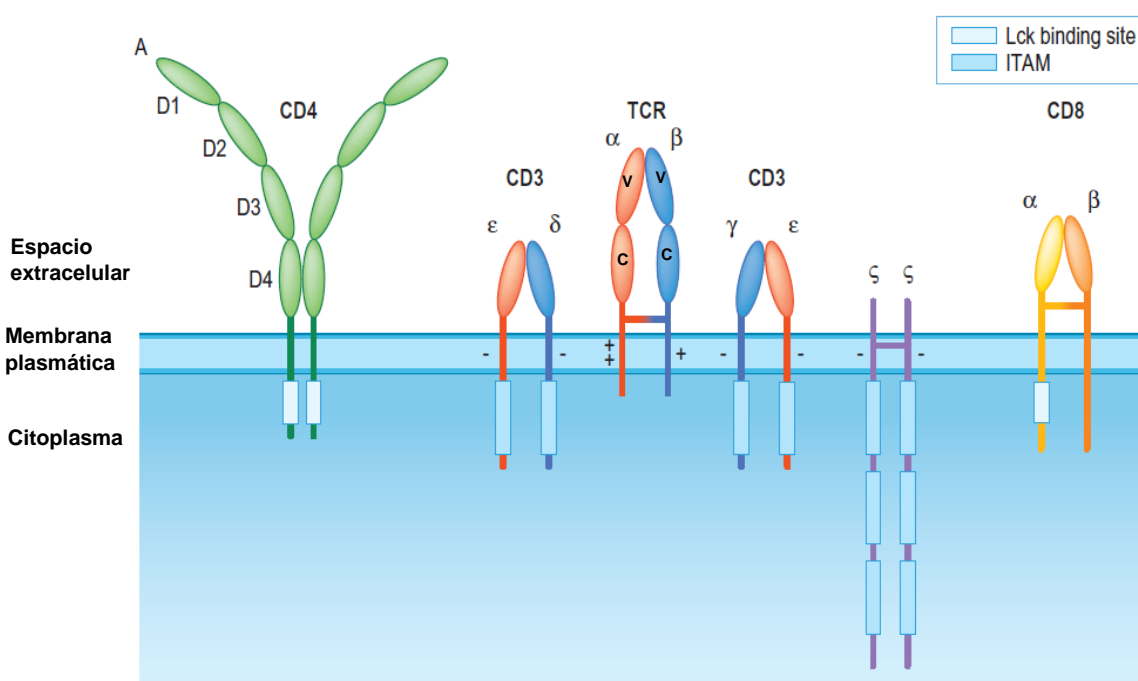
Existen tres etapas que comprenden la activación de los linfocitos T; la primera etapa corresponde a la presentación del antígeno. Durante esta etapa, las APC dotadas de receptores de reconocimiento de patrones (PPR) específicos para los patrones asociados a patógenos (PAM), migran hacia los ganglios linfáticos para encontrar un determinado antígeno; y luego lo degradan hasta formar fragmentos peptídicos con una longitud adecuada para unirse a los surcos específicos de las moléculas CMH y ser exhibidos a los linfocitos T vírgenes (Tai et al., 2018).

La siguiente etapa consiste en el reconocimiento del antígeno por el complejo TCR, el cual está formado por la asociación no covalente entre el receptor TCR y las subunidades de proteínas CD3 γ , δ , ϵ y ζ , como se muestra en la Figura 7. El receptor TCR posee la capacidad de reconocer fragmentos de antígenos unidos a CMH y también autoantígenos; consta de cadenas α y β con dominios variables y constantes que se encuentran unidos entre sí por

enlaces disulfuro. Los dominios variables tanto α como β poseen tres regiones hipervariables o conocidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). CDR3 es la región de mayor tamaño y juega un rol fundamental en la unión con el antígeno, debido a que sufre un cambio conformacional diagonal que permite la unión específica del receptor al complejo péptido-CMH (Coico & Sunshine, 2015; Rich et al., 2019).

Figura 7

Esquema del complejo TRC y correceptores CD4 y CD8 de linfocitos T



Nota. La carga asociada a los enlaces disulfuro de los residuos transmembrana es indicada como básica (+) y ácida (-). Lck: Tirosina quinasa. ITAM: Motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores. Adaptado de “*Clinical Immunology: Principles and Practice*” (p. 72), por Rich et al., 2019, Elsevier.

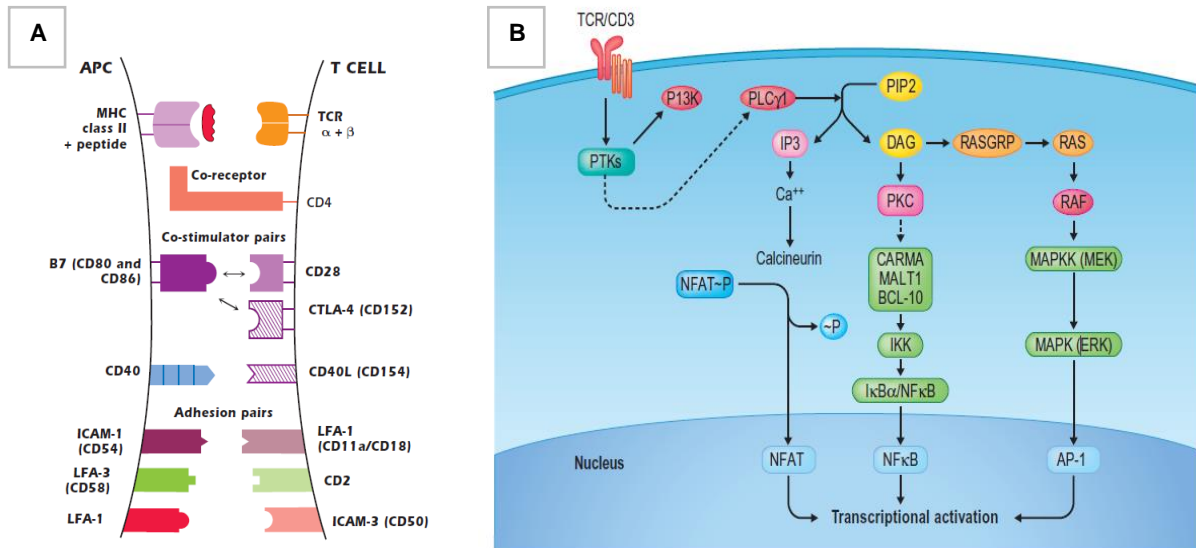
Las subunidades de CD3 se encuentran unidas por interacciones hidrofóbicas y aunque no tienen un rol directamente involucrado con el reconocimiento del antígeno, su función principal es la transmisión de señales desencadenadas por el TCR a través de motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores (ITAM) presentes en su cola citoplasmática. Los ITAM consisten en repeticiones en tándem de una secuencia con tirosina, presente tres veces en la cadena CD3 ζ y una vez en las cadenas CD3 γ , δ y ϵ ; como se muestra en la Figura 7 (Hwang et al., 2020).

La tercera y última etapa de activación de los linfocitos T, consiste en la captación de dos señales claves. La señal 1 está dada por la unión del TCR con el complejo péptido-CMH; la cual induce la fosforilación de ITAM mediante la acción de proteínas tirosina quinasas y facilita la interacción de otras moléculas efectoras o coestimuladores con el complejo TCR y correceptores CD4 o CD8, según el caso. El contacto físico de los coestimuladores con la interfaz CD y TCR, da lugar a una estructura diana denominada Sinapsis Inmunitaria (SI) que se convierte en la señal 2 de activación (Abbas et al., 2018; Tai et al., 2018).

Las células T captan la señal 1 luego de varias horas durante las cuales se ha producido una señalización sostenida a través de múltiples TCR, asegurando la estimulación eficaz de las vías de transducción de señales, mismas que conducen a la activación de los factores de transcripción nuclear. Mientras que la señal 2 es transferida a través de ITAM del dominio citoplasmático de CD3, luego de que se ha establecido la estructura SI. La vía coestimuladora mejor caracterizada, está dada por el receptor de superficie del linfocito T denominado CD28 que tiende a unirse a las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD-86) expresadas en la superficie de las APC. Sin embargo, se ha detectado otras señales que también forman parte del constructo SI como CTLA-4 con CD80, CTLA-4 con CD86, LFA-1 con ICAM-1, LFA-1 con ICAM3 y CD2 con LFA-3, ilustrados en la Figura 8A (Abbas et al., 2018; Coico & Sunshine, 2015).

Figura 8

Mecanismo de activación de los linfocitos T

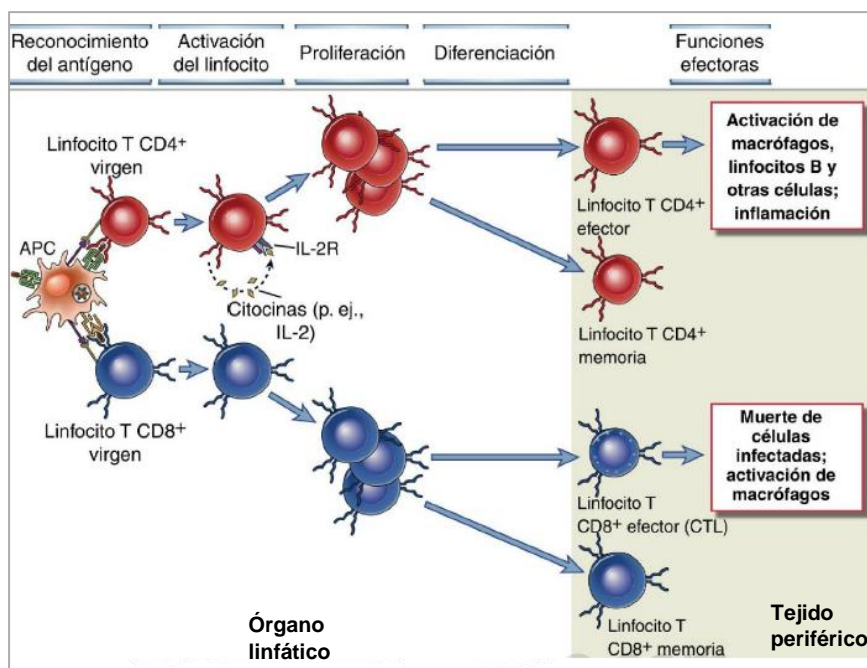


Nota. A: Señal 2 de la activación dada por la unión de receptores de superficie del linfocito T con coestimuladores expresados en la superficie de las APC. Adaptado de *“Immunology: A short course”* (p. 155), por Coico, R. & Sunshine, G., 2015, John Wiley & Sons Ltd. **B:** Vías de señalización implicadas en la activación del linfocito T. TCR emite señales que activan a las tirosinas quinasa (PTK), como LCK y ZAP-70. PTK fosforila y activa la fosfolipasa $Cy1$ (PLC γ 1). PLC γ 1 hidroliza al fosfatidil inositol bisfosfato (PIP2) y produce diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). IP3 estimula el aumento de calcio intracelular, activando la fosfatasa calcineurina y ésta desfosforila NFAT permitiendo su translocación al núcleo. A su vez, DAG induce la actividad de RAS-GRP1 y activa RAS, el cual se une y estimula la quinasa RAF1, dando lugar a una cascada de serina/treonina quinasa (MAPK) que permite la translocación nuclear de las quinasa ERK. Además, DAG activa el complejo CARMA/BCL-1/MALT1, que fosforila a la quinasa I κ B (IKK) y luego ésta fosforila a I κ B- α , lo que en consecuencia libera NF- κ B al núcleo. Los factores de transcripción NFAT, NF κ B y los derivados de la vía MAPK regulan la transcripción de genes críticos para la activación de células T, como IL-2. Adaptado de *“Clinical Immunology: Principles and Practice”* (p. 187), por Rich et al., 2019, Elsevier.

La captación consecuente de las señales 1 y 2, desencadena un conjunto de vías de señalización que son dirigidas por citocinas, moléculas coestimuladoras, quimiocinas, integrinas y metabolitos, como se ilustra en la Figura 8B. Dichas vías de señalización promueven la activación y diferenciación de las células T vírgenes en subtipos específicos de células efectoras y de memoria, que dotan de la capacidad de migrar a cualquier tejido y responder ante una infección. Sin embargo, en algunos casos la captación simultánea de las señales 1 y 2 o la ausencia de una vía coestimuladora podría significar una señal de apagado para las células T, por lo que se traduciría en un estado de tolerancia, clon incompetente con respuesta nula o eliminación del linfocito T (Rich et al., 2019; Tai et al., 2018).

El proceso de activación de los linfocitos T también implica la expresión de moléculas de superficie que modulan las respuestas inmunológicas mediante mecanismos de retroalimentación positiva al incrementar la magnitud de activación de los linfocitos T y retroalimentación negativa al inhibir la activación hasta un límite seguro para proteger al organismo de una respuesta inapropiada, evitando así enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Abbas et al., 2018; Hwang et al., 2020).

Los coestimuladores y las citocinas presentes durante la activación, inducen factores de transcripción específicos para la diferenciación de un determinado grupo de células T, según los requerimientos del huésped para combatir al antígeno, como se ilustra en la Figura 9. Las células T CD4⁺ activadas pueden diferenciarse en linfocitos T reguladores inmunosupresores (Treg) o linfocitos T efectoras inflamatorias como los T auxiliares (Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22) y los T auxiliares foliculares (Tfh). Este tipo de células están definidas en función a la producción de citocinas proinflamatorias como el interferón (IFN- γ) y los factores de necrosis tumoral (TNF- α o TNF- β) (Marti et al., 2017).

Figura 9*Activación y respuesta de los linfocitos T*

Nota. Esquema de respuesta de los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno en el huésped. Adaptado de “*Inmunología celular y molecular*” (p. 210), por Abbas et al., 2018, Elsevier.

Al igual que las células T CD4⁺, las células T CD8⁺ pueden diferenciarse en linfocitos con una misión regulatoria (Tc1, Tc2, Tc9 y Tc17); de los cuales el más caracterizado ha sido Tc1 o denominado linfocito citotóxico (CTL), cuya función es la eliminación directa de células infectadas, dañadas, disfuncionales y tumorales; por medio de la acción de IL-2 e IL-12, altamente citotóxicas que permiten la expresión de altos niveles de IFN- γ , TNF- α , granzimas y perforinas (Marti et al., 2017). Al erradicar la infección las células efectoras son eliminadas por fagocitosis para devolver el organismo a un estado de homeostasis, pero algunas de ellas se conservan como células de memoria principalmente en tejidos mucosos, piel y en órganos linfáticos; mismas que dotan de la capacidad para diferenciarse exponencialmente durante futuros encuentros con el mismo antígeno (Marshall et al., 2018; Sette & Crotty, 2021).

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)

El CMH comprende un conjunto de genes estrechamente relacionados que se heredan como una unidad y son responsables de la coordinación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Se sabe que el CMH está presente en todos los vertebrados y que en el ser humano se lo conoce como sistema de antígenos leucocitario humano (HLA) (Grifoni et al., 2021). Cumple un rol fundamental en la respuesta inmunológica frente a patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos; así como también interviene en procesos de trasplante, autoinmunidad, cáncer, respuestas a fármacos y vacunas, entre otros (Rich et al., 2019).

Los principales tipos de CMH incluyen al CMH de clase I (CMH-I) que se expresa en la superficie de todas las células nucleadas y al CMH de clase II (CMH-II) que se expresa en la superficie de células epiteliales y células inmunes como las células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas. La función primordial de CMH-I y CMH-II durante la respuesta inmune, es la presentación de fragmentos peptídicos derivados de antígenos fagocitados y células infectadas, a las células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente (Pérez-Galarza et al., 2021).

CMH-I y CMH-II son glicoproteínas transmembrana, comparten un pliegue similar de unión que se compone de dos dominios y cuya función es adaptarse al péptido del antígeno mediante enlaces de hidrógeno e interacción entre aminoácidos para formar el complejo CMH-péptido (Grifoni et al., 2021). El pliegue, en el CMH-I está compuesto de una sola cadena pesada (α) asociada de forma no covalente con un pequeño polipéptido invariable de β 2-microglobulina (β 2m) y rodeado por residuos de tirosina en los extremos, que limitan la unión de péptidos de un tamaño entre 8 a 11 residuos de longitud. Mientras que en el CMH-II, está conformado por dos cadenas (α y β) que permiten el acople de péptidos de entre 10 a 30 residuos de longitud (Arshad et al., 2022; Wieczorek et al., 2017).

La unión del péptido es un paso integral para la biosíntesis y ensamblaje del CMH, por lo que ocurre antes de su expresión en la superficie celular de las APC. Muchos antígenos están conformados por proteínas grandes y complejas, por lo que es crucial que exista un

mecanismo de proteólisis que permita romper las estructuras y convertirlas en péptidos más accesibles para el CMH; dicho mecanismo es mejor conocido como procesamiento del antígeno (Grifoni et al., 2021).

La vía del CMH-I para el procesamiento de proteínas citosólicas derivadas de antígenos endógenos como virus replicados, proteínas bacterianas inyectadas y parásitos fagocitados; consiste en la degradación proteolítica a través del complejo citoplasmático de enzimas denominado proteosoma. El proteosoma degrada proteínas mal plegadas o dañadas de manera rutinaria mediante mecanismos de ubiquitinación, pero en presencia de IFN- γ , el proteosoma potencia sus funciones inmunológicas (Abbas et al., 2018). Los péptidos generados por la degradación en el proteosoma son transportados selectivamente al retículo endoplásmico mediante un transportador de péptidos (TAP) y luego se unen a las cadenas de CMH previamente ensambladas. El complejo CMH-I-péptido se mueve a través del aparato de Golgi hacia la superficie celular, donde se muestra y se presenta a una célula T CD8⁺ que expresa el receptor de antígeno pertinente; como se muestra en la Figura 10A (Coico & Sunshine, 2015).

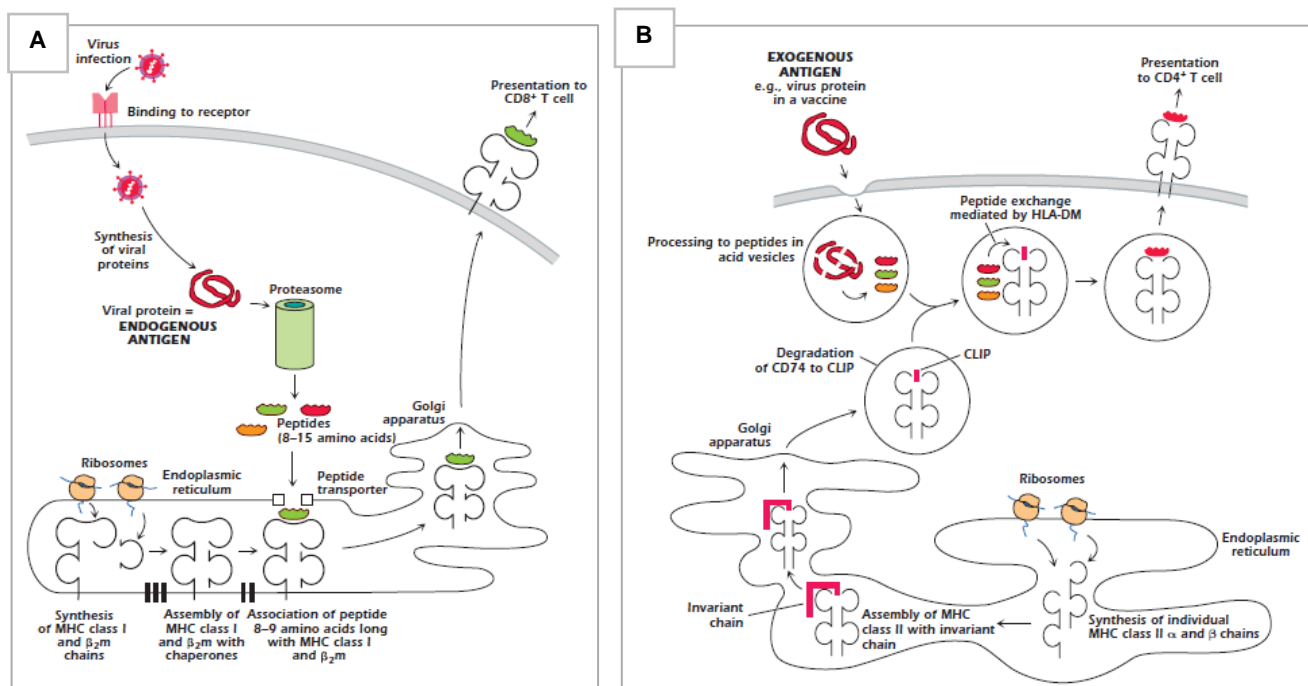
La vía del CMH-II para el procesamiento de proteínas exógenas se basa en la interiorización de proteínas desde el exterior de la célula hacia el citoplasma, mediante vesículas intracelulares que se fusionan con endosomas y lisosomas ácidos (pH~4). Dichas vesículas contienen enzimas proteasas como las catepsinas, que generan péptidos de menor tamaño. Simultáneamente, durante la síntesis de CMH-II en el retículo endoplásmico rugoso, una cadena invariable (CD74) se adhiere al surco de unión del CMH con el fin de evitar la unión de péptidos propios del huésped y actúa como chaperona para permitir su entrada al complejo de Golgi. Luego la cadena invariable se degrada formando un polipéptido invariable asociado a clase II (CLIP) que estimula la fusión de las vesículas que contienen al CMH con aquellas que contienen fragmentos del antígeno. El intercambio de péptidos entre el complejo CMH-II-CLIP y los péptidos derivados del antígeno exógeno es catalizado por la enzima HLA-DM y una vez

formado, el complejo CMH-II-péptido sale a la superficie celular y presenta el antígeno a una célula T CD4⁺ que expresa el receptor de antígeno apropiado, tal como se muestra en la Figura 10B (Rich et al., 2019; Wieczorek et al., 2017).

