



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
Unidad Zacatenco
Departamento de Biomedicina Molecular**

“Evaluación de la respuesta de anticuerpos en población mexicana infectada con SARS-CoV-2, convaleciente de COVID-19 y vacunado contra SARS-CoV-2”

Tesis

Que presenta
Martínez Frías Sandra Paola

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

En la especialidad de
Biomedicina molecular

Directora de Tesis
Doctora Leticia Cedillo Barrón

Asesores:
Dra. Carmen Sánchez Torres
Dr. Vianney Ortiz Navarrete
Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Agradecimientos

Al CONACYT por otorgarme la beca durante estos dos años de estudios de maestría.

A mi padre, por tanta fortaleza y amor. Ojalá algún día logre ser la mitad de lo que eres. A mi hermana, por todo su cariño y resiliencia y a mi hermanito, por ser el futuro cuyo brillo me ayudó a salir de la oscuridad. Gracias por comprenderme, amarme y protegerme.

A la Dra. Leticia Cedillo, por ser un ejemplo de lucha y a sus palabras tan oportunas sin las cuales seguramente estaría aún perdida en la tristeza.

Al doctor Julio, a quien jamás podré pagarle la calma que me ofrecía en el laboratorio, un refugio en la tempestad.

A Juve, por todo su apoyo y paciencia, pero principalmente por jamás juzgar; por devolverme la risa.

A Gio, mejor amigo no podría encontrar, gracias por sosegarme todos los días. Esas terapias de amistad nunca se podrán pagar.

A Arely, mi increíble amiga a distancia con quien podía desmoronarme en cada llamada y terminar reconstruida al terminar. ¡Aquí nadie se rinde!

A la Dra. Sandy, mi consejera de vida, mi alma gemela. Todo tu cariño y ternura los guardo en mi corazón.

A mis compañeros de generación ¡vaya que vivimos un momento histórico y sobrevivimos!

A mis compis Enrique y Dana, quienes nunca han dudado de mi y siempre me apoyaron, aunque creyeran que iba a bañar ratones y casi, ¡viste!

Y por supuesto señores, a todos los que durante esta pandemia estuvieron ahí, haciendo que el departamento de biomedicina fuera más que un lugar de trabajo. A Maru, por toda su entrega y disposición a ayudarnos; todo un ejemplo a seguir. A Froy por su amabilidad y tolerancia para conmigo. A Erick por ser tan buen profesor y amigo. A Carlos por ser realista y abrirme los ojos. A Mizael y Diana por su compañía y charlas. A Paola, por su comprensión y amabilidad.

A todo el colegio de profesores del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, en especial a los doctores que fueron unos guerreros y pusieron el ejemplo de como debíamos cuidarnos; ninguno de ellos enfermó. Por supuesto a mis asesores por aceptarme y tomarse el tiempo aún en un año de pandemia.

Gracias por cuidarse y cuidarnos, gracias por no perder la fe y gracias por seguir.

Dedicatoria

A mi madre, que amó la vida y ahora vuela junto a los pájaros.
A sus manos, que tenían el poder de convertir lo cotidiano en mágico.
Y a su corazón, que nos amó hasta su último latido.

Índice general

Abreviaturas	7
Resumen	8
Abstrac	10
Introducción	12
1. Epidemiología de la pandemia causada por SARS-CoV-2	15
2. La COVID-19	17
2.2 El virus de SARS-COV-2	19
2.2.1 Características de las proteínas estructurales	21
2.2.2 Ciclo de replicación	24
2.3 Infección por SARS-CoV-2	26
2.4 Inmunidad Innata	26
2.5 Inmunidad adaptativa	27
3. Anticuerpos contra SARS-Cov-2	30
3.1 Antígenos importantes en la inducción de la respuesta inmune	30
3.2 Diagnostico serológico	31
4. Vacunación contra SARS-Cov-2	31
4.1 Vacunación y respuesta humoral alterada	34
5. Justificación	35
6. Hipótesis	36
7. Objetivo general	36
7.1 Objetivos específicos	36
8. Material y métodos	37
9. Resultados obtenidos	51
10. Discusión	93
12. Conclusión	101
13. Referencias	102
14. Anexo	123
15. Firmas jurado, aprobación tesis	128

Lista de figuras

Figura 1. Representación de la estructura y de las proteínas estructurales del virus SARS-CoV-2	20
Figura 2. Organización del genoma viral de SARS-CoV-2	21
Figura 3. Proteína de espiga del SARS-CoV-2	22
Figura 4. Mecanismo de replicación del coronavirus SARS-CoV-2	25
Figura 5. Vacunas contra COVID-19 y las plataformas que se emplean para su desarrollo	33
Figura 6. Sensibilización de placas a diferentes concentraciones de antígeno y diferentes diluciones de sueros	43
Figura 7. Representación del diseño de las placas con curva de concentración	46
Figura 8. Análisis de las proteínas recombinantes S1, RBD y N producidas en el sistema de expresión Expi293	52
Figura 9. Las proteínas recombinantes S1, RBD, N son reconocidas por los anticuerpos generados tras una infección natural por SARS-CoV-2	54
Figura 10. Diseño de ELISA indirecta IgG anti RBD, Para ello se uso la concentración óptima de antígeno para sensibilización de placa y la dilución de sueros	56
Figura 11. Curva ROC ELISA indirecta y gráfico de dispersión de sueros verdaderos positivos y verdaderos negativos	58
Figura 12. Dinámica de anticuerpos IgG anti S1, N y RBD en pacientes con COVID-19 hospitalizados y convalecientes de COVID-19 leve	63
Figura 13. Contracción de anticuerpos IgG anti RBD similar en los pacientes graves independientemente del sexo y mayor en mujeres convalecientes de COVID-19	66
Figura 14. Niveles de anticuerpos similares en el grupo con COVID-19 grave y diferentes en los pacientes convalecientes de COVID-19 leve dependiendo el grupo de edad	69
Figura 15. Pacientes con COVID-19 grave y obesidad presentan niveles inferiores de anticuerpos IgG anti RBD, así como los convalecientes con un IMC elevado	72
Figura 16. El esquema Pfizer muestra niveles de anticuerpos IgG anti RBD superiores en comparación con otros esquemas	74
Figura 17. Decaimiento de la respuesta humoral post vacunación con los esquemas Pfizer y Cansino	79
Figura 18. El sexo y la variación de la respuesta humoral post vacunación	84
Figura 19. La edad como factor negativo en la generación de anticuerpos difiere dependiendo el tipo de vacuna, Pfizer y Cansino	88
Figura 20. La obesidad como factor asociado en los niveles de anticuerpos generados en hombres y mujeres vacunados con Pfizer o Cansino	92

Abreviaturas

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

COVID-19- enfermedad por ARS-CoV-2

OMS- Organización mundial de la salud

S1- Subdominio S1 de proteína de espiga de SARS-CoV-2

RBD- Dominio de unión a receptor por sus siglas en ingles

N- Nucleoproteína de virus SARS-CoV-2

ACE2- Enzima convertidora de angiotensina 2

WB- Western Blot

ELISA- Enzimoinmunoanálisis de adsorción

IMC-índice de masa corporal

DM- Diabetes mellitus

Resumen

SARS-CoV-2 es el virus causante de la pandemia de COVID-19. Esta enfermedad cursa con formas clínicas leves hasta muy graves, caracterizada por presentar fiebre, tos seca, cefalea, odinofagia, malestar generalizado, fatiga y dificultad respiratoria. A lo largo de esta pandemia causada por el SARS-CoV-2, en todo el mundo una de las prioridades ha sido elaborar pruebas para el diagnóstico.

Este nuevo coronavirus patógeno se ha dispersado en casi todos los continentes y ha afectado a todos los sistemas de salud incluidos los de primer mundo quienes están por presenciar la quinta ola de la pandemia.

En México, a casi dos años del inicio de la pandemia se ha reportado un total de 3.85 millones de casos y 292 mil defunciones. Figurando como el 7mo país a nivel Latinoamérica con mayor mortalidad por COVID-19. México implementó las pruebas moleculares RT-PCR para el diagnóstico y confirmación de los infectados con el nuevo coronavirus. Sin embargo una de las limitantes de este modelo es la ventana de utilidad. La necesidad de pruebas serológicas con una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 continúa siendo una necesidad urgente para conocer el número de casos reales de COVID-19 a nivel mundial y nacional. La mayoría de las pruebas serológicas desarrolladas internacionales son de tipo semi cuantitativo por lo que presentan algunas limitantes, desde la estandarización y establecimiento de punto de corte, hasta no poder comparar los resultados con otras pruebas semi- cuantitativas.

Nuestro grupo de trabajo evaluó la utilidad de los antígenos recombinantes S1, N y RBD para una prueba serológica ELISA casera. Los antígenos se expresaron y purificaron de manera muy eficiente. Se logró su caracterización e identificación y posteriormente se usaron para diseñar y validar la prueba casera ELISA cuantitativa indirecta.

Con esta prueba se evaluaron los niveles de anticuerpos en pacientes con COVID-19 grave y voluntarios convalecientes de COVID-19 leve. Nuestros análisis arrojaron niveles de IgG anti S1-S2 y N superiores a

RBD en enfermos graves de COVID-19, de los cuales, los pacientes hombres, con edades mayores a 40 años y con obesidad presentaron los niveles mas altos. Mientras que para el caso de los voluntarios convalecientes de la COVID-19 leve, la concentración fue mayor en mujeres con un IMC normal y con edades mayores a 40 años.

Una vez que se iniciaron las campañas de vacunación en nuestro país evaluamos a dos pequeños grupos que recibieron un esquema de vacunación con tecnología mRNA (Pfizer) y el otro con tecnología de vectores recombinantes (Cansino). Los individuos vacunados presentaron una respuesta de IgG anti RBD 3 veces mayor que el grupo de individuos recuperados de una infección leve de COVID-19. Se evidenció la prevalencia de anticuerpos anti RBD aún después de 6 meses posteriores a la vacunación con Pfizer.

La población vacunada mostró que la concentración de anticuerpos que siempre fue superior en el grupo que recibió las vacunas de Pfizer comparado con el grupo que recibió la vacuna Cansino. Se identificaron algunas tendencias como que las mujeres presentan niveles superiores de anticuerpos, que la edad podría influir en los niveles de anticuerpos si la vacuna aplicada es Cansino y que para ambas vacunas la concentración mayor se obtiene en el grupo etario mayor a 40 años.

De manera individual se analizaron a los voluntarios vacunados que habían tenido COVID-19 antes de la vacunación, lo que mostró la importancia de la vacunación aun después de haber sufrido la enfermedad.

Se concluye que Implementar esta prueba a nivel nacional revelará la persistencia de los anticuerpos en pacientes recuperados y en pacientes vacunados y que la comparación de las vacunas mediante serología no tiene el fin de elegir esquemas únicos para ser aplicados en nuestra población más bien, este estudio pretenden ayudan a conocer la influencia de factores intrínsecos de nuestra población relacionados con generación de anticuerpos para conocer la población de riesgo que podría requerir una vacunación de refuerzo.

Abstract

SARS-CoV-2 is the virus that causes the COVID-19 pandemic. This disease presents with mild to very serious clinical forms, characterized by fever, dry cough, headache, odynophagia, general malaise, fatigue and respiratory distress. Throughout this SARS-CoV-2 pandemic, one of the world's priorities has been to develop diagnostic tests.

This new pathogenic coronavirus has spread in almost all continents and has affected all health systems including those in the first world who are about to witness the fifth wave of the pandemic.

In Mexico, almost two years after the start of the pandemic, a total of 3.85 million cases and 292 thousand deaths have been reported. Appearing as the 7th country in Latin America with the highest mortality from COVID-19. Mexico implemented molecular RT-PCR tests for the diagnosis and confirmation of those infected with the new coronavirus. However, one of the limitations of this model is the utility window. The need for serological tests with high sensitivity and specificity for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 continues to be an urgent need to know the number of real cases of COVID-19 globally and nationally. Most of the serological tests developed internationally are semi-quantitative and therefore present some limitations, from standardization and establishment of cut-off points, to not being able to compare the results with other semi-quantitative tests.

Our working group evaluated the usefulness of the recombinant antigens S1, N and RBD for a home ELISA serological test. The antigens were expressed and purified very efficiently. Their characterization and identification were achieved and were subsequently used to design and validate the indirect quantitative ELISA home test.

With this test, antibody levels were evaluated in patients with severe COVID-19 and volunteers convalescing from mild COVID-19. Our analyzes yielded anti S1-S2 and N IgG levels higher than RBD in seriously ill patients with COVID-19, of which male patients, aged over 40 years and with obesity, had the highest levels. While in the case of

volunteers convalescing from mild COVID-19, the concentration was higher in women with a normal BMI and aged over 40 years.

Once the vaccination campaigns began in our country, we evaluated two small groups that received a vaccination scheme with mRNA technology (Pfizer) and the other with recombinant vector technology (Cansino). Vaccinated individuals presented an anti-RBD IgG response 3 times greater than the group of individuals recovered from a mild COVID-19 infection. The prevalence of anti-RBD antibodies was evidenced even 6 months after vaccination with Pfizer.

The vaccinated population showed that the antibody concentration was always higher in the group that received the Pfizer vaccines compared to the group that received the Cansino vaccine. Some trends were identified such as that women present higher levels of antibodies, that age could influence the levels of antibodies if the vaccine applied is Cansino and that for both vaccines the highest concentration is obtained in the age group over 40 years.

The vaccinated volunteers who had had COVID-19 before vaccination were individually analyzed, which showed the importance of vaccination even after having suffered the disease.

It is concluded that Implementing this test at the national level will reveal the persistence of antibodies in recovered patients and in vaccinated patients and that the comparison of vaccines through serology does not have the purpose of choosing unique schemes to be applied in our population, rather, this study They are intended to help determine the influence of intrinsic factors in our population related to the generation of antibodies to determine the population at risk that may require a booster vaccination.

Introducción

A finales del año 2019 se identificó un nuevo coronavirus, con capacidad patogénica para el ser humano, en la región de Wuhan China causante de un brote de neumonía atípica que escaló a nivel internacional convirtiéndose en el agente de la pandemia del 2020. [1] El comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en ingles) le dio a este nuevo coronavirus el nombre de SARS-CoV-2 por su relación con otro coronavirus con capacidad patogénica en humanos que fue causante de la epidemia del 2002-2003 en la región del sur de China. [2-4]

SARS-Cov-2 es el agente causal de la denominada enfermedad por coronavirus 2019, COVID-19, nombre que se le dio en febrero del 2020 por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS). [1] La enfermedad se caracteriza por presentarse como una neumonía atípica con rápida progresión a un síndrome de dificultad respiratoria en un 30% de los casos. Al inicio de la enfermedad pueden o no presentarse síntomas prodrómicos como fiebre, tos seca y agotamiento.[5] [6]

El daño causado por SARS-CoV-2 se ha asociado a su preferencia tisular la cual está dada por los receptores y correceptores que le permiten la entrada a nivel celular y por tanto la posibilidad de infectar los tejidos.

El virus SARS-CoV-2 utiliza al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2) para su entrada a la célula. Este receptor se encuentra enriquecido en el tejido pulmonar, principalmente a nivel alveolar pero su distribución es casi a nivel de todos los tejidos humanos. Además del receptor ACE-2 es necesario un correceptor denominado TMPRSS2 el cual escinde a la proteína de espiga y permite que el subdominio S1 interactúe con el receptor de entrada, ACE-2. La presencia de ACE-2 y su correceptor en las células permiten una infección eficiente y la propagación en los órganos con mayor expresión del receptor específico como en el caso de corneas, cavidad nasal, pulmones, corazón e intestino. [7][8]

Al igual que SARS-CoV, este nuevo coronavirus expone en su superficie 3 de las 4 proteínas estructurales que codifica su RNA. Las proteínas de membrana y envoltura son las más conservadas entre estos dos coronavirus mientras que la proteína de espiga es la más variable y más inmunogénica.

Al inicio de la pandemia en nuestro país al igual que en el resto del mundo se ocuparon las pruebas RT-PCR para el diagnóstico, sin embargo, existió una limitación en su uso por la disponibilidad internacional y los costos en ese momento. Como cualquier prueba diagnóstica, la RT-PCR está limitada en la sensibilidad y especificidad por una ventana de tiempo. El tiempo óptimo para realizar la prueba es a los 5-8 días posteriores de haberse infectado, después de los cuales la sensibilidad y especificidad van en decremento y podrían dar falsos negativos. [9] Dado que un 80% de la población que sufre la COVID-19 tiene una presentación asintomática o leve, el diagnóstico del número real de infectados se ve sesgado al no ser evidente la enfermedad y al emplear pruebas RT-PCR en una ventana de tiempo inadecuada. [10] Estos sesgos fueron esperados y considerados en el inicio de la pandemia, por lo cual los estudios epidemiológicos poblacionales se consideraron de importancia para los reportes internacionales. Para estos estudios se usan pruebas serológicas que reflejan de manera más realista el número de casos de COVID-19. Las pruebas serológicas para COVID-19, de manera general, se basan en la detección de anticuerpos generados posterior a la infección y tiene una ventana de utilidad que va de los 8 días posteriores al inicio de los síntomas hasta un promedio de 6 meses. [11–13]

La pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2 continúa siendo una emergencia sanitaria a nivel global. Con la reciente aparición de nuevas variantes del coronavirus circulando en al menos 36 países, incluyendo México, los esfuerzos para combatir su diseminación siguen siendo prioritarios para más de 200 países. [14–16] Para el control del número de casos en la pandemia se requirió de medidas efectivas de prevención de infecciones en grupos vulnerables como

los mayores de 60 años, mujeres embarazadas y pacientes con enfermedades crónicas. Las pruebas serológicas fueron y continúan siendo una herramienta indispensable para la identificación de la población con mayor riesgo de COVID-19. Además de las medidas preventivas se necesita continuar con los programas de vacunación masiva de la población.

Los estudios de seroconversión permiten conocer la incidencia real de la enfermedad por SARS-CoV-2, además de la evaluación de la respuesta humoral inducida por la vacunación. En los países estos estudios permitirán detectar grupos de población de riesgo y para el caso particular de México; donde se han aplicado 8 diferentes vacunas a la población mexicana; el conocimiento del estado humoral de la población nos permitirá detectar grupos que podrían necesitar un refuerzo de vacunación siguiendo el ejemplo de otros países. [17][18][19] [1] [2]

La necesidad de pruebas serológica con una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 continúa siendo una necesidad urgente para conocer el número de casos reales de COVID-19 a nivel mundial y nacional. Ahora que la vacuna se ha aplicado en casi todos los países, el uso de pruebas serológicas comerciales basadas en la detección de anticuerpos contra la proteína de espiga para la confirmación diagnóstica de infección por SARS-CoV-2 no es muy útil. La implementación de otras proteínas estructurales inmunogénicas, como la nucleoproteína, permiten la detección de los anticuerpos generados durante una infección natural y dado que en este momento ninguna de las vacunas aprobadas para uso de emergencia emplea este antígeno, también es posible evaluar a la población vacunada. Actualmente se considera necesario implementar otros ensayos con un espectro mayor de antígenos de SARS-Cov-2 que confieran por tanto una utilidad mayor sobre pruebas serológicas comerciales, al poder usarlas no solo para el diagnóstico de confirmación de la enfermedad, sino para la

evaluación de la inmunidad humoral generada posterior a un esquema de vacunación. [20] [19][18]

La subestimación de casos de COVID-19 en México es una de las limitaciones observadas en los sistemas de vigilancia epidemiológica; hospitalaria y centinela; aplicados por la mayoría de los países con recursos y economía limitada como México y América Latina. En contraste, países como Corea del Sur que emplearon estudios masivos de seroprevalencia desde un inicio, han estado reportando sus resultados y recientemente países europeos han arrojado sus primeros resultados a más de un año de la pandemia; por lo que, la experiencia y la evidencia científica de los países que han tenido éxito para controlar la diseminación de la pandemia, nos conmina a tomar medidas preventivas lo antes posible. [3] [4]

Bajo la evidencia de que la prevalencia estimada en otros países es insuficiente para lograr una inmunidad de grupo, [5] [6] [7] la evaluación de la inmunidad humoral generada posterior a una infección natural por SARS-CoV-2 o posterior a la vacunación o ambas en la población ayudaría a conocer el comportamiento y anticipar la respuesta humoral, predecir el pronóstico de la enfermedad y con ello mejorar la toma de decisiones para la prevención de la infección con nuevas variantes, al permitirnos conocer los grupos de riesgo que podrían necesitar un refuerzo de vacuna, como en el caso de países como EUA. [21–23] [3]

1. Epidemiología de la pandemia causada por SARS-CoV-2

La enfermedad de coronavirus 19 (COVID-19) causada por el nuevo coronavirus, nombrado SARS-CoV-2 continúa siendo una emergencia sanitaria de carácter internacional a más de 20 meses de haberse declarado la pandemia. A nivel global se han reportado un total de 255 millones de casos confirmados y un total de 5,12 millones de defunciones. [24–26]

En el continente americano el primer caso se reportó el 21 de enero en USA, más tarde, el 26 de febrero se detectó el primer caso en Brasil y tardó menos de un mes en dispersarse la COVID-19. En abril del 2021

la región del Norte de América empezó a ver sus primeros brotes importante, mientras que en América Latina se observó un aumento en el número de casos confirmados por sus respectivos gobiernos. Se ha asumido en casi todos los países de América Latina que el aumento rápido de contagios y muertes es resultado de una transmisión comunitaria.

El primero de septiembre la organización panamericana de la salud (PAHO) declaró al continente americano como la región con mayor número de muertes por COVID-19 en todo el mundo. Con un 64% de nuevas muertes en los meses de abril y mayo, México figuró como el 4to país responsable de las nuevas muertes. [8] Actualmente nos encontramos fuera del grupo de los 10 principales países con mayor número de casos.

Se siguen sumando casos y defunciones que generan la preocupación de los gobiernos y sistemas de salud a nivel internacional. México ha reportado hasta el momento (18.11.2021) 3.85 millones de casos y 292 mil defunciones, encontrándose en el fin de la denominada tercera ola de la pandemia. [25–27]

Pese a todos los esfuerzos en el desarrollo, producción y distribución de las diferentes vacunas aprobadas de emergencia contra el nuevo coronavirus a nivel internacional, el control de la pandemia continúa siendo un reto mundial por las variantes del virus y la efectividad de las vacunas frente a estas.[28–30]

Ahora que estamos a la mitad del segundo año de la pandemia los modelos estadísticos que predecían una inmunidad de rebaño han quedado en el olvido al considerar factores como la distribución y aceptación de las vacunas, la aparición de nuevas variantes y el lento desarrollo de las vacunas para la población infantil. [31]

El estudio de la respuesta humoral inducida por la vacunación cobra interés ahora que existe más de un esquema de vacunación que ofrece protección contra la forma grave y severa de la COVID-19. Dentro de las preguntas más recurrentes en el ámbito científico y médico se encuentran las relacionadas con el nivel de anticuerpos inducidos por la vacunación y la duración de estos anticuerpos. Fue

hasta principios de este año 2021 cuando se reportó que las variantes del SARS-CoV-2 pueden escapar” de los anticuerpos en personas recuperadas de COVID-19 e incluso en personas con esquemas de vacunación completo. [32–36] Sin embargo, los números reportados de nuestro país podrían no reflejar la verdadera transmisión del virus, dadas algunas limitaciones de los sistemas de vigilancia epidemiológica implementados en México, de manera puntual, al no considerar a los pacientes que cursan como asintomáticos por lo que las pruebas serológicas confirman su importancia. La evaluación de la seroconversión es una estrategia que se ha implementado en muchos países del mundo y ha sido sugerida reiteradamente en varias ocasiones por el director de la OMS para poder observar, además de la prevalencia a nivel nacional, la dinámica de la respuesta inmunológica humoral contra el coronavirus SARS-CoV-2. [37] Para el caso de Nueva Zelanda, el primer reporte de infección por la nueva variante, Delta, dio pie a una estrategia epidemiológica basada en el cierre de fronteras y cese de actividades en todo el país, durante 3 días; después de los cuales se realizaron pruebas moleculares y serológicas a los casos cercanos del paciente infectado y tras la confirmación de la ausencia de nuevas infecciones se reactivaron las actividades.[31]

2. La COVID-19

La OMS le dio el nombre de La COVID-19 a la enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2. El acrónimo está formado por las palabras en inglés de Coronavirus Disease of 2019. [37]

La enfermedad causada por este virus puede presentarse de dos formas, asintomática o subclínica y sintomática; conforme se fue conociendo más sobre la COVID-19 se observó y clasificó como COVID de larga duración a la persistencia por más de seis meses de síntomas y/o alteraciones en pacientes recuperados de una enfermedad asintomática o sintomática; dadas estas implicaciones es necesario realizar más estudios ya que será un parte aguas para la salud pública futura. [38–42]

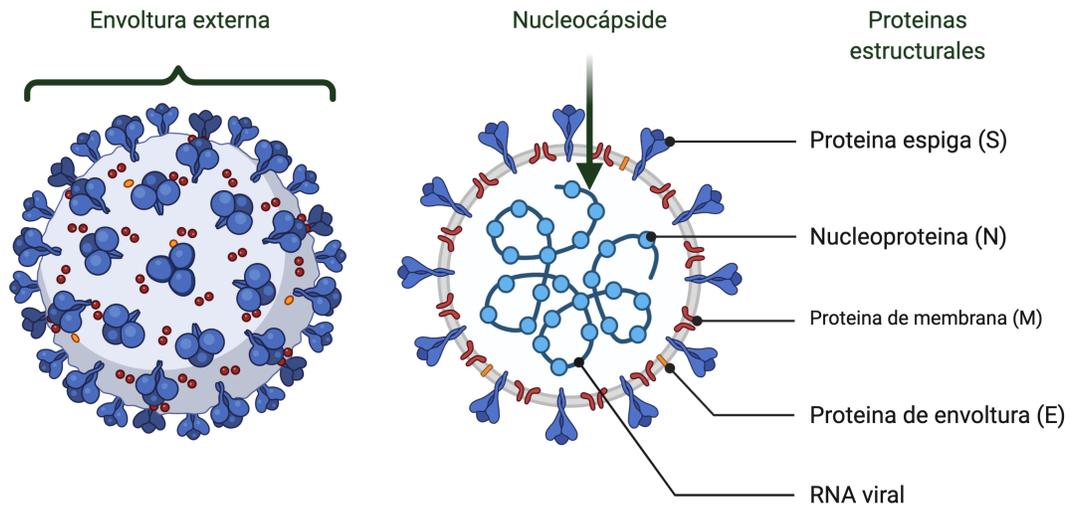
En la población mexicana los signos y síntomas más comunes reportados son fiebre, tos seca y cansancio. [43] Solo el 6% de la población con síntomas requiere de hospitalización. El estudio de la población mexicana hospitalizada evidencio factores asociados a la gravedad de la enfermedad entre ellos destacaron las comorbilidades como diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA) y obesidad. [44,45] Se ha reportado a nivel internacional que los pacientes que cursan con enfermedades metabólicas como la diabetes, obesidad o enfermedades cardiacas tienen dos veces más riesgo de presentar COVID-19 grave. [44,46,47] Tanto las enfermedades metabólicas como el tabaquismo han sido considerados como riesgos de susceptibilidad para la enfermedad viral. [48–50] Recientemente se han detectado predisposiciones genéticas para desarrollar la forma grave de la enfermedad como las mutaciones en los receptores TLR 3, 7, 9 lo que genera una respuesta de interferón deficiente y con ello una respuesta antiviral anómala. [51–53]