Las células dendríticas particularmente son un tipo de APC que tiene la capacidad de capturar o ingerir células infectadas por virus o células tumorales a través de vesículas por fagocitosis o pinocitosis. Al encontrarse en el citoplasma, dichas células son digeridas por el complejo proteosoma y luego son presentados a los linfocitos T CD8⁺, dando lugar a un proceso denominado presentación cruzada (Abbas et al., 2018; Coico & Sunshine, 2015).

Figura 10

Presentación de antígenos por CMH



Nota. **A:** Procesamiento de un antígeno endógeno por el CMH-I y presentación a los linfocitos T CD8⁺. **B:** Procesamiento de un antígeno exógeno por el CMH-II y presentación a los linfocitos T CD4⁺. Adaptado de "Immunology: A short course" (p. 125 y 126), por Coico, R. & Sunshine, G., 2015, John Wiley & Sons Ltd.

Respuesta inmune frente al SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 ingresa por el tracto respiratorio superior del huésped y luego se propaga hacia otros órganos, especialmente a los pulmones. La respuesta inmune inicia durante la incubación del virus en las células de la mucosa oral y nasal, cuando el ARN viral es reconocido por receptores innatos del huésped como los TLR7, TLR8 y TLR3; además de los receptores tipo RIG (Bartleson et al., 2021). El reconocimiento del antígeno estimula la producción de citocinas proinflamatorias que en conjunto generan un ambiente tisular antiviral y promueven el reclutamiento de células efectoras; una de ellas las células dendríticas quienes migran a los ganglios linfáticos y activan la respuesta inmune adaptativa (Soraci et al., 2022).

La magnitud de la carga viral inicial y la eficacia de la respuesta inmune innata mediada principalmente por INF de tipo I y III, son determinantes para establecer la respuesta inmune adaptativa y la condición clínica del huésped (Ricci et al., 2021; Sette & Crotty, 2021). Cuando la respuesta inmune innata, inicialmente protectora, se activa de forma desequilibrada puede provocar una condición perjudicial de hiperinflamación sistémica temprana y sostenida, seguida de daño tisular y mayor expresión de citocinas y quimiocinas que en conjunto dan lugar a un fenómeno denominado “tormenta de citocinas”, causante de COVID-19 grave y con consecuencias fatales, especialmente en pacientes con comorbilidades preexistentes (Kedzierska & Thomas, 2022; Moss, 2022; Toor et al., 2021). Además, se ha reportado que los huéspedes de edad avanzada son más susceptibles a desarrollar COVID-19 grave debida a la inmunosenescencia, la cual puede dificultar las respuestas tempranas de IFN tipo I, agravar la condición de hiperreactividad de la vía de señalización JAK-STAT y sobrecargar a las células de su sistema inmunitario (Bartleson et al., 2021). A su vez se ha detectado que CMH puede estar asociado a polimorfismos genéticos y que su expresión puede estar influenciada por las condiciones hiperinflamatorias del huésped; lo que en consecuencia tiende a aumentar su susceptibilidad a desarrollar COVID-19 severo (Shah et al., 2020).

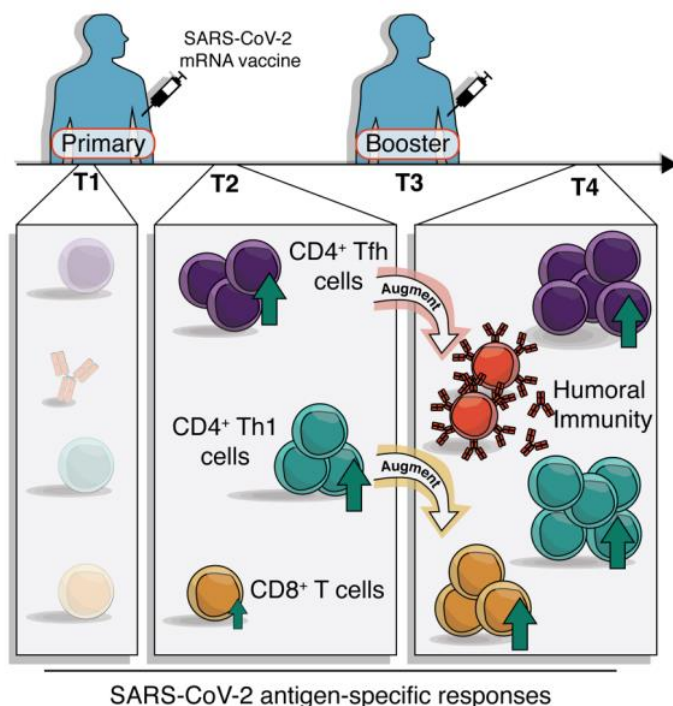
La mayoría de epítomos del virus SARS-CoV-2 presentados por CMH a las células T, se derivan de proteínas estructurales como las proteínas S y N, tanto en huéspedes humanos como en modelos animales. No obstante, se ha informado que la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 y también en ensayos con líneas celulares epiteliales, tiende a alterar la vía de procesamiento de antígenos mediada por CMH-I, es decir la vía de proteasoma. Lo cual se ha calificado como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, desarrollado por el virus gracias a sus proteínas accesorias ORF6, ORF8, ORF7a y ORF3a (Arshad et al., 2022; Nguyen et al., 2021; Yoo et al., 2021).

La activación de la inmunidad adaptativa ocurre entre los días 7 y 10 tras el ingreso del virus a la célula. Se ha registrado la ocurrencia de respuestas tempranas protagonizadas por los anticuerpos IgM e IgA secretados por los linfocitos B; seguidas de IgG con un pico máximo aproximadamente entre el día 50 al 60 después de la infección, que puede durar hasta 10 meses (Jordan, 2021). A su vez, la respuesta adaptativa celular ha sido detectable entre los días 10 y 20 tras el inicio de los síntomas y se ha visto caracterizada por la mayor prominencia de células T CD4⁺ respecto a células T CD8⁺, lo que se ha asociado con el control primario de la infección por SARS-CoV-2, en ensayos *in vivo* con modelos animales (Li et al., 2021; Soraci et al., 2022).

Algunos estudios han demostrado que la inducción rápida de células T CD4⁺ específicas para SARS-CoV-2, es esencial para la eliminación viral acelerada y se asocian con COVID-19 leve, mientras que la ausencia prolongada podría desencadenar COVID-19 grave o mortal (Kedzierska & Thomas, 2022). Este hallazgo se sustenta en que las células T CD4⁺ poseen la capacidad de diferenciarse en una variedad de células auxiliares y efectoras como se ilustra en la Figura 11; cuyas funciones son instruir a las células B para la secreción de anticuerpos neutralizantes, ayudar a reclutar células T CD8⁺, estimular células innatas, así como también ejecutar actividades antivirales directas y promover la reconstrucción de tejidos afectados por la infección (Painter et al., 2021; Sette & Crotty, 2021).

Figura 11

Respuesta inmune adaptativa específica frente al antígeno SARS-CoV-2



Nota. La figura esquematiza la respuesta inmune adaptativa inducida por una vacuna de ARNm del SARS-CoV-2. Las células T inducidas demuestran memoria central e incluyen los subconjuntos Tfh y Th1, similar a lo que ocurre durante una infección natural. Adaptado de "Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells guides coordinated humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccination" (p.2), por Painter et al., 2021, *bioRxiv*, 1(1).

Se ha informado que las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria específicas para SARS-CoV-2, tienen a disminuir dentro de los 3 y 6 meses luego del inicio de la enfermedad. Aunque, luego de los 6 meses se ha detectado la presencia de linfocitos Thf de memoria (Kedzierska & Thomas, 2022). La presencia de células T de memoria específicas para SARS-CoV-2, residentes en el pulmón está correlacionada con el control de la gravedad en caso de una reinfección. Además, se ha observado la inducción de células T de memoria tras la vacunación en modelos animales, por lo que se ha alentado al desarrollo de vacunas frente a

este antígeno (Moss, 2022). La vacunación masiva de una población es la estrategia más efectiva para controlar, eliminar o contener la enfermedad, debido a que promueve la memoria inmunitaria y previene consecuencias graves en los casos de reinfección por SARS-CoV-2 (Lahariya, 2016; Zheng et al., 2022).

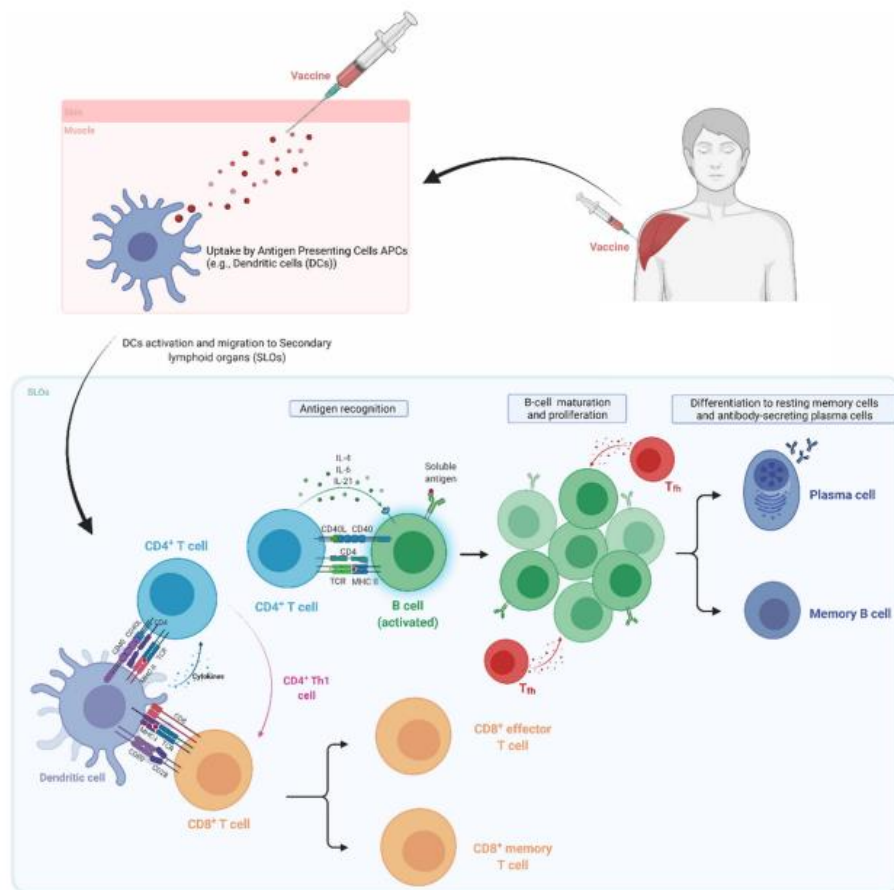
Vacunas

Las vacunas consisten en preparados biológicos que proporcionan inmunidad adquirida activa al huésped, frente a una determinada enfermedad. Su origen se remonta al año 1796, cuando Edward Jenner desarrolló la primera vacuna dirigida contra la viruela. Aunque, fue en la década de 1960 cuando se estableció de forma definitiva los programas de inmunización y desde entonces las vacunas han salvado millones de vidas alrededor de todo el mundo (Ndwandwe & Wiysonge, 2021).

El mecanismo de acción de las vacunas se basa en la estimulación segura de la respuesta inmune, empleando una molécula que forma parte del antígeno de interés; con el objetivo de generar una memoria inmunitaria específica y de larga duración (Glick et al., 2014). Tras la administración de la vacuna, las moléculas antigénicas son reconocidas por las APC del sistema inmune innato, lo que desencadena múltiples eventos de señalización que promueven el mecanismo de procesamiento de antígenos; los fragmentos peptídicos resultantes son conjugados con las moléculas de CMH y luego presentados a los linfocitos T, promoviendo su activación y diferenciación en células efectoras y de memoria, que protegerán al huésped frente a una infección futura, como se ilustra en la Figura 12 (Ghattas et al., 2021; Pollard & Bijker, 2021).

Figura 12

Mecanismo de acción de las vacunas



Nota. La figura muestra la activación de la respuesta inmune tras la administración intramuscular de una vacuna frente a un antígeno específico. Adaptado de “Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities” (p. 4), por Ghattas et al., 2021, *Vaccines*, 9(12).

De manera general, las vacunas están compuestas por una molécula activa derivada del patógeno de interés, preservantes, estabilizantes, excipientes y trazas de compuestos empleados durante su procesamiento. Algunos de estos compuestos pueden desencadenar eventos adversos variables en un rango de serio a moderado; incluyendo hipersensibilidad,

efectos neurológicos, autoinmunidad, entre otros; que pueden ser controlados o evadidos mediante investigación con ensayos clínicos (Ghattas et al., 2021).

Dichos ensayos clínicos permiten estudiar la protección conferida por una vacuna, mediante análisis de la respuesta inmune inducida y su relación con ciertos criterios, como la prevención de la enfermedad, disminución de la gravedad de la enfermedad o la reducción de la tasa de hospitalización debida a la enfermedad (Pollard & Bijker, 2021). Además, todos los procesos de desarrollo de vacunas son estrictamente regulados y monitoreados por organizaciones internacionales como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en coordinación con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (He et al., 2021).

Plataformas de vacunas

En la actualidad, existen diferentes tipos o plataformas de vacunas que incluyen a las vacunas vivas atenuadas, totalmente inactivadas, conjugadas, basadas en toxinas, basadas en subunidades recombinantes, basadas en vectores virales o bacterianos, basadas en ácido nucleico (ADN y ARN) y basadas en partículas similares a virus (Ghattas et al., 2021). Las vacunas vivas usualmente brindan protección inmunitaria luego de una sola dosis, pero otras como las vacunas enteras inactivadas requieren de múltiples dosis para asegurar una respuesta satisfactoria frente al antígeno. Las dosis sucesivas se deben aplicar en un intervalo de 4 a 8 semanas; y las dosis de refuerzo en intervalos de 6 meses luego de haber completado la serie primaria de vacunación (Lahariya, 2016). A continuación, se describen algunas plataformas de vacunas dirigidas principalmente a patógenos virales.

Vacunas vivas atenuadas. Se preparan a partir del antígeno entero y debilitado, incapaz de producir enfermedad, pero sí de replicarse y simular un proceso de infección natural. Su elaboración implica el uso de técnicas de modificación genética para silenciar genes virulentos y métodos físicos asociados a cambio de temperatura, que

permiten la atenuación del antígeno. Una sola dosis puede generar una respuesta inmune celular robusta sin necesidad de adyuvantes; sin embargo su procesamiento requiere personal calificado, riguroso control de calidad, altos costos y en determinados casos puede causar enfermedad en pacientes inmunodeprimidos (Pollard & Bijker, 2021).

Vacunas enteras inactivadas. Se derivan de una forma muerta del patógeno capaz de inducir respuestas humorales frente a múltiples dianas. La inactivación se realiza por medio de métodos químicos como el uso de formaldehído, ácido ascórbico, peróxido de hidrógeno y otros; que pueden combinarse con métodos físicos que incluyen calor, modificación de pH y radiación. Aunque son termoestables y su producción es de bajo costo; estas vacunas no son capaces de generar respuestas celulares y requieren ser administradas en varias dosis para alcanzar una protección duradera (Kudlay & Svistunov, 2022).

Vacunas de partículas similares a virus. Consisten en un ensamblaje macromolecular que aparenta la morfología del patógeno viral natural. Se producen por transfección en vectores celulares de mamíferos, vegetales, insectos, levaduras o bacterias, que luego son multiplicadas en biorreactores. Son diseñadas con el objetivo de inducir inmunidad celular frente a múltiples dianas, sin embargo, presenta desafíos en cuanto a su diseño, purificación y almacenamiento; debido a que requieren de tecnología especializada y altos costos de producción (Ndwandwe & Wiysonge, 2021).

Vacunas de péptidos sintéticos. Se basan en péptidos del patógeno que han sido catalogados como inmunodominantes. Su procesamiento involucra tecnología recombinante y está sujeto a estrictos procesos de síntesis, purificación y caracterización (Yadav et al., 2020). Además, requieren la adición de adyuvantes para asegurar su reconocimiento por las APC y potenciar la respuesta inmune. Son una de las plataformas más seguras para el huésped e inducen respuestas tanto humorales

como celulares, aunque están limitadas sólo a unos pocos epítomos (Ghattas et al., 2021).

Vacunas basadas en vectores virales. Se derivan de virus diseñados mediante ingeniería genética, para codificar genes de uno o más antígenos diana, sin la capacidad de replicarse (Glick et al., 2014). Son seguras, fáciles de producir, requieren de una sola dosis de administración y resultan altamente inmunogénicas, pues inducen respuestas inmunes humorales y celulares potentes. Sin embargo, el uso de vectores quiméricos y de biomoléculas derivadas de otras especies distintas al humano, puede ocasionar efectos adversos (Kudlay & Svistunov, 2022).

Vacunas de ácidos nucleicos. Utilizan información genética que codifica una proteína del antígeno de interés, en forma de ADN o ARNm. Para administrarse, este tipo de vacunas deben ser encapsuladas en nanopartículas o introducidas directamente en las células mediante herramientas de ingeniería genética. Inducen respuestas inmunitarias mediadas por células B y células T citotóxicas, luego de expresar la proteína diana en la superficie celular. No obstante requieren amplios conocimientos de biología molecular e ingeniería genética (Ndwandwe & Wiysonge, 2021).