En cuanto a la obesidad y la hipertensión se ha estudiado la relación entre un incremento en los receptores ACE-2. Interesantemente la obesidad esta relacionada con la presencia de receptores ACE-2 en el tejido adiposo; en contraste, en las personas con hipertensión los receptores ACE-2 se encuentran elevados en órganos como pulmón, corazón y riñón; por lo que la tienen mayor susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2. Esto es un dato muy alarmante para la salud pública en México pues el 75% de la población mayor de 20 años padece sobrepeso u obesidad y las enfermedades como HTA representan el 35% de las patologías cardiacas en México. También se han hecho estudios donde se asocia al índice de masa corporal (IMC) con una respuesta inmune deficiente en enfermedad como influenza o hepatitis, así como una pobre respuesta humoral generada tras la vacunación contra estas dos infecciones. Por todo lo anterior México representa a una población de riesgo para desarrollar la COVID-19 grave y una mala respuesta a la vacunación.[49,53–59]

2.2 El virus de SARS-COV-2

Los coronavirus son una familia amplia de virus que desde los años 60's se conoce su capacidad de causar diversas infecciones en el ser humano, que van desde resfriados comunes hasta enfermedades más graves como en el caso de los coronavirus causantes del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) y el causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). La pandemia actual es causada por un nuevo coronavirus SARS-CoV-2; el cual pertenece a la familia Coronaviridae y al género beta coronavirus. Es un virus RNA envuelto, con un diámetro de 60 a 140 nm que expresa 3 de sus 4 proteínas estructurales, en su superficie; las proteínas de espiga, membrana y envoltura. Y en su interior se encuentra la nucleoproteína asociada al genoma viral. SARS-CoV-2 al igual que MERS y SARS-CoV, tiene la capacidad de provocar enfermedades potencialmente mortales en los seres humanos. [60–62]

El genoma de SARS-CoV2 es un RNA monocatenario, de sentido positivo de 26 a 32 kb. Estructuralmente el virus tiene un diámetro de 60 a 140 nanómetros, y una forma redonda u ovalada. Pueden distinguirse dos estructuras: la nucleocápside en donde el material genético se asocia con la nucleoproteína estructural (proteína N) y la envoltura externa conformada por una bicapa lipídica con las proteínas estructurales de espiga (S), membrana (M), envoltura (E), y algunas proteínas accesorias (Figura 1). [60,63]

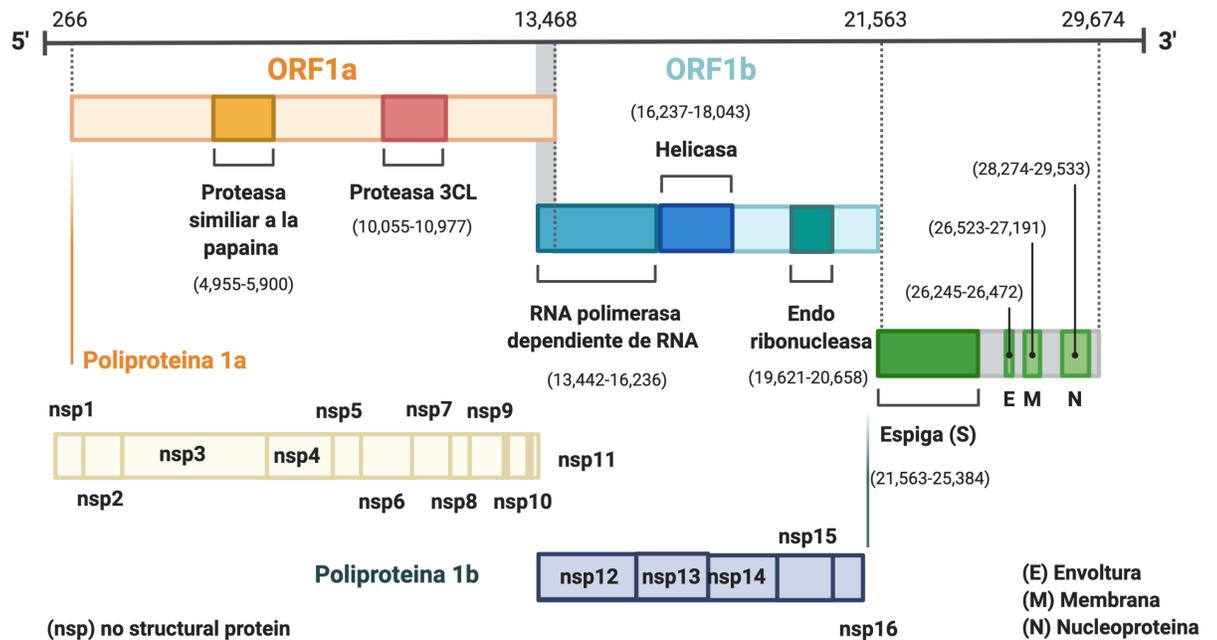


Created with BioRender.com

Figura 1. Representación de la estructura y de las proteínas estructurales del virus SARS-CoV-2.

La envoltura externa esta conformada por una bicapa lipídica y las proteínas de envoltura, espiga, y membrana. Internamente se encuentra la nucleocápside conformada por el genoma viral y la proteína estructural, nucleoproteína.

La organización del genoma viral puede dividirse en tercios; en donde el primer tercio codifica para el gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA también llamada replicasa viral. En esta región se presentan dos marcos de lectura abiertos denominados ORF1a y ORF1b los cuales son traducidos de a dos poliproteínas denominadas pp1a y pp1b respectivamente. La poliproteína pp1a da origen a 11 proteínas no estructurales (nsp's por sus siglas en ingles) mientras que la pp1b da origen a 5 nsp que están implicadas en la replicación del genoma viral y en la transcripción de RNA subgenómico. [60] Las proteínas estructurales de espiga, envoltura y membrana están codificadas en los genes del ultimo tercio del genoma viral y comparten funciones similares con los otros coronavirus (Figura 2). Gracias a los estudios previos de inmunogenicidad de otras epidemias causadas por coronavirus patogénicos, sabemos que las proteínas S y N son las mas inmunogénicas.



Created with BioRender.com

Figura 2. Organización del genoma viral de SARS-CoV-2. 5´-secuencia líder-región no codificante UTR-Replicasa viral-Espiga-Envoltura-Membrana-Nucleoproteína-3´UTR-poli(A). Los dos primeros tercios del genoma viral codifican para la replicada viral y además para dos poliproteínas pp1a y pp1b que dan origen a 16 proteínas no estructurales (nsp). El último tercio del genoma además de codificar para las 4 proteínas estructurales tiene intercalados genes de proteínas accesorias. Imagen tomada y modificada de Biorender nombre original: "Genómico organization of SARS-CoV-2".

2.2.1 Características de las proteínas estructurales

La **proteína de espiga (S)** es una glicoproteína poli funcional que adquiere una conformación trimérica. Cada monómero pesa 180 kDa y presenta dos dominios S1 y S2. El sub dominio S1 contiene al dominio de unión a receptor (RBD por sus siglas en inglés) mientras que el subdominio S2 contiene al péptido de fusión. [63] La proteína S es la proteína más grande del virus y al igual que las proteínas de membrana M y de envoltura E se encuentra en la superficie viral.

El primer paso del ingreso de SARS-CoV2 a la célula blanco está dado por la interacción de la proteína S y el receptor ACE2, pero la proteína S debe ser activada a través de la escisión proteolítica ejecutada por una o varias proteasas del huésped, proteasa de la serina transmembrana-2 (TMPRSS-2) o proteasas serina like. [64] Esta

proteasa genera una escisión que deja expuesta a la subunidad S1 de la proteína de espiga, lo cual permite a su vez la exposición del dominio RBD.

La proteína de espiga tiene una divergencia del 75% con el SARS-CoV y una divergencia aun mayor con otros coronavirus que infectan humanos. SARS-CoV-2 y SARS-CoV, sin embargo, ambos virus interactúan con ACE2 para ingresar las células huésped. En contraste los análisis comparativos la subunidad S2 de SARS-CoV2 y otros coronavirus humanos son más conservados siendo parcialmente responsable, de la reactividad cruzada observada en los ensayos que detectan la proteína S completa. Por el contrario, el grado de similitud de la subunidad S1; en particular del domino RBD; solo lo comparte con SARS-CoV y no así con otros coronavirus humanos como MERS-CoV, lo que posiciona a S1 como un antígeno candidato con buena especificidad en los ensayos inmunológicos de diagnóstico contra SARS-CoV-2 (Figura 3). [60,65]

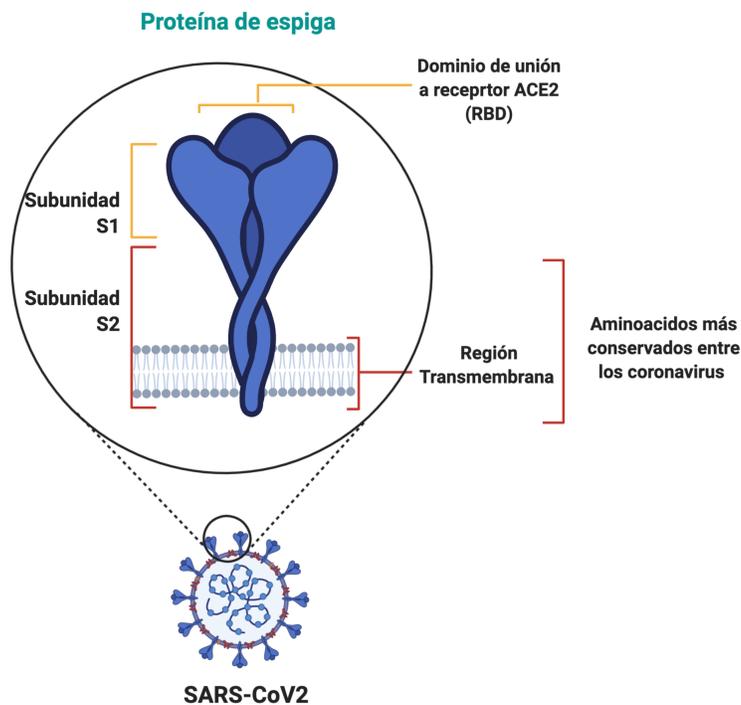


Figura 3. Proteína de espiga del SARS-CoV-2.

Representación de la proteína trimérica S con sus subunidades S1 y S2. El dominio de unión al receptor se encuentra en la subunidad S1 y es uno de los menos conservados en los coronavirus humanos. La subunidad encargada de la fusión de membranas, S2 es de las más conservada entre los coronavirus humanos.

La proteína de membrana es la responsable de la curvatura de la membrana viral y la unión con la nucleocápside dada su conformación dimérica. En SARS-CoV esta proteína tiene una alta capacidad inmunogénica. [66]

La proteína de envoltura es de tipo transmembrana, tiene una actividad de canal iónico, durante el ciclo de replicación, se expresa de manera abundante, aunque solo un porcentaje pequeño se incorpora a la envoltura del virus, diversos autores reportan que sin la secuencia que codifica para el gen de la proteína E el título viral se abate, lo que evidencia la importancia de esta proteína en la maduración viral. [66]

La nucleoproteína es una molécula que interacciona con el genoma viral para protegerlo formando la nucleocápside, es la única proteína que se encuentra libre en el citoplasma al infectar las células y toma una conformación de dímero con peso estimado de 114.5 kDa. [67] La proteína N es una de las más inmunogénica durante la infección por otros coronavirus patogénicos y no patogénicos. [68] Presenta dos dominios de unión a ARN; el dominio N terminal y el dominio C terminal; ambos están unidos por una región pobremente estructurada a temperatura ambiente. La región N terminal esta altamente fosforilada y el dominio C terminal de esta proteína se auto ensambla para quedar como dímero. La nucleoproteína adquiere una conformación dimérica cuando se purifica y presenta una estructura más estable a 55°C. El análisis de homología de la proteína N de SARS.CoV2 con otros coronavirus humanos como MERS muestra una identidad de 90% y de 28–49% con otra beta coronavirus. [66] Esta proteína induce una respuesta inmune humoral y celular robusta al igual que la proteína S.

Ambas proteínas virales, S y N, se consideran los principales inmunógenos y son utilizados ampliamente en inmunoensayos. [69,70] Diversos autores han evidenciado la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína N en etapas iniciales a la infección, razón por la que su evaluación y su uso en estudios longitudinales

durante la infección permite comprender mejor la enfermedad de COVID-19 y diseñar biológicos para el diagnóstico. [71,72]

Con respecto a las proteínas no estructurales, en la tabla 1 se resumen algunas de las funciones. [72–75]

Tabla 1. Función de algunas de las proteínas no estructurales del SARS-CoV-2.

Nombre de la proteína	Abreviación	Función
Proteasa similar a la papaína	nsp3	Componente más grande y esencial del complejo de replicación y transcripción viral. Por su función de proteasa, escinde a las nsp 1-3. Bloquea la respuesta inmune innata mediante su ADP-des-ribosilación y des-ubiquitinación. [76]
	nsp4	Esta proteína participa en la formación de vesículas de doble membrana. [77,78]
Proteasa similar a la quimiotripsina	Proteasa 3CL	Componente esencial en la replicación del RNA viral, ya que procesa el extremo carboxilo terminal de nsp4 a nsp16.
	nsp6	Formación de vesículas de doble membrana. [77]
	nsp7	Junto con nsp8 forman un complejo RNA polimerasa para la replicación y extensión del cebador.
RNA polimerasa	nsp8	RNA polimerasa primasa, puede iniciar la replicación de Novo sin necesidad de un cebador.
RNA polimerasa dependiente de RNA	nsp12	RNA polimerasa dependiente de cebador.

2.2.2 Ciclo de replicación

Tanto el tropismo celular y tisular, como la patogénesis, están controlados el gran parte por las interacciones entre la glicoproteína S y el receptor de la célula huésped. Investigaciones recientes mostraron que el receptor ACE2 se encuentra en casi todas las células del organismo, pero en una mayor proporción en los tejidos del sistema respiratorio; particularmente en las células alveolares tipo 2; sistema vascular, gastrointestinal y renal.

El virus SARS-Cov-2 ingresa a las células mediante la interacción del dominio RBD; localizado en la subunidad S1 de la glicoproteína S; con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La escisión y la activación proteolítica de la proteína S tienen un papel esencial. La activación puede producirse por diferentes tipos de proteasas del huésped lo que incluye a TMPRSS ya mencionado arriba. [79,80] Una vez que la proteína S es escindida y la subunidad S2 es activada, S adquiere una conformación post fusión que permite

la fusión de la membrana de la célula huésped con el virus. [79] La entrada del virus puede llevarse a cabo por endocitosis y por vía no endosómica, la primera depende de la clatrina y la última es independiente de clatrina y caveolinas. La fusión de las membranas tiene como resultado la liberación del genoma viral al citoplasma celular. [81]

El genoma viral RNA al ser de sentido positivo, es traducido en dos poliproteínas que dan lugar a 16 proteínas no estructurales que conforman el complejo de replicación viral. Este complejo sintetiza una copia complementaria de la cadena de RNA, como molde para la replicación viral mediante la generación de RNA subgenómico. Posteriormente los RNA's subgenómicos se traducen en las proteínas estructurales y accesorias.

Una vez sintetizadas las proteínas estructurales espiga S, envoltura E, membrana M en el retículo endoplásmico (ER endoplasmic reticulum) estas pasan al compartimento intermedio del ER y Golgi (ERGIC endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment). La proteína N; única que se encuentra libre en el citoplasma; se asocia con la copia del genoma viral recién sintetizado en el citoplasma y prosigue a asociarse con las demás proteínas estructurales en el ERGIC para formar el virión. El virión madura en los endosomas y el proceso de replicación finaliza cuando las partículas virales son liberadas al espacio extracelular por exocitosis (Figura 3). [61,64,75,82]

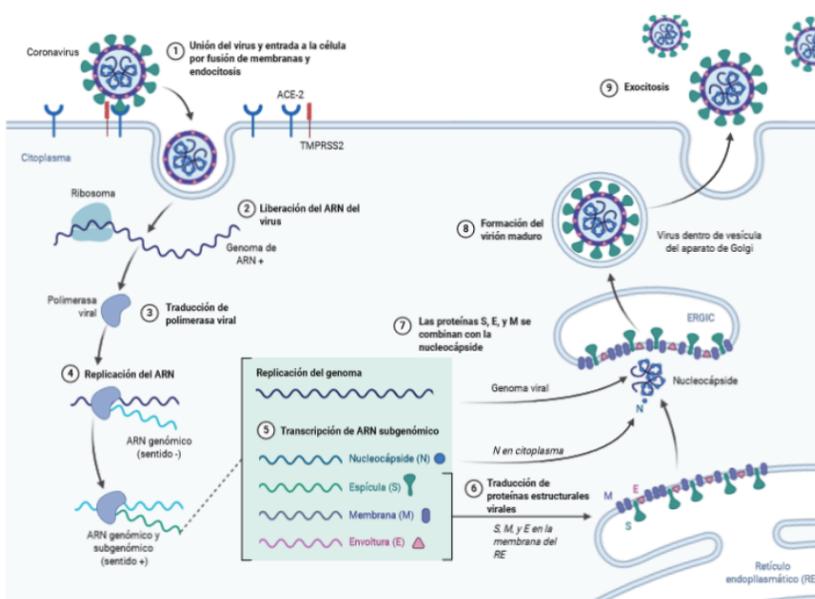


Figura 4. Mecanismo de replicación del coronavirus SARS-CoV-2. (1) Ingreso a la célula huésped que expresa el receptor ACE2 y la proteasa TMPRSS. La unión de la proteína de

espiga del virus con el receptor da paso a la endocitosis. (2) Fusión de las membranas viral y endosómica y liberación del genoma viral en el citoplasma celular. (3) Traducción de las poliproteínas y de la polimerasa viral dependiente de RNA. (4-5) Replicación del RNA genómico y subgenómico. (6-7) Traducción de las proteínas estructurales. N interactúa en el citoplasma con el RNA viral naciente y adquiere la conformación de nucleocápside; S, M y E pasan del retículo endoplásmico (ER) al compartimento intermedio ER y Golgi (ERGIC) donde interactúan con la nucleocápside para formar el virión. (8) El virión maduro es excitado al espacio extracelular.

Imagen tomada y modificada de Cascella M., et al. Nombre original "evaluation and treatment coronavirus (COVID-19).

2.3 Infección por SARS-CoV-2

Actualmente se conoce más acerca de la fisiopatología de la COVID-19 gracias a los avances tecnológicos en la rama biomédica y al estudio de otras epidemias por SARS-CoV y MERS. [81] La transmisión del SARS-CoV-2 está dada por tres mecanismos bien descritos: i) diseminación en gotas de más de 5 micras producidas por los pacientes infectados, cuando hablan o tosen cerca de una persona susceptible; ii) por diseminación mediante aerosoles de menos de 5 micras (frecuente entre personal médico); y iii) por contacto directo con la persona infectada o indirecto por el contacto con superficies contaminadas (fómites). La incubación viral va de 2 a 14 días dentro de los cuales se ha descrito que los pacientes pueden diseminar virus con capacidad replicativa. El tiempo de aparición de los síntomas es de aproximadamente 11 días para más de 95% de los pacientes. Las manifestaciones de la COVID-19 en los enfermos pueden variar desde ser asintomáticos hasta desarrollar enfermedad fulminante secundaria a el síndrome respiratorio agudo severo y sepsis. [82–84]

2.4 Inmunidad Innata

La respuesta inmune al inicio de la infección por SARS-CoV-2 está dada por las células del sistema inmune innato. La capacidad de reconocer patrones asociados a patógenos (PAMP's), con la consecuente activación de la vía de interferón (IFN) y la posterior inducción de la respuesta humoral y celular es el tipo de respuesta contra el virus SARS-CoV-2. Una activación moderada, genera una respuesta de IFN de forma eficiente y temprana, así como un reclutamiento del sistema inmune adaptativo e inflamación moderada.

Al igual que para SARS-CoV y MERS-CoV este nuevo coronavirus puede modular la producción de IFN, induciendo una producción baja de interferón tipo I al inicio de la infección como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune innata; como consecuencia, el daño tisular y la inflamación es mayor y desproporcionada condicionando una inmunopatología sistémica. [85–87] Puede observarse una tormenta de citocinas, desarrollo de linfopenia a lo largo de la infección y síndrome de activación de macrófagos. La correlación de la desregulación inmunológica y la clínica de la COVID-19 es evidente y proporcional. [83,87–89]

2.5 Inmunidad adaptativa

La generación de una respuesta de inmunológica de memoria es un mecanismo de protección contra las reinfecciones futuras, los anticuerpos producidos por las células B son parte integral de este mecanismo de defensa y son la base del éxito de las vacunas. La infección por SARS-CoV-2 desencadena una respuesta de linfocitos, hay una proliferación de células B y T pre existentes que reconocen epítopes de las proteínas estructurales, S y N con cierta afinidad. Los anticuerpos IgM e IgG son detectados en pacientes con COVID-19 entre los primeros 7-14 días después de aparición de los síntomas. La presencia de IgM puede observarse antes o al mismo tiempo que IgG para la COVID-19 o puede observarse únicamente la presencia de IgG. A diferencia de otras infecciones virales que siguen una cinética de cambio de isotipo, la infección por SARS-CoV-2 ha evidenciado la presencia de IgG contra alguna de las proteínas virales a la par de IgM y del inicio de los síntomas, esto podría deberse a la presencia de células B de memoria circulantes generadas posterior a una infección por algún otro coronavirus humano. Después de la infección por SARS-CoV-2 las células TCD4+ activadas por los patógenos virales interactúan con las células B para que estas proliferen y hagan cambio de clase de su receptor de antígeno, el anticuerpo unido a membrana de células B; para establecer un centro germinal y para diferenciarse en células secretoras de anticuerpo (plasmacitoides). Las células B a

su vez promueven la diferenciación de las células T en células cooperadoras foliculares (Tfh por sus siglas en inglés) las cuales tendrán la función de dirigir a las células B. Dentro de los centros germinales las células B proliferan rápidamente gracias a los estímulos de las citocinas y mejoran la afinidad de su receptor de unión a antígeno, la afinidad se mejora hasta que la respuesta antiviral termina o hasta alcanzar una afinidad máxima.

En los centros germinales se generan dos tipos de anticuerpos, los de larga duración, producidos por las células B de memoria circulante y los producidos por las células plasmacitoides. Estos últimos se encuentran en el bazo o en la médula ósea donde pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo, años o décadas secretando anticuerpos independientemente de la presencia de patógenos. Para el caso de SARS-CoV se ha reportado la detección de anticuerpos anti espiga hasta 12 años después de la infección, recordando que estos anticuerpos solo son protectores si se encuentran en la cantidad suficiente para neutralizar al patógeno y esta cantidad dependerá de la afinidad de los anticuerpos generados y del inóculo. Para el caso de SARS-CoV-2 aun no sabemos la duración de la memoria, aunque los primeros reportes del año 2021 mostraban una duración de aproximadamente 6 meses para el caso de la enfermedad moderada y menor de 6 meses para la enfermedad leve, aunque existe variaciones en los reportes serológicos de los diferentes países. [90]

Independientemente de los anticuerpos de tipo neutralizante, los anticuerpos generados por la infección por SARS-CoV-2 son opsonizantes y así ayudan al reconocimiento por parte de otros linfocitos para generar una respuesta inmune.

Las células B de memoria circulantes pueden activarse rápidamente después de la reinfección para producir células plasmáticas secretoras de anticuerpos o iniciar reacciones de centro germinal secundaria. [91,92]

En el curso y desenlace de la COVID-19 se asocia con una gran variedad de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, propias de cada individuo.

El estudio de la diversidad de anticuerpos en los pacientes convalecientes de COVID-19 moderado o severo, reveló más de mil tipos de anticuerpos monoclonales, donde casi la mitad de ellos se unían a las proteínas S o el RBD recombinantes, pero muy pocos mostraron actividad en los ensayos de neutralización. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes más potentes van dirigidos hacia el RBD y solo algunos muestran reacción cruzada con SARS-CoV o MERS. [93,94] Curiosamente, las primeras observaciones en los individuos convalecientes mostraron la presencia de títulos mayores de anticuerpos en los individuos de mayor edad y una clínica más grave. La caracterización de estos anticuerpos de pacientes con COVID-19 reveló que los títulos más altos y de aparición más temprana correspondían a inmunoglobulinas de tipo G dirigidas contra la nucleoproteína. Ahora se sabe que los títulos altos de anticuerpos contra la proteína S, no necesariamente correlacionan con su capacidad neutralizante, no conducen a una recuperación acelerada de los pacientes y que incluso el nivel de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 no es tan relevante como su avidéz y afinidad por los epítopes de S y RBD. [94][95]

Por otra parte, con los antecedentes de que SARS-CoV y el nuevo coronavirus usan al receptor ACE2 para invadir a las células y la secuencia para la proteína S tiene gran homología, se pensó en una posible protección cruzada que se descartó en parte al comprobar que estos virus no comparten los mismos epítopes de neutralización. [94]

Además de los anticuerpos neutralizantes, la respuesta inmune celular mediada por células T CD4+ y CD8+ tienen un papel primordial en la eliminación de la infección y responde en parte a la pregunta de porque en los pacientes jóvenes con niveles menores de anticuerpos para S, RBD o N, la enfermedad tiene un curso y un desenlace menos catastrófico. [96,97]

La activación de las células T por SARS-CoV-2 se da simultáneamente en la primera semana de la infección y la respuesta celular alcanza un

pico máximo a las 2 semanas. La detección de las células T permanece, aunque en niveles mas bajos durante mas de 100 días. Las células también pueden contribuir a la tormenta de citocinas, pero en una proporción mínima debido que la COVID-19 cursa con linfopenia, lo que refuerza la idea de que los macrófagos células y las células dendríticas son los principales responsables de esta respuesta exacerbada que lleva a la destrucción del tejido. [96,98]

3. Anticuerpos contra SARS-Cov-2

Se conoce que la infecciones cursan con un incremento en las células B de memoria y células plasmáticas durante la primera semana de infección. La aparición de inmunoglobulinas IgM e IgA neutralizantes a S y RBD en plasma se observa en los días 5 a 7 e IgG los días 7 a 10 después de la aparición de los síntomas. [99] En contraste, se ha reportado en numerosas ocasiones que los anticuerpos IgG contra la proteína N del virus se observan a los 14 días de la infección viral, lo que no sigue la dinámica humoral de una primoinfección. [99]

3.1 Antígenos importantes en la inducción de la respuesta inmune

Se ha comprobado que la seroconversión contra la proteína N ocurre mas rápido que para la proteína S, probablemente por la gran homología que guarda la proteína N de otros coronavirus humanos menos patógenos. [12,13,100]

Los pacientes con una seroconversión temprana para la proteína N, corresponden en su mayoría a adultos mientras que no es detectable en la población infantil. Esto puede estar correlacionado por una parte por el historial de infecciones respiratorias de tipo viral; virus de influenza, coronavirus estacionarios, virus de gripa común, a lo largo de la vida de cada individuo. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra la proteína N en sueros pre-pandémicos en una población que ha tenido una infección tanto con coronavirus estacionarios como con coronavirus patogénicos, SARS-CoV y MERS. [101,102]

Se sabe hasta ahora que, una gran proporción de pacientes en todo el mundo, con una clínica de COVID-19 grave o severa, presentan títulos de anticuerpos altos, pero muchos de ellos sin capacidad neutralizante. Esto podría explicarse como consecuencia de la inmunopatogénesis, donde una potenciación de la infección dependiente de anticuerpos podría ser la responsable del daño sistémico y del posterior desenlace de la enfermedad. [9,13]

La respuesta humoral observada para N además de que puede considerarse como un biomarcador de la infección temprana, podría sugerirnos de manera indirecta si el individuo ha estado en contacto con otro coronavirus. Y a la par de la evolución de la pandemia, nos permitirá distinguir en una población abierta entre vacunados e infectados considerando que ninguna vacuna hasta ahora aprobada para COVID-19 contiene esta proteína viral. [90,97,101,103–107]

3.2 Diagnóstico serológico

Para conocer la evolución de la inmunidad y la protección que confiere la infección por SARS-CoV-2 es necesaria la evaluación y cuantificación de los anticuerpos. [92] A principios de la pandemia la mayoría de los ensayos serológicos para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 estaban dirigidos principalmente a la proteína S o la subunidad S1; con el tiempo se ha mostrado la importancia de la evaluación de los anticuerpos dirigidos contra la proteína N. [90,107,108]

Evaluar los anticuerpos contra la proteína N, S y el dominio RBD en un mismo momento permite una ventana diagnóstica más amplia al considerar a los anticuerpos contra N como marcadores de infección temprana y a los dirigidos contra S y RBD como componentes específicos de SARS-COV-2. [104,105]

4. Vacunación contra SARS-Cov-2

Después de transcurridos 9 meses de declararse la pandemia de COVID-19, en diciembre del 2020, la OMS aprobó la primera vacuna autorizada para uso de emergencia contra la COVID-19, Pfizer

BioNTech. Esta primera vacuna pertenece al grupo de vacunas basadas en tecnología de RNA mensajero. [109]

Al momento de la elaboración de estas tesis existen en todo el mundo un total de 121 vacunas en fase clínica y 194 en fase pre clínica. El desarrollo de vacunas contra la COVID-19 marca un hito en la historia de la humanidad ya que las nuevas plataformas para generar vacunas, basadas en ácidos nucleicos RNA o DNA, están siendo evaluadas por primera vez en la población mundial. Esto constituye una razón de peso para estar a la expectativa de los efectos colaterales pues pese a que se ha trabajado con estas tecnologías desde hace ya unos 10 años, únicamente se habían aprobado para uso en ensayos de fase II en el área de cáncer o en enfermedades como Zika y Ebola.