Vacunas para COVID-19

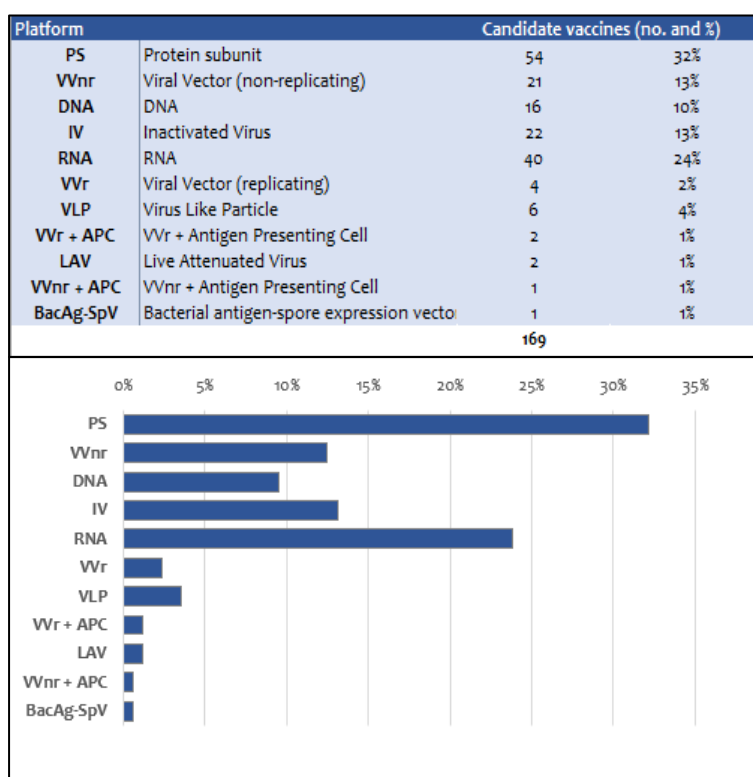
El desarrollo de una vacuna requiere de un amplio entendimiento sobre el funcionamiento del sistema inmunitario, la biología del patógeno y las interacciones huésped-patógeno; por lo que el proceso estándar de desarrollo usualmente es extenso y tedioso (Ghattas et al., 2021). Sin embargo, la emergencia generada por la pandemia de COVID-19 obligó a reducir extremadamente el tiempo de desarrollo y aprobación de vacunas con el fin de contrarrestar las muertes y propagación de la enfermedad (Ndwandwe & Wiysonge, 2021).

Algunas de las vacunas más destacadas, que fueron autorizadas para uso de emergencia frente a COVID-19 incluyen a ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222; Oxford-AstraZeneca) con 70.4% de efectividad, BNT162b2 mRNA COVID-19 (Pfizer-BioNTech) con 95% de

efectividad, mRNA-1273 (Moderna) con 94.1% de efectividad y vacuna C COVID-19 absorbida e inactivada (CoronaVac) con 50.7% de efectividad (Zheng et al., 2022). Sin embargo, el virus causante de COVID-19 sigue mutando y generando nuevas variantes, por lo que los esfuerzos por desarrollar una nueva y mejor vacuna continúan en pie. Según la Organización Mundial de la Salud (2022), existen 198 vacunas en etapas preclínicas y 169 vacunas en etapas clínicas de desarrollo; mismas que incluyen a múltiples plataformas de diseño, de las cuales el mayor porcentaje corresponde a vacunas basadas en subunidades de proteínas y vacunas basadas en ARN, como se muestra en la Figura 13 (Kudlay & Svistunov, 2022; World Health Organization, 2022).

Figura 13

Vacunas para COVID-19 en etapa clínica de desarrollo



Nota. Reporte de vacunas en desarrollo según la OMS. Adaptado de “COVID-19 - Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide” (p. 1), por Organización Mundial de la Salud, 15 de julio de 2022.

Desarrollo de proteínas recombinantes en el laboratorio

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en un huésped distinto al original, su diseño y producción han contribuido en gran medida al campo de la investigación y la medicina. La producción de proteínas recombinantes implica el aislamiento o síntesis de un gen de interés a partir de un organismo vivo, luego la introducción del gen en un plásmido mediante el uso de herramientas moleculares como las enzimas de restricción, seguido de la transformación del huésped utilizando el plásmido diseñado y la expresión del gen en dicho huésped (Alberts et al., 2015).

Los huéspedes utilizados como sistemas de expresión incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras, células de insecto, plantas y animales transgénicos. Cada uno de ellos con sus propias ventajas y desventajas, por lo que no se puede definir un huésped óptimo universal para la expresión de proteínas recombinantes (Glick et al., 2014; Tripathi & Shrivastava, 2019).

Por ejemplo, *E. coli* proporciona bajos costos de producción, un rápido crecimiento y una elevada tasa de expresión; sin embargo, las proteínas resultantes no son glicosiladas y pueden sufrir un mal plegamiento. Mientras que los huéspedes como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* expresan proteínas con modificaciones postraduccionales pero su tasa de crecimiento es menor (Fujita et al., 2020; Tripathi & Shrivastava, 2019).

Proteínas recombinantes del SARS-CoV-2

Los estudios tanto farmacológicos como virológicos enfocados en el SARS-CoV-2 se han visto limitados debido a que la manipulación de este patógeno requiere instalaciones de nivel de bioseguridad 3, el cual únicamente se dispone en determinados lugares alrededor del mundo. Sin embargo, en enero del 2020 se publicó la secuencia genética del SARS-CoV-2 en el banco de genes, permitiendo el acceso público a esta secuencia (Xu et al., 2020).

Ambos hechos han impulsado al desarrollo de proteínas recombinantes, principalmente aquellas proteínas estructurales, que no requieren de instalaciones con un alto nivel de

bioseguridad, dado que son incapaces de provocar enfermedades por sí solas (University of Wisconsin-Madison, 2021). La expresión de la proteína S del SARS-CoV-2 así como RBD de la subunidad S1 de la proteína S, se ha llevado a cabo en los laboratorios mediante la aplicación de sistemas de expresión asociados a células humanas cultivadas, células de insectos como Sf9, vectores de expresión de baculovirus y en determinados casos sistemas pseudovirales como vectores adenovirales o lentivirales; lo que ha facilitado el estudio de la respuesta inmunológica *in vivo* frente a este antígeno y ha impulsado al desarrollo de vacunas (Fujita et al., 2020; Zheng et al., 2022).

Expresión génica *in vivo*

La expresión génica es un proceso complejo que consiste en sintetizar un gen funcional a partir de la información proporcionada por el ADN en las células, de acuerdo a los requerimientos biológicos y fisiológicos de organismos tanto procariotas como eucariotas. La expresión génica se define como la producción de un fenotipo observable de un gen e incluye procesos como la transcripción y la traducción, que constituyen el dogma central de la biología molecular (Buccitelli & Selbach, 2020). Existen genes constitutivos que se expresan de forma constante e independiente del ambiente celular y genes inducibles cuya expresión está ligada al ambiente y a la posición del ciclo celular (Badigeru, 2021).

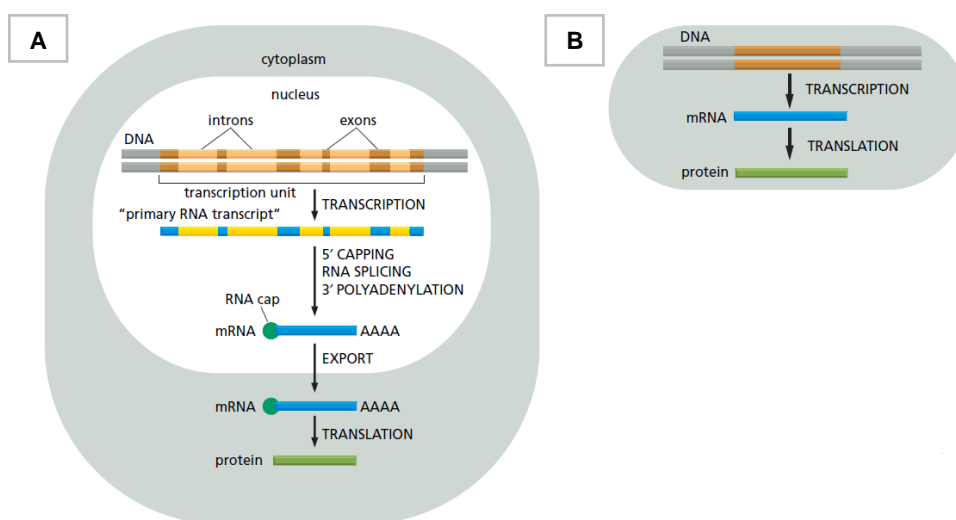
El ADN posee regiones específicas que se encargan de la regulación de la transcripción; como los promotores que son regiones altamente conservadas y se ubican aguas arriba del sitio de la transcripción, los potenciadores que activan la transcripción, las regiones silenciadoras que se encargan de reprimir la transcripción y los aislantes que protegen al gen del entorno que lo rodea (K. P. Singh et al., 2018). Durante la transcripción en el núcleo celular, la cadena de ADN se desenrolla permitiendo la adición de factores de transcripción que son atraídos por las regiones específicas de regulación como la caja TATA, formando un complejo que luego permite la unión de la maquinaria transcripcional comprendida por la enzima ARN

polimerasa e inicia la síntesis de la cadena de ARN a partir de la plantilla molde de ADN (Alberts et al., 2015).

La cadena de ARN resultante compuesta por regiones codificantes y no codificantes, denominadas exones e intrones respectivamente; se transforma en ARN de tipo mensajero (ARNm) por medio de ciertas modificaciones postranscripcionales que incluyen la formación de un recubrimiento en el extremo 5', la poliadenilación del extremo 3' (cola de poli-A) y la eliminación de intrones mediante empalmes alternativos; lo que permite la salida del ARNm hacia el ribosoma en el citoplasma celular, para iniciar el proceso de traducción (Nachtergaele & He, 2017).

Figura 14

Expresión génica *in vivo*



Nota. **A:** Expresión génica en células eucariotas. **B:** Expresión génica en células procariotas.

Adaptado de "*Molecular Biology of the Cell*" (p.315), por Alberts et al., 2015, Garland Science.

La traducción se lleva a cabo por la lectura de codones, que son grupos de tres nucleótidos y sus combinaciones generan aminoácidos diferentes que en conjunto ensamblan una proteína (Buccitelli & Selbach, 2020). En la Figura 14 se puede observar un esquema de la

expresión génica tanto en células eucariotas como células procariotas. Al carecer de núcleo celular las células procariotas sintetizan ARNm de forma más simplificada y no requieren modificaciones postranscripcionales (Badigeru, 2021).

Ensayos de inmunidad en modelos murinos

El ratón es el modelo experimental mamífero más dominante en el campo de la biomedicina; desde inicios del siglo XX hasta la actualidad ha sido incluido como sujeto experimental en múltiples ensayos *in vivo*. Posee importantes características que han permitido llevar a cabo estudios científicos que tardarían décadas, en tan solo 2 años; mismas que incluyen una homología genética mayor al 90% con el ser humano, gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, fácil manipulación y transporte debido a su tamaño pequeño, reproducción prolífica y tiempo de vida corto (Masopust et al., 2017).

Aunque el porcentaje de homología es alto, existen ciertas diferencias fisiológicas y genéticas que impiden la manifestación de enfermedades humanas en el ratón (Graham, 2021). Lo que ha impulsado a la creación de nuevas y variadas cepas mediante el aprovechamiento de tecnologías de ingeniería genética y de la alta tasa de mutación espontánea propia del ratón. Dichas cepas han facilitado la ejecución de ensayos experimentales relacionados con cáncer, expresión génica, trasplante de tejidos, enfermedades infecciosas, entre otros (Tao & Reese, 2017).

En 1913 el investigador Halsey J. Bagg logró crear una cepa de ratones albinos que mantuvo en criaderos y entrecruzó durante 26 generaciones por 15 años, dando lugar a una cepa actualmente conocida como BALB/c (Nakamura, 2013). Los ratones de la cepa BALB/c se caracterizan por ser consanguíneos, sensibles a la luz, al estrés y la ansiedad, poseen un buen rendimiento reproductivo, su genética se mantiene sin contaminación y son excelentes modelos para estudios de inmunogenicidad (Gu et al., 2020). En el campo de la inmunología, el modelo murino ha permitido explorar y comprender fenómenos como la interacción antígeno-anticuerpo, la diferenciación linfocítica, la respuesta inmune frente a un determinado antígeno, el

rol de CMH polimórfico como regulador del sistema inmunitario de los mamíferos e incluso el desarrollo de vacunas (Masopust et al., 2017).

La inclusión de modelos animales en la investigación está ligada a estrictas responsabilidades y normativas de bioética. Los experimentos deben llevarse a cabo siempre y cuando se mantenga claro y definido el objetivo de la investigación, procurando el menor sufrimiento posible del animal y proporcionándole una buena nutrición, buen ambiente, buena salud, experiencias mentales positivas y un comportamiento adecuado del investigador durante el desarrollo del experimento (Fenton, 2019; Morales & Aguilar, 2018).

El principio que rige la ética de la investigación con animales de laboratorio en la actualidad fue propuesto por Russell y Burch como el principio de las 3R, por las iniciales de Reemplazo, Reducción y Refinamiento (Gonçalves et al., 2016). El Reemplazo se refiere a la sustitución de animales superiores vivos por animales menores como los insectos y también por ensayos *in vitro* e *in silico*. La Reducción pretende disminuir el número de animales utilizados en el ensayo mediante estrategias de optimización de la metodología y la recuperación de datos. Mientras que el Refinamiento consiste en la disminución de la incidencia o severidad de los procedimientos aplicados a los animales durante el experimento (Gorzalczany & Rodriguez, 2021).

Técnicas moleculares

La biología molecular es una ciencia que estudia las características, estructura y función de las biomoléculas presentes en las células de los organismos vivos. Su constante evolución ha permitido el desarrollo de técnicas experimentales y el avance de la ciencia a nivel molecular (Vitale, 2017). Las técnicas moleculares son rápidas, sensibles, altamente específicas y permiten el estudio de muestras biológicas basándose en los ácidos nucleicos como el ADN y el ARN; una de las técnicas más dominantes es la reacción en cadena de la polimerasa y sus variantes, mismas que han permitido estudiar la expresión génica por medio de la cuantificación de un producto génico transcrito de forma *in vitro* (K. P. Singh et al., 2018).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR convencional o también denominada punto final, es una técnica *in vitro* ampliamente utilizada en investigación y diagnóstico, así como en ciencias forenses, medicina, biología y biotecnología (J. Singh et al., 2014). Fue desarrollada por Kary Banks Mullis en el año 1983 y consiste en alcanzar múltiples copias de un fragmento de ADN específico a partir de una pequeña cantidad de muestra de ADN genómico o de ADN complementario obtenido de un extracto de ARN mensajero mediante RT-PCR, debido a la acción de la enzima ADN polimerasa (Mullis, 2022).

La reacción de amplificación se compone de tres fases caracterizadas por una temperatura y número de ciclos específicos; la primera fase es la desnaturalización de las cadenas de ADN molde y activación de la polimerasa, la siguiente fase consiste en la hibridación de los cebadores y la última fase es la elongación donde se sintetiza el amplicón de interés mediante la adición de desoxirribonucleósidos trifosfato presentes en la mezcla de reacción (Nolan, 2014). La detección del producto amplificado tras una reacción de PCR demanda la aplicación de técnicas como la electroforesis horizontal, métodos colorimétricos y secuenciación de ácidos nucleicos en combinación con herramientas bioinformáticas (Tamay de Dios et al., 2013).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)

La RT-PCR está diseñada para amplificar un gen de interés a partir de una cadena de ARN molde, por acción de una enzima transcriptasa inversa generando copias monocatenarias de ADNc que luego pueden ser convertidas en cadenas bicatenarias mediante una PCR convencional (Mustafa et al., 2020). Esta técnica es ampliamente utilizada para el diagnóstico e investigación de virus de ARN, para ensayos de clonación molecular y de forma más común como primer paso para la RT-qPCR. La RT-qPCR consiste en un acoplamiento que da lugar a la PCR cuantitativa en tiempo real de transcripción inversa, empleada principalmente en estudios de expresión génica a través de la cuantificación del ARNm (Adams, 2020).

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La qPCR es una técnica más dinámica que la PCR convencional, fue desarrollada por Higuchi y sus colaboradores en el año 1992. Esta técnica se fundamenta en la detección y cuantificación de una secuencia específica de ADN mediante el uso de reporteros fluorescentes y polimerasas de alta fidelidad, de inicio en caliente y rápidas (Alberts et al., 2015). Un reportero fluorescente puede ser un tinte de unión al ADN de doble cadena como el colorante SYBR Green I o puede ser un tinte conjugado con oligonucleótidos como las sondas TaqMan (Adams, 2020; Fraga et al., 2014). No requiere el uso de técnicas para la detección del producto, debido a que la qPCR es altamente sensible, rápida y precisa. Además de que involucra el uso de sistema con insumos herméticos y ópticos, que impiden la contaminación cruzada y permiten la excitación de los fluoróforos (J. Singh et al., 2014).

Durante la amplificación, el aumento de la señal fluorescente es directamente proporcional a la cantidad de copias del producto de PCR, el mismo que incrementa de forma exponencial. El punto en el cual la fluorescencia se torna medible, es denominado ciclo de umbral o punto de cruce (Ct o Cq) que permite determinar la cuantificación de la expresión génica, misma que puede ser absoluta o relativa (Tamay de Dios et al., 2013). La cuantificación absoluta se basa en la construcción de un modelo lineal a partir de una muestra estándar diluida en serie, que permite calcular la expresión de las muestras de interés. Mientras que la cuantificación relativa consiste en el uso de genes control endógenos del huésped o también conocidos como housekeeping, para compararlos con los genes en estudio (Fraga et al., 2014). El housekeeping se selecciona de acuerdo al modelo animal u organismo del cual derive la muestra analizada; algunos ejemplos son GAPDH, β -actina, HPRT y TBP que son empleados en estudios con modelos murinos (Bio-Rad Laboratories, 2019; Svingen et al., 2015).

CAPÍTULO III: Materiales y métodos

Localización geográfica

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Campus Matriz, Avenida General Rumiñahui S/N y Ambato, Sangolquí, Pichincha, Ecuador. Coordenadas 0°18'53"S 78°26'36"O.

Técnicas y procedimientos de laboratorio

Diseño de primers

Las secuencias de los genes de interés se buscaron en la plataforma web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), se descargó en formato FASTA y se realizó un alineamiento múltiple en el software MEGA X (<https://www.megasoftware.net>) utilizando el algoritmo MUSCLE para determinar una secuencia consenso. Los primers requeridos se diseñaron a partir de la secuencia consenso en la herramienta bioinformática Primer3 (<https://primer3.org/>), considerando el tamaño de entre 18 a 22 pb, temperatura de Melting de entre 50 a 70°C y un %GC de 40 a 60%.

Las propiedades físico-químicas y estructuras secundarias derivadas de los pares de primers (forward y reverse) diseñados, se analizaron en la herramienta OligoAnalyzer de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y se llevó a cabo un alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente se verificó la funcionalidad de los pares de primers diseñados mediante una PCR *in silico*, en el software Serial Cloner (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html). Las características de los Primers se describen en la Tabla 4.

Tabla 4*Características de Primers para PCR punto final y qPCR*

Primers	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	T_m (°C)	T_{Hibridación} (°C)	Amplificación (pb)
β-Actina de ratón	Forward TGCTCTAGACTTCGAGCAGGAGATG	25	63.7	62.0	121
	Reverse AGCCTCAGGGCATCGGAA	18	60.9		
TCR	Forward GGTGGCAGTAACAGGAGGAA	20	62.4	62.0	175
	Reverse TGGTCTGGAGGCCTTGATC	20	62.4		
CD4	Forward AGGAAGTGAACCTGGTGGTG	20	62.4	62.4	222
	Reverse TCCTGGAGTCCATCTTGACC	20	62.4		
CMH-II	Forward TGAAAGAGCGTTCCAACAACACTCC	25	65.8	68.0	244
	Reverse AGGAAGGTCAGATAGTGGAATTTGCGG	27	68.3		
CD8	Forward ATGTGAAGCCAGAGGACAGTGA	22	62.7	60.0	236
	Reverse CAGGATGCAGACTACCAGCA	20	62.4		
CMH-I	Forward CTCCTGAAAGTTGCCCTCTG	20	62.0	60.0	235
	Reverse CTCAGGGCCTCATAATGCT	20	62.0		

Nota. En el laboratorio se disponía de algunos pares de primers, previamente diseñados durante la ejecución de proyectos de investigación antecesores.