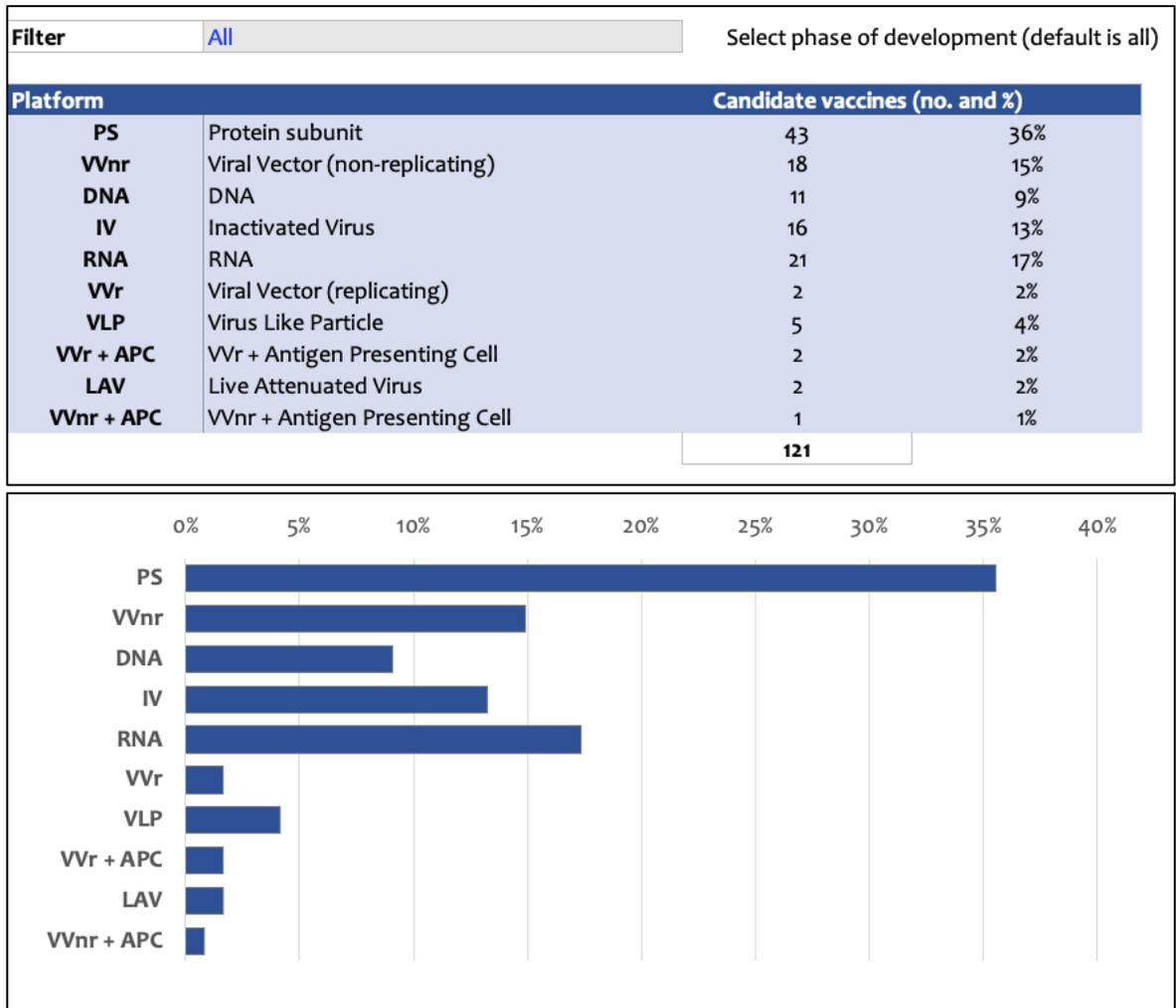
Si los resultados que se observen en la población mundial; con estas “nuevas vacunas” genera una robusta respuesta inmune humoral y celular, si su eficacia es similar a la observada en la fase III y si su tolerabilidad es aceptable; estas tecnologías revolucionaran el campo de la medicina al asegurarse un lugar dentro de las terapias moleculares. [110][111][112] Hasta ahora se tiene un registro de 9 diferentes plataformas para el desarrollo de vacunas contra la COVID-19, estas plataformas se pueden dividir en 5 categorías, a) vacunas desarrolladas con virus vivos atenuados, b) con virus inactivados, c) con vectores virales que pueden ser replicantes o no, d) vacunas basadas en ácidos nucleicos (RNA o DNA) y e) vacunas basadas en proteínas virales pudiendo ser completas, subunidades o péptidos recombinantes.[113][114][115]

La OMS ha aprobado 7 vacunas a nivel mundial, EUA y Reino Unido se han aprobado las vacunas de Pfizer, Moderna y Johnson&Johnson para el primero y Pfizer, Moderna, Johnson&Johnson y AstraZeneca para el segundo. Sin embargo, ambos países mantienen un bloqueo para el uso de vacunas desarrolladas en Rusia (Sputnik); por parte de EUA; y en China (CanSino y Sinovac); para EUA y Reino Unido. [116][117] Por su parte Latinoamérica fue de las primeras en aprobar el uso de estas vacunas en su población pese a que para ese

momento ninguna de las dos vacunas se encontraba aprobada por la OMS y recientemente en el mes de junio de este año (2021) se aprobó el uso de Sinovac. [117] [118]

Para el caso particular de México al momento de la elaboración de la tesis se cuenta con una aprobación de ocho vacunas, en orden de aprobación: Pfizer BioNtech, AstraZeneca/Oxford, Sputnik, Sinovac, CanSino, Covaxin, Johnson&Johnson, Moderna.[119] En la figura 5 se muestran las diferentes plataformas en las que se desarrollan las vacunas y el porcentaje de las vacunas desarrolladas con cada una de las plataformas.

Figura 5. Vacunas contra COVID-19 y las plataformas que emplean para su desarrollo. Imagen tomada de los gráficos de la OMS de las diferentes plataformas de vacunas en desarrollo en todo el mundo. [120]



4.1 Vacunación y respuesta humoral alterada

Existen múltiples reportes sobre la variación de la respuesta inmune generada post vacunación en todo el mundo que involucra tanto a la respuesta celular como a la humoral. En cuanto a la respuesta humoral se han asociado factores tanto intrínsecos como extrínsecos de cada individuo. Dentro de los factores intrínsecos se tiene a la edad, el sexo, la predisposición genética y las comorbilidades.

La edad se ha correlacionado con una respuesta de anticuerpos post vacunación débil y se ha sugerido en la mayoría de los casos como una consecuencia de la inmunosenescencia. Con respecto al sexo los hombres han mostrado niveles inferiores de anticuerpos (1:1.5) en comparación con las mujeres. Dentro de las causas de esta variación se encuentra el componente hormonal y el fondo genético. Hablando ahora de las comorbilidades de la población vacunada, de los primeros reportes señalan que el sobrepeso y la obesidad influyen de manera directa en la generación de anticuerpos anti RBD con el esquema completo de Pfizer. Esta deficiencia en la respuesta humoral se le atribuye al estado de inflamación crónica, que es compensado por un estado antiinflamatorio persistente en estos pacientes. [121–126]

Justificación

El control de la diseminación de pandemia causada por el nuevo coronavirus sigue representando un reto en nuestro país al haber sobrepasados los umbrales pronosticados de contagios y decesos y encontrarnos ante la aparición de nuevas variantes por lo que se requieren mejores estrategias de vigilancia epidemiológicas basadas en estudios de seroconversión a la par de la estrategia usadas hasta ahora (hospitalaria y centinela).

Es fundamental conocer el espectro de las formas clínicas de la enfermedad, la duración de la infección y de la enfermedad leve o asintomática. Por lo que se requiere el desarrollo y validación de pruebas serológicas con una alta sensibilidad y especificidad, que además de permitir la caracterización de la respuesta inmune humoral, permita estudiar la prevalencia de la seroconversión.

Mientras que algunos autores señalan una posible duración de más de 6 meses de los anticuerpos neutralizantes contra el nuevo coronavirus, basándose en los estudios seroepidemiológicos de SARS-CoV y MERS; otros autores menos optimistas, con evidencia de los recientes estudios seroepidemiológicos de SARS-CoV-2 en Islandia y España, señalan una preocupante duración en los títulos y de anticuerpos neutralizante de 3 meses o 100 días de la recuperación de la infección. Lo que podría llevar a una posible reinfección y con ello la prevalencia del ciclo de la enfermedad. [88,94]

Es necesario que cada país genere sus propios datos de seroprevalencia y de memoria inmunológica, ya que esto puede variar dependiendo de el fondo genético. Pese a los comunicados de la OMS sobre la baja tasa de reinfección posterior a la recuperación de la COVID-19, con los recientes estudios seroepidemiológico de algunas naciones se pueden observar poblaciones vulnerables las cuales reportan ausencia de anticuerpos posterior a cierto tiempo. [127]

Hipótesis

La sintomatología y los factores intrínsecos del paciente podrían estar asociados a los niveles de anticuerpos generados tras la vacunación contra SARS-CoV-2

Objetivo general

Validar una prueba de ELISA para el estudio serológico de la población mexicana infectada con el virus SARS-CoV-2, recuperada de la COVID-19 y vacunada contra el virus SARS-CoV-2, utilizando las proteínas recombinantes de espiga, nucleocápside y dominio RBD del virus SARS-CoV-2.

Objetivos específicos

- 1.-Expresar y purificar las proteínas recombinantes de SARS-CoV-2, dominio 1 de la espiga (S1) dominio de unión a receptor (RBD) y nucleocápside (N) en células Expi293.
- 2.-Diseñar y realizar la validación de un ensayo de ELISA, usando proteínas recombinantes de SARS-CoV2 como antígenos y posteriormente aplicar análisis estadístico ROC para seleccionar el modelo/diseño óptimo de la prueba.
- 3.- Evaluar y cuantificar los anticuerpos específicos de clase IgG contra SARS-CoV-2 en población con COVID-19, recuperados y vacunados.
- 4.- Analizar la duración del nivel de anticuerpos en un grupo de individuos vacunados con los diferentes esquemas de vacunación aplicados en México.
- 5.- Integración y análisis no paramétricos de los datos clínicos de cada grupo participante de nuestro estudio.

Metodología

Células Expi 293

Se emplearon las células eucariotas Expi293 (Thermo Fisher, número de catálogo A14527), estas células están en suspensión y crecen en ausencia de suero y en agitación constante, tienen un alto rendimiento en la producción de proteínas recombinantes de hasta seis veces más en comparación con la línea celular HEK293. El cultivo se realizó en matraces con deflectores en el fondo con capacidad de 250 ml. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C en medio Expi293 (Thermo Scientific, EUA, Gibco, A1435101) en agitación orbital de 160 rpm y con una concentración de 8% de CO₂. La transfección se realizó en un volumen de 100 ml al alcanzarse una densidad celular de 3x10⁶/ml.

Diseño de los plásmidos codificantes para las proteínas recombinantes

Las células Expi293 se transfectaron con los plásmidos pCAGGS/RBD que contiene la secuencia de RBD (donado generosamente por el Dr. F. Krammer) y con los plásmidos pCDNA3.1/S1 y pCDNA3.1/N que contienen la secuencia del dominio S1 y la secuencia de N respectivamente. Estos dos fueron diseñados en nuestro laboratorio tomando la secuencia del virus SARS-CoV-2 aislado y reportado en Wuhan a principios del 2020 que se encuentra en GeneBank (GenBank: MN908947.3). [128] El plásmido pCDNA3.1 contiene un promotor de citomegalovirus; la construcción fue optimizado para su expresión en células eucariotas y se le agregó en su extremo 3' una secuencia que codifica para seis histidinas con la cual puede purificarse mediante una columna de afinidad.

Las contracciones fueron mandadas a secuenciar y se comprobó su identidad.

Producción de las proteínas recombinantes

Se transfectaron 3x10⁸ en 100ml de medio se emplearon 50µg de DNA de cada uno de los plásmidos. El plásmido correspondiente se mezcló

con 3ml de expifectamina. El cultivo se dejó incubando por 5 días a las condiciones de 37°C con una concentración de 8% de CO₂ en agitación orbital a una velocidad de 160rpm. Al día siguiente de la transfección se le adicionaron 600 µl de una solución “enhancer” 1 y 6 ml de una solución “enhancer 2” de células Expi293 y se regresaron a la incubación. Cinco días post-transfección, se cosechó el sobrenadante, se le agregó inhibidor de proteasas (Thermo Scientific, 78415) posteriormente se centrifugó a 15,000 gravedades para eliminar las células y restos celulares. El sobrenadante se concentró usando centricones de 50 KDa hasta obtener un volumen final de 10 ml. Se almacenó a 4°C para ser utilizado en los pasos posteriores de purificación.

Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes fue analizada a los días 3 y 5 posteriores a la transfección empleado electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE a las siguientes concentraciones; para el dominio RBD al 15% y para las proteínas S1 y N al 8%. Como control negativo se usó el sobrenadante sin transfectar de los cultivos celulares. Además, se realizaron análisis mediante Western Blot, se transfirió el gel de poliacrilamida a una membrana PVDF (Western Blotting Membranes), se bloqueó la membrana con una solución de PBSTween 0.1% caseína al 5% por una hora, posteriormente se incubó con un anticuerpo conjugado anti histidinas (Mouse anti Histidine Tag AB_322084) a una dilución de 1:5,000 en PBSTween 0.1% caseína 3%, toda la noche a 4°C. Terminada la incubación se lavó tres veces la membrana con PBS-Tween 0.1% por espacio de 10 minutos cada lavado posterior a estos se reveló usando un kit de sustrato de inmunotransferencia (Western blotting) de ECL (Thermo Scientific, número de catálogo 10455145). Se mezclan los reactivos del Kit con agua en una relación 1:1:1, con esta solución se cubrió toda la membrana y se reveló usando el equipo ChemiDoc XRS+ (Fabricante Bio Rad, código SF1708265), software Image. De esta manera

demostramos la presencia de las proteínas recombinantes en el sobrenadante a los días indicados.

Purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas recombinantes provenientes de los sobrenadantes, se utilizó el método de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (por sus siglas en inglés FPLC), empleando el equipo ÄKTA Pure, en colaboración con el laboratorio del Doctor Edgar Morales del departamento de Bioquímica. La purificación de las proteínas se realizó en dos pasos, la primera purificación se hizo mediante cromatografía de afinidad y la segunda purificación mediante cromatografía de exclusión molecular.

Como primer paso se inyectó el sobrenadante en una columna de níquel (FF HisTrap 5x5 ml, código del producto 10571680) que se equilibró previamente con 5 volúmenes de la columna (1 volumen= 5 ml) de buffer A. Posterior al equilibrio se realizó la elución por gradiente; se recolectaron las fracciones y se analizó la presencia de las proteínas por medio de geles SDS-PAGE al 8 % para el dominio RBD y al 10% para las proteínas S1 y N. Los geles se tiñeron por 10 minutos a 37°C en agitación con solución de tinción Coomassie, se destiñó con solución desteñidora. Las fracciones donde se observaban las bandas con el peso estimado de cada proteína se mezclaron y se concentraron empleando centricones de 30 kDa (Millipore Amicon Ultra, UFC901096) para RBD y 50 kDa (Millipore Amicon Ultra, UFC905096) para S1 y N. Las fracciones obtenidas se colocaron en los centricones y se centrifugaron a 3,000 gravedades por 15 minutos a un volumen final de 500µl. Una vez que se obtuvo el concentrado de proteína se inyectaron los 500µl en una columna de exclusión molecular Superdex; Superdex 75 para RBD y Superdex 200 para S1 y N (Sigma-Aldrich, código de referencia GE28-9909-44); que se equilibró previamente. Se colectaron y analizaron las fracciones obtenidas mediante geles SDS-PAGE al 8 y 12% según las proteínas purificadas. Las fracciones obtenidas de esta purificación final se cuantificaron mediante método de Bradford (Bradford 1976) posterior a

la cuantificación se alicuotaron a 50µl por vial y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Evaluación de las proteínas recombinantes como antígenos para el desarrollo de inmunodiagnóstico (ELISA) de humanos.

Se evaluó el reconocimiento de las proteínas recombinantes con sueros de pacientes convalecientes de COVID-19, mediante técnica de inmunofluorescencia y Western Blot.

Inmunofluorescencia

Se plaquearon las células Vero en placas de 24 pozos, y se transfectaron con los diferentes plásmidos, cada pozo contenía un cubreobjetos con las células transfectadas. Las células de los cubreobjetos se fijaron con 300µl de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, número de catálogo 30525-89-4) a una concentración de 4% durante 20 minutos, temperatura ambiente y protegido de la luz. Los pozos de las placas con los cubreobjetos se lavaron con 500ml de PBS Tritón 0.1%. Posteriormente se permeabilizó por 30 minutos con 300µl de PBS Tritón 0.1% gelatina 0.2% a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación. Se realizaron 2 lavados con 500µl de PBS Tritón 0.1% posteriores a la permeabilización y se bloqueó por una hora con 300µl de PBS Tritón 0.1% suero de chivo 1% en las mismas condiciones de temperatura ambiente, agitación y protegido de la luz. A la par del bloqueo se preparó una cámara húmeda en donde se colocaron los cubreobjetos al terminar el bloqueo cuidando que la cara donde se encuentran las células fijadas, este expuesta. Se agregó entonces el suero de un paciente convaleciente de COVID-19 a una dilución de 1:100-sobre las células Vero transfectadas durante una hora bajo las mismas condiciones de temperatura ambiente y protegidas de la luz. Al terminar la incubación se lavaron los cubreobjetos en las cajas de 24 pozos y se adicionaron los anticuerpos secundarios (Goat anti human IgG- Biotin (Jackson Immunoresearch, catálogo: 109-066-088) y FITC- Streptavidin (Invitrogen catálogo:43-4311) por una hora y bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y protegidos de la luz. Posterior

a esta ultima incubación se colocaron 3 gotas, en cada cubreobjetos, de Vectashield H1200 DAPI (Sigma-Aldrich, catálogo: 10236276001) y se posicionó un cubreobjetos sobre cada uno de los cubre objetos con células, cuidando que las gotas quedarán bien distribuidas. Se sellaron con barniz y se procedió a analizar empleando un microscopio confocal Stellaris Sted (Leica microsystems)

Western Blot

Se realizaron geles SDS-PAGE a diferentes concentraciones. Se transfirió el gel una membrana PDV previamente activada con metanol. Terminada la trasferencia se bloqueo con PBS-Tween 0.1% caseína 3% por una hora a temperatura ambiente y en agitación. Al terminar el bloqueo se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween 0.1% y se incubo con una mezcla de sueros, provenientes de individuos convalecientes de COVID-19, a una dilución de 1:500 en PBD Tween 0.1% caseína 5% por una hora a temperatura ambiente y en agitación continua. Al terminar la incubación con la mezcla de sueros se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.1% y se realizó el mismo procedimiento de incubación ahora con el anticuerpo secundario conjugado con HRP anti IgG humanos (Sigma-Aldrich, número de catálogo MFCD00162436). Finalmente se realizó un último lavado de la membrana al terminar la incubación con el anticuerpo secundario y se reveló la membrana en el equipo ChemiDoc XRS+ (Fabricante Bio Rad, código del producto SF1708265), software Image. Demostramos el reconocimiento de nuestras proteínas por parte de los anticuerpos naturales generados por los infectados de COVID-19.

Diseño y validación de ELISA casera para virus SARS-CoV-2

Para el diseño del ELISA se consideraron las siguientes variables: a) sensibilización de la placa, b) dilución de los sueros humanos, c) dilución de los anticuerpos monoclonales usados para la curva de concentración y d) la dilución de los anticuerpos secundarios conjugados con HRP.

Como primer paso se evaluaron las condiciones optimas de adsorción pasiva de los antígenos recombinantes (proteínas recombinantes purificadas) a las placas de 96 pozos (Greiner Bio-One, Fisherscientific, número de catálogo 10252711). Se determinó la concentración necesaria para sensibilizar las placas con cada uno de los antígenos recombinantes, empleando cuatro diferentes concentraciones: 2, 4, 7.5 y 10 µg/ml, se representa la sensibilización en la figura 6. Las distintas concentraciones se hicieron diluyendo los antígenos recombinantes en PBS1X (buffer de fosfatos pH7,4). Con cada una de las cuatro diluciones del antígeno, se sensibilizaron los pozos correspondientes con 50 µl cuidando que cada pozo quedara totalmente recubierto y sin burbujas.

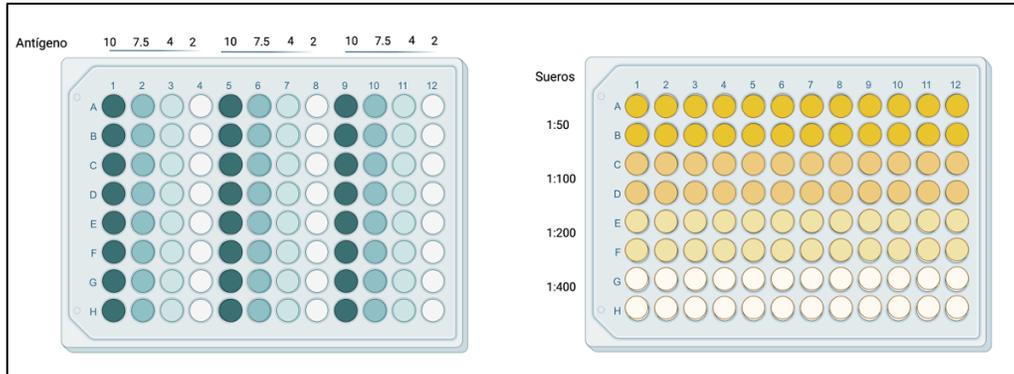
Las placas se incubaron por 24 horas, a una temperatura de 4°C y protegidas de la luz, posterior a la incubación se desechó el sobrenadante y se realizaron 4 lavados con solución de lavado (PBS 1x, Tween20 0.1%), se bloquearon las placas por una hora en agitación leve continua con 100µl de solución de bloqueo (PBS1x, Tween20 0.1%, caseína 3%). Al terminar el bloqueo se realizaron tres lavados y se procedió a agregar los sueros humanos.

Para establecer las condiciones optimas a las cuales se usarían los sueros de pacientes, se emplearon los sueros de pacientes con un diagnostico molecular RT-PCR POSITIVO para SARS-CoV-2 y como control negativo sueros históricos del 2018, a diferentes diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400.

A la par del bloqueo de las placas se realizó la dilución e inactivación de los sueros con PBS 1x Tween20 0.1% caseína 1% y Tritón 1x (Sigma Aldrich, USA, catalogo 9036-19-5). Este procedimiento se realizó en la campana de extracción. En microtubos eppenforff de 1.5 ml se colocó la cantidad del suero necesaria para cada dilución, el PBS Tween 0.1% caseína 1% como diluyente y el Triton 1x para la inactivación, los tubos se mezclaron gentilmente y se incubaron por una hora a 37°C posterior a la cual se mezclaron gentilmente y se agregaron 50µl por pozo. Cada dilución de sueros se agregó por duplicado y en cada una de las regiones de la placa con diferente

concentración de antígeno. Una distribución análoga a un tablero de ajedrez.

Figura 6. Sensibilización de placas a diferentes concentraciones de antígeno y diferentes diluciones de sueros.



Las placas se incubaron con los sueros por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación leve constante y protegidas de la luz. Posteriormente se desechó el sobrenadante, se lavaron las placas tres veces con PBS Tween 0.1% y se realizó una incubación con el anticuerpo secundario conjugado anti IgG Humana (Goat anti Human IgG (H+L) Secondary antibody, catálogo: 31410).

Para establecer la dilución óptima a la cual se usaría el anticuerpo secundario se ocuparon placas ya sensibilizadas que respetaban el mismo esquema de concentración de antígeno y diluciones de sueros anteriormente descrito. Se realizaron dos diluciones 1:2,000 y 1:5000. Las diluciones se hicieron en PBS Tween 0.1% caseína 1%.

Se agregaron 50µl en cada pozo de la dilución de anticuerpo secundario y las placas se incubaron por una hora a temperatura ambiente en agitación constante y protegidas de la luz. Finalmente se lavaron las placas 3 veces con PBS Tween 0.1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario al terminar la incubación y se agregaron 50µl de solución reveladora por pozo (buffer citratos, OPD, peróxido de hidrógeno), se incubaron las placas a 37°C por 15 minutos posteriores a los cuales se adicionaron 50µl de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción y se realizó la lectura en un lector de multiplacas (marca) con un filtro de 450 nm.

Los resultados de estos ensayos se analizaron mediante el ensayo de saturación. Representación de Scatchard para cada condición de concentración de antígeno y dilución de los sueros; se dividieron los valores de densidad óptica de los sueros positivos entre el valor de la mezcla de sueros negativos.

Estandarización de la curva de concentración de anticuerpos IgG

Para la cuantificación de la concentración de anticuerpos IgG anti S1, RBD y N en los sueros humanos se realizó una curva de concentración empleando anticuerpos monoclonales quiméricos dirigidos hacia las proteínas S, N y el dominio RBD.

Con las condiciones óptimas ya establecidas para el ensayo de ELISA indirecto, se sensibilizaron placas con cada uno de los antígenos recombinantes, se incubaron por 24 horas a 4°C protegidas de la luz. Se decantó el exceso de antígeno al día siguiente y se realizaron 4 lavados con 250µl de PBS Tween 0.1% por pozo, se adicionaron 100µl de solución de bloqueo, PBS Tween 0.1% caseína 3% por pozo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación leve constante. Posterior a la incubación se realizaron 3 lavados con 250 µl de PBS Tween 0.1% por pozo y se agregaron 50µl de la dilución de anticuerpos monoclonales a las concentraciones iniciales siguientes: anti RBD 1µg/ml, anti S 5µg/ml, anti N 5µg/ml.

Para la curva de concentración se realizaron 8 diluciones seriadas por duplicado. Cada curva de concentración de anticuerpos tuvo control de curva por duplicado que consistía en un control positivo (dilución 4 de la curva de concentración), un control negativo (dilución 1:50 de suero humano histórico), fondo (pozos sin antígeno a los que se les agregó 50µl del control positivo y 50µl del anticuerpo secundario) y un control primario (pozos con antígeno a los que se les agregó únicamente 50µl de control positivo). En la figura 7 se representa la forma en como se realizó la curva de concentración.

Las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante, se lavaron 3 veces y se incubaron con el

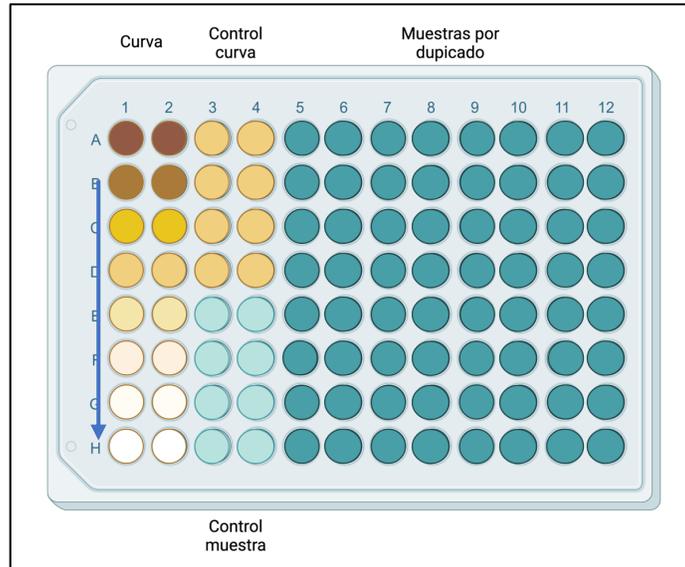
anticuerpo secundario conjugado a una dilución 1:5,000. Finalmente se lavaron las placas 3 veces con PBS Tween 0.1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario al terminar la incubación y se agregaron 50µl de solución reveladora por pozo, se incubaron las placas a 37°C por 15 minutos posteriores a los cuales se adicionaron 50µl de ácido sulfúrico 2 normal para detener la reacción y se realizó la lectura en un lector de multiplacas con filtro de 450 nm.

Los anticuerpos monoclonales empleados para cada placa sensibilizada con los antígenos recombinantes S1, RBD y N fueron: SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike antibody, Chimeric MAb (IgG) (Marca: Sino Biological, catálogo: 40150), Anti-Spike-RBD Human mAb (IgG) (Marca: Sanyou Biopharmaceuticals, catálogo: AHA001), Anti-SARS-CoV-2 (2019-nCov) Nucleocapsid Human Chimeric Monoclonal Antibody, Clone RMH03 (IgG) (Marca: RevMAb Biosciences USA, catálogo: 54-1306-00) respectivamente.

El anticuerpo secundario anti IgG empleado para detectar los anticuerpos monoclonales anti S y anti RBD fue: Goat anti-Human IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific, USA, Catalog # 31410)

El anticuerpo secundario anti IgG empleado para detectar los anticuerpos monoclonales anti N fue: Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific, USA, Catalog # 3143).

Figura 7. Representación del diseño de las placas con curva de concentración.



Las densidades obtenidas diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales se normalizaron y se analizaron los coeficientes de variación y concordancia.

Estandarización y validación de la ELISA indirecta

Después de establecer el diseño de la ELISA indirecta; se considero la concentración óptima de los antígenos para la sensibilización de la placa, la dilución de los sueros y la dilución de anticuerpos secundarios, Con lo cual se estableció el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad para cada antígeno recombinante. Adicionalmente, se describen las muestras para la estandarización, validación y determinación de punto de corte de ELISA indirecta.

Grupos positivos

- Positivo (enfermo): Sueros de individuos con prueba de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (siguiendo el protocolo Berlín) que hayan manifestado algún síntoma de la enfermedad (dolor de garganta, tos, fiebre, dificultad respiratoria, dolor de cabeza, anosmia y ageusia). Procedentes del

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ.

- Positivo (convaleciente): Sueros de voluntarios convalecientes de COVID-19 leve con antecedente diagnóstico RT-PCR positivo para SARS-CoV-2.
- Vacunado: Suero de voluntarios con esquema completo de vacunación con vacuna Pfizer o CanSino.

Grupo negativo

Negativos históricos: Sueros tomados en el año 2018, previo a la pandemia por el actual SARS-CoV-2. Procedentes del banco de sueros históricos del laboratorio de la Dra. Cedillo Barrón.

Los criterios de inclusión y exclusión para las muestras se encuentran en el anexo 1.

Repetibilidad intra placa

Para el ensayo de La repetibilidad intra placa se usaron 20 sueros de cada grupo: a) voluntarios RT-PCR positivos para SARS-CoV-2, b) voluntarios convalecientes de SARS-CoV-2, c) voluntarios con esquema de vacunación completo y d) históricos de 2018 como control negativo.

Las muestras de cada grupo se colocaron por duplicado en la misma placa. Se determinó el coeficiente de variación ($CV = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{medias de los duplicados}}$), el coeficiente fue menor a 10%.

Para el caso de la evaluación de la curva de concentración anticuerpos, se evaluó la repetibilidad realizando por triplicado las curvas de concentración en una misma placa. A los resultados obtenidos de la estandarización de ELISA indirecta y de la estandarización de la curva de concentración se les determinó el coeficiente de variación que para ambos casos fue menor a 10%. Este porcentaje demuestra que nuestro ensayo tiene una buena precisión.

Repetibilidad intra laboratorio

Se realizaron los mismos ensayos y determinaciones arriba mencionadas en otro momento y a la par con otro laboratorio perteneciente al mismo departamento de Biomedicina Molecular con ayuda del Doctor en ciencias Erick Saúl Sánchez.

Determinación de punto de corte de ELISA casera indirecta

Para la determinación del punto de corte se empleo la metodología estadística de curvas ROC para cada uno antígeno recombinante. Se evaluaron 50 sueros positivos de pacientes con un diagnostico molecular RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 y 50 sueros verdaderos negativos, sueros históricos del 2018. Esta metodología estadística generó una tabla de “pares” sensibilidad-especificidad a diferentes valores de corte y una curva ROC para cada antígeno recombinante. De la primera se seleccionaron los valores de corte con mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad, lo cual consideró el mayor número de pruebas correctamente identificadas como positivas o negativas según el caso.

Evaluación de la respuesta humoral generada tras la infección natural con SARS-CoV-2

Una vez estandarizadas y validadas las pruebas para determinación de la concentración de anticuerpos, se realizó un estudio de detección de anticuerpos a dos grupos positivos a SARS-CoV-2 y un grupo negativo. Los resultados obtenidos se analizaron considerando las características clínicas de edad, sexo, peso y enfermedades crónico degenerativas; hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes.

Grupos positivos

- Positivo a enfermedad: Sueros de individuos con prueba de RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 (siguiendo el protocolo Berlín) que hayan manifestado algún síntoma de la enfermedad (dolor de garganta, tos, fiebre, dificultad respiratoria, dolor de cabeza, anosmia y ageusia).

Procedentes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ.

- Positivo convaleciente: Sueros de voluntarios convalecientes de COVID-19 que no sufrieron una enfermedad grave y con diagnóstico RT-PCR positivo para SARS-CoV-2.

Grupo negativo

Negativos históricos: Sueros tomados en el año 2018, procedentes del banco de sueros históricos del laboratorio de la Dra. Cedillo Barrón.

Evaluación de la respuesta humoral generada post esquema de vacunación

Se evaluó la concentración de anticuerpos anti RBD de individuos con un esquema de vacunación completo. Se consideraron dos grupos A) grupo vacunado con Pfizer y B) grupo vacunados con CanSino. A estos dos grupos se les realizó un estudio transversal a los 20 días posteriores el esquema completo de vacunación y a los 180 días posteriores para el grupo de Pfizer o 90 días posteriores para el grupo CanSino. Los resultados obtenidos se analizaron considerando las características clínicas de edad, sexo, peso, antecedentes de COVID-19 previo y enfermedades crónico degenerativas; hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes.

Descripción de las muestras para evaluar la respuesta humoral generada post vacunación y su duración

- Grupo Pfizer: 120 sueros de voluntarios del Hospital Regional número 2 de Coyoacán se analizaron a diferentes tiempos 20, 140 y a los 180 días posteriores al esquema completo de vacunación
- Grupo Cansino: 60 sueros evaluados antes del esquema de vacunación y 20 y 90 días Post-vacunación

Para el caso particular de estos grupos evaluados se ajustó la curva de concentración de anticuerpos. Se inició la curva con una

concentración de 5 µg/ml y se realizaron las diluciones de la manera previamente descrita.

Análisis estadísticos

La validación de la prueba se hizo siguiendo las recomendaciones de la OIE para pruebas diagnóstica de enfermedades infecciosas. [129]

El análisis de las características clínicas y las concentraciones de anticuerpos de las muestras evaluadas se hizo mediante estadística paramétrica y no paramétrica según el caso. Los cálculos estadísticos de los resultados se realizaron empleando el software Prism 8 GraphPad.

Resultados obtenidos

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes en el sistema de expresión Expi293

El sistema de expresión con células Expi 293 se empleó para la producción de las tres proteínas, S1, RBD, N ya que es un sistema de expresión eucariota (células de riñón embrionario humano) con alta eficiencia en transfección y con alto rendimiento en la expresión de proteínas; seis veces superior a sistemas eucariontes similares como HEK293. Debido a que las células Expi293 tienen la capacidad de crecer en suspensión y alcanzar una densidad celular mayor por ml de medio de cultivo y por lo que es más eficiente la expresión de las proteínas.

Antes de cada transfección se tomó una alícuota del medio de cultivo como control sin inducción y otra a los cinco días post transfección para evaluar la expresión de cada proteínas.

Las tres proteínas S1, RBD y N se observaron en los geles SDS-PAGE y se identificaron con un ensayo de WB usando un anticuerpo específico anti-HIS. La electroforesis reveló la presencia de estas proteínas recombinantes. La Figura 8 A) muestra la presencia de las bandas con el peso molecular esperado de cada proteína, columna 3. El peso de la proteína S1 fue de 120 KDa, el de RBD de 35 KDa, el de N de 58 KDa y no se detectó ninguna banda en la columna correspondiente al sobrenadante sin transfectar (CN) al teñir los geles con azul de Coomassie. La figura 8 B) El análisis por Western Blot evidencia la presencia y el reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos anti histidinas en el carril "5". El peso de la proteína S1 fue de 120 KDa, el de RBD de 35 KDa, el de N de 58 KDa. En la tabla 2 se muestran las concentraciones de los geles SDS-PAGE y el peso de las proteínas recombinantes

Las imágenes fueron modificadas del artículo publicado por nuestro grupo de trabajo [128]

Tabla 2. Pesos estimados de las proteínas recombinantes

Proteína	Concentración gel	Peso kDa
S1	12%	120
RBD	8%	35
N	12%	58

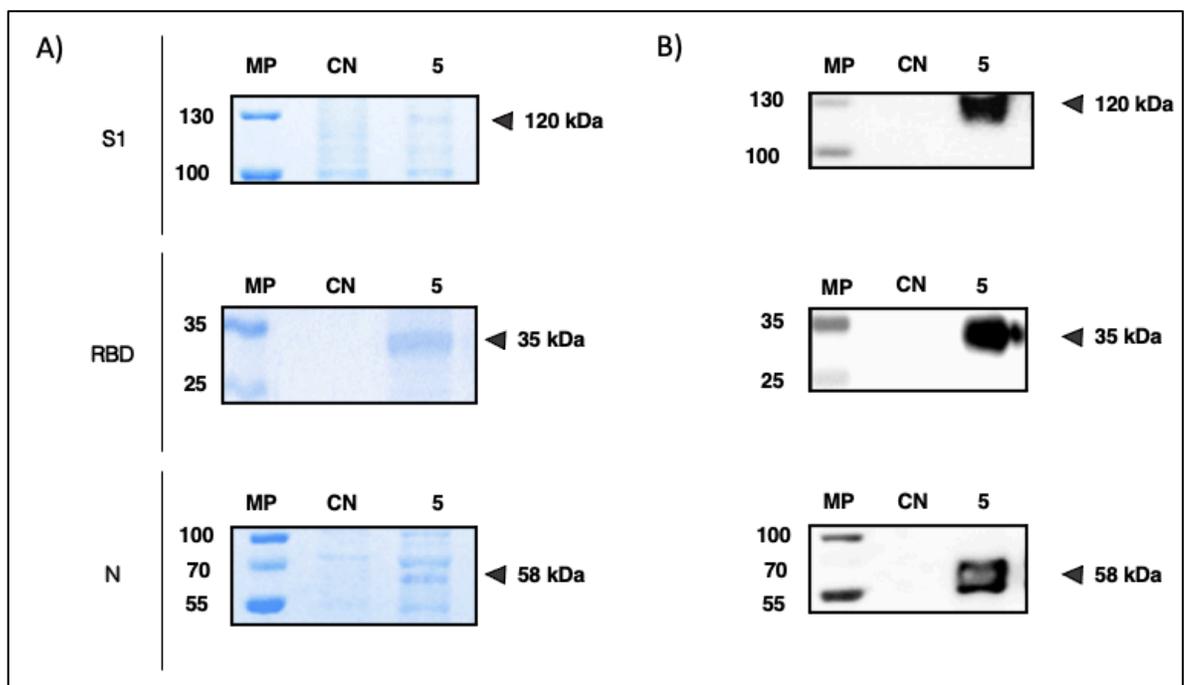


Figura 8. Análisis de las proteínas recombinantes S1, RBD y N producidas en el sistema de expresión Expi293. A) Geles SDS-PAGE:12% (S1 y N) y 8% (RBD), teñidos con azul Coomassie. B) Western Blot de las proteínas recombinantes con el tag de histidina expresadas en Carril 1: (MP) marcador de peso molecular, carril 2: (CN) sobrenadante de medio de cultivo Expi293 sin transfectar, carril 3: sobrenadante del medio de cultivo 5 días posteriores a la transfección.

La cantidad de las proteínas recombinantes S1 y N expresadas en el sistema de células Expi resultó inferior que la cantidad expresada de la proteína RBD, además, para los casos de S1 y N se pueden observar

algunas bandas que corresponden a las proteínas parcialmente glicosiladas como se ha sido reportado por otros autores. [103]

Nuestro grupo de trabajo estableció las condiciones de purificación de cada proteína recombinante. Para los tres casos la elución de la columna de níquel se realizó con 500mM de imidazol usando 5 volúmenes por columna y posteriormente se realizó una purificación por exclusión molecular con columnas Superdex 75 (RBD y N) y Superdex 200 (S1) lo cual aumentó la pureza, el rendimiento y concentración de cada una de nuestras proteínas. Se analizaron las fracciones obtenidas de esta última purificación por geles SDS-PAGE donde se observaron algunas bandas de pesos inferiores a los esperados para las proteínas S1 y N que corresponden a las proteínas sin glicosilaciones, pero en menor número y concentración. Las fracciones obtenidas de esta última purificación se unieron considerando las que presentaban mayor concentración y se cuantificaron por método de Bradford.

El rendimiento de los cultivos celulares a los 5 días post transfección fue de 15µg/L, para S1, 30µg/L para RBD y 14µg/L para N. El rendimiento siempre fue mayor para la proteína RBD. [128]

Análisis de las proteínas recombinantes como antígenos para diagnóstico serológico

Para comprobar si las proteínas recombinantes podían ser detectadas por los sueros provenientes de pacientes con una infección natural por SARS-CoV-2, transfectamos células Vero con nuestros plásmidos y se usaron los sueros de pacientes convalecientes de COVID-19 para los ensayos de inmunofluorescencia.

Se observó el reconocimiento de las proteínas recombinantes por los sueros de convalecientes y no así por los sueros históricos del 2018. En la Figura 9, el primer panel muestra las células Vero transfectadas con el plásmido que codifica para proteína S1, con una clara señal positiva. Los paneles de en medio muestran las células transfectadas con la construcción que codifica a la proteína N y de nueva cuenta se observa la señal positiva. Finalmente, en la última hilera de paneles, se

observa una clara señal de las células transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína RBD. Para el control negativo usamos sueros pre pandémicos, en la columna uno se observa la señal de núcleo y en el carril 2, FITC, no se observa señal en ausencia de anticuerpos dirigidos hacia estas proteínas en los sueros.

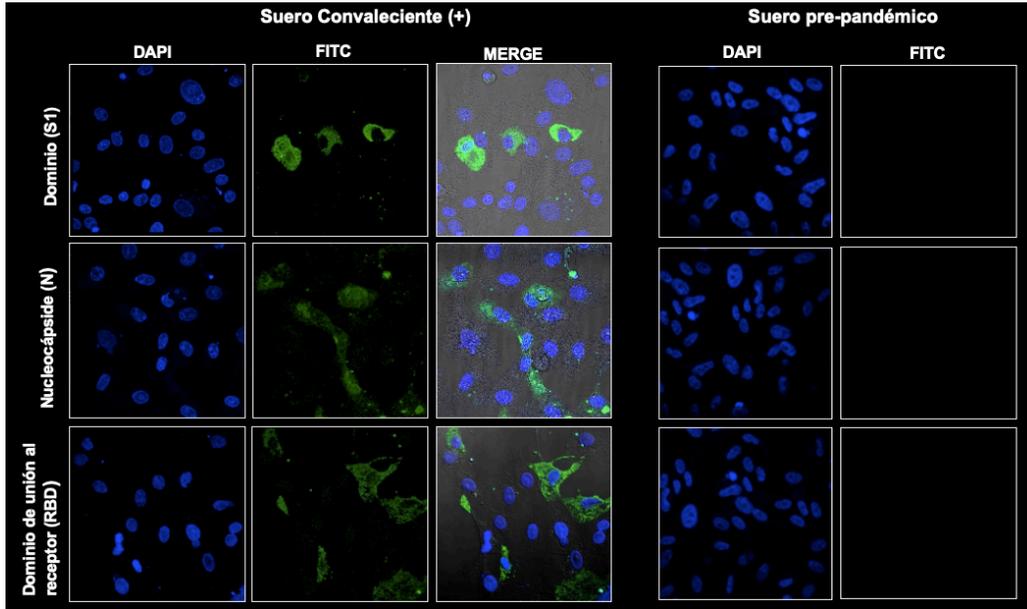


Figura 9. Las proteínas recombinantes S1, RBD, N son reconocidas por los anticuerpos generados tras una infección natural por SARS-CoV-2. Los anticuerpos presentes en el suero de un paciente convaleciente de COVID-19 detectan las proteínas recombinantes S1, N, RBD. El suero pre pandémico no mostro señal en ninguno de los paneles transfectados con las construcciones y teñidos con un anticuerpo secundario acoplado con FITC.

Este resultado es valioso ya que las proteínas que expresan las células a partir de genes sintéticos son reconocidas, por los anticuerpos generados en la COVID-19. Este resultado sugiere que la conformación de proteínas recombinantes podría ser similar a la que tendrían las proteínas que se expresan durante la infección con el virus SARS-CoV-2 y muestra la factibilidad de usarlas como antígenos recombinantes para los estudios serológicos en individuos infectados.

Diseño y validación de ELISA casera para virus SARS-CoV-2

Para el diseño de la ELISA indirecta se evaluaron 5 concentraciones diferentes de los antígenos recombinantes y 4 diluciones de los sueros de pacientes COVID-19 como un primer acercamiento.

Se considero como controles negativos tres grupos, sueros de voluntarios clínicamente sanos del 2020, sueros históricos del 2018 y sueros de pacientes con antecedente de una infección viral no respiratorio del 2018. Como controles positivos se emplearon sueros de pacientes con COVID-19 (Figura 10 A). Se diseñó un ensayo donde a medida que aumenta la concentración de antígeno recombinante fijado en la placa aumente la señal y a medida que disminuye la dilución de los sueros, aumenta la señal. Se graficaron estos resultados en unidades de densidad óptica (Figura 10 B).

Los valores de la densidad óptica obtenidos de los controles negativos y positivos se promediaron y se calculó y graficó la desviación estándar para cada condición de concentración del antígeno y las diferentes diluciones del suero. Con estos primeros resultados se estableció el punto de corte siguiendo las recomendaciones de la organización panamericana de la salud para pruebas serológicas. [129] El punto de corte se estableció sumándole a la media obtenida en el grupo controles negativos 2 veces su desviación estándar. El promedio de la señal fue de (0.0684) y la desviación estándar de estos fue de (0.0163).

Punto de corte ELISA RBD= (media de controles negativos) + 2*(desviación estándar)

Punto de corte= 0.0684+ 2*(0.0163)

Punto de corte ELISA RBD=0.101

En la gráfica de la figura 10 B, se observa que los valores de densidad óptica para los controles negativos se mantienen agrupados en niveles muy bajos, independientemente de la concentración a la que se sensibilizó la placa lo cual permite establecer un punto de corte igual para todas las condiciones. Se observan falsos positivos a partir de la dilución 1:200 de los sueros bajo las condiciones de sensibilización

4µg/ml, 1µg/ml, 0.5µg/ml, 0.25µg/ml de RBD. Arriba de las diluciones 1:100 y en las condiciones de sensibilización 4µg/ml y 7.5µg/ml el 100% de los controles positivos dan por arriba del punto de corte. Este ensayo se realizó por duplicado y se observó un coeficiente de variación menor a 1, lo cual indica poca variabilidad de nuestros resultados y adecuada precisión del ensayo.

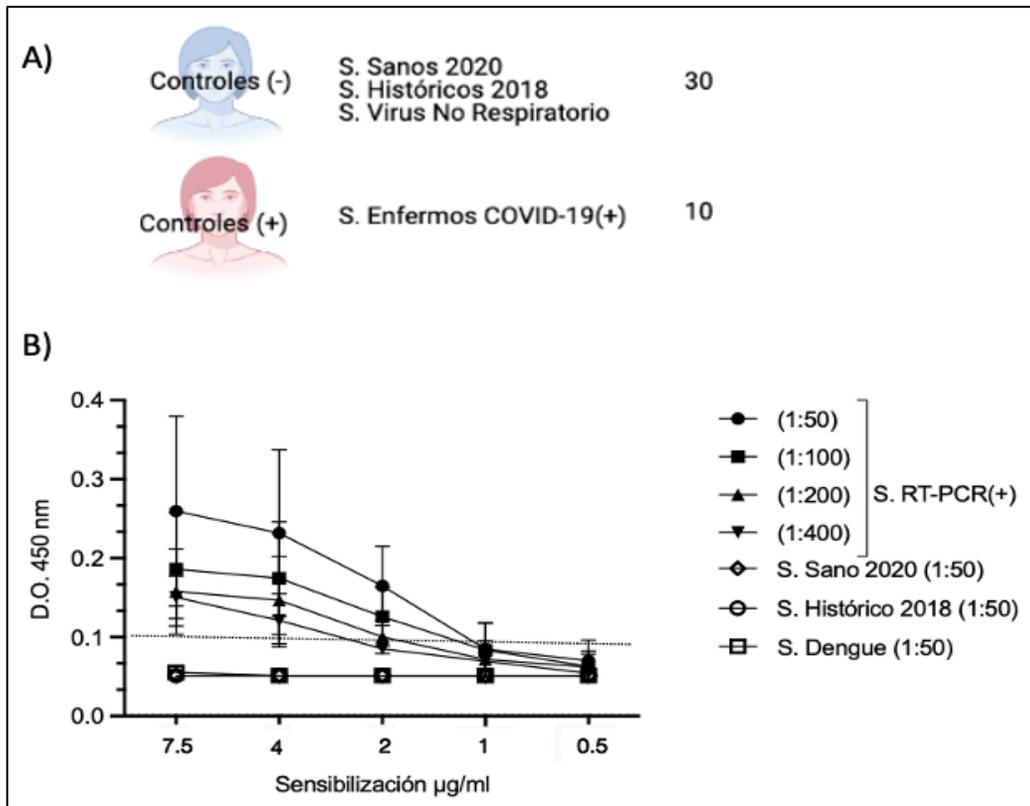


Figura 10. Diseño de ELISA indirecta IgG anti RBD, Para ello se usó la concentración óptima de antígeno para sensibilización de placa y la dilución de sueros. En el eje de las X se muestran las concentraciones a las que se sensibilizó la placa y en el eje de las Y la señal obtenida en unidades de densidad óptica (D.O.) a 450 nm. Las diluciones de los sueros COVID-19 (con una prueba RT-PCR (+) previa) que se evaluaron fueron 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. La dilución a la que se evaluaron los controles negativos; sueros 2020, históricos, enfermedad viral no respiratoria (dengue); fue de 1:50. Todos los sueros fueron inactivados por una hora con Tritón 1x. La línea punteada representa el punto de corte establecido.

En general podemos observar que las diluciones de los sueros mayores a 1:200 producen una señal baja incluso a la concentración de sensibilización más alta 7.5µg/ml. Tomando en cuenta que los

sueros pertenecen a pacientes que se encuentran en la fase inicial de la COVID-19 era esperado que los niveles de anticuerpos anti RBD sean bajos como se ha reportado en otros estudios. Las condiciones donde el 100% de los controles positivos se encontraban arriba del punto de corte están descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de ELISA indirecta IgG anti RBD con el 100% de controles positivos correctamente identificados.

Concentración de sensibilización RBD	Dilución de sueros	Porcentaje arriba del punto de corte
7.5µg/ml	1:50, 1:100, 1:200, 1:400	100%
4µg/ml	1:50, 1:100	100%
2µg/ml	1:50	100%

La concentración óptima para sensibilizar la placa con antígeno RBD fue de 7.5µg/ml y la dilución de los sueros 1:50.

Dado que para la determinación de las condiciones óptimas de sensibilización de placa y de sueros se necesita una cantidad considerable de antígeno del que no se disponía, no fue posible realizar esta evaluación con los otros antígenos recombinantes S1 y N.

Determinación de punto de corte de ELISA casera indirecta

Una vez establecidas las condiciones de trabajo óptimas para el ensayo se procedió a determinar el punto de corte óptimo de nuestra ELISA anti RBD. Para ello se realizó un análisis por curvas ROC. Se consideraron 50 muestras verdaderas positivas (RT-PCR+ a SARS-Cov-2) y 50 muestras verdaderas negativas (Sueros pre-pandémicos 2018).

Las curvas ROC permiten elegir un punto de corte que maximice la utilidad de la prueba, es decir un punto con mayor sensibilidad y especificidad. [129] La curva ROC se realizó con el programa abierto “ROC Analysis Web-based Calculator for ROC Curves” de la Universidad de Johns Hopkins.

El punto de corte para ELISA indirecta IgG anti RBD fue de 0.109 (D.O. 450nm) con una sensibilidad de 96% (95% intervalo de confianza 86-99%) y una especificidad del 100% (95% intervalo de confianza 92-100). Únicamente dos sueros verdaderos positivos fueron clasificados como falsos negativos. Con un intervalo de confianza de 95% (0.1660-0.1990) la media de densidad óptica del grupo de verdaderos positivos fue de 0.1825. En la gráfica de dispersión se representa el punto de corte establecido por la curva ROC (Figura 11)

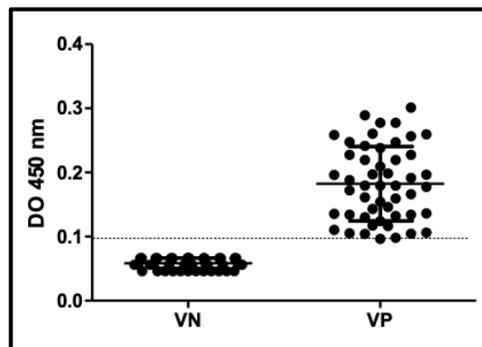


Figura 11. Curva ROC ELISA indirecta y gráfico de dispersión de sueros verdaderos positivos y verdaderos negativos. Gráfico de dispersión de DO de verdaderos negativos (VN, N=50) media 0.05845, desviación estándar 0.008214. Verdaderos positivos (VP, N=50) media 0.1825, desviación estándar 0.05812. Se representa el punto de corte con la línea punteada. Dos valores de DO del grupo de verdadero positivo están por debajo del punto de corte, todos los valores de los verdaderos negativos se mantienen por debajo del punto de corte.

Sabemos que ninguna prueba diagnóstica es 100% confiable, el valor del 100% de especificidad de nuestra prueba irá disminuyendo a razón del aumento de número de muestras a evaluar. [129]

Conociendo el punto de corte óptimo para establecer positividad, el valor del punto de corte se les resta a los valores de densidad óptica obtenidos en las muestras problemáticas; lo que depura señales inespecíficas o de fondo.