Extracción de ARN

El ARN se extrajo de muestras de bazo de ratón de la cepa BALB/c previamente inoculados con la proteína S y RBD recombinantes (PrS1 y PrRBD1) del SARS-CoV-2, como se describe en la Tabla 5, y conservadas a una temperatura de -80°C. Dichas muestras se encontraban organizadas en dos grupos correspondientes al ensayo a corto plazo (duración 15 días) y al ensayo a largo plazo (duración 42 días).

Tabla 5

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 (Ctrl -)	n=4	n=2

Nota. PrS1: Proteína Spike recombinante. PrRBD1: Proteína RBD recombinante. Adv:

Adyuvante. PBS: Tampón fosfato salino. Ctrl-: Control negativo.

Cada muestra de bazo de ratón en 700 µL del reactivo de trizol Tri Reagent (Molecular Research Center, TR 118), se trituró mediante el uso de una sonda metálica con un homogeneizador automático de tejido (OMNI TH), estéril y previamente lavado con agua pura, hidróxido de sodio 0.4 M y etanol al 75%. Una vez triturado el tejido, se centrifugó a 12000 RPM durante 10 minutos a 4°C.

Para la separación de fases, se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril de 1.5 mL libre de RNasa, se colocó 200 µL de cloroformo libre de RNasa por cada mL de Tri Reagent, se agitó manualmente por inversión y se dejó reposar durante 2 minutos en una gradilla con hielo, luego se centrifugó a 12000 RPM durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se recuperó la fase acuosa donde se encontraba el ARN, en un nuevo tubo de 1.5 mL libre de RNasa.

Para precipitar el ARN, se adicionó 500 μL de isopropanol libre de RNasa por cada mL de Tri Reagent, se agitó por inversión y se dejó reposar durante 15 minutos en una gradilla con hielo y se centrifugó a 12000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Después se examinó la formación del pellet de ARN, se descartó el sobrenadante, se lavó con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de Tri Reagent, se agitó por inversión y se centrifugó a 7500 RCF durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet en la sorbona extractora de gases (BIOBASE, FH1200-A) durante 20 minutos y se resuspendió el ARN en 100 μL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Determinación de la concentración y calidad del ARN

Se cuantificó la concentración de ARN (ng/ μL) utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000) y se verificó los radios 260/280 y 260/230 para estimar la pureza del ARN extraído.

La calidad del ARN se determinó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% con colorante SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, S33102). Se cargó 3500 ng de ARN junto con 2 μL de agua DEPC y 1.5 μL de buffer de carga Blue/Orange 6X (Promega, G190A), en cada pocillo del gel. A continuación, se realizó una corrida electroforética de 60 minutos a 100 V y 300 mA, y se visualizó las bandas de ARN en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories, ChemiDoc).

Purificación de ARN

El ARN extraído se purificó mediante la aplicación del kit DNasa I libre de RNasa (Life Technologies, AM2222), de acuerdo con el protocolo propuesto por el fabricante. Para lo cual se preparó una reacción compuesta por una alícuota de 1500 ng de ARN, 4.5 μL de agua DEPC y 1 μL de mezcla de DNasa I (2 U/ μL) y 10X DNasa I Buffer. Se incubó durante 25 minutos a 37°C en el termociclador Proflex (Thermo Fisher Scientific, 4483636). Luego se adicionó 1 μL de EDTA 5mM y se incubó por 10 minutos a 75°C, para inactivar la reacción

enzimática. Posteriormente se cuantificó la concentración de ARN purificado en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000).

Síntesis de ADNc

Para sintetizar ADNc se aplicó una RT PCR, en la cual se empleó el kit de retrotranscripción M-MLV Reverse Transcriptase (Termo Fisher Scientific, 28025-013), según el protocolo establecido por el fabricante. Para lo cual, se preparó en un microtubo de 0.2 mL una reacción con los componentes de la Master Mix 1 descritos en la Tabla 6 y se incubó durante 10 minutos a 65°C. A continuación, se añadió los reactivos de la Master Mix 2 descritos en la Tabla 6 a la mezcla, se homogenizó, se realizó una centrifugación spin y se incubó durante 2 minutos a 37°C. Luego, se añadió los reactivos de la Master Mix 3 descritos en la Tabla 6 a la mezcla, se homogenizó, se realizó una centrifugación spin, se incubó durante 50 minutos a 37°C y después durante 15 minutos a 70°C.

Tabla 6

Reacciones para la síntesis de ADNc

Reacción	Reactivos	Volumen (µL)
Master Mix 1	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/mL)	1
	dNTP Mix 10 mM	1
	ARNm tratado con DNasa I (1 ng a 500 ng)	2
	Agua DEPC	8
Master Mix 2	Master Mix 1	12
	5X First-Strand Buffer	4
	DTT 0.1 M	2
Master Mix 3	Master Mix 2	18
	M-MLV RT (200 U/µL)	0.8
	Agua DEPC	1.2
Volumen final por reacción		20

Finalmente, se cuantificó la concentración de ADNc sintetizado en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000) y se lo almacenó a -20°C para su posterior uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final

Se realizó una PCR punto final utilizando los primers detallados en la Tabla 4 y el kit comercial DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EP0702). Se calculó y preparó la Master Mix para cada par de primer a analizar, con un volumen final de 25 µL en un microtubo de 0.2 mL, se realizó una centrifugación spin y se procedió a ejecutar el programa de PCR punto final en el termociclador Proflex (Thermo Fisher Scientific, 4483636).

El programa de amplificación se compuso por un ciclo de desnaturalización inicial de la polimerasa a 95°C durante tres minutos, 35 ciclos de desnaturalización de ADNc a 95°C durante 30 segundos, 35 ciclos de hibridación durante 30 segundos a la temperatura de hibridación ($T_{\text{Hibridación}}$) respectiva de cada primer indicada en la Tabla 4, 35 ciclos de extensión a 72°C durante 30 segundos, un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos y un ciclo de enfriamiento a 4°C durante un tiempo indefinido.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR punto final se examinaron mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% con colorante SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, S33102). Se cargó 10 µL (80 ng) de producto de la PCR en cada pocillo y 3 µL de marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder junto con 2 µL de BlueJuice 10X (Thermo Fisher Scientific, 10068013). Se ejecutó una electroforesis durante 1 hora a 110V y 300 mA; luego se observó el gel en el transiluminador (Bio-Rad Laboratories, ChemiDoc) y se analizó las imágenes mediante densitometría, aplicando la herramienta informática Image Lab (Bio-Rad).

Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para lo cual se empleó el reactivo Go Taq qPCR Master Mix (Promega, A6001). Se preparó el Master Mix de acuerdo a la Tabla 7, se dispensó 13 μ L por reacción seguido de 2 μ L de ADNc muestra, en una placa de 96 pocillos conforme a un plan de placa previamente diseñado, considerando réplicas de cada muestra. Se selló la placa con un film adhesivo óptico, se centrifugó la placa a 1000 RPM por 1 minuto y se colocó en el termociclador CFX Real-Time PCR (Bio-Rad).

El programa de amplificación empleado fue un ciclo de desnaturalización inicial de la polimerasa a 95°C durante dos minutos, 35 ciclos de desnaturalización de ADNc a 95°C durante 15 segundos, 35 ciclos de hibridación durante 15 segundos a la temperatura de hibridación ($T_{\text{Hibridación}}$) respectiva de cada primer indicada en la Tabla 4, 35 ciclos de extensión a 60°C durante 45 segundos, un ciclo de curva de Melting en un rango de 58 a 95°C con un aumento de 0.5 °C y un ciclo de enfriamiento a 4°C durante un tiempo indefinido. Al finalizar la reacción de qPCR, se analizó los datos en la herramienta informática CFX Maestro (Bio-Rad), para determinar tanto la cuantificación absoluta como la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés.

Tabla 7

Reactivos para qPCR – Reacción 1X

Volumen de reactivos	Volumen de reactivo (μL)
Go Taq qPCR Master Mix, 2X	7.5
Primer forward	0.5
Primer reverse	0.5
Agua libre de nucleasas	4.5
Plantilla de ADNc	2
Volumen total	15

Cuantificación absoluta. Por cada ensayo de qPCR se realizó una serie de diluciones (1, 1/10, 5/100, 25/1000, 12.5/1000, 6.25/1000 y 3.13/1000) de lipopolisacárido (LPS), para construir una curva estándar que permitió calcular el número de copias del gen de interés, presentes en la muestra analizada. Para ello se manipuló el umbral del gráfico RFU vs Ciclos como el mostrado en la Figura 15A, hasta lograr obtener una curva estándar Cq vs Log (Sq) como en la Figura 15B, con un porcentaje de eficiencia entre 90 a 110%, pendiente entre -3.1 a -3.6 y un R^2 aproximado a 1. El ajuste de la curva estándar se lleva a cabo mediante un modelo lineal dado por la Ecuación 1 y la eficiencia se calcula mediante la Ecuación 2 (Bio-Rad Laboratories, 2019). Starting Quantity (Sq) corresponde a la concentración inicial de ácido nucleico expresado de cada gen y se determina con la Ecuación 3.

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 1}$$

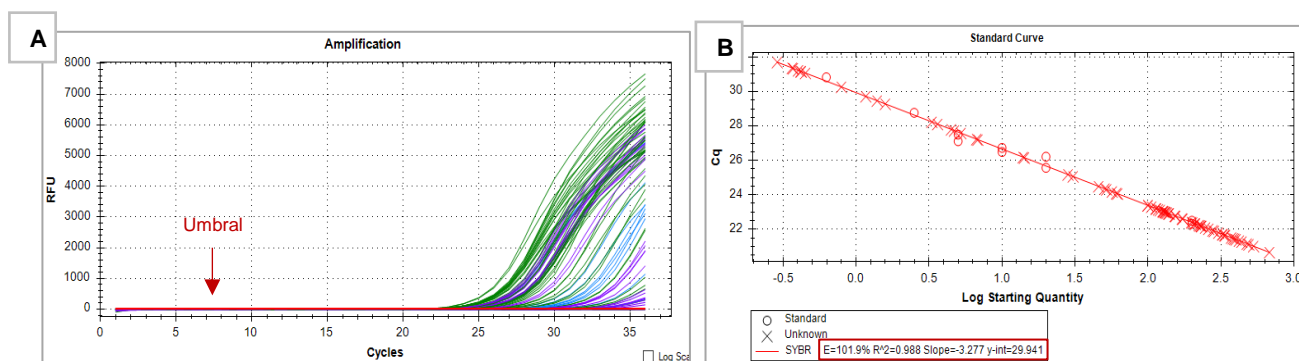
$$\% E = (10^{-\frac{1}{m}} - 1) * 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

$$Sq = 10^x \quad \text{Ecuación 3}$$

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

Figura 15

Ajuste de la curva estándar para la cuantificación absoluta mediante qPCR



Nota. **A:** Gráfico RFU vs Ciclos donde se indica el umbral. **B:** Gráfico Cq vs Log (Sq) donde se indica los parámetros óptimos para la cuantificación absoluta de un ensayo de qPCR.

Cuantificación relativa. Se empleó el método 2 delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), considerando como muestra calibrador al grupo control tratado con PBS, el gen normalizador al gen endógeno β -Actina de ratón y los genes de interés a TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I. Se obtuvo valores promedio del Ct entre las réplicas de todas las muestras, luego se calculó el ΔCt del tratamiento probado con la Ecuación 4 y del calibrador con la Ecuación 5:

$$\Delta Ct_{\text{tratamiento}} = Ct_{(G_{\text{int}}, \text{tratamiento})} - Ct_{(G_{\text{norm}}, \text{tratamiento})} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{(G_{\text{int}}, \text{calibrador})} - Ct_{(G_{\text{norm}}, \text{tratamiento})} \quad \text{Ecuación 5}$$

A continuación, se obtuvo un promedio del ΔCt del calibrador y se lo normalizó con el ΔCt de cada tratamiento probado, aplicando la Ecuación 6:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{calibrador promedio}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Finalmente, se determinó el ratio de expresión relativa respectivo para cada caso aplicando la Ecuación 7:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Relación de expresión relativa normalizada} \quad \text{Ecuación 7}$$

Análisis estadístico de datos

Se generó bases de datos de las variables cuantificadas en el software Microsoft Excel y se las analizó en la herramienta informática GraphPad Prism. Se calculó la media \pm el error estándar (SEM) de cada grupo de datos obtenidos en cada ensayo. Finalmente, la diferencia estadísticamente significativa fue analizada mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Tukey, para comparación múltiple entre tratamientos, considerando: **ns** $p \leq 0.1$, * $p \leq 0.033$, ** $p \leq 0.002$ y *** $p \leq 0.001$.

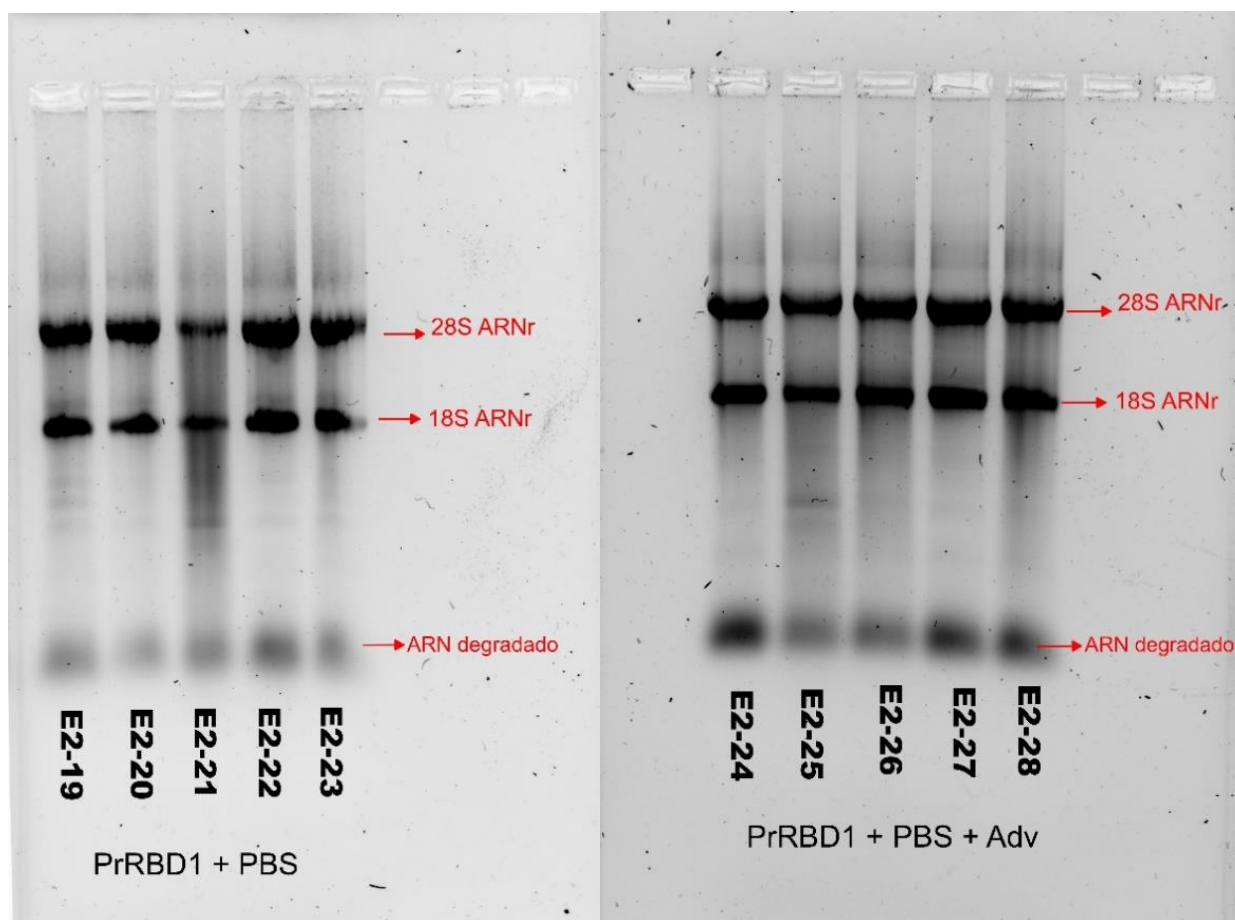
CAPÍTULO IV: Resultados

El ARN obtenido a partir de las muestras del bazo de ratones BALB/c estimulados *in vivo* con el inmunógeno, fue purificado y luego transformado en ADNc mediante RT-PCR. El ADNc sintetizado se empleó para la amplificación de los fragmentos génicos de interés, a través de una PCR punto final. Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis horizontal y las imágenes de los geles se analizaron por densitometría. Simultáneamente, se cuantificó la expresión génica de los fragmentos de interés, a partir del ADNc molde mediante una qPCR y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. Los resultados de cada ensayo, se detallan a continuación.

Extracción y purificación de ARN

La calidad del ARN extraído a partir de las muestras de tejido pertenecientes a los ensayos a corto y largo plazo, fue relativamente buena y se evidenció como tres bandas bien definidas e íntegras en cada gel de agarosa al 1.5%. Al tratarse de muestras derivadas de un organismo eucariota se determinó que la banda superior corresponde a la subunidad mayor (28S) del ARNr, la banda intermedia corresponde a la subunidad menor (18S) del ARNr y la banda inferior corresponde a trazas de ARN degradado; como se muestra en la Figura 16.

La cuantificación del ARN en solución, fue determinada mediante espectrofotometría en el equipo Nanodrop, el cual arrojó los valores de concentración en nanogramos por microlitro (ng/ μ L) y determinó las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, mismas que permitieron estimar la pureza del ARN extraído. La concentración inicial de las soluciones de ARN pertenecientes a los ensayos a corto y largo plazo, disminuyó durante la etapa de purificación después de emplear el kit DNasa I libre de RNasa. Dicha reducción en la concentración ocurre debido a que la enzima DNasa I, además de actuar como una endonucleasa que digiere las cadenas de ADN monocatenario y bicatenario, también puede contener trazas contaminantes de RNasas derivadas de su bioprocesamiento, que degradan ligeramente el ARN presente en la muestra.

Figura 16*Integridad del ARN*

Nota. La figura muestra un gel de agarosa al 1.5% con colorante SYBR Safe, donde se observa la subunidad mayor (28S) y subunidad menor (18S) del ARN ribosomal extraído de las muestras correspondientes al tratamiento PrRBD1 + PBS y PrRBD1 + PBS + Adv del Ensayo a largo plazo.

Los parámetros de pureza dados por la relación de absorbancia 260/280 y 260/230; tuvieron valores promedio de 2.04 y 1.40 respectivamente. El valor de la relación 260/280 resultante indica que el ARN extraído es puro, mientras que el valor de la relación 260/230 indica que ha existido una leve alteración de la calidad del ARN debida a la contaminación con

agentes orgánicos durante el proceso de extracción; como por ejemplo algún componente del reactivo de Tri Reagent.

Síntesis de ADNc

La RT-PCR se llevó a cabo para convertir una muestra de 500 ng de ARNm molde en una cadena monocatenaria de ADNc, para luego emplearla en los ensayos de PCR punto final y expresión génica mediante qPCR. Al finalizar el protocolo de transcripción reversa, se logró obtener concentraciones promedio de ADNc que variaron en un rango de entre 701.66 ± 7.50 y 1024.08 ± 99.53 ng/ μ L, tanto en el ensayo a corto plazo como en el ensayo a largo plazo. El ratio de pureza 260/280 tuvo un valor promedio de 1.74 y el ratio 260/230 tuvo un valor promedio de 1.70.

PCR punto final y análisis densitométrico

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR punto final a partir del ADNc monocatenario se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y en todos los casos se evidenció la presencia de los amplicones esperados. A su vez, el análisis densitométrico permitió realizar una medición aproximada de la expresión génica, mediante una cuantificación absoluta de cada gen dada en nanogramos (ng).