Estandarización de la curva de concentración de anticuerpos IgG

Para la estandarización de la curva de concentración de anticuerpos IgG anti S1, RBD, N se empleó como referencia concentraciones conocida de anticuerpos monoclonales dirigido hacia las proteínas S1, RBD y N de SARS-CoV-2 que dan una señal en DO con la que se

calcula indirectamente la concentración de anticuerpos en las muestras problema interpolando el resultado del suero problema en las graficas de concentraciones conocidas.

Como primer paso se determinó la concentración a la que se inicia la curva estándar considerando que todos los valores de las muestras deben de entrar en la curva.

Teniendo como antecedente los datos de la curva ROC, sabemos que la media de DO a 450 nm de los sueros de pacientes con COVID-19 es de 0.1745, una máxima de 0.301 y 0.101 de valor mínimo. Estos valores de media máximos y mínimos varían dependiendo el tipo de muestra que se analice. Para el caso de las muestras de pacientes que han sido vacunados es necesario ajustar la curva de concentración estándar para que todos los posibles valores de las muestras entren en la curva y se pueda calcular la concentración de manera confiable.

Para el caso de la curva de S1 la concentración a la que se inició fue de 1 nanogramo por ml, para RBD fue de 0.5 nanogramos por ml y para N de 3 nanogramos por ml. La curva se construyó con 6 puntos, seis diluciones seriadas de 1:1.25 para que el rango de diferencia entre las densidades ópticas obtenidas se ampliara.

Para evaluar la exactitud de la ELISA cuantitativa indirecta se realizó una ELISA con curva de concentración de seis puntos por duplicado. La muestra a evaluar fue un suero con una concentración conocida de anticuerpos IgG anti RBD. Esta muestra se evaluó seis veces a ocho diluciones dobles seriadas por duplicado. De los datos obtenidos se calculó para cada repetición de las diluciones el valor de concentración obtenido. Este valor se dividió entre el valor de concentración esperado y se multiplicó por 100. El método de cuantificación tuvo una exactitud de entre 95%.

Procesamiento de datos.

Las curvas de concentración de anticuerpos anti S1, RBD y N se corrieron para cada evaluación de la concentración de anticuerpos problema, por duplicado y para cada una de ellas se realizó un control de curva del cual se obtienen los valores de fondo. A los valores de densidad óptica obtenidos de esta curva estándar se les hizo un ajuste

lineal restando los valores promedios del fondo. Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal que generó; cada vez; una fórmula para calcular la concentración estimada de anticuerpos IgG de las muestras problema. El valor de R² aceptable debe ser mayor a 0.98 para cada análisis de regresión lineal.

Una vez que se ha calculado la concentración de anticuerpos de las muestras, se realiza una corrección de la concentración multiplicando los valores obtenidos por el factor de dilución (1:50).

El intervalo de detección de la curva de concentración de IgG anti S1 va de 520 ng a 50 µg por ml de suero; para RBD va de 260 ng a 25 µg por ml de suero y para N va de 49.5 µg a 150 µg por mililitro de suero.

Existe una relación lineal entre las variables de densidad óptica y la concentración de anticuerpos. Para evaluar si el comportamiento de la concentración de anticuerpos anti RBD y la densidad óptica es lineal, se realizó un ensayo de diluciones dobles seriadas tanto de la curva estándar (curva de concentración) como de los sueros de pacientes con COVID-19. El coeficiente de determinación o R² establece el porcentaje de variación de la variable, en este caso, la densidad óptica a concentración seriadas. En una regresión lineal, la relación entre la concentración y la densidad óptica obtenida guardarán una relación lineal y podrá predecirse su comportamiento. La R² se calcula con el programa Excel y fue de 0.97, el cual se considera un límite adecuado para las pruebas serológicas. El valor de la R² nos indica que tan bien puede predecirse la concentración de anticuerpos.

Para evaluar muestras con mayor concentración de anticuerpos como en el caso de pacientes que presenten una sintomatología grave de COVID-19 o individuos que hayan sido vacunados, se podrán evaluar siempre que todos los valores caigan dentro de la curva estándar. Esto se logra al aumentar el factor de dilución de los sueros que deseamos evaluar. Al resultado obtenido se corrige la concentración multiplicándolo por el factor de dilución.

Evaluación de la respuesta humoral generada tras la infección con SARS-CoV-2

Con el objetivo de estudiar el nivel de anticuerpos IgG anti S1, RBD y N en los pacientes que iniciaban con la COVID-19 se evaluaron los sueros de 50 pacientes que tenían de 5 a 15 días de inicio de los síntomas, cuyas características en común fue que se encontraban hospitalizados debido a la gravedad de la enfermedad y un diagnóstico molecular RT-PCR positivo (Figura 12 A y B). Estos sueros fueron proporcionados por el Dr. Maravillas del Hospital Salvador Zubirán. La media de edad de este grupo es de 45 años +/- 13 años, 18 mujeres y 32 hombres. Todos con una o mas comorbilidades y en común comparten el sobrepeso. De acuerdo a la clasificación de la OMS para gravedad de la COVID-19, este grupo se clasificó con enfermedad grave y se encontraban hospitalizados.

Dado que no contábamos con los antígenos recombinantes S1 y N al momento de esta evaluación, se emplearon los antígenos recombinantes comerciales de S1-S2 y N (casa comercial SinoBiological).

Los resultados muestran que el 96% de estos pacientes con COVID-19 grave hospitalizados (48/50) presentaron concentraciones detectables de anticuerpos de clase IgG específicos; anti S1-S2, N y RBD; durante la primera semana de aparición de los síntomas. La concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2 y N muestra una alta concentración con una media de 350ng/ml, desviación estándar 12.19 y 335 ng/ml, desviación estándar 16.92 respectivamente. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de IgG anti S1-S2 y N. La concentración media de IgG contra RBD en pacientes con COVID-19 grave fue de 91 ng/ml, desviación estándar 64 (Figura 12 A). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre S1-S2 vs RBD y entre N vs RBD estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.0001$. Las concentraciones observadas concuerdan con las reportadas internacionalmente para los casos de COVID-19 grave. [130] En la figura 12 B se observan los perfiles de concentración de anticuerpos de los 50 pacientes analizados donde

casi todos los pacientes; a excepción de 2; presentaron niveles detectables de anticuerpos anti RBD. El perfil de anticuerpos IgG anti S1, N y RBD de los buenos respondedores muestra concentraciones elevadas para los tres antígenos y de manera contraria para los poco respondedores.

Los dos pacientes con concentraciones indetectables por nuestra prueba IgG anti RBD son hombres. Ambos requirieron ventilación mecánica avanzada y uno de ellos falleció posterior a 20 días de hospitalización. A todos los pacientes se les realizó una historia clínica completa. En el anexo 2 se muestra el formato de la historia clínica.

Posteriormente se evaluó la concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD en un grupo de 23 voluntarios (11 hombres y 12 mujeres) con una infección leve por COVID-19, media de edad 55 años. La concentración media de IgG anti RBD, S1-S2 y N fue de 233 ng/ml y de 367 ng/ml, 290 ng/ml respectivamente (Figura 12 C). En la Figura 12 D se representan las concentraciones de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD de los 29 pacientes convalecientes de COVID-19 leve de manera individual; se observa que el perfil de los buenos respondedores y malos respondedores es similar al observado en los pacientes con COVID-19 grave, donde existe una respuesta robusta o leve contra los tres antígenos respetivamente.

Entre el grupo de convalecientes se observaron dos que, por nuestra prueba, no presentaron niveles detectables de anticuerpos anti RBD, un hombre y una mujer. Ambos tenían una edad mayor a 70 años y más de una comorbilidad, lo que podría estar relacionado con una alteración en la producción de anticuerpos.

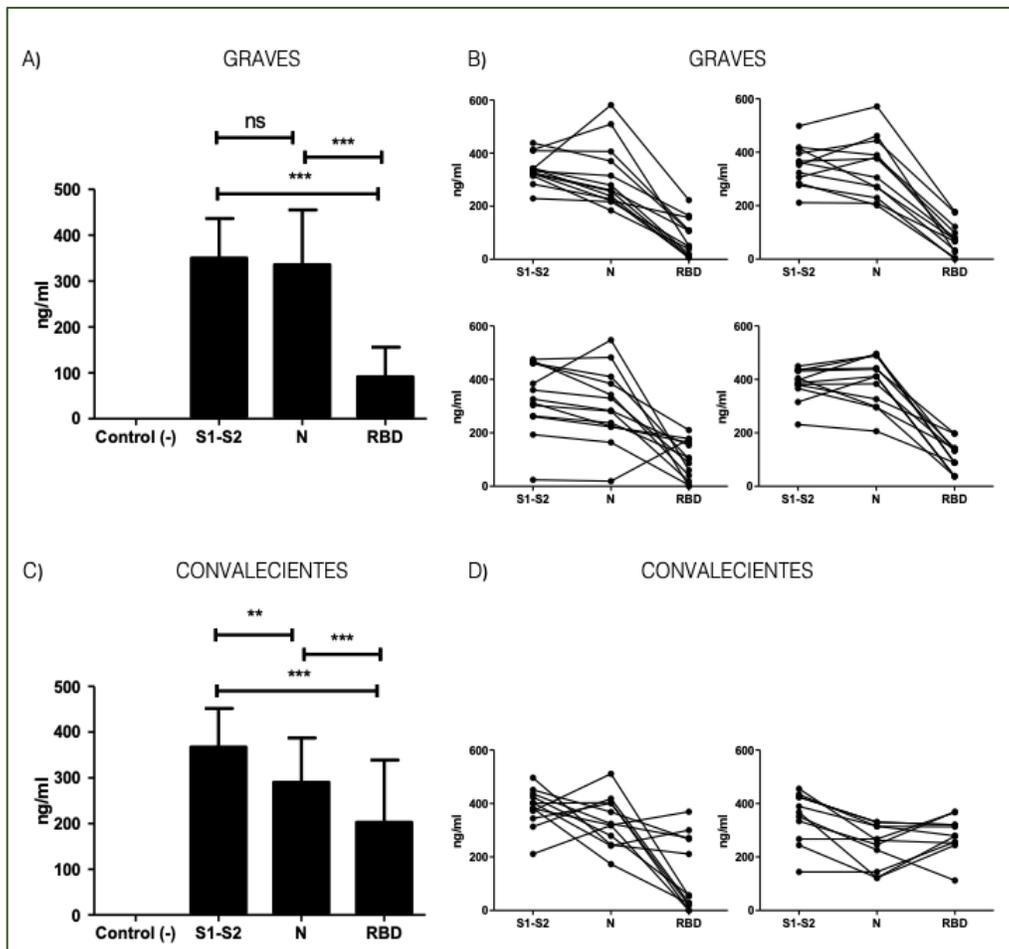


Figura 12. Dinámica de anticuerpos IgG anti S1, N y RBD en pacientes con COVID-19 hospitalizados y convalecientes de COVID-19 leve. A) Se muestran las concentraciones IgG contra los tres antígenos virales S1-S2, N y RBD de pacientes hospitalizados con COVID-19 moderado/grave. Como control se evaluaron 10 sueros históricos del 2018. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre S1-S2 vs RBD $p < 0.0001$ y entre N vs RBD $p < 0.0001$. No hay diferencia estadísticamente significativa entre S1-S2 vs N $p > .478$. B) Patrón de la concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD de los 50 pacientes hospitalizados. Las gráficas representan de manera individual a los pacientes del 1 al 50, para su adecuada visualización se repartieron en cuatro gráficas C) Concentraciones de los anticuerpos IgG contra los tres antígenos virales S1-S2, N y RBD de los voluntarios convalecientes de COVID-19 leve. Como control se evaluaron 10 sueros históricos del 2018. D) Patrón de la concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD de los 23 convalecientes de COVID-19 leve. Las gráficas representan de manera individual a los pacientes del 1 al 23, para su adecuada visualización se repartieron en dos gráficas. Concentración en ng/ml.

Ambos grupos de enfermos por COVID-19 tienen niveles detectables de S1-S2 y N. Para el caso de los recuperados de COVID-19 leve existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de S1-S2 y N, siendo mayor para el primer caso. Esta diferencia no se aprecia en el grupo de los hospitalizados por COVID-19.

Las concentraciones inferiores de IgG anti N podrían explicarse por el decaimiento de los anticuerpos posterior a la resolución de la infección.

Para el caso particular de los anticuerpos dirigidos a RBD, algunos tendrán capacidad neutralizante y estos a su vez tendrán una actividad neutralizante o muy alta o muy baja. Entre los grupos de COVID-19 grave y convalecientes de COVID-19 leve se observa una mayor concentración de IgG anti RBD en el grupo de recuperados comparado con los que apenas iniciaban con la enfermedad grave. Esta observación era la esperada para una respuesta primaria contra el virus donde en un principio el nivel de anticuerpos circulantes es bajo, pero conforme pasa el tiempo aumenta la concentración y la afinidad de estos anticuerpos.

En el caso de los pacientes donde no se detectaron anticuerpos IgG anti RBD posterior a la enfermedad leve, podría explicarse como un sesgo de nuestra prueba de ELISA la cual tiene límites de detección ya mencionados.

Sexo

La pandemia por COVID-19 ha mostrado un sesgo en la mortalidad donde es mayor para los hombres que para las mujeres, el sexo afecta la respuesta inmune adaptativa lo que resulta en una respuesta diferente ante las infecciones. [131] Es por ello que nuestro siguiente análisis fue evaluar la diferencia entre la concentración de anticuerpos específicos anti S1-S2, N y RBD en relación al sexo en los grupos de pacientes con COVID-19 grave y los convalecientes de COVID-19 leve (Figura 13). El grupo de pacientes con COVID-19 grave presenta una diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres. Las concentraciones de anticuerpos anti S1-S2 y N son mayores en los hombres; la media de concentración para hombres es de 370 y 369

ng/ml mientras que para mujeres es de 318 y 291 ng/ml respectivamente. No se observa diferencia significativa entre las concentraciones de IgG anti RBD $p= 0.180$, la media de concentración es de 65ng/ml para hombres y de 38ng/ml para mujeres (Figura 13 A).

Para el grupo de convalecientes de COVID-19 leve la concentración de anticuerpos anti RBD es mayor para las mujeres, con una media de concentración de 217 ng/ml para mujeres y de 191 ng/ml para hombres. Para las mujeres los valores de concentración se mantienen agrupados mientras que para los hombres se observa una mayor desviación estándar. La media de concentración de S1-S2 para hombres y mujeres es de 384 ng/ml, 351 ng/ml respectivamente mientras que la media de concentración de N es de 311 ng/ml, 251 ng/ml respectivamente (Figura 13 B).

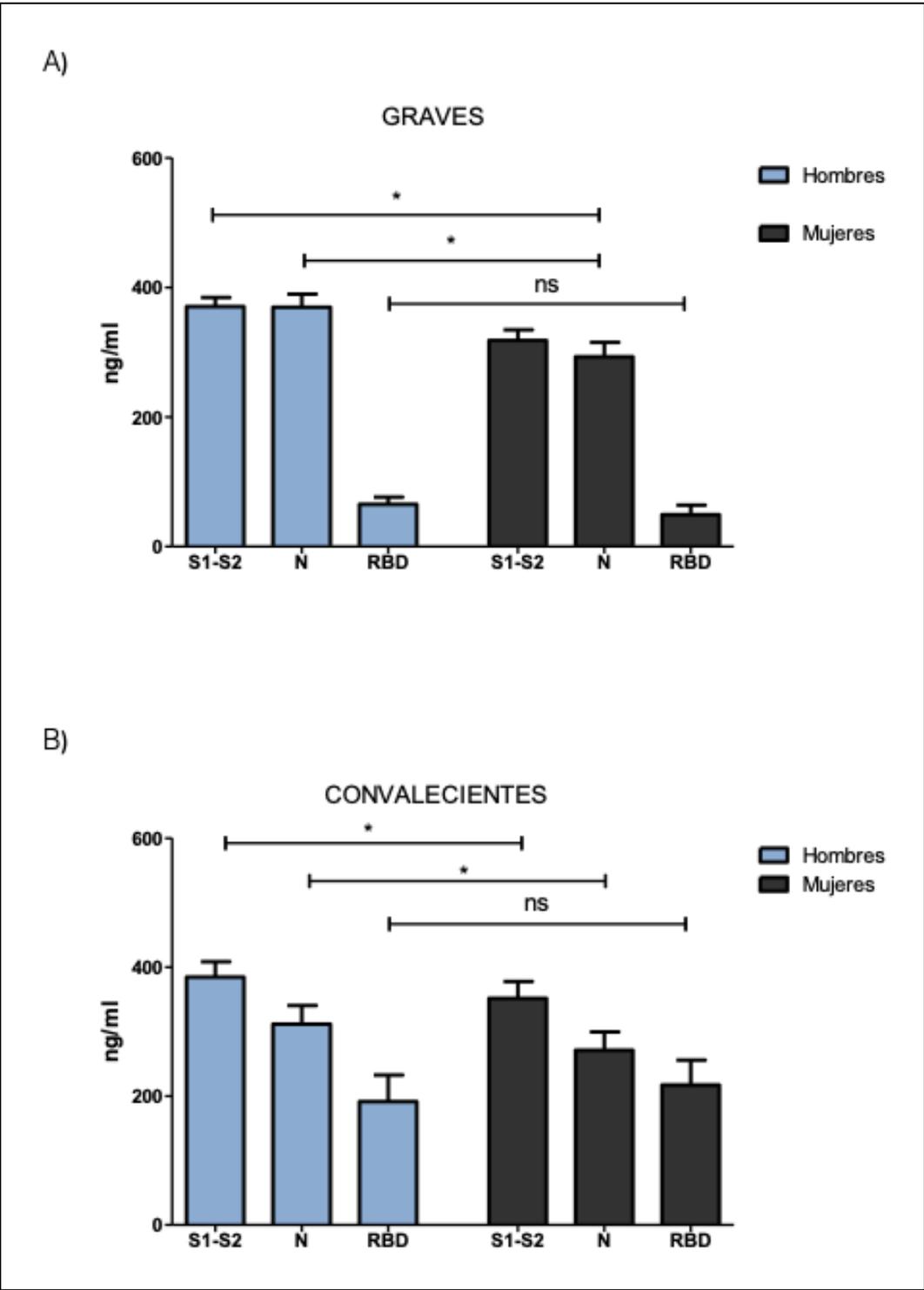


Figura 13. Contracción de anticuerpos IgG anti RBD similar en los pacientes graves independientemente del sexo y mayor en mujeres convalecientes de COVID-19. A) Concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD de hombres (azul) y mujeres

(gris) con COVID-19 grave. Hay una diferencia estadísticamente significativa de los IgG anti S1-S2 y anti N entre hombres y mujeres. * = Valor de $p < 0.022$.

B) Concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2 y N de hombres (azul) y mujeres (gris) convalecientes de COVID-19 leve. Concentraciones en ng/ml de suero. * = Valor de $p < 0.05$.

Los anticuerpos dirigidos hacia la nucleoproteína no tienen una función neutralizante. [12] La gráfica de los convalecientes de COVID-19 leve (Figura 13 B) evidencia diferencias estadísticamente significativas entre géneros, sin embargo, somos conscientes de que la N de este grupo es pequeña por lo que tomamos con cautela los resultados arrojados. Se observa un decaimiento de IgG anti N mayor para las mujeres que para los hombres lo cual podría sugerir la eliminación del virus mucho más rápido para ellas.

Siendo la proteína de espiga la más inmunogénica de las proteínas estructurales, su decaimiento se ve postpuesto y no se observan diferencias por sexo. La diferencia observada en la concentración de IgG anti RBD con los hombres nos sugieren que las mujeres generan niveles más altos de anticuerpos por tanto podrían tener una con mayor posibilidad de resolver una infección secundaria mucho más rápido, sin embargo, sabemos que es necesario conocer la capacidad neutralizante de los anticuerpos.

Edad

Otra de las características clínicas consideradas como factores que predisponen a desarrollar COVID-19 grave es la edad. [126,132] Nosotros evaluamos como influye la edad en la generación de anticuerpos.

Dentro del grupo de pacientes que presentaban COVID-19 grave, las concentraciones de anticuerpos anti S1-S2 y N de clase IgG, fueron superiores para los que se encontraban en el rango de edad de >40 años. Sin embargo, para el caso de los IgG anti RBD no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los rangos de edad (Figura 14 A). Las concentraciones medias de anticuerpos IgG anti RBD en este grupo por rangos de edad fueron de 55ng/ml de 20 a 30 años, de 63ng/ml de 31 a 40 años y de 63ng/ml de >40 años (Figura

14 A). Para el caso de los convalecientes de COVID-19 leve el grupo de edad que presentó una mayor concentración de anticuerpos IgG anti RBD fue el de mayor edad salvo por dos voluntarios, que tuvieron niveles indetectables de anticuerpos por nuestra prueba y que como característica clínica en común tenían más de 70 años. Las concentraciones medias de anticuerpos IgG anti RBD para los rangos de edad fueron de 256ng/ml de 20 a 30 años, de 163ng/ml de 31 a 40 años y de 186ng/ml de >40 años. Las concentraciones de S1-S2 de los tres grupos de edad fueron de 378,444,343ng/ml y de N las medias fueron de 280, 226, 310ng/ml (Figura 14 B). Las concentraciones medias de S1-S2 fueron mayores que las de N para los tres rangos de edad. Estos resultados nos siguieron cierto comportamiento sin embargo e la limitación de este análisis es el tamaño de muestra (N) que es pequeña.

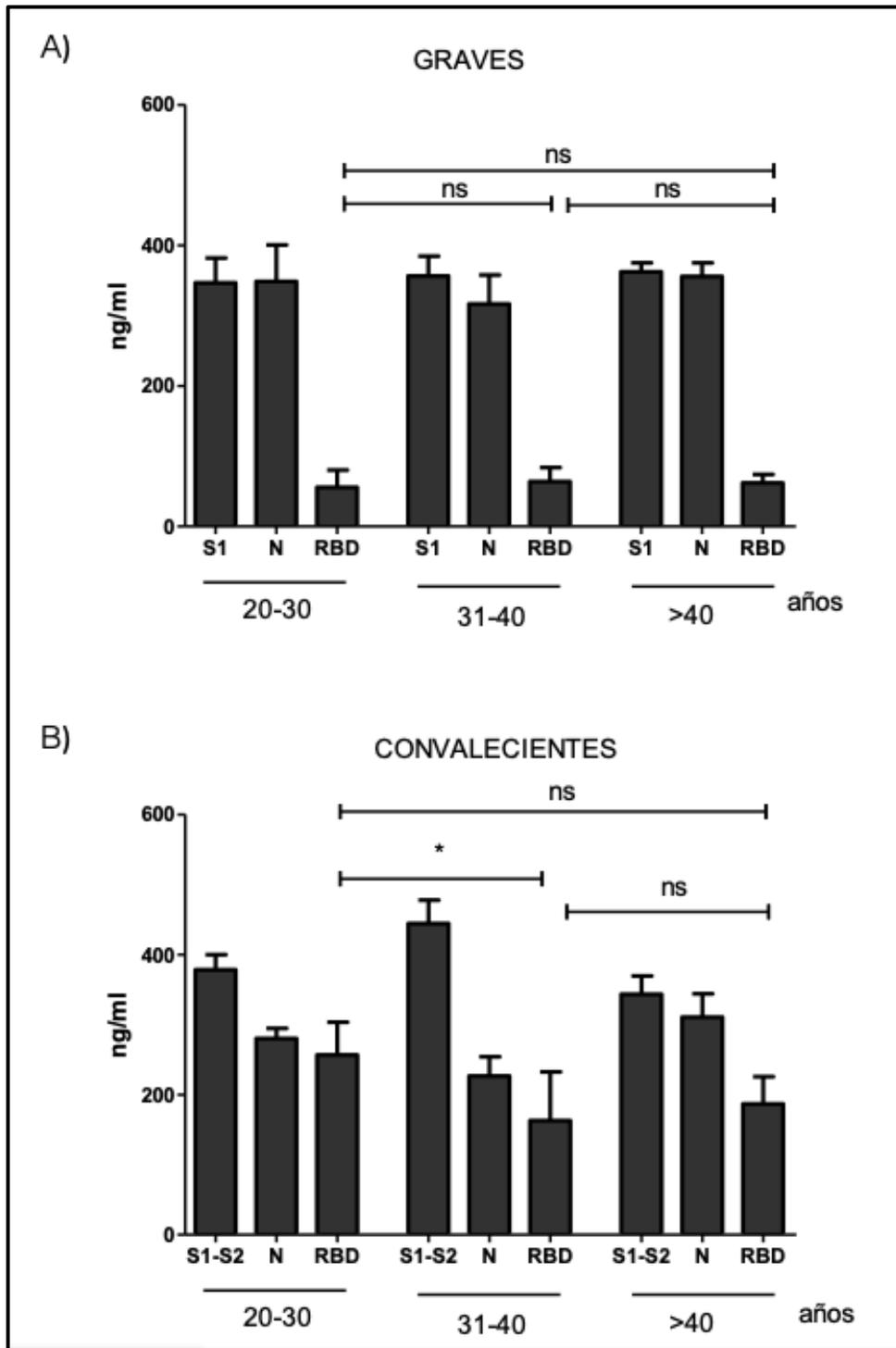


Figura 14. Niveles de anticuerpos similares en el grupo con COVID-19 grave y diferentes en los pacientes convalecientes de COVID-19 leve dependiendo el grupo de edad. Concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD en tres rangos etarios 20-30, 31-40 y >40 años A) Grupo de pacientes COVID-19 grave, grupos etarios 20 a 30 años (N=7), 31 a 40 años (N=8) y >40 años (N=31). B) Grupos de

convalecientes COVID-19 leves grupos etarios 20 a 30 años (N=7), 31 a 40 años (N=3) y >40 años (N=13).

Al inicio de la enfermedad grave (<10 días de aparición de los síntomas) no se observa una diferencia significativa con relación a la edad lo que se evidencia en la gráfica de la figura 14 A.

El grupo etario de mayor edad, convaleciente de COVID-19 leve (Figura 14 B), presenta concentraciones superiores de IgG anti S1-S2 y N, lo cual se asociaría a que pese a haberse resuelto la infección aun quedan inmunocomplejos que siguen siendo presentados por las células dentríticas a los plasmocitos, los que entonces se mantiene produciendo anticuerpos.

Obesidad

Considerando los factores de riesgo para el desarrollo de COVID-19 grave, se analizaron distintas comorbilidades en los dos grupos. Sin embargo y pese a que nuestro país ocupa el primer lugar a nivel mundial con Diabetes en la población adulta, en los dos grupos que analizamos, no era la comorbilidad más representada, pero si la obesidad. Ya se ha relacionado a la obesidad en otras infecciones virales como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades virales severas. [50,54,59]

En el grupo de pacientes con COVID-19 grave llama la atención que el sobrepeso y la obesidad estaba presente en los 50 pacientes, ninguno de ellos presentaba un índice de masa corporal normal. Es por ello que los pacientes se agruparon en pacientes con sobrepeso y pacientes con obesidad, de acuerdo a los criterios de la OMS. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de anticuerpos IgG (Figura 15 A). Las medias de concentración de IgG anti S1-S2, N y RBD para el grupo con sobrepeso fue de 344, 335, 66 ng/ml respectivamente y para el grupo con obesidad fue de 362, 351, 43 ng/ml.

En el caso de los individuos convalecientes de COVID-19 leve se interesantemente se observó que la mayoría se encontraba en su peso ideal, y solo algunos presentaban niveles elevados de IMC que no

llegaba a obesidad. De esta forma fue como se agruparon para su análisis (Figura 15 B). Las medias de concentración de IgG anti S1-S2, N y RBD para el grupo con IMC normal fue de 363, 335, 237 ng/ml respectivamente y para el grupo con IMC elevado fue de 365, 264, 148 ng/ml. Se observó que en los voluntarios convalecientes que presentaban un IMC elevado, la concentración de anticuerpos anti RBD y N era inferior en comparación con los voluntarios que presentaban un IMC normal.

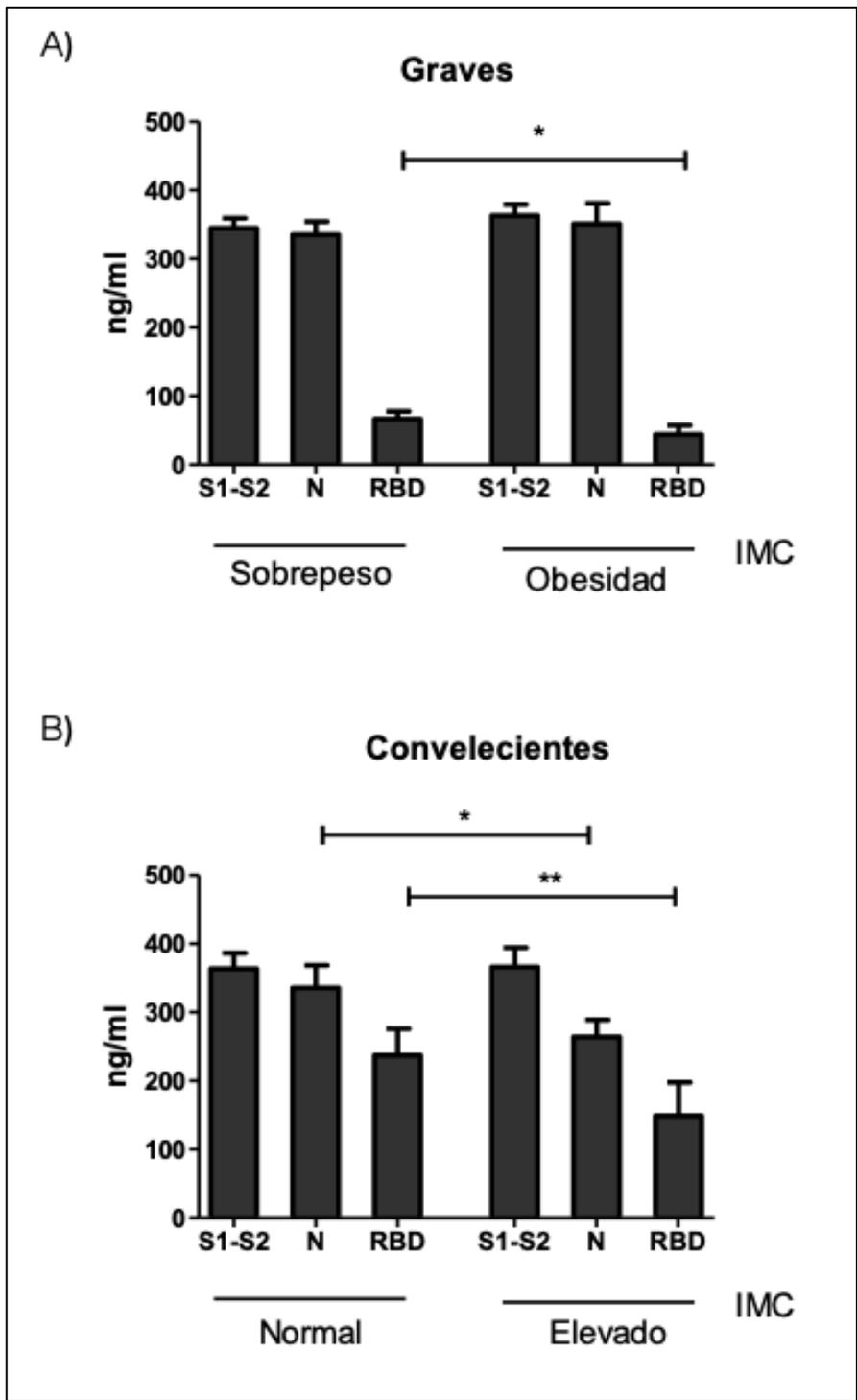


Figura 15. Pacientes con COVID-19 grave y obesidad presentan niveles inferiores de anticuerpos IgG anti RBD, así como los convecientes con un IMC elevado. Concentración de anticuerpos IgG anti S1-S2, N y RBD A) Grupo de pacientes COVID-19 grave con sobrepeso (N=34) y obesidad (N=16) de acuerdo a su IMC. No hay diferencia en entre ambos grupos B) Grupo de convecientes de COVID-19

leve. Dos clasificaciones IMC normal (N=9) y elevado (N=11). Niveles mayores se observan en el grupo con IMC normal. IMC, índice de masa corporal. Valor de *p <0.05. Concentraciones en ng/ml de suero.

En el grupo de enfermos graves de COVID-19 los pacientes comparten la característica de tener un IMC elevado y por tanto no pudimos comparar los niveles de anticuerpos generados en pacientes con un IMC normal. Sin embargo, estos datos nos muestran que tanto con sobrepeso como con obesidad los niveles de anticuerpos generados tras la infección son similares.

Las implicaciones de la obesidad en la generación de anticuerpos se ven mejor representadas en el grupo de convalecientes de la infección leve donde podemos observar que los niveles superiores los generaron los voluntarios con un IMC normal. Sin embargo, estas son solo observaciones de nueva cuenta conocemos las limitaciones asociadas a nuestra N.

Respuesta humoral en individuos vacunados

La primera vacuna aprobada para su uso de emergencia frente a esta pandemia fue la generada con tecnología de RNA mensajero, Pfizer Bio-tech. En el transcurso de la pandemia se aprobaron vacunas con tecnologías de vectores adenovirales como la vacuna CanSino, y la AstraZeneca. Se evaluó entonces la respuesta humoral inducida posterior a vacunación. La Vacuna Pfizer administrada al personal de salud y vacuna CanSino administrada a personal de educación e investigación. De manera abierta realizamos también convocatoria para evaluar la respuesta humoral frente a las demás vacunas aplicadas en nuestro país. La N fue muy pequeña para los grupos de vacunados con AstraZeneca y Sputnik V.

Se evaluó la concentración de anticuerpos IgG anti RBD una vez concluido el esquema de vacunación, dos o una dosis dependiendo de la vacuna. Para este estudio nos aseguramos que ninguno de los voluntarios hubiera padecido de COVID-19 y se evaluaron los anticuerpos a los 20 días posterior a tener un esquema completo de vacunación con Pfizer, AstraZeneca, Sputnik-V y CanSino. Las tres primeras vacunas tienen un esquema de dos dosis, mientras que para

Cansino el esquema es de una dosis. Todas las vacunas, a excepción de Pfizer, ocupan tecnología con vectores adenovirales.

En la Figura 16 se grafican las medias y desviaciones estándares de la concentración de anticuerpos después del esquemas completos de vacunación.

Para el caso de la vacuna Pfizer la media de concentración de anticuerpos de clase IgG fue de 489 ng/ml (DS=136), para AstraZeneca, 236 ng/ml (DS=116) para Sputnik-V 278 ng/ml (DS=169) y para Cansino 54 ng/ml (DS=72).

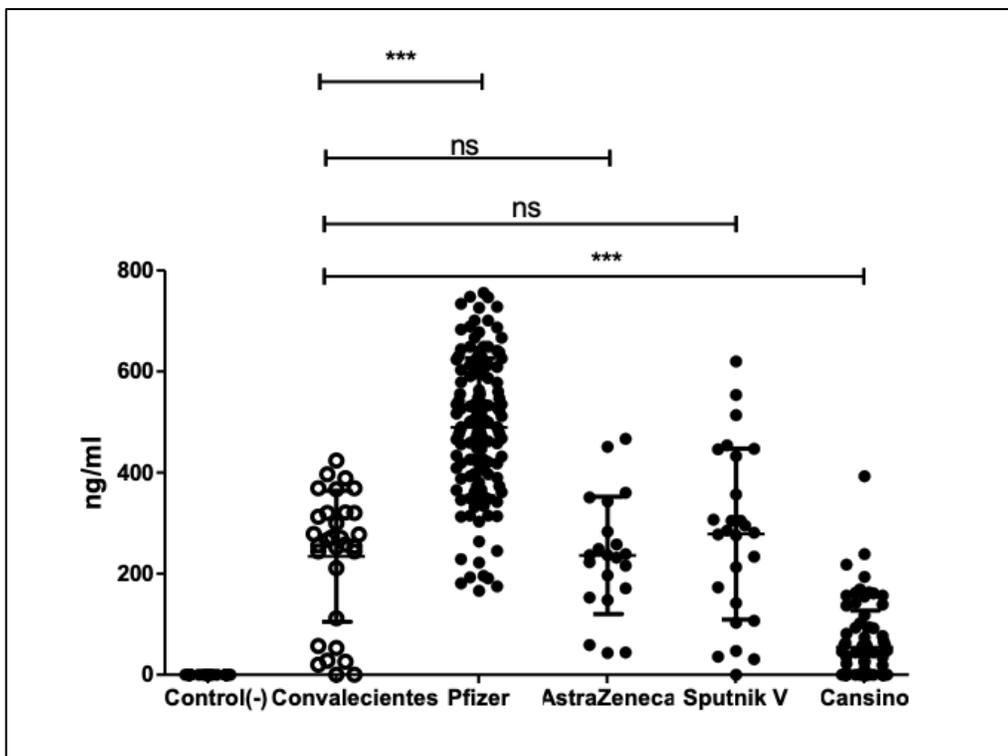


Figura 16. El esquema Pfizer muestra niveles de anticuerpos IgG anti RBD superiores en comparación con otros esquemas. Concentración de anticuerpos IgG RBD post-vacunación Control (-) (N=30), Convalecientes (N=23), Pfizer (N=136), AstraZeneca (N=21), Sputnik-V (N=26), Cansino (N=80). Medias y desviaciones estándar graficadas, todas las vacunas comparadas con las concentraciones medias de los convalecientes. Test de Welch valor de *** $p < 0.0001$. Concentraciones en ng/ml de suero.

La media de concentración de anticuerpos contra la proteína RBD es mayor para los voluntarios vacunados con Pfizer, seguidas de las de AstraZeneca, Sputnik-V y CanSino.

Pfizer Bio-tech; desarrolló una respuesta humoral mas robusta comparada con la población que recibió otra vacuna. Conocemos las limitaciones asociadas a nuestra N y sabemos que son necesarios mas estudios que permitan evaluar la respuesta inmune de la población que ha sido vacunada con diferentes estrategias tecnológicas.

Duración de la inmunidad humoral post vacunación, en individuos con esquemas completos de vacunación

Para este estudio longitudinal se analizaron dos grupos **A)** vacunados con Pfizer (esquema de dos dosis) y **B)** vacunados con Cansino (esquema de una dosis).

El grupo de individuos vacunas con Pfizer, grupo A, es una población de voluntarios del personal de salud; el grupo de individuos vacunados con Cansino, grupo B, es una la población voluntaria de profesores y estudiantes que en ese momento se encontraban laborando en el centro de investigación CINVESTAV. El tiempo en el que realizamos las evaluaciones se basó en los tiempos marcados dentro de los estudios clínicos de las vacunas, Todos los participaron firmaron consentimiento informado, Anexo 3.

De los dos grupos de vacunados; Pfizer y Cansino; las medias de edad son similares. Para el grupo de vacunados con Pfizer la media es de 36 años y para Cansino es de 32 años.

Se analizó un total de 247 participantes a los 20 días post-vacunacion. Posteriormente se realizó una segunda evaluación a los mismos voluntarios que continuaron en el proyecto a los 180 dias post vacunación para el caso de los que recibieron el esquema Pfizer y a los 90 días post vacunación para el caso de los que recibieron el esquema Cansino.

La evaluación a los 90 días post vacunación con Cansino se debe al tiempo en el que se aplicó esta vacuna y el timepo de realizacion de esta tesis.

Mientras que la vacuna Pfizer se aplicó a inicios de diciembre del 2020, Cansino se empezó a aplicar en el mes de mayo del 2021. Se tiene planeado realizar evaluaciones en tiempos similares.

De la población total de vacunados analizados (247) los vacunados con Pfizer, a partir de ahora llamado **grupo A**, representan el 64% (157/247).

Del grupo A el 87% (137/157) no tenían antecedentes de COVID-19 previo a vacunación y 13% (20/157) tenían el antecedente de COVID-19 leve previa vacunación.

Los vacunados con Cansino, a partir de ahora llamado **grupo B**, representan el 36% (90/247) de la población vacunada analizada.

Del grupo B el 78% (70/90) no tenían antecedentes de COVID-19 previo a vacunación y 22% (20/90) tenían antecedentes de COVID-19 leve previa vacunación.

Para el caso del grupo A el 100% (157) de los voluntarios sin antecedentes de COVID-19 a los 20 días post vacunación mostraron niveles detectables de anticuerpos clase IgG anti RBD, la media de la concentración fue de 488 ng/ml.

A los 180 días 111 voluntarios seguían presentando niveles detectables de anticuerpos, la media de concentración fue de 411 ng/ml. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre las medias (Figura 17 A).

La evaluación de los voluntarios con antecedentes de COVID-19 del grupo A mostró una media de concentración de IgG anti RBD de 549 ng/ml y a los 180 días post-vacunación la media de concentración fue de 504 ng/ml (Figura 17 A). Se puede observar el decaimiento individual de los voluntarios del grupo A vacunados y vacunados + antecedentes de COVID-19 en la figura 17 B. En la gráfica cada punto representa un voluntario a través de los 20 y 180 días post vacunación. Se observa un decaimiento de la respuesta de anticuerpos específicos contra RBD estadísticamente significativo, $p < 0.001$ sin embargo, todos los voluntarios mantienen niveles detectables de anticuerpos.

El decaimiento es menor en los voluntarios con antecedentes de COVID-19 y vacunado comparado con los voluntarios solo vacunados.

La inmunidad humoral resultante de la combinación de la inmunidad humoral de memoria generada tras la infección natural por SARS-CoV-2 y la inducida por el esquema de vacunación; llamada por algunos autores inmunidad híbrida [133]; ha sido reportada hasta 100 veces más alta que la respuesta inducida solo por la infección y 25 veces más alta tras administrar la vacuna. Nosotros también observamos un incremento en la concentración de anticuerpos en los voluntarios vacunados con COVID-19 previo.

El grupo A, personal de salud, cada 20 días fue evaluado por parte de la institución donde laboran para diagnosticar por RT-PCR la infección por SARS-CoV-2. Gracias a estas evaluaciones constantes es que estamos seguros de que ninguno de nuestros pacientes evaluados presentó una infección posterior a la vacunación. Sin embargo, observamos que existe un individuo donde la concentración de anti RBD a los 180 dpv fue mayor que a los 20 dpv, lo que podría sugerir una infección reciente que no detectada probablemente por ser falso negativo en la prueba molecular RT-PCR, ya sea por una resolución rápida de la infección o por los límites propios de la prueba molecular.

En el grupo B el 75% (60/80) 20 días post vacunación mostraron niveles detectables de anticuerpos clase IgG anti RBD, la media de concentración de anticuerpos IgG anti RBD fue de 72.44 ng/ml, a los 90 días post-vacunación arrojó una media de anticuerpos de 32 ng/ml. Dado que la N y los valores obtenidos son muy diferentes, se optó por realizar un análisis de varianzas mediante el test de F, este arrojó una diferencia estadísticamente significativa, $p=0.0007$ (Figura 14 C).

Interesantemente se observó que a los 3 meses de haber recibido el esquema completo de Cansino, únicamente el 39.5% (16/43) de la población evaluada tenía niveles detectables de anticuerpos IgG anti RBD.

Los voluntarios con antecedentes de COVID-19 analizados a los 20 dpv presentaban una media de concentración de 376 ng/ml, a los 90

dpv la media de concentración fue de 294 ng/ml. Se observó una respuesta más robusta en el grupo de individuos infectados y vacunados comparada con los que solo fueron vacunados. (Figura 17 C).

La Figura 17 D, muestra el seguimiento individual de estos voluntarios, con puntos grises los voluntarios vacunados y con puntos negros los voluntarios con antecedentes de COVID-19 + vacuna. Se puede observar que existe un decaimiento muy marcado en los voluntarios únicamente vacunados, diferencia significativa $p < 0.0001$; mientras que en los voluntarios con COVID-19 + vacuna, el decaimiento no es significativo, $p < 0.905$, ambos test de Welch.

A los 20 dpv, la concentración de anticuerpos es indetectable y este número aumentó en la segunda evaluación a los 90 dpv. Se observó como la concentración de anticuerpos es casi indetectable para la mayoría de los voluntarios.

Atribuimos los resultados al tamaño de muestra. Observamos que hay un individuo que muestra niveles superiores de anticuerpos a los 90 dpv, lo cual creemos que puede atribuirse a una infección asintomática.

La inmunidad inducida post vacunación con Cansino no es tan potente como la generada con la vacuna Pfizer donde todos los voluntarios analizados en los diferentes tiempos mostraron concentraciones detectables.

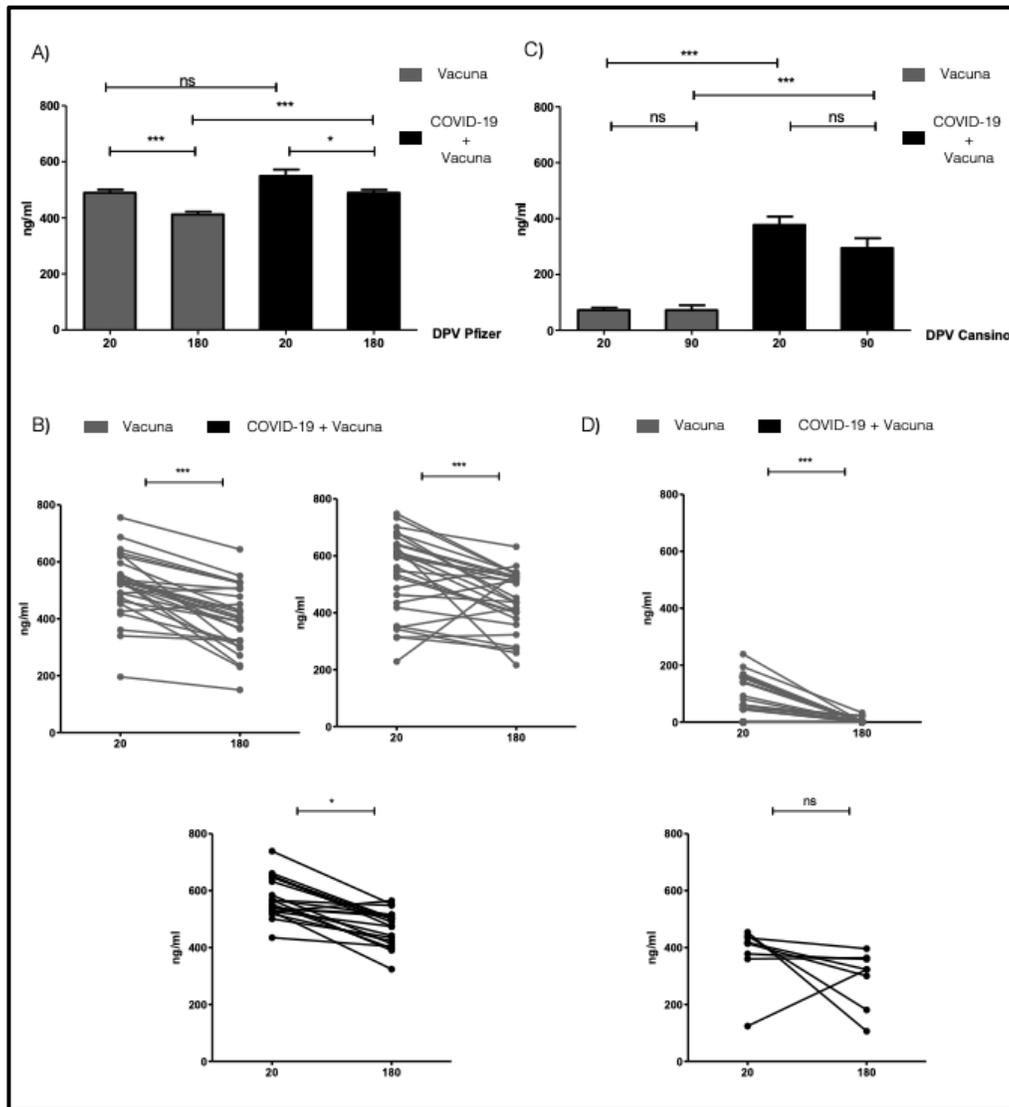


Figura 17. Decaimiento de la respuesta humoral post vacunación con los esquemas Pfizer y Cansino. A) Evaluación del grupo Pfizer, Grupo A. Concentración de IgG anti RBD a los 20 y 180 dpv en sueros de voluntarios vacunados y voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna.

Voluntarios vacunados a los 20 dpv (N=137) media concentración 488 ng/ml IC95%; a los 180 dpv (N=111) media de concentración 411 ng/ml IC95%. Decaimiento estadísticamente significativo, diferencia entre medias $p < 0.0001$.

Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna a los 20 dpv (N=20) media concentración 549 ng/ml IC95%; a los 180 dpv (N=60) media de concentración 504 ng/ml IC95%. Decaimiento estadísticamente significativo, diferencia entre medias $p < 0.001$.

Comparación entre Voluntarios vacunados vs Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna; a los 20 dpv, no diferencia significativa, $p = 0.059$; a los 180 dpv, diferencia significativa, $p = 0.0001$.

B) Análisis de seguimiento individual del grupo A, Pfizer; a los 20 y 180 dpv de voluntarios vacunados (N=56) y voluntarios con antecedente de COVID-19 previo +

vacuna (N=20). Decaimiento estadísticamente significativo en voluntarios vacunados $p < 0.0001$ IC95%; para voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna el decaimiento es estadísticamente significativo $p < 0.001$ IC95%. Solo hay un caso entre los voluntarios vacunados donde la concentración es mayor a los 180 dpv y podría corresponder a una infección asintomática no detectada por RT-PCR.

C) Evaluación grupo Cansino, Grupo B. Concentración de IgG anti RBD a los 20 y 90 dpv en sueros de voluntarios vacunados y voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna.

Voluntarios vacunados a los 20 dpv (N=80) media concentración 72.44 ng/ml IC95%; a los 90 dpv (N=43) media de concentración 32 ng/ml IC95%.

Decaimiento estadísticamente no significativo $p = 0.9001$. Test F para comparación de varianzas $p = 0.0007$.

Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna a los 20 dpv (N=10) media concentración 376.8 ng/ml IC95%; a los 180 dpv (N=8) media de concentración 294 ng/ml IC95%.

Decaimiento estadísticamente no significativo, diferencia entre medias $p = 0.901$.

Comparación entre Voluntarios vacunados vs Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna; a los 20 dpv, test Welch *** $p < 0.0001$; a los 90 dpv, test Welch *** $p < 0.0002$.

D) Análisis de seguimiento individual del grupo B, Cansino; a los 20 y 90 dpv de voluntarios vacunados (N=25) y voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna (N=8). Decaimiento estadísticamente significativo para voluntarios vacunados $p < 0.0001$ IC95%, para voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna decaimiento estadísticamente significativo $p < 0.001$ IC95%.

Concentración en ng/ml de suero. Código de color: gris=vacunados, negro=antecedente de COVID-19+vacuna. Abreviaturas: dpv, días post vacunación; IC, intervalo de confianza.

Coincidiendo con otros reportes, la inmunidad híbrida genera niveles más altos de anticuerpos con posible función neutralizante, lo cual refuerza la idea del beneficio de la vacunación aún después de haber tenido la enfermedad. Para la población que recibió la vacuna Pfizer el decaimiento no es tan marcado como indican algunos reportes de otras naciones. En esta pequeña muestra se observa que las concentraciones se mantienen elevadas aun después de 6 meses de haberse aplicado la vacuna, situación que no se observa para el grupo de vacunados con Cansino, aún si han tenido COVID-19 previo.

Determinar la duración y calidad de esta inmunidad es clave para proponer estrategias de prevención y guiar los planes de vacunación de cada nación.

Factores intrínsecos que generan variación en la respuesta humoral post vacunación

Una de las preguntas principales que se generaron al iniciarse las campañas de vacunación alrededor del mundo era como influirían las características de la población en la generación de la respuesta inmune. Por ello es necesario analizar factores como la edad, el sexo y las enfermedades intrínsecas de los individuos (comorbilidades). En este momento son múltiples los estudios que investigan la influencia de los factores mencionados en el desarrollo de la inmunidad celular y humoral en individuos vacunados contra COVID-19. Dado que es la primera vez que se aplican diversas vacunas con tecnologías diferentes en la población mexicana para un mismo fin, los estudios que permitan observar como estos factores pueden afectar a la generación de la respuesta humoral son necesarios, de modo que se puedan identificar poblaciones de riesgo y sugerir cambios en las estrategias de vacunación conforme se va resolviendo la pandemia y aún cuando esta termine.

Sexo

Se ha observado que el género es una variable que influye en la vulnerabilidad a las enfermedades infecciosas, tanto en la modulación de la respuesta inmune y en el desarrollo de la fisiopatología, entre otros factores.

En los hombres existe una prevalencia y tendencia a la gravedad ante las enfermedades bacterianas, parasitarias y virales mientras que para las mujeres la respuesta que se desarrolla ante estas infecciones son más vigorosas y eficaces.[134–137] Los estudios de la respuesta inmune post vacunación y el género son importantes por lo que se analizó la concentración de IgG anti RBD en hombres y mujeres del grupo A (vacunados con Pfizer) a los 20 días post-vacunación (N=138) y 180 dpv (N=111) y voluntarios con antecedente de COVID-19+vacuna a los 20 dpv (N=20) y 180 dpv (N=60).

De la misma forma se analizó al grupo B (voluntarios vacunados con Cansino) a los 20 dpv (N=80) y 90 dpv (N=43) y voluntarios con antecedente de COVID-19+vacuna a los 20dpv (N=10) y 90dpv (N=8)

Análisis del Grupo A, la media de IgG anti RBD de los voluntarios vacunados hombres a los 20 días fue de 449 ng/ml y a los 180 días de 400 ng/ml y para mujeres de 508 ng/ml y a los 180 días de 421 ng/ml.

La diferencia entre medias se realizó con una prueba no paramétrica y fue estadísticamente significativa $p < 0.0201$ a los 20 días donde los hombres presentaban niveles inferiores mientras que a los 180 días la concentración entre los sexos no eran diferentes (Figura 18 A, gráfica izquierda).

La concentración de anticuerpos IgG anti RBD en los voluntarios vacunados es mayor en mujeres que en hombres durante los primeros días post vacunación, donde es posible observar una diferencia en la inmunidad humoral generada.

Los voluntarios hombres con antecedentes de COVID-19 + vacuna mostraron a los 20 días una concentración media de 555 ng/ml y a los 180 días una concentración de 493. Las mujeres presentaron una concentración a los 20 días de 545 ng/ml y a los 180 días 486 ng/ml. El análisis de las medias a los 20 y 180 días no fue estadísticamente significativo $p = 0.720$ (Figura 18 A, gráfica derecha).

Existe una mayor concentración de anticuerpos en las mujeres vacunadas con el esquema Pfizer únicamente a los 20 dpv. Lo que podría sugerir que la respuesta humoral inducida por esta vacuna no se ve alterada por el sexo.

Cuando existe una infección previa y posterior vacunación no se observa diferencia en la concentración de anticuerpos generados dependiente del género en ninguno de los tiempos de evaluación. Lo que demuestra el beneficio de la vacunación aún en la población que ya ha tenido COVID-19.

Análisis del Grupo B, la media de IgG anti RBD de los voluntarios vacunados

hombres a los 20 días fue de 75 ng/ml y a los 90 días de 57 ng/ml y para las mujeres la media a los 20 días fue de 86 ng/ml y a los 90 días de 69 ng/ml.

Se observó que un 27% de los voluntarios vacunados hombres y un 22% de las mujeres no presentaron niveles de anticuerpos IgG detectables por nuestra prueba a los 20 días posteriores; a los 90 días el porcentaje de voluntarios con niveles indetectables fue de 59% y 52% respectivamente.