β -Actina de ratón fue el gen endógeno empleado como control, su amplicón de tamaño ~121 pb se observó como una banda intensa en todas las muestras correspondientes a los ensayos a corto (Figura 17A) y largo plazo (Figura 18A), exceptuando las muestras E1-11 y E1-28 donde no se identificó claramente la banda posiblemente debido a un incorrecto procesamiento. El análisis densitométrico confirmó que no hubo variaciones significativas entre los tratamientos de los dos ensayos, en cuanto a la expresión del gen β -Actina (Figura 19A); lo cual es un hallazgo coherente debido a que este gen es el control endógeno y constitutivo del modelo animal empleado en el ensayo.

Los amplicones correspondientes a TCR de tamaño ~175 pb, CD4 de tamaño ~222 pb, CMH-II de tamaño ~244 pb, CD8 de tamaño ~236 pb y CMH-I de tamaño ~235 pb; fueron detectados en las muestras pertenecientes a los dos ensayos, como se puede observar en la Figura 17 (B, C, D, E y F) y Figura 18 (B, C, D, E y F), respectivamente. Sin embargo, la mayor intensidad de banda y la mayor cantidad de muestras que expresaron los genes de interés, fue claramente evidenciado en los geles correspondientes al ensayo a largo plazo y luego confirmado mediante el análisis densitométrico de cada gen.

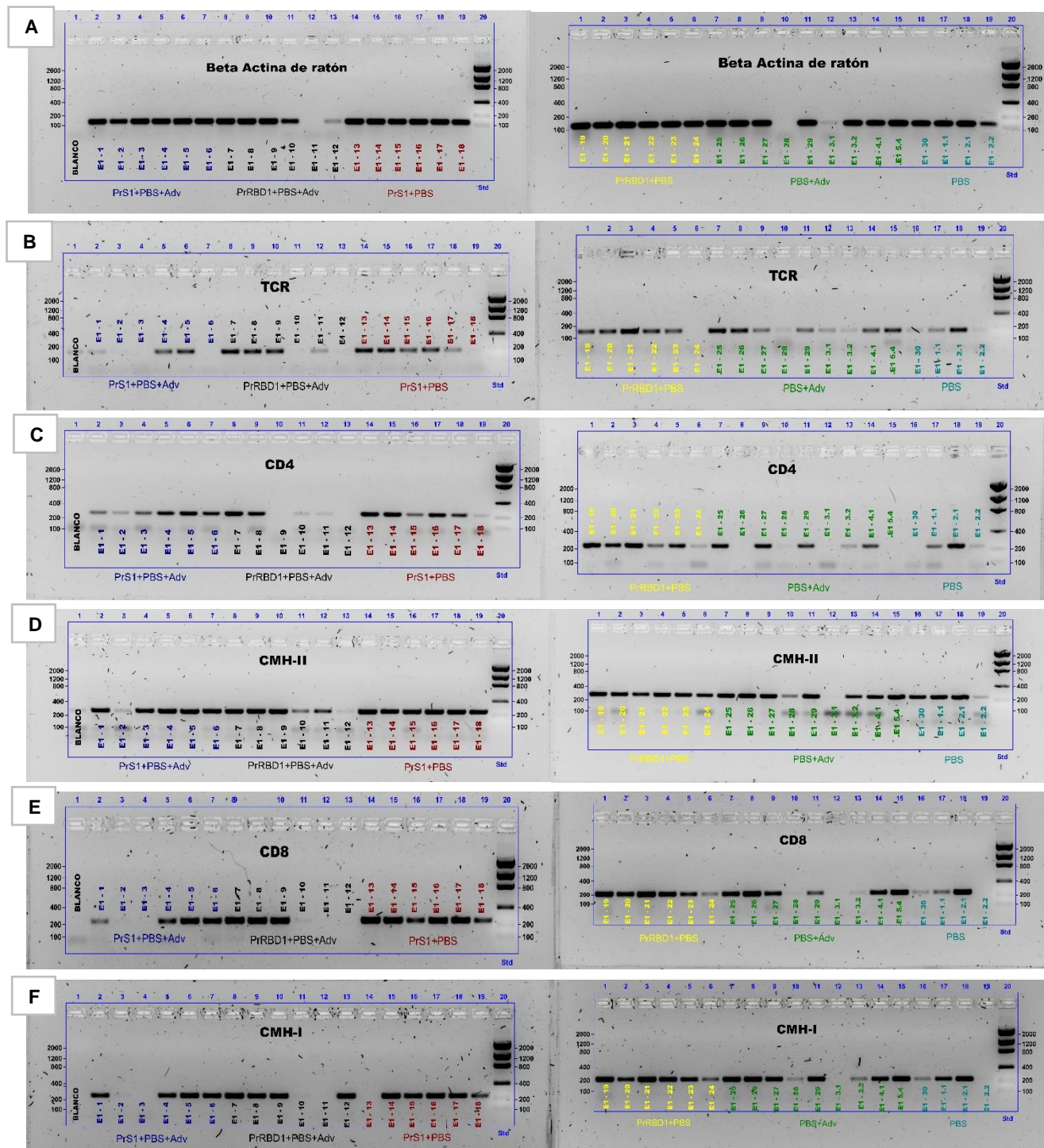
En la Figura 19B, se puede observar que la cuantificación absoluta de TCR presente en muestras del Ensayo a largo plazo es mayor que las del ensayo a corto plazo; además de que existió diferencias significativas entre los tratamientos PrS1+PBS+Adv, PrRBD1+PBS+Adv (donde se detectó el valor más alto) y PrS1+PBS del Ensayo a largo plazo.

En la Figura 19C se puede observar que la cuantificación absoluta de CD4 fue mayor en el ensayo a largo plazo, lo que indica la notable estimulación de la población de linfocitos T CD4⁺ luego de la segunda dosis del inmunógeno. Además, el tratamiento con PrS1+PBS+Adv mostró una diferencia significativa respecto a los demás tratamientos. A su vez, en la Figura 19D se puede notar que la cuantificación absoluta de CMH-II también fue mayor en el Ensayo a largo plazo, aunque no se detectó variaciones significativas entre tratamientos.

La cuantificación absoluta de CD8 mostrada en la Figura 19E fue ligeramente mayor en el Ensayo a largo plazo y destaca el tratamiento con PrS1+PBS+Adv. Este hallazgo evidencia que dicho tratamiento fue más estimulante para la producción de linfocitos T CD8⁺, respecto a los demás. En cuanto al gen CMH-I, su cuantificación absoluta no presentó variaciones significativas entre ambos ensayos, ni tampoco entre tratamientos; excepto por un ligero incremento en el tratamiento con PrS1+PBS+Adv del ensayo a largo plazo que fue el valor más alto detectado visualmente.

Figura 17

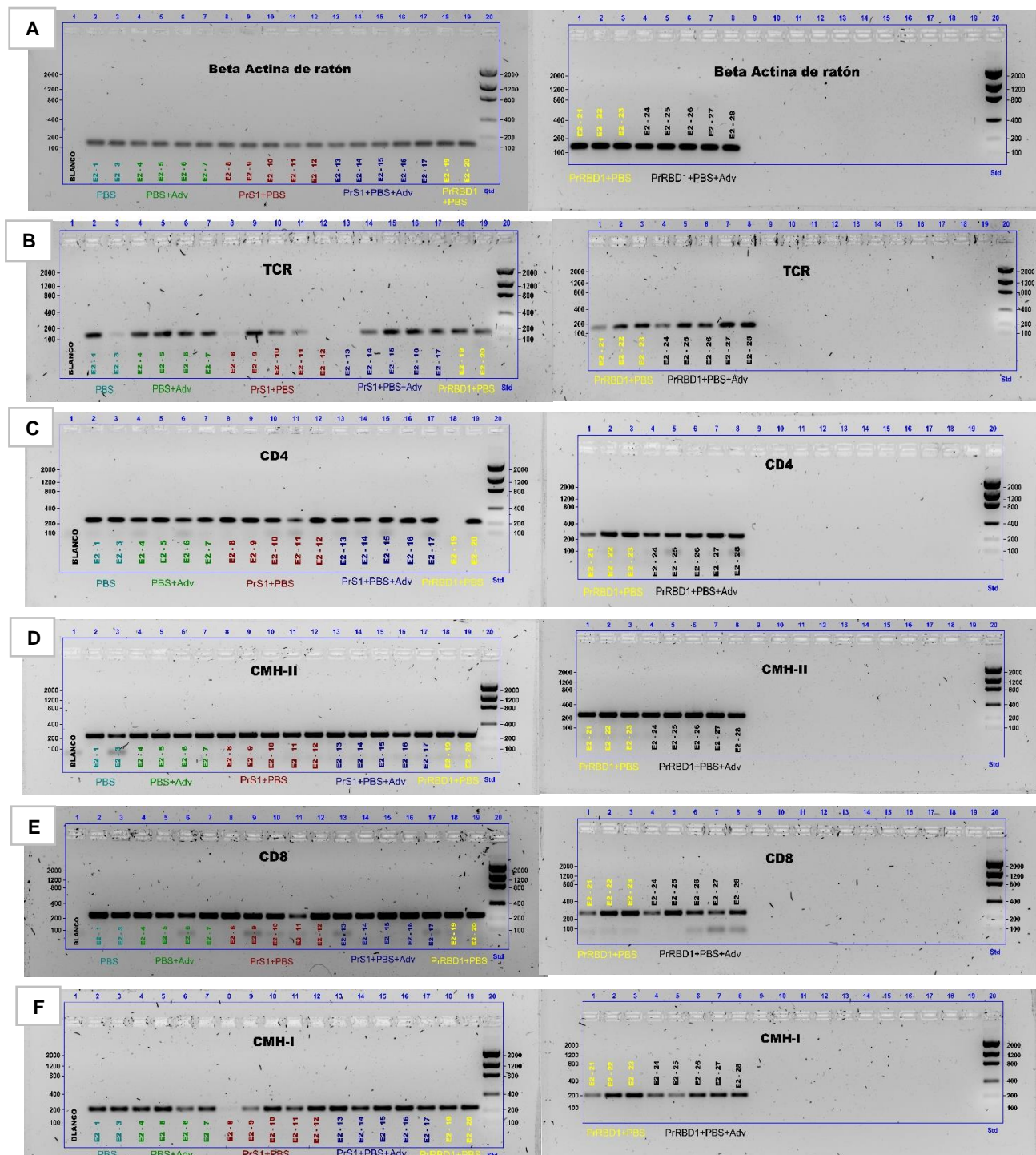
Gel de agarosa al 1.5% con amplicones correspondientes a muestras del Ensayo a corto plazo



Nota. **A:** Amplicón de β -Actina de ratón. **B:** Amplicón del receptor de linfocitos T (TCR). **C:** Amplicón de CD4. **D:** Amplicón de CMH-II. **E:** Amplicón de CD8. **F:** Amplicón de CMH-I.

Figura 18

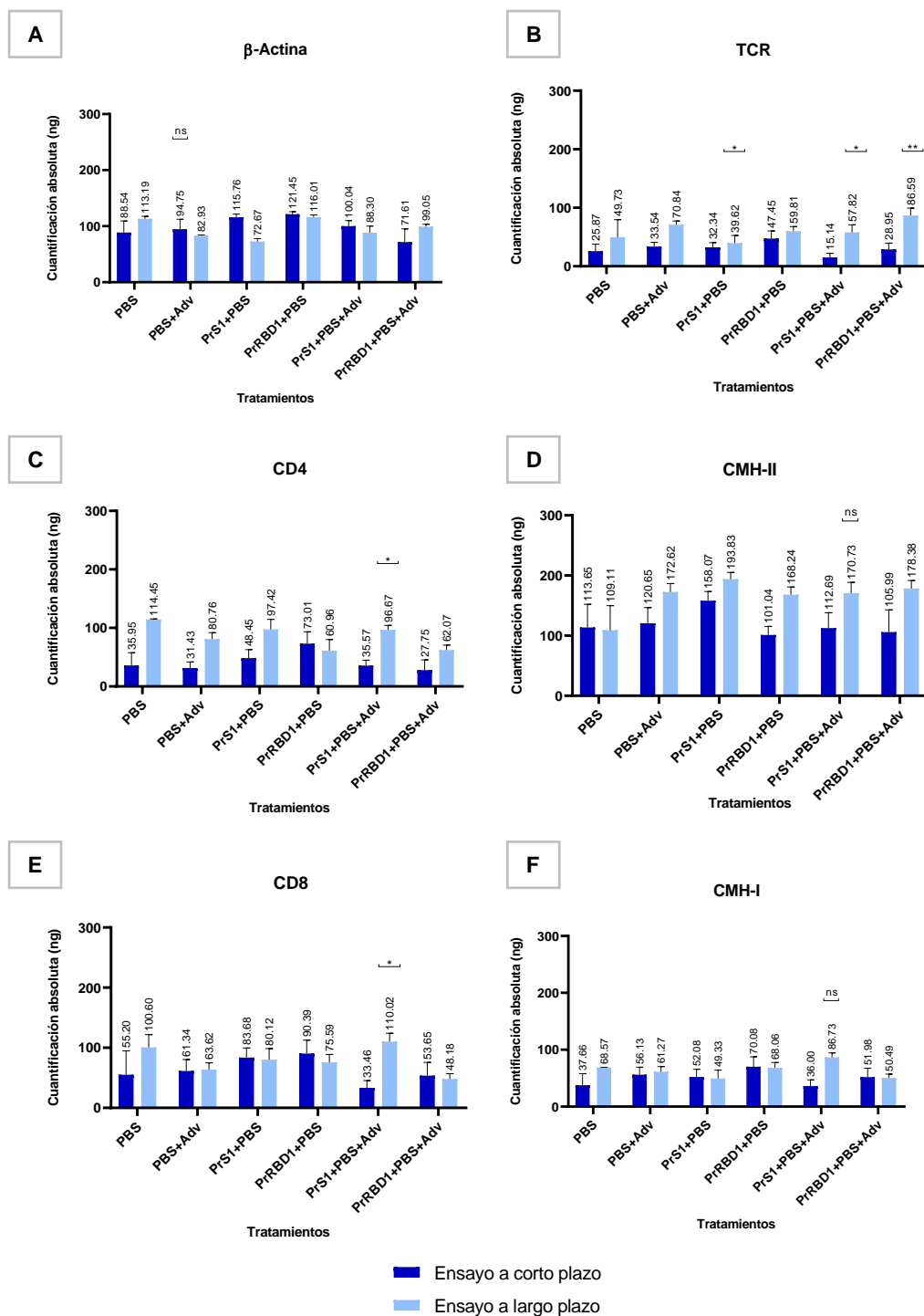
Gel de agarosa al 1.5% con amplicones correspondientes a muestras del Ensayo a largo plazo



Nota. **A:** Amplicón de β -Actina de ratón. **B:** Amplicón del receptor de linfocitos T (TCR). **C:** Amplicón de CD4. **D:** Amplicón de CMH-II. **E:** Amplicón de CD8. **F:** Amplicón de CMH-I.

Figura 19

Análisis densitométrico



Nota. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. La diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos se muestra por: ns $p \leq 0.1$, * $p \leq 0.033$, ** $p \leq 0.002$ y *** $p \leq 0.001$.

Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

La expresión génica de TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I, se evaluó mediante qPCR considerando la cuantificación absoluta y cuantificación relativa. Los resultados obtenidos permitieron estimar la densidad de linfocitos T presentes durante la respuesta inmune adaptativa celular, frente a los tratamientos aplicados con antígenos del virus SARS-CoV-2.

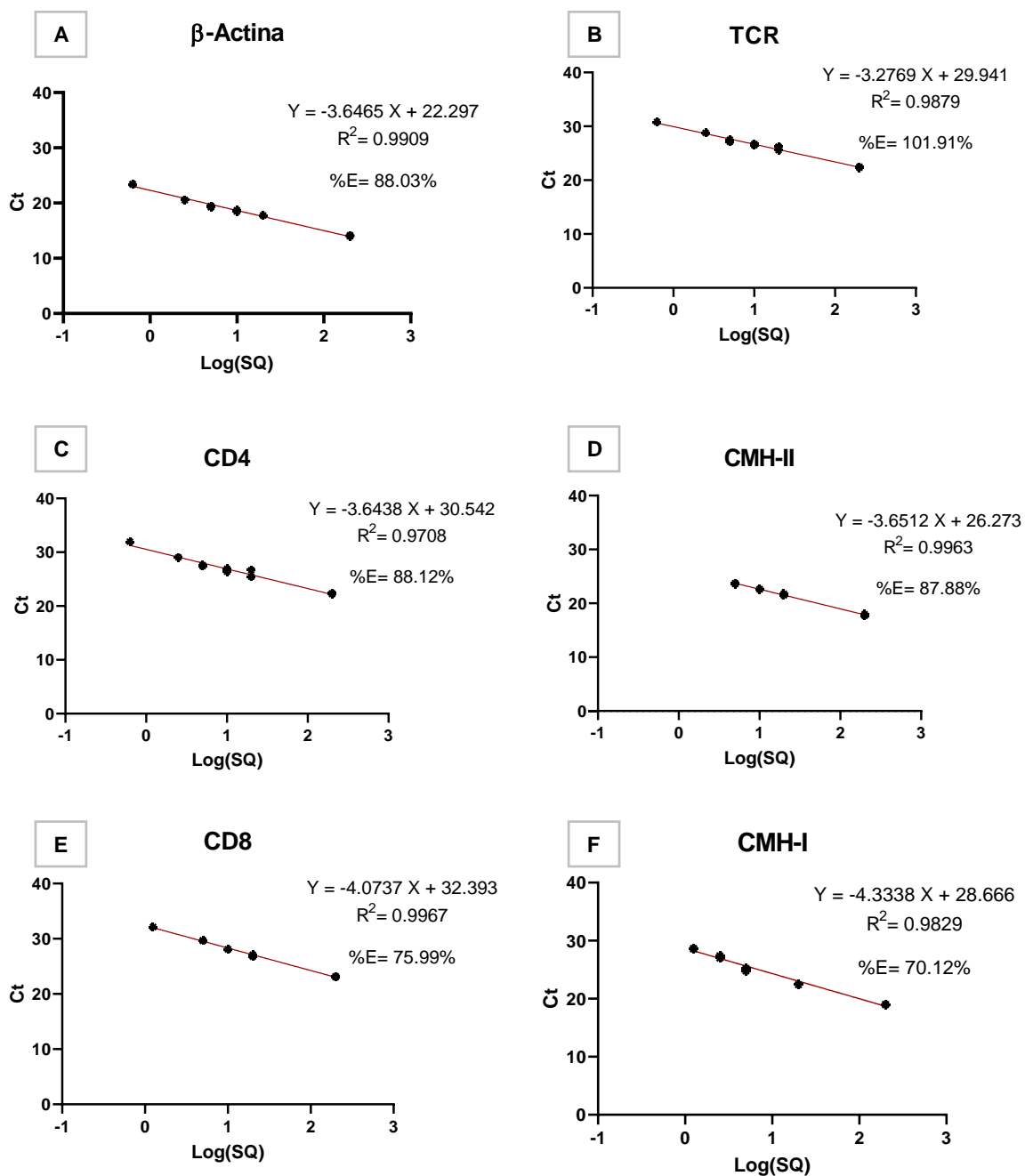
Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta se llevó a cabo mediante el establecimiento de una curva estándar correspondiente a las diluciones de LPS; a partir de la cual se calculó el número de copias de cada gen en la muestra. En la Figura 20 se puede observar las curvas estándar para cada gen, donde se puede notar que los valores de R^2 se aproximan a 1 en todos los casos y la pendiente oscila entre -4.3338 a -3.2769; además de que los valores de eficiencia determinados como indica la Ecuación 2, varían entre 70.12 a 101.91%.

La Figura 21 muestra los resultados de la cuantificación absoluta de la expresión génica mediante qPCR; donde se puede observar que el número de copias medido del gen endógeno β -Actina fue muy próximo en todos los tratamientos. También, se puede evidenciar que los genes CD4, CMH-II y TCR presentaron el mayor número de copias; mientras que los genes CD8 y CMH-I mostraron los valores más bajos en todos los tratamientos. Sin embargo, el hallazgo más relevante fue que el tratamiento con PrS1+PBS+Adv estimuló la expresión más alta de los genes TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I; en contraste con los demás.

Figura 20

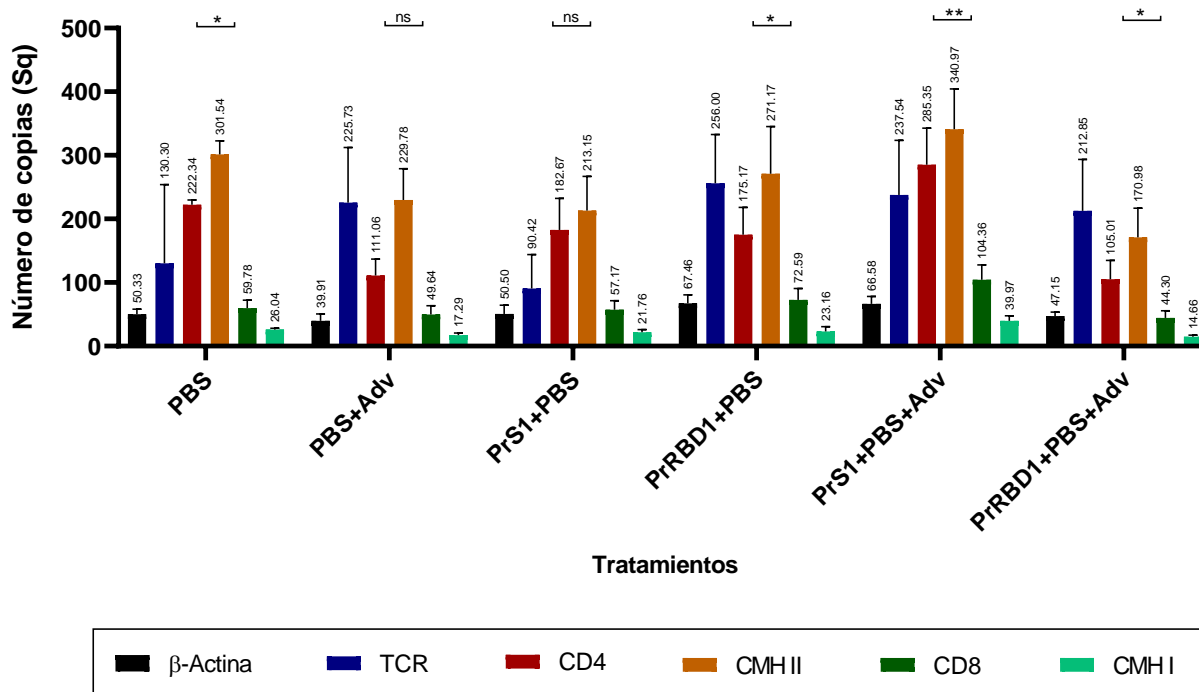
Curvas estándar de la cuantificación absoluta de la expresión génica



Nota. Las curvas estándar fueron determinadas mediante el método de fluorescencia SYBR Green. **A:** Ajuste lineal de β -Actina de ratón. **B:** Ajuste lineal de TCR. **C:** Ajuste lineal de CD4. **D:** Ajuste lineal de CMH-II. **E:** Ajuste lineal de CD8. **F:** Ajuste lineal de CMH-I.

Figura 21

Cuantificación absoluta de la expresión génica asociada a la respuesta inmune celular



Nota. Sq: Starting quantity, se refiere al número de copias del gen expresado que se han cuantificado. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. La diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos se muestra por: ns $p \leq 0.1$, * $p \leq 0.033$, ** $p \leq 0.002$ y *** $p \leq 0.001$.

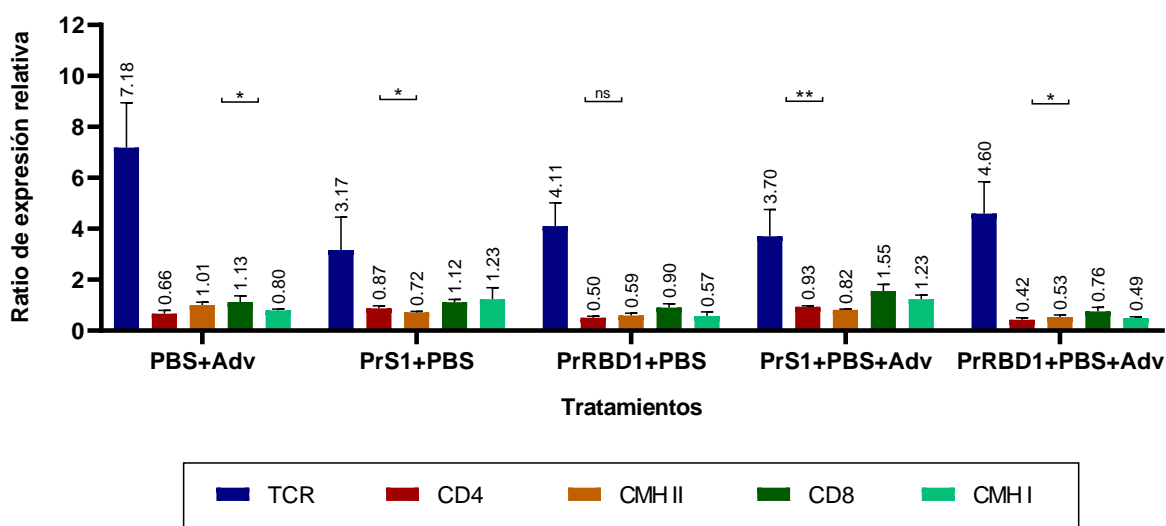
Cuantificación relativa

La Figura 22 muestra los resultados de la cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR; donde se puede notar que hubo diferencias significativas en los tratamientos PrS1+PBS+Adv, PrRBD1+PBS+Adv y PrS1+PBS, respecto a la expresión del gen CD4, CD8 y CMH-I principalmente. Los ratios indican cuantas veces se expresó el gen respecto al gen endógeno control; es decir para el tratamiento PrS1+PBS+Adv, el gen TCR se expresó 3.70 veces más que β -Actina y de igual manera CD4 se expresó 0.93 veces más, CMH-II 0.82 veces

más, CD8 1.55 veces más y CMH-I 1.23 veces más que β -Actina. Lo cual se aplica para los demás tratamientos como se evidencia en la gráfica de barras.

Figura 22

Cuantificación relativa de la expresión génica asociada a la respuesta inmune celular



Nota. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. La diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos se muestra por: **ns** $p \leq 0.1$, ***** $p \leq 0.033$, ****** $p \leq 0.002$ y ******* $p \leq 0.001$.

CAPÍTULO V: Discusión

Una de las mayores ventajas de las técnicas moleculares es que permiten la cuantificación precisa de un fragmento objetivo de ARN o ADN presente en una mezcla compleja, incluso cuando su concentración es muy baja (Fraga et al., 2014). La técnica RT-qPCR permite analizar la expresión génica, mediante la medición cuantitativa de los niveles de transcripción del ARNm, como respuesta a un requerimiento del organismo (Sidova et al., 2015). El estudio de la expresión génica es esencial para comprender las respuestas biológicas de un organismo frente a una sustancia tóxica, un fármaco o una enfermedad de interés. Sin embargo, las técnicas empleadas para el análisis de la expresión génica demandan el aislamiento de ARN con un alto nivel de integridad (Padhi et al., 2018).

El ARN es una molécula monocatenaria, altamente inestable y susceptible a la degradación *post mortem*. En los organismos eucariotas, aproximadamente entre el 80 y 85% del ARN total, corresponde al ARN de tipo ribosomal (ARNr) de distintos tamaños, incluyendo 18S, 28S, 5S y 5.8S (K. P. Singh et al., 2018). Las funciones principales del ARNr son conjugarse con proteínas para dar lugar a la estructura ribosomal y unirse a las moléculas de ARNm y ARNt para iniciar la traducción durante el proceso de expresión génica (Alberts et al., 2015).

La calidad del ARN depende principalmente de la presencia de enzimas con actividad endonucleasa como las RNasas, que son altamente estables y tienen la capacidad de degradar las moléculas de ARN mediante la eliminación de la cola de poli-A y el recubrimiento 5' del ARNm, pero no del ARNr debido a que carece de dichas estructuras. Además, existen factores físicos (luz UV, temperatura elevada, otros) y químicos (parafina, aldehídos, otros); que pueden ser causantes de la degradación tanto del ARNm como del ARNr (Sidova et al., 2015). Para evitar la degradación y contaminación del ARN, el proceso de extracción llevado a cabo en este estudio, fue cuidadosamente controlado mediante estrictos protocolos para el manejo de

muestras, manteniendo todo el tiempo una cadena de frío, uso de reactivos libres de RNasa y limpieza de equipos e insumos.

El método tradicional y más empleado para determinar la calidad de ARN es la electroforesis horizontal, misma que consiste en separar por tamaño a las especies dominantes de ARN presentes en la muestra. La evaluación de la integridad del ARN mediante electroforesis está dada por la relación de intensidad de banda 28S:18S, donde una proporción aproximada a 2:1 indica buena integridad del ARN (Padhi et al., 2018). En este estudio la relación de intensidad de banda 28S:18S fue analizada de forma netamente cualitativa. Las bandas detectadas fueron observadas como se indica en la Figura 16, donde en casi todas las muestras de los ensayos a corto y largo plazo se observó una integridad relativamente buena; sin embargo, dicha comprobación fue complementaria al análisis de los ratios 260/280 y 260/230 de absorbancia dados por el espectrofotómetro Nanodrop.

Las relaciones de absorbancia son parámetros que permiten estimar la pureza de los ácidos nucleicos luego de su extracción o síntesis. La pureza del ADN está dada por un ratio 260/280 aproximado a 1.8, mientras que la pureza del ARN está dada por un valor aproximado a 2.0; este parámetro es considerado el principal indicador de contaminación proteica (Boesenberg et al., 2012). A su vez, el valor del ratio 260/230 puede variar entre los valores 2.0 y 2.2 para considerar puro al ácido nucleico, caso contrario este parámetro indica la presencia de compuestos orgánicos indeseados cuya absorbancia es próxima a 230 nm, como el trizol, fenol y derivados de guanidina (Fraga et al., 2014). Los ratios 260/280 y 260/230 promedio obtenidos en este estudio fueron de 2.04 y 1.40 respectivamente, lo que indica que aunque se extrajo un ARN puro, existen trazas de compuestos orgánicos implicados en el protocolo de extracción, como el fenol y el tiocianato de guanidina que componen el reactivo Tri Reagent, empleado en el protocolo de extracción del ARN (Molecular Research Center, Inc., 2017).

El ARNm es una de las especies de ARN presentes en las células como resultado de la transcripción del ADN. El ARNm experimenta modificaciones postranscripcionales como la

formación del recubrimiento en el extremo 5' y la cola de poli-A en el extremo 3'; además de la eliminación de intrones mediante empalme alternativo, que da lugar a una cadena compuesta únicamente por regiones codificantes o denominadas exones (Nachtergaele & He, 2017). El Oligo (dT), durante el ensayo de RT-PCR permitió delimitar la amplificación únicamente de ARNm, debido a la unión complementaria de repeticiones del nucleótido timina con las repeticiones de adenina en la cola de poli-A de la cadena molde. De tal manera que la cadena del ADNc obtenida estuvo compuesta por la información genética codificante y permitió estudiar la expresión de los genes de interés. Además, los valores promedio de los ratios 260/280 igual a 1.74 y 260/230 igual a 1.70; se hallan muy próximos a los valores óptimos indicados por los autores, lo que revela la obtención de ADNc con una pureza aceptable.

La pandemia a causa de COVID-19 ha sido responsable de millones de muertes por todo el mundo, principalmente de aquellas personas más vulnerables que incluyen a adultos mayores, así como a pacientes inmunocomprometidos y con comorbilidades (Z. Hu et al., 2022; Sette & Crotty, 2021; Toor et al., 2021). Si bien se ha introducido algunos medicamentos en la práctica clínica para el tratamiento de COVID-19, todavía no existe una terapia curativa eficaz y segura para tratar esta enfermedad (Kudlay & Svistunov, 2022). Por lo tanto la estrategia más prometedora para controlar y prevenir la propagación de COVID-19 es la vacunación (Nguyen et al., 2021).

Las vacunas basadas en péptidos sintéticos o subunidades recombinantes, constituyen una de las plataformas más dominantes en el campo de la biomedicina, pues han sido utilizadas desde 1986, demostrando ser altamente eficaces y seguras (Zhang et al., 2022). Sin embargo, uno de los puntos más críticos durante su desarrollo, es la selección de epítomos altamente inmunogénicos y protectores (Ghattas et al., 2021). Algunas vacunas basadas en subunidades proteicas aprobadas para uso de emergencia, incluyen a COVOVAX, SARS-CoV-2: NVX-CoV2373, RBD Dimer, CIGB-66, FINLAY-FR-2, BECOV2A, EpiVacCorona-N, entre otras (Soraci et al., 2022; World Health Organization, 2022).

Múltiples investigadores han catalogado a las proteínas estructurales S, M y N del SARS-CoV-2, como los principales epítomos de la respuesta inmune celular del huésped; aunque otras proteínas como ORF3, ORF8, nsp4, nsp3 y nsp12, también suelen ser empleados como epítomos pero menos frecuentes (Grifoni et al., 2021; Wragg et al., 2022). Sin embargo, la proteína S particularmente ha demostrado ser el epítomo preferido, debido a su papel durante la entrada viral a la célula huésped (Lázaro et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Algunos estudios de inmunidad han demostrado que las vacunas basadas en la proteína S recombinante del SARS-CoV-2, pueden inducir los niveles más altos de anticuerpos neutralizantes con capacidad de brindar protección efectiva durante la infección (Soraci et al., 2022; Wragg et al., 2022). Especialmente los anticuerpos neutralizantes se encargan de bloquear al dominio RBD de la subunidad S1 de la proteína S, encargado de la fusión de membrana (Lee et al., 2021; Zhang et al., 2022). Por lo que en este estudio se evaluó una plataforma de vacunación basada en las proteínas S y RBD recombinantes del virus SARS-CoV-2.

Las vacunas basadas en proteínas recombinantes por sí solas son medianamente inmunogénicas, debido al plegamiento incorrecto e ineficiente presentación del antígeno; por lo que requieren ser combinadas con adyuvantes específicos, para potenciar su capacidad de inducción de respuestas inmunes de larga duración (Z. Hu et al., 2022; Ndwandwe & Wiysonge, 2021). Lo que puede explicar que aquellos tratamientos que contenían adyuvante fueron más eficaces en la inducción de la respuesta inmune celular; particularmente el tratamiento PrS1+PBS+Adv que indujo la mayor expresión de CD4 (Figura 19C) y CD8 (Figura 19E), así como también de CMH-I y CMH-II (Figura 21 y 22), en este estudio.

Las oleadas recurrentes de la enfermedad están estrechamente relacionadas con la aparición de nuevas variantes de SARS-CoV-2 como Delta y Ómicron, que fueron de gran preocupación para la salud pública en todo el mundo (Alexandridi et al., 2022). Actualmente, la inmunidad celular se ha convertido en el nuevo enfoque central, debido a que los receptores

presentes en la superficie de los linfocitos T pueden reconocer secuencias de aminoácidos cortas y altamente conservadas, sin importar la variante viral (Kingstad et al., 2022). Particularmente la inmunidad celular es clave para contrarrestar infecciones virales y proporcionar memoria inmunológica a largo plazo, incluso cuando las respuestas humorales son escasas como ocurre en pacientes inmunodeprimidos; por lo tanto, la inducción de células T mediante vacunas se ha convertido en un aspecto de gran interés para la salud (Heitmann et al., 2022).

Muchos investigadores han empleado principalmente técnicas como la citometría de flujo, tinción de citoquinas, microarrays y ELISPOT; para estudiar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ inducidos por antígenos del SARS-CoV-2, en órganos linfáticos secundarios de modelos murinos y primates no humanos (Elizaldi et al., 2020; Lakshmanappa et al., 2021; Lázaro et al., 2022; Lee et al., 2021; Taus et al., 2022; Vogel et al., 2021).

Lee et al. (2021) detectaron mediante ELISPOT y Citometría de flujo, la estimulación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN- γ y de memoria efectora en el bazo y ganglios linfáticos; luego de inmunizar ratones y hámster con una plataforma vacunal basada en péptidos altamente conservados de las proteínas S y N del SARS-CoV y el SARS-CoV-2, y suplementadas con un adyuvante de ARN derivado del virus de la encefalomiocarditis. Así mismo, Lázaro et al. (2022) observaron mediante la técnica de tinción de citoquinas, la inducción robusta de linfocitos T CD4⁺ con un perfil de Th1 y linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN γ , TNF α e IL-2, específicos de S, luego de aplicar dos dosis de una vacuna basada en un vector viral de poxvirus (MVA-CoV2-S) codificante de la proteína S del SARS-CoV-2, en ratones C57BL/6 infectados con este agente viral.

La RT-qPCR es una técnica molecular empleada de forma más frecuente en el diagnóstico y detección de ARN viral en diferentes muestras biológicas; sin embargo, como se mencionó anteriormente esta técnica también permite estudiar la expresión génica a partir de muestras de ARNm. Griessler et al. (2017) emplearon la técnica RT-qPCR para evaluar la

expresión génica en tejidos del pulmón, glándula salival, hígado, bazo y riñón; asociada a la infección por citomegalovirus en ratones de la cepa BALB/c y determinaron que la expresión de los genes correspondientes al sistema inmune fue más intensa en el bazo. Así también Young et al. (2020), utilizaron la técnica RT-qPCR para estudiar la expresión de Th1, Th2, Treg y Th17, en muestras de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de ratones salvajes, para evaluar la inmunidad adaptativa frente a antígenos presentes en sangre. En este estudio se aplicó la técnica RT-qPCR para medir los niveles de expresión de las moléculas TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I, asociadas a la inmunidad celular y de esa manera conocer la respuesta del organismo modelo frente a un inmunógeno compuesto por subunidades recombinantes del virus SARS-CoV-2 (PrS1 y PrRBD1), administrado en dos dosis.

La RT-qPCR demanda la selección de un gen control endógeno apropiado de acuerdo al experimento, modelo animal y tipo de tejido que se va a analizar (Prieto et al., 2003; Svingen et al., 2015). Griessl et al. (2017) informaron que los genes de referencia más adecuados para el estudio de la expresión génica por la técnica RT-qPCR en el bazo de ratones BALB/c, incluyen a β -Actina, β 2- microglobulina y HPRT. Las proteínas de actina son altamente conservadas, se encargan de la motilidad, integridad, estructura y señalización de las células. El gen β -Actina codifica una de seis proteínas de actina, misma que forma parte del aparato contráctil y citoesquelético no muscular de las células (Saeed et al., 2020). Es un gen endógeno altamente conservado y estable en diferentes tipos de tejidos, incluido el bazo; por lo que usualmente es empleado en ensayos de expresión génica como referencia para normalizar los niveles de ARN dentro de la célula (Svingen et al., 2015). Lo que evidentemente se pudo detectar en este estudio, debido a que la expresión de β -Actina se mantuvo uniforme tanto en el ensayo a corto plazo como en el ensayo a largo plazo (Figura 19A) y no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 21).