La diferencia entre medias a los 20 y 90 dpv se realizó con una prueba no paramétrica y no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos $p=0.7219$ (Figura 18 B, gráfica izquierda).

La concentración de anticuerpos IgG anti RBD post vacunación fue mayor en las mujeres a los 90 dpv. Esto sugiere que tanto la concentración de IgG anti RBD inducida por esta vacuna, como la duración de los anticuerpos generados pueden estar influenciadas por el sexo. Tenemos en cuenta que nuestra N es pequeña por lo cual solo describimos algunas observaciones.

Los voluntarios hombres con antecedentes de COVID-19 + vacuna mostraron una concentración a los 20 días de 315 ng/ml y a los 90 días de 253 ng/ml, mientras que en las mujeres la concentración a los 20 días fue de 403 ng/ml y a los 90 días de 307 ng/ml (Figura 18 B, gráfica derecha).

La diferencia de medias es notoria pero no es estadísticamente significativa, esto se le atribuye a la N pequeña, son necesarios más estudios e incrementar la N

Dada la N tan pequeña, no se pueden hacer comparaciones de medias, sin embargo se puede observar que las mujeres tienen niveles más altos de anticuerpos aún después de los 90 días y solo

algunas presentan niveles indetectables a este tiempo; de manera contraria los hombres en su mayoría tienen niveles indetectables de anticuerpos aún a los 20 días posteriores a la vacunación con Cansino. La respuesta humoral generada por esta vacuna si muestra diferencias en la concentración de anticuerpos IgG anti RBD que podrían estar relacionadas con el sexo. Se necesita incrementar la N para poder realizar asociaciones (Figura 18 B, gráfica derecha).

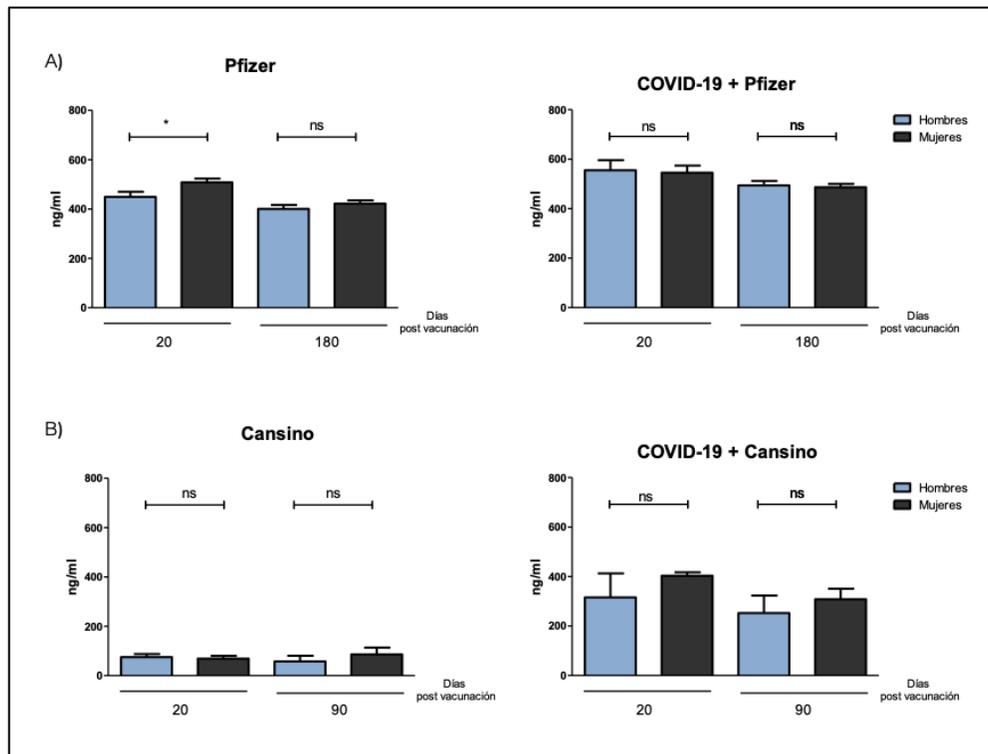


Figura 18. El sexo y la variación de la respuesta humoral post vacunación. A) Concentración de IgG anti RBD en hombres(azul) y mujeres(gris) del Grupo A, vacuna Pfizer, analizados a los días los 20 y 180 post vacunación. Gráfica izquierda. Voluntarios vacunados a los 20dpv, hombres (N=60), mujeres (N=78); a los 180dpv hombres (N=52), mujeres (N=59). Gráfica derecha. Voluntarios con antecedentes de COVID-19 vacunos a los 20dpv, hombres (N=8), mujeres (N=12); a los 180dpv hombres (N=21), mujeres (N=39). Diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en el subgrupo de vacunados a los 20dpv. Análisis no paramétricos, significancia $p < 0.05$. B) Concentración de IgG anti RBD en hombres(azul) y mujeres(gris) del Grupo B, vacuna Cansino, analizados a los días los 20 y 90 post vacunación. Gráfica izquierda. Voluntarios vacunados a los 20dpv, hombres (N=40), mujeres (N=36); a los 90dpv hombres (N=22), mujeres (N=21). Gráfica derecha. Voluntarios con antecedentes de COVID-19 previo vacunados a los 20dpv hombres (N=3), mujeres (N=7); y a los 180dpv hombres (N=2), mujeres (N=6).

Análisis no paramétricos, significancia $p < 0.05$. Abreviaturas: ns, no significancia; dpv, días post vacunación.

Las mujeres presentaron mayor concentración a lo largo del tiempo. La respuesta generada en las mujeres es superior a los 20dpv y a los 180dpv parece no existir diferencias importantes entre los sexos cuando el esquema aplicado es Pfizer; este esquema parece inducir una respuesta inmune humoral más robusta y prolongada en contraste con los individuos vacunados con Cansino donde pareciera que el género contribuye a la diferencia entre las concentraciones de anticuerpos generados usando este esquema.

Edad

La edad como factor que influye en la respuesta humoral para otras vacunas como la influenza o la hepatitis. Se han mostrado correlaciones negativas entre la edad y la generación y duración de la respuesta inmune. [136,138]

Nosotros analizamos la concentración de anticuerpos IgG anti RBD a los 180 y 90 dpv en los grupos A y B de voluntarios vacunados.

Los grupos de edad se calcularon con la fórmula para datos agrupados. La cual arrojó 3 grupos de edad: 20 a 30 años, 31 a 40 años y >40 años.

Todos los grupos se analizaron dependiendo del sexo.

Análisis de las concentraciones de IgG anti RBD en el grupo A (Pfizer) por edad.

El grupo de vacunados entre los 20-30 años de edad la media de concentración de IgG fue de 380 ng/ml en hombres y de 461 ng/ml en mujeres, hay una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$. En los grupos entre 31-40 años la media en hombres y mujeres fue de 414 µg/ml no se encontraron diferencias significativas $p = 0.9581$. Entre los grupos con >40 años la media en hombres fue de 384 ng/ml y de 412 ng/ml en mujeres reflejando una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$ (Figura 19, gráfica izquierda).

Las edades mayores a 40 años presentan los niveles mas bajos de anticuerpos, seguido del grupo etario más joven. Esto podria asociarse para el primer caso a la inmunosenescencia; mientras que para el segundo caso podria estar implicada la eficacia del sistema inmune innato. Una adecuada función del sistema inmune innato acorta la exposición viral y por tanto la respuesta de memoria generada no es tan amplia. [7,88] Además observamos que las mujeres de los grupos etarios más jóvenes y más adultos presentan concentraciones superiores a la de los hombres. En el grupo etario de 31-40 parece no existir diferencia relacionada con la edad y sexo.

Los voluntarios con antecedente de COVID-19 y vacunados en las edades de 20-30 años presentaron una concentración media de IgG anti RBD de 496 ng/ml en hombres y de 412 ng/ml en mujeres. Por lo que no hay diferencia significativa $p > 0.05$. Entre las edades de 31-40 años la media de concentración en hombres y en mujeres es de 508 μ g/ml, no hay diferencia significativa $p = 0.9581$.

Entre las edades de >40 años la media en hombres es de 481 ng/ml y en mujeres de 458 ng/ml (Figura 19 A, gráfica derecha).

Dada nuestra N pequeña no se pueden hacer análisis de medias, pero podemos observar que existe una tendencia de presentar concentraciones similares independientemente de la edad y sexo.

Análisis de las concentraciones de IgG anti RBD en el grupo B (Cansino) por edad.

Los voluntarios vacunados que se encontraban entre los 20-30 años tuvieron una media de concentración en los hombres de 43 ng/ml y en las mujeres de 140 ng/ml en mujeres. No hay una diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$.

Entre las edades de 31-40 años ninguno de los hombres evaluados en esta edad presentó concentraciones detectables de anticuerpos. La

media en mujeres fue de 1.5 µg/ml. Entre las edades >40 años la media en hombres fue de 2 ng/ml y de 67 ng/ml en mujeres.

Dada la N tan pequeña, no es posible la comparación. Sin embargo, se pueden observar algunas tendencias como que las mujeres en los tres grupos etarios presentaron niveles detectables de anticuerpos, los hombres a la edad de 30 y 40 años no presentaron niveles detectables. Las concentraciones promedio para ambos sexos son mayores en las edades mas jovenes mientras que a edades superiores a 40 años la concentracion promedio es inferior en las mujeres y casi nula en los hombres.

Los voluntarios con antecedente de COVID-19 y vacunados en las edades de 20-30 años tenina concentraciones de de 261 ng/m, entre las edades de 31-40 años la media de concetración fue de 348 µg/ml y entre las edades de >40 años la media de concentración fue de 310 ng/ml. (Figura 19 B, gráfica derecha)

Para este analisis no consideramos el sexo por ser un grupo pequeño y solo observamos tendencias como que hay una concetración similar en las edades más jovenes. Todos los participantes presentaron niveles detectables de anticuerpos que fueron muy similares a los de la inmunidad natural.

La vacunación con este esquema muestra una desventaja para las edades de mayores de 30 años y el sexo funge como como un factor de mayor riesgo en la generación y duración de anticuerpos post vacunación. Ninguno de los hombres evaluados de ese grupo etario tenía niveles detectables.

La vacunación en las personas con COVID-19 previo elimina el impacto perjudicial; observado por diversos autores [138,139] y por nosotros; que tiene la edad en la generación de respuesta humoral.

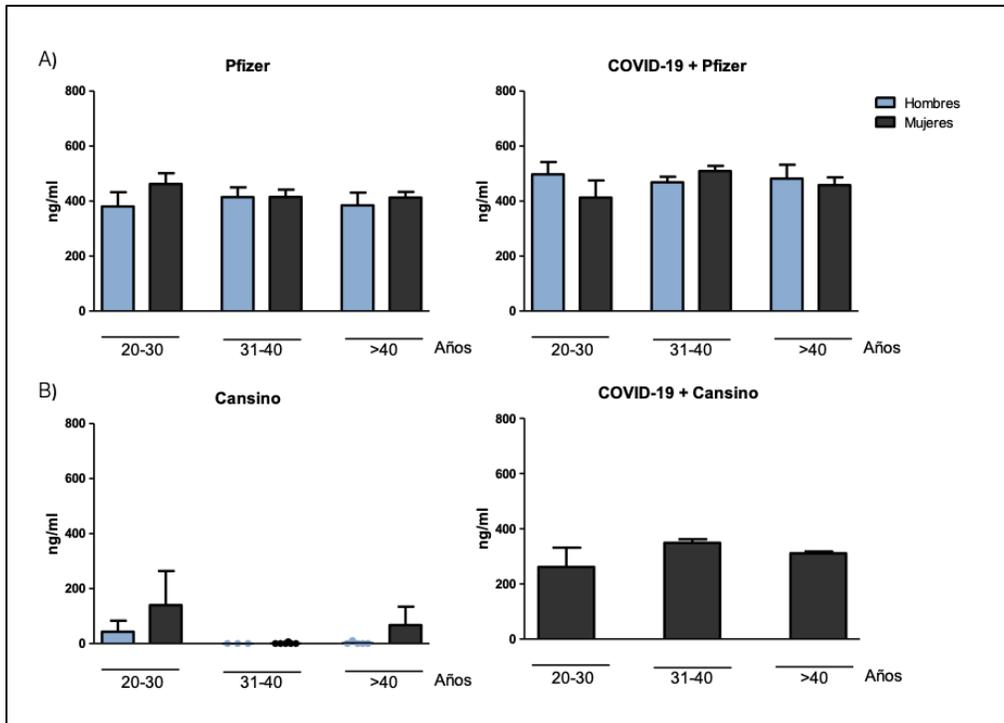


Figura 19. La edad como factor negativo en la generación de anticuerpos difiere dependiendo el tipo de vacuna, Pfizer y Cansino. A) Concentración de IgG anti RBD por grupo etario en hombres(azul) y mujeres(gris) con esquema Pfizer a los 180 dpv. Voluntarios vacunados; Edad 20 a 30 años, hombres (N=5) 380 μ g/ml, mujeres (N=2) 461 μ g/ml. Edad 31-40 años, hombres (N=10) 414 μ g/ml, mujeres (N=14) 414 μ g/ml. Edad >40 años, hombres (N=7) 384 μ g/ml, mujeres (N=5) 412 μ g/ml. Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna; Edad 20 a 30 años, hombres (N=3) 496 μ g/ml, mujeres (N=3) 412 μ g/ml; Edad 31-40 años, hombres (N=5) 468 μ g/ml, mujeres (N=9) 508 μ g/ml. Edad >40 años, hombres (N=6) 481 μ g/ml, mujeres (N=3) 458 μ g/ml. No se realizan análisis de comparación de medias debido a la N, pero se observan tendencias por edad donde es mayor a las edades de 30 a 40 años y las concentraciones son mayores en las mujeres. B) Concentración de IgG anti RBD por grupo etario en hombres(azul) y mujeres(gris) con esquema Cansino a los 90 dpv. Voluntarios vacunados; Edad 20 a 30 años, hombres (N=8) 43 μ g/ml, mujeres (N=3) 140 μ g/ml. Edad 31-40 años, hombres (N=3) 0 μ g/ml, mujeres (N=6) 1 μ g/ml. Edad >40 años, hombres (N=5) 2 μ g/ml, mujeres (N=2) 67 μ g/ml. Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo + vacuna; No se consideró estratificar a los grupos por sexo debido a la N. Se muestran resultados tanto de hombres como mujeres. Edad 20 a 30 años (N=4) 261 μ g/ml. Edad 31-40 años (N=3) 348 μ g/ml. Edad >40 años (N=3) 310 μ g/ml. No se realizan análisis de comparación de medias debido a la N, pero se observa que todos los pacientes generaron anticuerpos independientemente del grupo etario y que la concentración es menor a las edades de 20 a 30 años. Abreviaturas: dpv, días post vacunación.

Obesidad

El último análisis de nuestra población fue referente a la obesidad, definida como un índice de masa corporal elevado. [140] La obesidad se ha relacionado como un factor predisponente a desarrollar niveles bajos de anticuerpos posterior a la vacunación. Existen reportes de individuos vacunados con influenza con obesos en donde se observa una respuesta inmune humoral baja comparada con individuos sin esta comorbilidad. [54,57,58,126,140] Más recientemente el grupo de trabajo del doctor Krammer describió las diferencias en los títulos de anticuerpos generados post vacunación con esquema Pfizer, en donde los individuos que presentaban un IMC elevado tenían niveles inferiores de anticuerpos comparados con los voluntarios analizados con un IMC normal.

Nosotros analizamos las concentraciones de IgG anti RBD a los 180 y 90 días post vacunación en los voluntarios vacunados y los voluntarios con antecedentes de COVID-19 vacunados de los grupos A y B de acuerdo al índice de masa corporal (IMC) calculado.

El IMC se calculó tomando en cuenta los datos clínicos de cada paciente, el peso en kilogramos entre la estatura en metros y nuevamente entre la estatura en metros. El IMC permite clasificar a los individuos en dos grupos, un grupo con un IMC con valores normales (18.5-24.9) y un grupo con IMC elevado (>25). Un IMC elevado corresponde a sobrepeso cuando los valores van de 25 a 29.9 y corresponde a obesidad cuando los valores obtenidos son >30.

Análisis de las concentraciones de IgG anti RBD en el grupo A a los 180dpv de acuerdo a su IMC.

Los voluntarios vacunados clasificados de acuerdo a su IMC, normal y elevado, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre en hombres y mujeres $p > 0.05$ (Figura 20 A, gráfica izquierda).

Los voluntarios con antecedentes de COVID-19 + vacuna analizados de acuerdo a su IMC, mostraron concentraciones similares independientemente del género. No existe una diferencia estadísticamente significativa, $p > 0.05$ (Figura 20 A, gráfica derecha).

Estos resultados nos podrían sugerir que el factor del sobrepeso u obesidad no influye en la intensidad de la respuesta humoral generada, concentración de anticuerpos, cuando se administra esta vacuna, Pfizer. Evidentemente sabemos que es necesario estudios mucho mas amplios y con una N mucho mayor para poder realizar una asociación.

Análisis de las concentraciones de IgG anti RBD en el grupo B a los 90 dpv de acuerdo a su IMC.

Los voluntarios vacunados clasificados de acuerdo a su IMC, normal y elevado, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los hombres, donde la concentración media fue mayor para los hombres que tuvieron IMC elevado.

Este primer resultado contradice el efecto que se le ha atribuido a la obesidad como factor predisponente a niveles inferiores de anticuerpos. Analizando la historia clínica individual de cada voluntario destacamos que son dos los hombres que presentan concentraciones elevadas que modifican la desviación estándar y la media de todo el grupo $p < 0.05$ (Figura 20 B, gráfica izquierda). Somos conscientes de que es necesario aumentar nuestra N para poder realizar una asociación adecuada. Además, recordemos que desde los análisis anteriores se reportó que son muy pocos los hombres vacunados con Cansino que aun presentan concentraciones detectables de anticuerpos a los 90 dpv.

Por otra parte, para el caso de las mujeres si se observa una concentración inferior de anticuerpos en aquellos que tenían un IMC elevado comparados con los que tenían un IMC normal, sin embargo, no es estadísticamente significativo por nuestro pequeño número de voluntarios analizados (Figura 20 B, gráfica izquierda).

Los voluntarios con antecedentes de COVID-19 vacunados analizados de acuerdo a su IMC, mostraron concentraciones diferentes dependiendo del genero. Los hombres mostraron concentraciones inferiores de anticuerpos cuando tenían un IMC elevado. A diferencias

de las mujeres, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los que presentaban un IMC normal o elevado. Los análisis estadísticos se hicieron mediante pruebas no paramétricas con diferencia de varianzas dado el número de voluntarios evaluados. (Figura 20 B, gráfica derecha).

Estos resultados nos podrían sugerir que el factor del sobrepeso u obesidad influye en la intensidad de la respuesta humoral generada, principalmente en los hombres, donde la concentración de anticuerpos fue inferior en aquellos que presentaban un IMC elevado y fueron vacunados con Cansino. Esta observación es cierta aun cuando han sufrido una enfermedad natural. Lo que refuerza una vez mas la necesidad de vacunarse aun después de la recuperación de la enfermedad.

Sabemos que es necesario estudios mucho mas amplios y con una N mucho mayor para poder realizar una asociación.

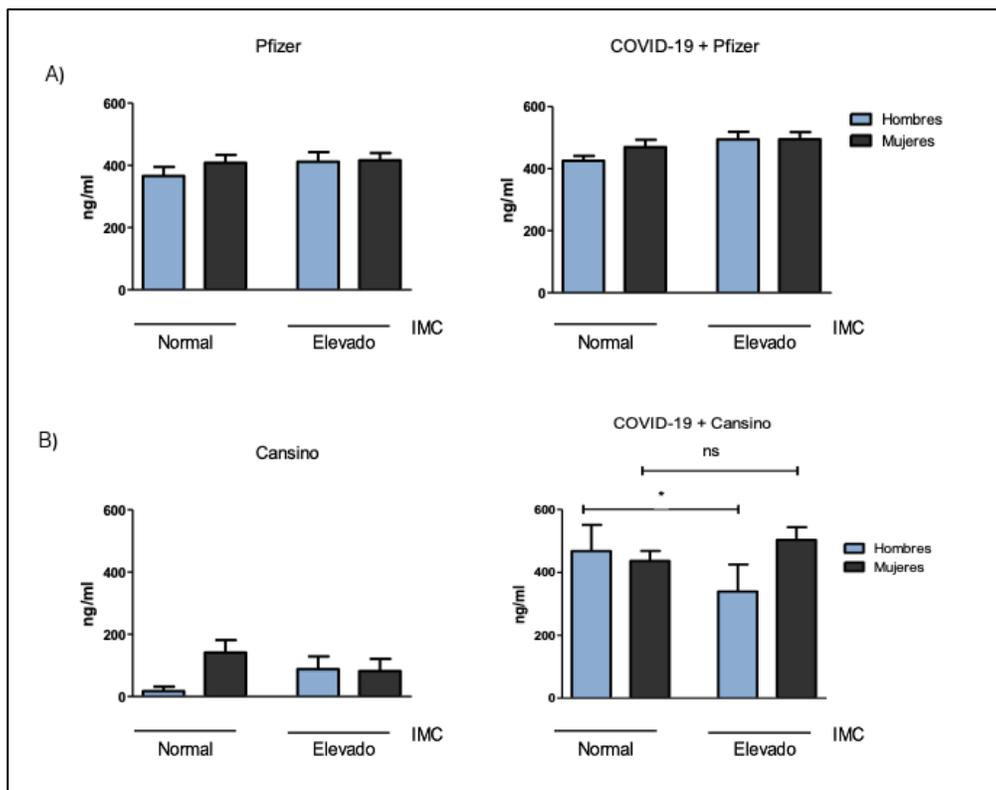


Figura 20. La obesidad como factor asociado en los niveles de anticuerpos generados en hombres y mujeres vacunados con Pfizer o Cansino. A) Concentración

de IgG anti RBD a los 180dpv en grupo Pfizer con IMC normal y elevado en hombres (azul) y mujeres (negro). Voluntarios vacunados, IMC normal; hombres (N=5) 380 µg/ml, mujeres (N=2) 461 µg/ml. IMC alto; hombres (N=10) 414 µg/ml, mujeres (N=14) 414 µg/ml. Voluntarios con antecedente de COVID-19 previo vacunados, IMC normal; hombres (N=3) 496 µg/ml, mujeres (N=3) 412 µg/ml. IMC elevado, hombres (N=5) 468 µg/ml, mujeres (N=9) 508 µg/ml.

B) Concentración de IgG anti RBD a los 90dpv en voluntarios vacunados con IMC normal y elevado en hombres (azul) y mujeres (negro). IMC normal; hombres (N=5) 380 µg/ml, mujeres (N=2) 461 µg/ml. IMC elevado; hombres (N=5) 380 µg/ml, mujeres (N=2) 461µg/ml.

Voluntarios con antecedente de COVID-19 vacunados. IMC normal; hombres (N=3) 496 µg/ml, mujeres (N=3) 412 µg/ml. IMC elevado; hombres (N=5) 468 µg/ml, mujeres (N=9) 508 µg/ml.

Abreviaturas: dpv, días post vacunación; IMC, índice de masa corporal.

Discusión

El nuevo coronavirus patogénico para humanos, nombrado como SARS-CoV-2, ha causado cientos de miles de muertes en todo el mundo desde su identificación a finales del 2019, como responsable de un brote de neumonía atípica. Desde la declaración de la pandemia en el año 2020, se han desarrollado numerosas pruebas diagnósticas con utilidades y limitaciones diferentes; estas van desde pruebas moleculares para el diagnóstico de infección (RT-PCR), como las serológicas para el diagnóstico de confirmación. Las pruebas serológicas que se desarrollaron en un principio de la pandemia, están dirigidas a cubrir las necesidades de diagnóstico confirmatorio y estudios epidemiológicos de seroprevalencia, todo ello con la finalidad generar estrategias para disminuir el índice de transmisión y proteger a las poblaciones de riesgo. [37,141]

La mayor parte de las pruebas serológicas están basadas en ensayos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) los cuales detectan los anticuerpos generados tras la infección por SARS-CoV-2. Las pruebas comerciales pueden identificar anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas de espiga o nucleoproteína o ambos. [18,100,105,107,142,143] El diseño de pruebas serológicas específicas para los diferentes antígenos del SARS-CoV2 co-ayuda en la caracterización de la dinámica de anticuerpos inducidos por una infección natural o al recibir un esquema de vacunación contra COVID-19 o bien la serología contra las nuevas variantes del virus. [105,144–148]

El objetivo principal de este trabajo fue diseñar y validar una prueba con una sensibilidad y especificidad alta con la cual evaluar la dinámica de los anticuerpos IgG anti el subdominio S1 de la proteína de espiga, el dominio RBD y la nucleoproteína.

Nuestro laboratorio diseñó, expresó y purificó las proteínas recombinantes S1 y N y se expresó y purificó la proteína RBD (el plásmido de RBD fue donado amablemente por el Dr. F. Krammer). [149] Se demostró que estas proteínas se fueron reconocidas por los anticuerpos provenientes de individuos que han sufrido una infección

natural por SARS-CoV-2 y que en contraste estas proteínas no fueron reconocidas por sueros obtenidos antes de la llegada de la pandemia; una vez comprobada su utilidad como antígenos se diseñó un ensayo de ELISA indirecta. Para ello se determinó la concentración óptima de antígeno recombinante para la sensibilización de la placa y dilución óptima de los sueros tal como indican las buenas prácticas para el desarrollo de pruebas serológicas. [129] El siguiente paso fue validar el ensayo, para lo cual recurrimos a las pruebas ROC que nos arrojaron una sensibilidad de 96% y especificidad del 100%. [150] Con el antecedente de que la mayoría de las pruebas serológicas desarrolladas fuera del país pueden dar falsos negativos; debido a que la estandarización se hace con muestras de otras poblaciones diferentes a donde se aplica la prueba; una de las principales ventajas del desarrollo de nuestra prueba es que se puede ajustar el punto de corte tomando en consideración el fondo de las muestras verdaderas negativas de la población en estudio.

En este trabajo se evaluaron 50 muestras históricas del 2018 (muestras pre-pandémicas) de la población mexicana y además se evaluaron sueros de pacientes infectados con una enfermedad viral no relacionada con SARS-CoV2 para asegurarnos que no existiría una reacción cruzada. Con el entendido de que ninguna prueba puede ser 100% específica sabemos que al aumentar la N la especificidad disminuirá. Gracias a los análisis estadísticos de curvas ROC es que podemos nosotros emplear el punto de corte óptimo con mayor sensibilidad y especificidad.

La prueba de ELISA cuantitativo indirecto que estandarizamos en este trabajo dio como resultado una alta sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud. Estos resultados demuestran que el ensayo cumple con los parámetros de validación para su uso clínico. Además, permiten visualizar el ensayo con una opción viable para la cuantificación de anticuerpos no solo de los pacientes con COVID-19 sino también en el seguimiento para evaluar el decaimiento o

mantenimiento del nivel de anticuerpos después de una infección o a la vacunación.