La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR es altamente sensible, precisa y reproducible (Fraga et al., 2014; Griessl et al., 2017; Young et al., 2020). Los valores

de cuantificación génica determinados mediante esta técnica molecular dependen de ciertos parámetros como la pendiente de la curva estándar cuyo valor debe variar entre -3.1 y -3.6, el coeficiente de determinación (R^2) del modelo lineal cuyo valor debe ser próximo a 1 y los porcentajes de eficiencia cuyo valor óptimo debe encontrarse en un rango de entre 90 a 110% (Bio-Rad Laboratories, 2019). Prieto et al. (2003) estudiaron la expresión génica de β -actina de ratón en el bazo y otros tejidos, mediante RT-qPCR; obteniendo una curva estándar caracterizada por una pendiente de -3.23, R^2 igual a 0.99 y un porcentaje de eficiencia de 1.04 (104%). En el presente estudio se obtuvo una curva estándar del control endógeno β -actina en el bazo de ratón, con una pendiente de -3.6465, R^2 igual a 0.9909 y un porcentaje de eficiencia de 88.03% (Figura 20A). Mientras que los demás genes estudiados mostraron una pendiente que osciló entre los valores -4.3 a -3.3, los porcentajes de eficiencia variaron entre 70.12 a 101.91% y los valores de R^2 se aproximaron a 1 en todos los casos (Figura 20 B, C, D, E y F). Si bien existió consistencia entre los resultados obtenidos por densitometría y qPCR, se presume que la cuantificación de CD8 y CMH-I tuvo leves variaciones, debido a que estos genes presentaron los porcentajes de eficiencia más bajos en el ensayo qPCR (Figura 20 E y F).

La estimulación de TCR es esencial para determinar la activación, el desarrollo, diferenciación, proliferación y la supervivencia de los linfocitos T. Una fuerte estimulación de TCR favorece la diferenciación de linfocitos cooperadores principalmente de tipo 1 (Th1), mientras que una estimulación leve es suficiente para la generación o mejora de los linfocitos CD8⁺ de memoria (Hwang et al., 2020). Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa frente a péptidos antigénicos, ha demostrado expresar fenotipos celulares principalmente de naturaleza CD4⁺ (Minervina et al., 2021). En este estudio la expresión de TCR fue relativamente alta en comparación con las otras moléculas estudiadas (Figura 22), aunque fue evidentemente mayor en los tratamientos PrS1+PBS+Adv y PrRBD1+PBS+Adv (Figura 19B), además de PrRBD1+PBS (Figura 21).

Las células T CD4⁺ son claves para la inmunidad adaptativa, pues sus funciones incluyen la estimulación de las células B, las células T CD8⁺ y la producción de citoquinas antivirales (Wragg et al., 2022). Ensayos *in vivo* con modelos animales han demostrado que las respuestas de linfocitos T CD4⁺ tienden a ser más dominantes que las respuestas de células T CD8⁺, lo cual se ha relacionado con el control primario de la infección por SARS-CoV-2 o sus antígenos (Li et al., 2021; Sette & Crotty, 2021). La magnitud de respuesta de los linfocitos T está ligada al tipo de proteína empleada como antígeno (Nguyen et al., 2021); así la proteína nsp12 estimula débilmente a las células CD8⁺, mientras que la proteína S se riga por una alta estimulación de células CD4⁺ y en consecuencia da soporte a la inmunidad humoral (Moss, 2022). La presentación de antígenos exógenos como las proteínas introducidas mediante la vacunación, ocurre a través de la vía del CMH-II que emplea el mecanismo de fagolisosoma y procesa el antígeno para presentarlo a las células CD4⁺ (Coico & Sunshine, 2015). Además, existen reportes de que los ratones de la cepa BALB/c poseen una excelente respuesta frente a la inmunización, debido a que tienden a expresar fácilmente las células T cooperadoras, luego de ser vacunados (Nakamura, 2013). Lo que en conjunto explica los altos niveles de expresión de las proteínas CD4 y CMH-II, cuantificados por densitometría (Figura 19 C y D) y qPCR (Figura 21 y 22).

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en algunos fenotipos con diferentes funciones efectoras de acuerdo a las citoquinas secretadas en el organismo. El fenotipo Th1 se encarga esencialmente de la eliminación de antígenos intracelulares, Th2 se dirige a agentes parasitarios extracelulares y se asocia con enfermedades alérgicas, Th17 elimina agentes bacterianos y hongos extracelulares, Thf se encarga de estimular la inmunidad humoral mediante interacción con linfocitos B y Treg desempeña un rol esencial en la tolerancia a antígenos propios y extraños (Luckheeram et al., 2012).

Estudios de infección por SARS-CoV en modelos animales han demostrado que las respuestas de células T CD4⁺ de tipo Th2 se relacionan con una inmunopatología asociada a la

vacunación (Tseng et al., 2012); también se ha informado sobre la presencia del fenotipo Th2 en pacientes con COVID-19 grave (Chen & John Wherry, 2020). Al contrario, las respuestas sesgadas por Th1 y Thf se ha asociado con casos de COVID-19 leve (Elizaldi et al., 2020; Toor et al., 2021); pues estos fenotipos celulares han demostrado la capacidad para detener la replicación viral y reducir el riesgo de complicaciones respiratorias derivadas de la enfermedad pulmonar (Lázaro et al., 2022). Además, Vogel et al. y Lakshmanappa et al. (2021), reportaron una elevada estimulación de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th1 y Thf en los ganglios linfáticos de ratones y macacos rhesus; luego de la vacunación con una plataforma de ARNm codificante de las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2. Por lo tanto, se presume que la mayor parte de la población de linfocitos T CD4⁺ estimulados en este estudio (Figura 19C, 21 y 22), corresponde a los fenotipos Thf cuya función efectora es la estimulación de la inmunidad humoral; lo que tiene coherencia con los altos títulos de anticuerpos neutralizantes encontrados por Orozco-Vega (2022) en un estudio predecesor; sin embargo, esta hipótesis se podría confirmar mediante un análisis de citoquinas e interleucinas asociadas a dichos fenotipos.

Las células T CD8⁺ son claves para el combate de antígenos intracelulares como los virus, estas células se encargan de producir citocinas efectoras y eliminar células contaminadas (Pérez-Galarza et al., 2021). El retraso en el reclutamiento de los linfocitos T CD8⁺ durante la infección *in vivo*, se debe a una función deteriorada de las células dendríticas encargadas de la presentación de antígenos, misma que es causada por los mecanismos de evasión del SARS-CoV-2 (Arshad et al., 2022; Yoo et al., 2021). Algunas plataformas como las vacunas vivas, las vacunas basadas en ARNm y vacunas basadas en vectores virales, tienen mayor acceso a la maquinaria de procesamiento del CMH-I por lo que poseen la facultad para estimular de manera más eficaz la respuesta de las células T CD8⁺; evento que no ocurre en las plataformas basadas en proteínas recombinantes (Minervina et al., 2021; Nguyen et al., 2021). Tal y como se evidenció en este estudio, donde la expresión de CD8 y CMH-I fue la más baja, respecto a las demás moléculas estudiadas, en todos los tratamientos empleados (Figuras 21 y 22). No

obstante, si hubo un aumento de la expresión de CD8 y CMH-I, en el ensayo a largo plazo luego de la segunda dosis del inmunógeno compuesto por PrS1+PBS+Adv (Figuras 19 E y F). Además, Taus et al. (2022) determinaron que la población de linfocitos T CD8⁺ se ve mejor estimulada por la proteína N del SARS-CoV-2, que por las proteínas S y M.

La aplicación de dos dosis de una vacuna suplementada con adyuvante, basada en la proteína S recombinante del SARS-CoV-2; ha demostrado ser altamente efectiva en la inducción de la respuesta inmune adaptativa humoral en modelos murinos (Z. Hu et al., 2022). Lázaro et al. (2022) reportaron que un esquema de inmunización compuesto por dos dosis de una vacuna basada en un vector viral codificante de la proteína S del SARS-CoV-2 fue altamente eficaz para prevenir la replicación del virus, inducir títulos altos de IgG específicos de S y RBD, así como también de causar lesiones inflamatorias pulmonares leves. Además, Nguyen et al. (2021) reportaron que la aplicación de la segunda dosis de una vacuna inactivada (BNT162b2) contra la COVID-19, estimuló significativamente la expresión de linfocitos T CD4⁺ en ensayos *in vivo* con modelos animales; donde el pico más alto fue detectado tras 7 días después de su inoculación (día 28 del ensayo) y la población de células T CD4⁺ persistió durante aproximadamente 200 días más.

En este estudio se inoculó dos dosis de un prototipo de vacuna compuesto por 5µg de PrS1 o PrRBD1 en 200µL de solución (Tabla 5), la primera dosis el día 0 y la segunda dosis el día 28 del ensayo; y luego se evaluó la inmunogenicidad generada a los 15 días en el ensayo a corto plazo y a los 42 días en el ensayo a largo plazo (Orozco-Vega, 2022). Tanto la inmunidad humoral como la inmunidad celular fueron significativamente potenciadas luego de la adición de la segunda dosis; lo que se evidencia en este estudio por la expresión elevada de todos los genes asociados a la respuesta inmune celular en el ensayo a largo plazo (Figura 19 B, C, D, E y F).

En cuanto a la respuesta adaptativa celular de memoria, se sabe que las citoquinas IL-7 e IL-15 promueven el desarrollo y supervivencia de los linfocitos T de memoria, mismos que se

mantienen en un estado de reposo funcional durante años luego del encuentro con el antígeno; aunque este mecanismo todavía no se ha descrito claramente (Abbas et al., 2018). Jordan (2021) y Lázaro et al. (2022) reportaron la inducción de respuestas de memoria específicas de S, tanto humorales como celulares que se prolongaron hasta por 6 meses luego de la inmunización con diferentes plataformas de vacunación. Wragg et al. (2022) afirmó en su estudio que las células T CD4⁺ de memoria específicas de SARS-CoV-2, se han detectado luego de 8 y 12 meses después de la infección y corresponden principalmente a los fenotipos Th1. Además existen informes de que las células T de memoria específicas del SARS-CoV principalmente dirigidas a las proteínas S, M y N; persistían hasta por 17 años después de la exposición al antígeno, mientras que las células B secretoras de anticuerpos se extinguían al paso de solo unos pocos años, aproximadamente 6 años (Lee et al., 2021; Sette & Crotty, 2021). Dada la cercanía genética entre SARS-CoV y SAR-CoV-2 (homología del 79.5%) (Shen et al., 2022), muchos investigadores estiman que la respuesta de memoria frente a este patógeno tendrá una duración igual o mayor a 10 años, como ocurre también con la fiebre amarilla (Jordan, 2021).

No obstante, la mutación continua de SARS-CoV-2 constituye un gran desafío para los programas de vacunación, debido a que las vacunas existentes han perdido eficacia y consecuentemente ha incrementado la demanda de dosis de refuerzo (Zhang et al., 2022). Se ha reportado que la proteína S tiene un alto nivel de mutagenicidad y que las variantes del virus han logrado desarrollar estrategias evasivas de la respuesta inmune inducida por la vacunación (Arshad et al., 2022). Dando lugar a un nuevo reto para los científicos, quienes se han enfocado en buscar e identificar nuevos objetivos antigénicos potenciales, como la proteína N, que ha sido reportada como un epítipo capaz de mantener una inmunidad general de larga duración y permite combatir múltiples variantes de SARS-CoV-2 (Soraci et al., 2022).

La mutación del virus, también ha dado lugar a nuevas rutas de infección alternas a la ruta clásica comprendida por ACE2/TMPRSS2 y asociada al sistema respiratorio. Estudios han

reportado la detección de SARS-CoV-2 y sus antígenos derivados, en el bazo y ganglios linfáticos de pacientes fallecidos; lo que revela la afectación del sistema inmune debida a muerte pronunciada de linfocitos T o linfopenia. Ensayos *in vitro* mostraron que dicha vía está probablemente dada por la proteína superficial de leucocitos, LFA-1 (Shen et al., 2022). Por lo tanto, es esencial desarrollar nuevas estrategias para mejorar las plataformas de vacunación existentes y actualmente disponibles, orientadas principalmente a la población más vulnerable.

CAPÍTULO VI: Conclusiones

La integridad del ARN extraído a partir del bazo de los ratones BALB/c, expuestos a los diferentes tratamientos inmunogénicos *in vivo*; se evidenció mediante electroforesis horizontal y espectrofotometría. En general se obtuvo altas concentraciones de ARN y sus parámetros de pureza 260/280 y 260/230 tuvieron valores aproximados a 2.

Los resultados del análisis densitométrico y la cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR, revelaron que los tratamientos inmunogénicos basados en PrS1 y PrRBD1 con adyuvante son altamente eficaces, al inducir respuestas significativamente altas de las moléculas TCR, CD4, CMH-II, CD8 y CMH-I asociadas a la respuesta inmune adaptativa celular, durante el ensayo a largo plazo. Por lo tanto, se concluye que el régimen de vacunación compuesto por dos dosis brindó una respuesta más sólida de linfocitos T y fue mucho más eficiente que el régimen compuesto por una sola dosis.

El prototipo de vacuna basada en proteínas recombinantes empleado en este estudio, indujo una fuerte expresión del receptor de los linfocitos T, así como también de la molécula CMH-II y estimuló vigorosamente a la población de linfocitos T CD4⁺. En contraste con la activación de los linfocitos T CD8⁺ y las moléculas CMH-I, que resultó significativamente más baja en todos los tratamientos. Este hallazgo reveló que los antígenos PrS1 y PrRBD1 presentes en el constructo vacunal son procesados por la vía de fagolisosoma del CMH-II, lo que tiende a estimular esencialmente células T CD4⁺ cooperadoras, cuyas funciones son activar a las células CD8⁺ y mantener la inmunidad humoral; así como también promover la inmunidad de memoria orientada a la protección del huésped frente a futuros encuentros con el mismo antígeno.

CAPÍTULO VII: Recomendaciones

Optimizar el protocolo de qPCR para mejorar los porcentajes de eficiencia obtenidos en este estudio, mediante la aplicación de otros genes control murinos o mediante el mejoramiento de la curva estándar empleada en la cuantificación absoluta.

Estudiar la expresión de IL-6 e IL-21 para confirmar si la elevada población de linfocitos T CD4⁺ detectada en este estudio, corresponde a los linfocitos cooperadores foliculares (Tfh) y también las citoquinas IFN- γ , IL-12 e IL-2 para determinar si corresponden al tipo Th1.

Investigar la inmunogenicidad de epítomos alternos como la proteína de la nucleocápside y la proteína de membrana del SARS-CoV-2, así como también evaluar alternativas de vacunación heteróloga mediante combinación de plataformas vacunales o diseño de vacunas multiproteicas, que permitan inducir la expresión de diversos tipos de células T.

Evaluar otros agentes adyuvantes para suplementar la vacuna diseñada en este estudio, con el fin de incrementar el potencial inmunogénico, orientado principalmente a la activación de los linfocitos T CD8⁺ específicos del SARS-CoV-2.

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
<https://www.edicionesjournal.com/Papel+Digital/9788491132752/Inmunolog%C3%ADa+celular+y+molecular+Ed+9%C2%BA>
- Actor, J. K. (2019). A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. En *Introductory Immunology* (pp. 1-16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816572-0.00001-2>
- Acurio-Páez, D., Vega, B., Orellana, D., Charry, R., Gómez, A., Obimpeh, M., Verhoeven, V., & Colebunders, R. (2021). Seroprevalence of SARS-CoV-2 Infection and Adherence to Preventive Measures in Cuenca, Ecuador, October 2020, a Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 46-57.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18094657>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Alamri, S. S., Alluhaybi, K. A., Alhabbab, R. Y., Basabrain, M., Algaissi, A., Almahboub, S., Alfaleh, M. A., Abujamel, T. S., Abdulaal, W. H., ElAssouli, M.-Z., Alharbi, R. H., Hassanain, M., & Hashem, A. M. (2021). Synthetic SARS-CoV-2 Spike-Based DNA Vaccine Elicits Robust and Long-Lasting Th1 Humoral and Cellular Immunity in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 12(727455), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.727455>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., & Hunt, T. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
https://books.google.com.ec/books?id=jK6UBQAAQBAJ&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Alexandridi, M., Mazej, J., Palermo, E., & Hiscott, J. (2022). The Coronavirus pandemic – 2022: Viruses, variants & vaccines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 63(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.02.002>

- Arshad, N., Laurent-Rolle, M., Ahmed, W. S., Hsu, J. C.-C., Mitchell, S. M., Pawlak, J., Sengupta, D., Biswas, K. H., & Cresswell, P. (2022). *SARS-CoV-2 accessory proteins ORF7a and ORF3a use distinct mechanisms to downregulate MHC-I surface expression*. *Immunology*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.17.492198>
- Badigeru, R. (2021). A Mini Review on Gene Expression. *Insights in Biomedicine*, 6(7), 34-36. <https://www.primescholars.com/articles/a-mini-review-on-gene-expression-95607.html>
- Banerjee, A., Doxey, A. C., Mossman, K., & Irving, A. T. (2021). Unraveling the Zoonotic Origin and Transmission of SARS-CoV-2. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(3), 180-184. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.002>
- Barreto-Vieira, D. F., da Silva, M. A. N., de Almeida, A. L. T., Rasinhas, A. da C., Monteiro, M. E., Miranda, M. D., Motta, F. C., Siqueira, M. M., Girard-Dias, W., Archanjo, B. S., Bozza, P. T., L. Souza, T. M., Gomes Dias, S. S., Soares, V. C., & Barth, O. M. (2022). SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an In Vitro System. *Viruses*, 14(2), 201-222. <https://doi.org/10.3390/v14020201>
- Bartleson, J. M., Radenkovic, D., Covarrubias, A. J., Furman, D., Winer, D. A., & Verdin, E. (2021). SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system. *Nature Aging*, 1(9), 769-782. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00114-7>
- Bio-Rad Laboratories. (2019). *The Ultimate qPCR Assay Design Guide*. Bio-Rad. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf
- Boechat, J. L., Chora, I., Morais, A., & Delgado, L. (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. *Pulmonology*, 27(5), 423-437. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008>
- Boesenberg, K. A., Pessarakli, M. M., & Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA Yield and Purity: An Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>

- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). MRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 630-644.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Chen, Z., & John Wherry, E. (2020). T cell responses in patients with COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 529-536. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>
- Coico, R., & Sunshine, G. (2015). *Immunology: A short course*. John Wiley & Sons Ltd.
<https://books.google.com.ec/books?id=4O4wBgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536-544.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- De Alwis, R., Gan, E. S., Chen, S., Leong, Y. S., Tan, H. C., Zhang, S. L., Yau, C., Low, J. G. H., Kalimuddin, S., Matsuda, D., Allen, E. C., Hartman, P., Park, K.-J. J., Alayyoubi, M., Bhaskaran, H., Dukanovic, A., Bao, Y., Clemente, B., Vega, J., ... Ooi, E. E. (2021). A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice. *Molecular Therapy*, 29(6), 1970-1983.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.001>
- Echeverría, G., Guevara, Á., Coloma, J., Ruiz, A. M., Vasquez, M. M., Tejera, E., & de Waard, J. H. (2021). Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 Interferon-Gamma Release Assay. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(5), 21-25.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
- Elizaldi, S., Lakshmanappa, Y. S., Roh, J., Schmidt, B., Carroll, T., Weaver, K., Smith, J., Deere, J., Dutra, J., Stone, M., Franz, S., Sammak, R., Olstad, K., Reader, J. R., Ma, Z.-M., Nguyen, N., Watanabe, J., Usachenko, J., Immareddy, R., ... Iyer, S. (2020). SARS-

- CoV-2 infection induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. *Research Square*, 1(12), 4-23. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-51545/v1>
- Fenton, A. (2019). A moderate Buddhist animal research ethics. *Developing World Bioeth*, 19(2), 106-115. <https://doi.org/10.1111/dewb.12220>
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques: Real-Time PCR*. John Wiley & Sons, Inc. 10.1002/9780470089941.et1003s08
- Fujita, R., Hino, M., Ebihara, T., Nagasato, T., Masuda, A., Lee, J. M., Fujii, T., Mon, H., Kakino, K., Nagai, R., Tanaka, M., Tonooka, Y., Moriyama, T., & Kusakabe, T. (2020). Efficient production of recombinant SARS-CoV-2 spike protein using the baculovirus-silkworm system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.020>
- Ghattas, M., Dwivedi, G., Lavertu, M., & Alameh, M.-G. (2021). Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines*, 9(12), 1490. <https://doi.org/10.3390/vaccines9121490>
- Glick, B. R., Delovitch, T. L., & Patten, C. L. (2014). *Medical Biotechnology*. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555818890>
- Gonçalves, A., Crippa, A., & Lauren, J. (2016). Animal Bioethics: Proposal for bioethics education in Animal Ethics. *Revista de Bioética y Derecho & Perspectivas Bioéticas*, 1(36), 85-91. <https://doi.org/10.1344/rbd2016.36.15379>
- Gorzalczany, S., & Rodriguez, A. (2021). Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(5), 1-9. <https://doi.org/10.1002/prp2.863>
- Graham, A. L. (2021). Naturalizing mouse models for immunology. *Nature Immunology*, 22(2), 111-117. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00857-2>

- Griessler, M., Gutknecht, M., & Cook, C. H. (2017). Determination of suitable reference genes for RT-qPCR analysis of murine Cytomegalovirus in vivo and in vitro. *Journal of Virological Methods*, 248(1), 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.06.012>
- Grifoni, A., Sidney, J., Vita, R., Peters, B., Crotty, S., Weiskopf, D., & Sette, A. (2021). SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1076-1092. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.010>
- Gu, H., Chen, Q., Yang, G., He, L., Fan, H., Deng, Y.-Q., Wang, Y., Teng, Y., Zhao, Z., Cui, Y., Li, Y., Li, X.-F., Li, J., Zhang, N., Yang, X., Chen, S., Zhao, G., Wang, X., Luo, D., ... Zhou, Y. (2020). Rapid adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice: Novel mouse model for vaccine efficacy. *BioRxiv*, 7(3), 4-11. <https://doi.org/10.1101/2020.05.02.073411>
- Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshnev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
- Harbour, J. C., Lyski, Z. L., Schell, J. B., Thomas, A., Messer, W. B., Slifka, M. K., & Nolz, J. C. (2021). Cellular and Humoral Immune Responses in Mice Immunized with Vaccinia Virus Expressing the SARS-CoV-2 Spike Protein. *The Journal of Immunology*, 206(11), 2596-2604. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100054>
- He, Z., He, M., & Yuan, E. (2021). Vaccine safety and efficacy: A literature review. 3rd *International Conference on Frontiers of Biological Sciences and Engineering*, 23(50), 1-8. <https://doi.org/10.1063/5.0049198>
- Heitmann, J. S., Bilich, T., Tandler, C., Nelde, A., Maringer, Y., Marconato, M., Reusch, J., Jäger, S., Denk, M., Richter, M., Anton, L., Weber, L. M., Roerden, M., Bauer, J., Rieth, J., Wacker, M., Hörber, S., Peter, A., Meisner, C., ... Walz, J. S. (2022). A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature*, 601(7894), 617-622. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04232-5>

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, Z., Chen, J.-P., Xu, J.-C., Chen, Z.-Y., Qu, R., Zhang, L., Yao, W., Wu, J., Yang, H., Lowrie, D. B., Liu, Y., & Fan, X.-Y. (2022). A two-dose optimum for recombinant S1 protein-based COVID-19 vaccination. *Virology*, 566(1), 56-59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.11.011>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141-1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D., & Park, S.-G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(5), 750-761. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Institute for Quality and Efficiency in Health Care. (2020). *The innate and adaptive immune systems*. Cologne, Germany. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>
- Jordan, S. C. (2021). Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: Relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 204(3), 310-320. <https://doi.org/10.1111/cei.13582>
- Kaye, A. D., Cornett, E. M., Brondeel, K. C., Lerner, Z. I., Knight, H. E., Erwin, A., Charipova, K., Gress, K. L., Urits, I., Urman, R. D., Fox, C. J., & Kevill, C. G. (2021). Biology of COVID-19 and related viruses: Epidemiology, signs, symptoms, diagnosis, and treatment. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 35(3), 269-292. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.12.003>
- Kedzierska, K., & Thomas, P. G. (2022). Count on us: T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Reports Medicine*, 3(3), 100-581. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100562>

- Kingstad, B., Lee, W., Chandrasekar, S. S., Gasper, D. J., Salas-Quinchucua, C., Cleven, T., Sullivan, J. A., Talaat, A., Osorio, J. E., & Suresh, M. (2022). Vaccine-induced systemic and mucosal T cell immunity to SARS-CoV-2 viral variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(20), 1-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2118312119>
- Kudlay, D., & Svistunov, A. (2022). COVID-19 Vaccines: An Overview of Different Platforms. *Bioengineering*, *9*(2), 72. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020072>
- Kumavath, R., Barh, D., Andrade, B. S., Imchen, M., Aburjaile, F. F., Ch, A., Rodrigues, D. L. N., Tiwari, S., Alzahrani, K. J., Góes-Neto, A., Weener, M. E., Ghosh, P., & Azevedo, V. (2021). The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. *Frontiers in Immunology*, *12*(663912), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663912>
- Lahariya, C. (2016). Vaccine epidemiology: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, *5*(1), 7. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.184616>
- Lakshmanappa, Y., Elizaldi, S. R., Roh, J. W., Schmidt, B. A., Carroll, T. D., Weaver, K. D., Smith, J. C., Verma, A., Deere, J. D., Dutra, J., Stone, M., Franz, S., Sammak, R. L., Olstad, K. J., Rachel Reader, J., Ma, Z.-M., Nguyen, N. K., Watanabe, J., Usachenko, J., ... Iyer, S. S. (2021). SARS-CoV-2 induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. *Nature Communications*, *12*(1), 541. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20642-x>
- Lázaro, A., Pérez, P., Zamora, C., Sánchez-Cordón, P. J., Guzmán, M., Luczkowiak, J., Delgado, R., Casasnovas, J. M., Esteban, M., & García-Arriaza, J. (2022). Full efficacy and long-term immunogenicity induced by the SARS-CoV-2 vaccine candidate MVA-CoV2-S in mice. *Npj Vaccines*, *7*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00440-w>
- Lee, Y.-S., Hong, S.-H., Park, H.-J., Lee, H.-Y., Hwang, J.-Y., Kim, S. Y., Park, J. W., Choi, K.-S., Seong, J. K., Park, S.-I., Lee, S.-M., Hwang, K.-A., Yun, J.-W., & Nam, J.-H. (2021). Peptides Derived From S and N Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome

- Coronavirus 2 Induce T Cell Responses: A Proof of Concept for T Cell Vaccines. *Frontiers in Microbiology*, 12(732450), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732450>
- Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, 4(33), 60-85. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
- Li, S., Li, S., Disoma, C., Zheng, R., Zhou, M., Razzaq, A., Liu, P., Zhou, Y., Dong, Z., Du, A., Peng, J., Hu, L., Huang, J., Feng, P., Jiang, T., & Xia, Z. (2021). SARS-CoV-2: Mechanism of infection and emerging technologies for future prospects. *Reviews in Medical Virology*, 31(2), 21-68. <https://doi.org/10.1002/rmv.2168>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012(925135), 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2), 49-59. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Marti, L. C., Bacal, N. S., Bento, L. C., Correia, R. P., & Rocha, F. A. (2017). Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation. En G. Isvoranu (Ed.), *Lymphocyte Updates—Cancer, Autoimmunity and Infection*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69058>
- Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 199(2), 383-388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700453>
- Minervina, A. A., Komech, E. A., Titov, A., Bensouda Koraichi, M., Rosati, E., Mamedov, I. Z., Franke, A., Efimov, G. A., Chudakov, D. M., Mora, T., Walczak, A. M., Lebedev, Y. B., & Pogorelyy, M. V. (2021). Longitudinal high-throughput TCR repertoire profiling reveals

- the dynamics of T-cell memory formation after mild COVID-19 infection. *ELife*, 10(e63502), 1-17. <https://doi.org/10.7554/eLife.63502>
- Molecular Research Center, Inc. (2017). *TRI Reagent®—RNA/DNA /Protein isolation reagent*. Molecular Research Center, Inc. <https://www.mrcgene.com/wp-content/uploads/2014/06/TRIMarch2017.pdf>
- Morales, A., & Aguilar, E. (2018). *Reflections on Bioethics*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71309>
- Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, 23(2), 186-193. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>
- Mullis, K. (2022). *Polymerase chain reaction: Facts & Related Content*. Encyclopaedia Britannica. <https://www.britannica.com/facts/polymerase-chain-reaction>
- Mustafa, M. A., AL-Samarraie, M. Q., & Ahmed, M. T. (2020). Molecular techniques of viral diagnosis. *Science Archives*, 1(3), 98-101. <http://dx.doi.org/10.47587/SA.2020.1304>
- Nachtergaele, S., & He, C. (2017). The emerging biology of RNA post-transcriptional modifications. *RNA Biology*, 14(2), 156-163. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1267096>
- Nakamura, H. (2013). BALB/c Mouse. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 1(2), 290-292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>
- Ndwandwe, D., & Wiysonge, C. S. (2021). COVID-19 vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 1(71), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.003>
- Nguyen, T. H. O., Cohen, C. A., Rowntree, L. C., Bull, M. B., Hachim, A., Kedzierska, K., & Valkenburg, S. A. (2021). T Cells Targeting SARS-CoV-2: By Infection, Vaccination, and Against Future Variants. *Frontiers in Medicine*, 8(793102), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.793102>

Nolan, T. (2014). *PCR Technologies: A Technical Guide*. Sigma Aldrich.

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/197/153/pcr-technologies-guide.pdf>

Orozco-Vega, M. (2022). *Determinación de la inmunogenicidad de dos proteínas recombinantes S espiga (Spike) y RBD de SARS-CoV-2 en modelos animales* [Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE].

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/29684/1/T-ESPE-052360.pdf>

Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R. C., Zella, D., & Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine*, *18*(1), 179-188.

<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>

Padhi, B. K., Singh, M., Rosales, M., Pelletier, G., & Cakmak, S. (2018). A PCR-based quantitative assay for the evaluation of mRNA integrity in rat samples. *Biomolecular Detection and Quantification*, *15*(1), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.02.001>

Painter, M. M., Mathew, D., Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Pattekar, A., Kuthuru, O., Baxter, A. E., Herati, R. S., Oldridge, D. A., Hicks, P., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Giles, J. R., Weirick, M. E., McAllister, C. M., ... Wherry, E. J. (2021). Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells guides coordinated humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *bioRxiv*, *1*(1), 1-26. <https://doi.org/10.1101/2021.04.21.440862>

Pérez-Galarza, J., Prócel, C., Cañadas, C., Aguirre, D., Pibaque, R., Bedón, R., Sempértegui, F., Drexhage, H., & Baldeón, L. (2021). Immune Response to SARS-CoV-2 Infection in Obesity and T2D: Literature Review. *Vaccines*, *9*(2), 102-122.

<https://doi.org/10.3390/vaccines9020102>

- Pizzato, M., Baraldi, C., Boscato Sopetto, G., Finozzi, D., Gentile, C., Gentile, M. D., Marconi, R., Paladino, D., Raoss, A., Riedmiller, I., Ur Rehman, H., Santini, A., Succetti, V., & Volpini, L. (2022). SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. *Frontiers in Virology*, 1(815388), 2-29. <https://doi.org/10.3389/fviro.2021.815388>
- Pollard, A. J., & Bijker, E. M. (2021). A guide to vaccinology: From basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 83-100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
- Prieto, M.-J., Cabrera, J.-M., & Pueyo, C. (2003). Absolute Quantitation of Normal and ROS-Induced Patterns of Gene Expression: An In Vivo Real-Time PCR Study in Mice. *Gene Expression*, 11(1), 23-34. <https://doi.org/10.3727/000000003783992315>
- Rando, H. M., MacLean, A. L., Lee, A. J., Lordan, R., Ray, S., Bansal, V., Skelly, A. N., Sell, E., Dziak, J. J., Shinholster, L., D'Agostino McGowan, L., Ben Guebila, M., Wellhausen, N., Knyazev, S., Boca, S. M., Capone, S., Qi, Y., Park, Y., Mai, D., ... Greene, C. S. (2021). Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. *MSystems*, 6(5), 5-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00095-21>
- Ricci, D., Etna, M. P., Rizzo, F., Sandini, S., Severa, M., & Coccia, E. M. (2021). Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7017. <https://doi.org/10.3390/ijms22137017>
- Rich, R., Fleisher, T., Shearer, W., Schroeder, H., Frew, A., & Weyand, C. (2019). *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/clinical-immunology/rich/978-0-7020-6896-6>
- Saeed, M. B., Record, J., & Westerberg, L. S. (2020). Two sides of the coin: Cytoskeletal regulation of immune synapses in cancer and primary immune deficiencies. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 356, pp. 1-97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.06.001>

- 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>
- Shah, V. K., Fimal, P., Alam, A., Ganguly, D., & Chattopadhyay, S. (2020). Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Frontiers in Immunology*, 11(1949), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01949>
- Shen, X.-R., Geng, R., Li, Q., Chen, Y., Li, S.-F., Wang, Q., Min, J., Yang, Y., Li, B., Jiang, R.-D., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhu, Y., Jia, J.-K., Yang, X.-L., Liu, M.-Q., Gong, Q.-C., Zhang, Y.-L., Guan, Z.-Q., ... Zhou, P. (2022). ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00919-x>
- Sidova, M., Tomankova, S., Abaffy, P., Kubista, M., & Sindelka, R. (2015). Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular Detection and Quantification*, 5(1), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.08.002>
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., & Goswami, A. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1(7), 65-80. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.680.3508&rep=rep1&type=pdf>
- Singh, K. P., Miaskowski, C., Dhruva, A. A., Flowers, E., & Kober, K. M. (2018). Mechanisms and Measurement of Changes in Gene Expression. *Biological Research For Nursing*, 20(4), 369-382. <https://doi.org/10.1177/1099800418772161>
- Singh, L., Bajaj, S., Gadewar, M., Verma, N., Ansari, M. N., Saeedan, A. S., Kaithwas, G., & Singh, M. (2021). Modulation of Host Immune Response Is an Alternative Strategy to Combat SARS-CoV-2 Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 12(660632), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660632>

- Soraci, L., Lattanzio, F., Soraci, G., Gambuzza, M. E., Pulvirenti, C., Cozza, A., Corsonello, A., Luciani, F., & Rezza, G. (2022). COVID-19 Vaccines: Current and Future Perspectives. *Vaccines*, *10*(4), 608-636. <https://doi.org/10.3390/vaccines10040608>
- Sternberg, A., & Naujokat, C. (2020). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sciences*, *257*(118056), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118056>
- Svingen, T., Letting, H., Hadrup, N., Hass, U., & Vinggaard, A. M. (2015). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*, *3*(e855), 1-15. <https://doi.org/10.7717/peerj.855>
- Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., & Wei, W. (2018). Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(642), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00642>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, *2*(2), 70-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, *36*(1), 579-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>
- Tao, L., & Reese, T. (2017). Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. *Trends in Immunology*, *38*(3), 13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.12.007>
- Taus, E., Hofmann, C., Ibarrodo, F. J., Hausner, M. A., Fulcher, J. A., Krogstad, P., Ferbas, K. G., Tobin, N. H., Rimoin, A. W., Aldrovandi, G. M., & Yang, O. O. (2022). Dominant CD8+ T Cell Nucleocapsid Targeting in SARS-CoV-2 Infection and Broad Spike Targeting From Vaccination. *Frontiers in Immunology*, *13*(835830), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835830>
- Tennant, P., Fermin, G., & Foster, J. (2018). *Viruses: Molecular Biology, Host Interactions, and Applications to Biotechnolog*. Elsevier.

https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=gyk0DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Viruses:+molecular+biology,+host+interactions,+and+applications+to+biotechnology&ots=5TCrtEBgqF&sig=bc1WzRKypqrTaiE5w0jZ0a5BPi4&redir_esc=y#v=onepage&q=Viruses%3A%20molecular%20biology%2C%20host%20interactions%2C%20and%20applications%20to%20biotechnology&f=false

Toor, S. M., Saleh, R., Sasidharan Nair, V., Taha, R. Z., & Elkord, E. (2021). T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology*, 162(1), 30-43.

<https://doi.org/10.1111/imm.13262>

Tripathi, N. K., & 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>

Tseng, C.-T., Sbrana, E., Iwata-Yoshikawa, N., Newman, P. C., Garron, T., Atmar, R. L., Peters, C. J., & Couch, R. B. (2012). Immunization with SARS Coronavirus Vaccines Leads to Pulmonary Immunopathology on Challenge with the SARS Virus. *PLoS ONE*, 7(4), e35421.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035421>

University of Wisconsin-Madison. (2021). *Requirements for COVID-19 research* (EHS-BIO-GUI-006-V06). Office of Biological Safety. <https://ehs.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/1408/2020/09/EHS-BIO-GUI-006-V06.pdf>

Van Dorp, L., Acman, M., Richard, D., Shaw, L. P., Ford, C. E., Ormond, L., Owen, C. J., Pang, J., Tan, C. C. S., Boshier, F. A. T., Ortiz, A. T., & Balloux, F. (2020). Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution*, 83(104351), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104351>

Vitale, I. (2017). Molecular Biology. En *Reference Module in Life Sciences* (p.

B9780128096338125000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12381->

- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vogel, A. B., Kanevsky, I., Che, Y., Swanson, K. A., Muik, A., Vormehr, M., Kranz, L. M., Walzer, K. C., Hein, S., Güler, A., Loschko, J., Maddur, M. S., Ota-Setlik, A., Tompkins, K., Cole, J., Lui, B. G., Ziegenhals, T., Plaschke, A., Eisel, D., ... Sahin, U. (2021). BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*, 592(7853), 283-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>
- Wang-Shick, R. (2017). *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15172-0>
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, 8(292), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- World Health Organization. (2022). *COVID-19 Weekly Epidemiological Update: Edition 102, published 27 July 2022*. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-july-2022>
- Wragg, K. M., Lee, W. S., Koutsakos, M., Tan, H.-X., Amarasena, T., Reynaldi, A., Gare, G., Konstandopoulos, P., Field, K. R., Esterbauer, R., Kent, H. E., Davenport, M. P., Wheatley, A. K., Kent, S. J., & Juno, J. A. (2022). Establishment and recall of SARS-CoV-2 spike epitope-specific CD4+ T cell memory. *Nature Immunology*, 23(5), 768-780. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01175-5>
- Xia, X. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*, 13(1), 109-125. <https://doi.org/10.3390/v13010109>

- Xu, R., Shi, M., Li, J., Song, P., & Li, N. (2020). Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(862), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00862>
- Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B., & Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(12), 2905-2912. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1820808>
- Yan, W., Zheng, Y., Zeng, X., He, B., & Cheng, W. (2022). Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1-26. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>
- Yang, H., & Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 685-700. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>
- Yoo, J.-S., Sasaki, M., Cho, S. X., Kasuga, Y., Zhu, B., Ouda, R., Orba, Y., de Figueiredo, P., Sawa, H., & Kobayashi, K. S. (2021). SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1-IRF1-NLRC5 axis. *Nature Communications*, 12(1), 6602. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26910-8>
- Young, S., Fenn, J., Arriero, E., Lowe, A., Poulin, B., MacColl, A. D. C., & Bradley, J. E. (2020). Relationships between immune gene expression and circulating cytokine levels in wild house mice. *Ecology and Evolution*, 10(24), 13860-13871. <https://doi.org/10.1002/ece3.6976>
- Yu, K. K. Q., Fischinger, S., Smith, M. T., Atyeo, C., Cizmeci, D., Wolf, C. R., Layton, E. D., Logue, J. K., Aguilar, M. S., Shuey, K., Loos, C., Yu, J., Franko, N., Choi, R. Y., Wald, A., Barouch, D. H., Koelle, D. M., Lauffenburger, D., Chu, H. Y., ... Seshadri, C. (2021). Comorbid illnesses are associated with altered adaptive immune responses to SARS-CoV-2. *JCI Insight*, 6(6), 146-242. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146242>

Zhang, Z., Shen, Q., & Chang, H. (2022). Vaccines for COVID-19: A Systematic Review of Immunogenicity, Current Development, and Future Prospects. *Frontiers in Immunology*, 13(1), 843-928. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.843928>

Zheng, C., Shao, W., Chen, X., Zhang, B., Wang, G., & Zhang, W. (2022). Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: A literature review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 114(1), 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.009>