La innovación e importancia del diseño de la ELISA casera cuantitativa que aquí se describe, es que mediante el uso de anticuerpos monoclonales se establecieron curvas de concentración y, de manera indirecta se pudo conocer la concentración de las muestras problema. Se estandarizó y validó una prueba de ELISA cuantitativa que en el momento de su desarrollo era la única que ofrecía una cuantificación de los anticuerpos en nuestro país. La cuantificación de los anticuerpos permite dar un seguimiento de la respuesta de humoral a lo largo de la enfermedad. Al día de hoy ya se cuenta con un total de 119 pruebas serológicas autorizadas en nuestro país y solo 23 de ellas son de tipo semicuantitativo indirecto. [151]

Para poder validar esta prueba, la reproducibilidad, precisión intra ensayo e intra laboratorio fueron fundamentales. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios por lo que consideramos que es un método de cuantificación adecuado con utilidad para evaluar la dinámica de anticuerpos generados durante una infección por SARS-CoV-2. [20,104,130]

El SARS-CoV-2 induce una respuesta de células B robusta a las dos semanas posteriores a la infección en la mayoría de la población. En este momento la cinética de la repuesta humoral al SARS-CoV-2 ya se ha descrito y de manera similar a SARS-CoV-1, la proteína más inmunogénica es la de espiga. [149,152–154] Tras los primeros días de inicio de los síntomas es posible detectar los anticuerpos dirigidos a las proteínas de espiga y nucleoproteína a niveles similares. [155]

Los datos anteriores han sido generados en otros países, por lo que era necesario conocer el perfil de anticuerpos en nuestra población, para ello iniciamos el estudio (una vez validada la prueba) con la población que había sido hospitalizada a principios de la pandemia por presentar COVID-19 grave. Nosotros observamos que, en este grupo de hospitalizados, a los 10 días de inicio de sus síntomas presentaban concentraciones detectables de IgG para S1, RBD y N.

De la misma manera que lo han reportado otros autores [103,144,155,156] Adicional a esto se ha observado que las personas mas graves, muestran niveles elevados de anticuerpos. Diversos autores han señalado que, pese a la cantidad de anticuerpos generados, estos podrían tener una baja capacidad neutralizante por lo que no es posible detener la entrada del virus [90,145,158] Al respecto, aún es necesario el desarrollo de ensayos de neutralización por parte de nuestro grupo de trabajo para completar nuestra investigación, pero, en un primer momento, nuestros resultados permiten hacer un seguimiento del nivel de anticuerpos específicos a lo largo de la enfermedad de modo que sea posible distinguir entre la infección reciente y la infección pasada tomando como referencia la concentración de anticuerpos. Para el caso de los convaleciente de COVID-19 se observó que a los 30 días inicia el decaimiento de anticuerpos anti S1-S2 y N. Por otra parte, se observaron niveles superiores de IgG anti RBD en comparación con los pacientes graves, donde las concentraciones de S1-S2 y N son mayores y menores las concentraciones de RBD.

En las ultimas décadas previas a la pandemia se han realizado estudios que abordan la implicación del género en la respuesta inmune ante las infecciones virales. [135,137,159,160] Siguiendo esta línea, se reportó que la tasa de mortalidad de los brotes epidémicos previos causados por otros coronavirus fue significativamente más alta para los hombres que para las mujeres. [159,161,162]

Gracias a la cooperación mundial en el reporte y acceso libre de los datos recabados de pacientes con COVID-19 una de las primeras observaciones fue la prevalencia de la incidencia y mortalidad en hombres, en la población con edades superiores a los 60 años y en pacientes con comorbilidades intrínsecas como la obesidad. [136,159,163,164] En las ultimas décadas previas a la pandemia se han realizado estudios que abordan la implicación del genero en la respuesta inmune ante las infecciones virales. Nosotros intentamos evaluar si en SARS-CoV-2, el sexo influyó en la intensidad y calidad de la respuesta inmune y pudimos observar las concentraciones de

anticuerpos, son mayores para las mujeres recuperadas de la enfermedad leve más no así en las mujeres con enfermedad grave, lo cual podría estar relacionado con las comorbilidades de cada persona.

Siendo la proteína de espiga la más inmunogénica de las proteínas estructurales, su decaimiento se ve postpuesto y no se observan diferencias en función del género. La diferencia en la concentración de IgG anti RBD con los hombres nos sugieren que las mujeres generan niveles más altos de anticuerpos y que se encontrarían con mayor posibilidad de resolver una infección secundaria mucho más rápido, esto es consistente con otras infecciones virales como la influenza, además de con los reportes de morbilidad y mortalidad de COVID-19. [131,134]

El siguiente análisis que realizamos fue con respecto a la edad, donde las concentraciones de anticuerpos IgG anti RBD en el grupo con COVID-19 grave no tuvo una diferencia relacionada con la edad lo que podría estar relacionado con el hecho de que se encuentran hospitalizados, lo que implica que la regulación de la respuesta inmune se encuentra alterada y la influencia de factores como la edad es sobrepasada. [95,103,130,154,165] Caso contrario se observó en el grupo de convalecientes de COVID-19 leve que presentó niveles más altos de anticuerpos anti RBD a edades más jóvenes lo que podría estar relacionado a la ausencia de comorbilidades. [91,95,132]

Una concentración menor de anticuerpos en estos grupos etarios tan distintos no debería considerarse como un mal pronóstico, si no más bien como un perfil que refleja la variabilidad de la respuesta inmune ante un antígeno. La forma en como el sistema inmune afronta y resuelve las infecciones son individual y por tanto única. Mientras que algunos recuperados de COVID-19 leve presentan niveles de anticuerpos inferiores a los recuperados de mayor edad, estos podrían tener una respuesta de memoria celular mejor o una inmunidad innata muy efectiva que eliminó rápidamente al virus sin dar oportunidad de generar más centros germinales. La importancia de nuestro estudio no solo radica en el desarrollo de un ensayo de ELISA cuantitativo con el

cual se puedan hacer estudios comparativos en diferentes etapas de la enfermedad en los casos de COVID de larga duración [13,90,105,149,166], los resultados obtenidos nos dieron un bosquejo de la variabilidad y de la existencia de patrones de la respuesta inmune frente al COVID-19 en nuestra población mexicana.

Nuestro siguiente análisis se centró en la evaluación de la influencia de diversas comorbilidades en la generación de anticuerpos IgG anti RBD.

Autores como el Dr. Krammer reportaron en un inicio como la obesidad estaba relacionada con niveles inferiores de anticuerpo, por lo cual nuestra primera comorbilidad a evaluar fue la obesidad. [149] Para los casos de los pacientes con enfermedad grave y convalecientes de la enfermedad leve, el índice de masa corporal elevado esta relacionado con concentraciones menores de anticuerpos IgG anti RBD. La obesidad al ser un estado de inflamación leve crónica condiciona al organismo a compensar este efecto produciendo factores antiinflamatorios que alteran la respuesta antiviral inicial, retardándola. Es por eso que para el caso de la COVID-19 se pronosticó una relación similar. Conforme se fueron estudiando los mecanismos moleculares que podrían estar implicados más allá del estado inflamatorio crónico, se evidenció internacionalmente la existencia de receptores ACE-2 en los adipocitos, lo cual abre el debate respecto a si estos receptores sobre expresados en estas células podrían ser los responsables de una mayor diseminación viral y por tanto de promover un estado de respuesta exacerbado que en algún punto perdiera la regulación y conducir al sistema inmune a la temida tormenta de citocinas. [46,50,54,59]

El desarrollo de memoria inmunológica es la forma en como nos protegemos de las infecciones, la generación de esta por medio de las vacunas condiciona su éxito. Conforme evolucionaba la pandemia, la carrera por la generación de vacunas que ayudaran a detener la mortalidad por la enfermedad grave causada por SARS-CoV-2, arrojó una variedad de vacunas desarrolladas con tecnologías diversas,

dentro de estas y por primera vez aprobadas para su aplicación en la población abierta, las de tecnología de RNA. Una de las cuestiones de interés para los sistemas de salud internacionales fue observar la respuesta generada por estas diversas vacunas. [111,114,123,125] Es por eso que nosotros evaluamos la respuesta de anticuerpos IgG generada posterior a la vacunación en nuestra población. Además, evaluamos los factores intrínsecos que podrían estar asociados con la generación de anticuerpos y su duración. Observamos que la respuesta para las vacunas con nueva tecnología; Pfizer; generaron una respuesta superior y una duración mayor comparada con la generada por la vacuna con tecnología de vector adenoviral, Cansino. Una de las diferencias más notables en los esquemas de vacunación evaluados fue la ausencia de niveles detectables de anticuerpos IgG anti RBD aún en los primeros 20 días posteriores a la vacunación con el esquema Cansino. Esta observación había sido visto por otro grupo de trabajo mexicano, pero a un mayor tiempo posterior a la vacunación, más de 30 días. [118]

Nuestra siguiente evaluación de la concentración de anticuerpos fue a los 6 meses posteriores a la aplicación del esquema completo de Pfizer y a los 3 meses para el esquema Cansino; el tiempo de evaluación para Cansino es más corto debido a los tiempos de los planes de vacunación de nuestro país y al de elaboración de esta tesis, pero esta considerado el seguimiento en otro momento.

Para el caso de la vacuna Pfizer la concentración de anticuerpos parece mantenerse aun después de 6 meses, con un leve decaimiento que estadísticamente fue más significativo en los hombres pero que no parece estar relacionado con la edad ni las comorbilidades. Mientras que para el caso de la vacuna Cansino mas del 50% de la población evaluada no presentaba niveles detectables de anticuerpos y el decaimiento fue mucho más marcado. Y observamos que las edades de entre 31-40 años fueron las que tuvieron niveles indetectables de anticuerpos. Con este esquema el índice de masa corporal elevado parece estar relacionado a concentraciones inferiores de anticuerpos.

Conocemos las limitaciones de nuestro estudio y esperamos en un futuro poder aumentar nuestra población.

A la par de la evaluación de vacunados con los dos esquemas, evaluamos pequeños grupos de pacientes que había sufrido COVID-19 leve antes de la vacunación. Observamos que la inmunidad híbrida, la generada al vacunarse alguien que ya ha padecido una enfermedad natural; proporciona beneficios como disminuir o compensar la influencia de los factores como género, edad y comorbilidades en la producción alterada de anticuerpos. [133]

En el momento actual de la pandemia, la comparación de las vacunas mediante serología no tiene el fin de elegir esquemas únicos para ser aplicados en nuestra población ya que la inmunidad generada por las vacunas involucra además de los anticuerpos a la inmunidad celular, más bien, este estudio pretenden ayudan a conocer la influencia de factores intrínsecos de nuestra población relacionados con generación de anticuerpos, factores propios de las vacunas como el tipo y la dosis, factores de administración como el momento de administración o el almacenaje previo. Además de ayudar a conocer a la población vacunada que podría requerir de otra dosis como ya se ha hecho en otros países y evalúan la duración de los anticuerpos post vacunación. [23]

Con respecto a este ultimo punto el estudio de la respuesta post vacuna Pfizer será ampliado ya que nuestros resultados muestran una concentración elevada aun después de seis meses, lo cual es diferente a lo reportado por otros autores donde se percibe el decaimiento a niveles inferiores a la mitad a este mismo tiempo, seis meses. [21,167,168] Es necesario además la evaluación de la respuesta humoral generada por las otras vacunas que tienen aprobación en nuestro país. En este proyecto no fue posible debido a la limitación en un primer momento de obtención de muestras de poblaciones de grupos etarios similares, pero esperamos que pronto podamos recolectarlas.

Conclusión

La estrategia del uso de pruebas serológicas cuantitativas indirectas como la nuestra, permite observar en nuestra población el comportamiento de la respuesta humoral y la duración post infección. Además, permite conocer la intensidad de la respuesta humoral post vacunación en nuestra población, lo que es un dato de suma importancia para las nuevas y futuras estrategias para el control de la pandemia.

Bibliografia

1. Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (accessed on Sep 12, 2021).
2. Walker, P.J.; Siddell, S.G.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adriaenssens, E.M.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Hendrickson, R.C.; et al. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Arch. Virol.* 2020, 165, 2737–2748.
3. Viruses, C.S.G. of the I.C. on T. of The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020, 5, 536, doi:10.1038/S41564-020-0695-Z.
4. KV, H. SARS-associated coronavirus. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 1948–1951, doi:10.1056/NEJMP030078.
5. Symptoms of COVID-19 | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> (accessed on Sep 15, 2021).
6. Xu, Z.; Shi, L.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, P.; Liu, H.; Zhu, L.; et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020, 8, 420–422, doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
7. Sungnak, W.; Huang, N.; Bécavin, C.; Berg, M.; Queen, R.; Litvinukova, M.; Talavera-López, C.; Maatz, H.; Reichart, D.; Sampaziotis, F.; et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat. Med.* 2020, 26, 681–687, doi:10.1038/s41591-020-0868-6.
8. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease

- Inhibitor. *Cell* 2020, 181, 271-280.e8, doi:10.1016/J.CELL.2020.02.052.
9. Wang, Y. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J. Clin. Investig.* 2020, 130, 5235–5244, doi:10.1172/jci138759.
 10. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020, 395, 497–506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
 11. M, K.; H, K.; S, K.; M, N. Epidemiological and clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) cases at a screening clinic during the early outbreak period: a single-centre study. *J. Med. Microbiol.* 2020, 69, 1114–1123, doi:10.1099/JMM.0.001231.
 12. Algaissi, A.; Alfaleh, M.A.; Hala, S.; Abujamel, T.S.; Alamri, S.S.; Almahboub, S.A.; Alluhaybi, K.A.; Hobani, H.I.; Alsulaiman, R.M.; AlHarbi, R.H.; et al. SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci. Reports* 2020 101 2020, 10, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-73491-5.
 13. Lou, B. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset. *Eur. Respir. J.* 2020, 56, 2000763, doi:10.1183/13993003.00763-2020.
 14. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html> (accessed on Sep 29, 2021).
 15. Davies, N.G.; Abbott, S.; Barnard, R.C.; Jarvis, C.I.; Kucharski, A.J.; Munday, J.; Pearson, C.A.B.; Russell, T.W.; Tully, D.C.; Washburne, A.D.; et al. Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England. *Science* (80-.). 2020, doi:10.1101/2020.12.24.20248822.
 16. Deng, X.; Garcia-Knight, M.A.; Khalid, M.M.; Servellita, V.; Wang, C.; Morris, M.K.; Sotomayor-González, A.; Glasner, D.R.; Reyes, K.R.; Gliwa, A.S.; et al. Transmission, infectivity, and antibody

- neutralization of an emerging SARS-CoV-2 variant in California carrying a L452R spike protein mutation. medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci. 2021, doi:10.1101/2021.03.07.21252647.
17. Hou, H.; Wang, T.; Zhang, B.; Luo, Y.; Mao, L.; Wang, F.; Wu, S.; Sun, Z. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. Clin. Transl. Immunol. 2020, 9, doi:10.1002/CTI2.1136.
 18. • ¿Cómo utilizar pruebas para lograr los objetivos de salud pública?
 19. WHO Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200122-sitrep-2-2019-ncov.pdf> (accessed on Mar 24, 2021).
 20. Manisty, C.; Treibel, T.A.; Jensen, M.; Semper, A.; Joy, G.; Gupta, R.K.; Cutino-Moguel, T.; Andiapen, M.; Jones, J.; Taylor, S.; et al. Time series analysis and mechanistic modelling of heterogeneity and sero-reversion in antibody responses to mild SARS-CoV-2 infection. EBioMedicine 2021, 65, doi:10.1016/J.EBIOM.2021.103259.
 21. FDA Authorizes Booster Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine for Certain Populations | FDA Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-booster-dose-pfizer-biontech-covid-19-vaccine-certain-populations> (accessed on Sep 30, 2021).
 22. El Salvador aplica tercera dosis de vacuna contra el COVID - San Diego Union-Tribune en Español Available online: <https://www.sandiegouniontribune.com/en-espanol/noticias/story/2021-09-26/el-salvador-aplica-tercera-dosis-de-vacuna-contra-el-covid> (accessed on Sep 30, 2021).
 23. Booster Shots and Third Doses for COVID-19 Vaccines: What You Need to Know | Johns Hopkins Medicine Available online: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/coronavirus/booster-shots-and-third-doses-for-covid19-vaccines-what-you-need-to-know> (accessed on Sep 30, 2021).
 24. Declaración acerca de la séptima reunión del Comité de

- Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre la pandemia de enfermedad por el coronavirus de 2019 (COVID-19) Available online: [https://www.who.int/es/news/item/19-04-2021-statement-on-the-seventh-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/es/news/item/19-04-2021-statement-on-the-seventh-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (accessed on Sep 30, 2021).
25. Mexico COVID: 3,655,395 Cases and 276,972 Deaths - Worldometer Available online: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/mexico/> (accessed on Sep 30, 2021).
26. Mexico: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data Available online: <https://covid19.who.int/region/amro/country/mx> (accessed on Sep 30, 2021).
27. Datos Abiertos Dirección General de Epidemiología | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx Available online: <https://www.gob.mx/salud/documentos/datos-abiertos-152127> (accessed on Sep 30, 2021).
28. Ningún país ha alcanzado inmunidad de rebaño: OMS - ONU México | Enfermedad por el Coronavirus (COVID-19) Available online: <https://coronavirus.onu.org.mx/ningun-pais-ha-alcanzado-inmunidad-de-rebano-oms> (accessed on Sep 30, 2021).
29. Harvey, W.T.; Carabelli, A.M.; Jackson, B.; Gupta, R.K.; Thomson, E.C.; Harrison, E.M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; Peacock, S.J.; et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021 197 2021, 19, 409–424, doi:10.1038/s41579-021-00573-0.
30. Hodcroft, E. Emergence and spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. Preprint at. medRxiv 2020, doi:10.1101/2020.10.25.20219063.
31. Ashwanden, C. Five reasons why COVID herd immunity is probably impossible. *Nature* 2021, 591, 520–522,

doi:10.1038/D41586-021-00728-2.

32. Subbaraman, N. How do vaccinated people spread Delta? What the science says. *Nat.* 2021 5967872 2021.
33. Mallapaty, S. COVID vaccines slash viral spread – but Delta is an unknown. *Nature* 2021, 596, 17–18, doi:10.1038/D41586-021-02054-Z.
34. Lopez Bernal, J.; Andrews, N.; Gower, C.; Gallagher, E.; Simmons, R.; Thelwall, S.; Stowe, J.; Tessier, E.; Groves, N.; Dabrera, G.; et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 585–594, doi:10.1056/NEJM0A2108891.
35. Planas, D.; Veyer, D.; Baidaliuk, A.; Staropoli, I.; Guivel-Benhassine, F.; Rajah, M.M.; Planchais, C.; Porrot, F.; Robillard, N.; Puech, J.; et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nat.* 2021 5967871 2021, 596, 276–280, doi:10.1038/s41586-021-03777-9.
36. Edara, V.-V.; Pinsky, B.A.; Suthar, M.S.; Lai, L.; Davis-Gardner, M.E.; Floyd, K.; Flowers, M.W.; Wrammert, J.; Hussaini, L.; Ciric, C.R.; et al. Infection and Vaccine-Induced Neutralizing-Antibody Responses to the SARS-CoV-2 B.1.617 Variants. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 664–666, doi:10.1056/NEJMC2107799.
37. Tang, Y.W.; Schmitz, J.E.; Persing, D.H.; Stratton, C.W. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J. Clin. Microbiol.* 2020, 58.
38. Nalbandian, A.; Sehgal, K.; Gupta, A.; Madhavan, M. V.; McGroder, C.; Stevens, J.S.; Cook, J.R.; Nordvig, A.S.; Shalev, D.; Sehrawat, T.S.; et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* 2021 274 2021, 27, 601–615, doi:10.1038/s41591-021-01283-z.
39. Against, C.-P.-A.G. Post-COVID-19 global health strategies: The need for an interdisciplinary approach. *Aging Clin. Exp. Res.* 2020, 32, 1613–1620, doi:10.1007/s40520-020-01616-x.
40. Tenforde, M. Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a

- multistate health care systems network—United States, March–June 2020. *Morb. Mortal Wkly Rep.* 2020, 69, 993–998, doi:10.15585/mmwr.mm6930e1.
41. Rubin, R. As their numbers grow, COVID-19 “long haulers” stump experts. *JAMA* 2020, 324, 1381–1383, doi:10.1001/jama.2020.17709.
 42. Lopez-Leon, S.; Wegman-Ostrosky, T.; Perelman, C.; Sepulveda, R.; Rebolledo, P.A.; Cuapio, A.; Villapol, S. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Reports* 2021 111 2021, 11, 1–12, doi:10.1038/s41598-021-95565-8.
 43. Signos, síntomas y prevención Available online: <https://www.insp.mx/nuevo-coronavirus-2019/signos-sintomas-prevencion.html> (accessed on Sep 30, 2021).
 44. Angulo-Zamudio, U.A.; Martínez-Villa, F.M.; Leon-Sicairos, N.; Flores-Villaseñor, H.; Velazquez-Roman, J.; Campos-Romero, A.; Alcántar-Fernández, J.; Urrea, F.; Muro-Amador, S.; Medina-Serrano, J.; et al. Analysis of Epidemiological and Clinical Characteristics of COVID-19 in Northwest Mexico and the Relationship Between the Influenza Vaccine and the Survival of Infected Patients. *Front. Public Heal.* 2021, 9, 570098, doi:10.3389/FPUBH.2021.570098.
 45. Takahashi, T.; Ellingson, M.K.; Wong, P.; Israelow, B.; Lucas, C.; Klein, J.; Silva, J.; Mao, T.; Oh, J.E.; Tokuyama, M.; et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 2020, 588, 315–320, doi:10.1038/S41586-020-2700-3.
 46. Hussain, A.; Mahawar, K.; Xia, Z.; Yang, W.; EL-Hasani, S. Obesity and mortality of COVID-19. Meta-analysis. *Obes. Res. Clin. Pract.* 2020, 14, 295–300, doi:10.1016/J.ORCP.2020.07.002.
 47. Rothan, H.A.; Byrareddy, S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.* 2020, 109, doi:10.1016/J.JAUT.2020.102433.
 48. PA, S.; HA, P.; J, H.; EA, K.; MG, H.; AB, S.; LA, H.; S, W.; TL, N.;

- MA, B. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2012, 36, 1072–1077, doi:10.1038/IJO.2011.208.
49. Alhadi, M.A.; Friedman, L.M.; Karlsson, E.A.; Cohen-Lavi, L.; Burkovitz, A.; Schultz-Cherry, S.; Noah, T.L.; Weir, S.S.; Shulman, L.M.; Beck, M.A.; et al. Obesity is associated with an altered baseline and post-vaccination influenza antibody repertoire. medRxiv 2021.
 50. Alhadi, M.A.; Friedman, L.M.; Karlsson, E.A.; Cohen-Lavi, L.; Burkovitz, A.; Schultz-Cherry, S.; Noah, T.L.; Weir, S.S.; Shulman, L.M.; Beck, M.A.; et al. Obesity is associated with an altered baseline and post-vaccination influenza antibody repertoire. medRxiv 2021, 2021.03.02.21252785, doi:10.1101/2021.03.02.21252785.
 51. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 1522–1534, doi:10.1056/NEJMORA2020283.
 52. Park, A.; Iwasaki, A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe* 2020, 27, 870–878, doi:10.1016/J.CHOM.2020.05.008.
 53. Plenge, R.M. Molecular Underpinnings of Severe Coronavirus Disease 2019. *JAMA* 2020, 324, 638–639, doi:10.1001/JAMA.2020.14015.
 54. Shamah-Levy, T.; Campos-Nonato, I.; Cuevas-Nasu, L.; Hernández-Barrera, L.; Morales-Ruán, M. del C.; Rivera-Dommarco, J.; Barquera, S. Overweight and obesity in Mexican vulnerable population. Results of Ensanut 100k. *Salud Publica Mex.* 2019, 61, 852–865, doi:10.21149/10585.
 55. Campos-Nonato, I.; Hernández-Barrera, L.; Pedroza-Tobías, A.; Medina, C.; Barquera, S. Hypertension in Mexican adults: Prevalence, diagnosis and type of treatment. Ensanut MC 2016. *Salud Publica Mex.* 2018, 60, 233–243, doi:10.21149/8813.
 56. Heinzerling, A.; Stuckey, M.J.; Scheuer, T.; Xu, K.; Perkins, K.M.;

- Resseger, H.; Magill, S.; Verani, J.R.; Jain, S.; Acosta, M.; et al. Transmission of COVID-19 to Health Care Personnel During Exposures to a Hospitalized Patient — Solano County, California, February 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2020, 69, 472–476, doi:10.15585/MMWR.MM6915E5.
57. Drucker, D.J. Diabetes, obesity, metabolism, and SARS-CoV-2 infection: the end of the beginning. *Cell Metab.* 2021, 33, 479–498, doi:10.1016/J.CMET.2021.01.016.
 58. Cefalu, W.T.; Rodgers, G.P. COVID-19 and metabolic diseases: a heightened awareness of health inequities and a renewed focus for research priorities. *Cell Metab.* 2021, 33, 473–478.
 59. Sheridan, P.A.; Paich, H.A.; Handy, J.; Karlsson, E.A.; Hudgens, M.G.; Sammon, A.B.; Holland, L.A.; Weir, S.; Noah, T.L.; Beck, M.A. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int. J. Obes.* 2012, 36, 1072–1077, doi:10.1038/IJO.2011.208.
 60. Y, C.; Q, L.; D, G. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 418–423, doi:10.1002/JMV.25681.
 61. Y, J.; H, Y.; W, J.; W, W.; S, C.; W, Z.; G, D. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses* 2020, 12, doi:10.3390/V12040372.
 62. Coronaviruses - a general introduction - The Centre for Evidence-Based Medicine Available online: <https://www.cebm.net/covid-19/coronaviruses-a-general-introduction/> (accessed on Nov 2, 2021).
 63. Mousavizadeh, L.; Ghasemi, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2021, 54, 159–163, doi:10.1016/J.JMII.2020.03.022.
 64. X, O.; Y, L.; X, L.; P, L.; D, M.; L, R.; L, G.; R, G.; T, C.; J, H.; et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 2020, 11, doi:10.1038/S41467-020-15562-9.
 65. Okba, N.M.A.; Müller, M.A.; Li, W.; Wang, C.; GeurtsvanKessel,

- C.H.; Corman, V.M.; Lamers, M.M.; Sikkema, R.S.; Bruin, E. de; Chandler, F.D.; et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv 2020, 2020.03.18.20038059, doi:10.1101/2020.03.18.20038059.
66. J, L.; Y, S.; J, Q.; F, C.; H, W.; F, G.; T, L.; J, Y.; GF, G. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Infect. Dis.* 2010, 202, 1171–1180, doi:10.1086/656315.
67. Zeng, W.; Liu, G.; Ma, H.; Zhao, D.; Yang, Y.; Liu, M.; Mohammed, A.; Zhao, C.; Yang, Y.; Xie, J.; et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020, 527, 618–623, doi:10.1016/J.BBRC.2020.04.136.
68. B, S.; XY, W.; JW, Y.; A, V.; XD, W.; RF, Y.; L, T.; YY, J.; V, D.; B, S. Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 336, 110–117, doi:10.1016/J.BBRC.2005.08.032.
69. Pei, H.; Liu, J.; Cheng, Y.; Sun, C.; Wang, C.; Lu, Y.; Ding, J.; Zhou, J.; Xiang, H. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* for serodiagnosis and mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68, 220, doi:10.1007/S00253-004-1869-Y.
70. M, S.; B, L.; VT, C.; SK, L. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 10669–10681, doi:10.1074/JBC.M509233200.
71. YJ, T.; PY, G.; BC, F.; S, S.; CF, C.; JL, F.; HN, L.; YS, L.; EE, O.; AE, L.; et al. Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11, 362–371, doi:10.1128/CDLI.11.2.362-371.2004.

72. Y, S.; Y, Y.; P, L.; T, K.; L, L.; M, D.; Q, M.; C, C. Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 5781–5782, doi:10.1128/JCM.41.12.5781-5782.2003.
73. Fong, I.W. Emerging Animal Coronaviruses: First SARS and Now MERS. *Emerg. Zoonoses* 2017, 63–80, doi:10.1007/978-3-319-50890-0_4.
74. Y, J.; H, Y.; W, J.; W, W.; S, C.; W, Z.; G, D. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses* 2020, 12, doi:10.3390/V12040372.
75. SJR, da S.; CT, A. da S.; RPG, M.; L, P. Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 1427–1429, doi:10.1002/JMV.25858.
76. J, L.; Y, K.; R, H. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* 2018, 149, 58–74, doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.11.001.
77. Angelini, M.M.; Akhlaghpour, M.; Neuman, B.W.; Buchmeier, M.J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *MBio* 2013, 4, doi:10.1128/MBIO.00524-13.
78. K, A.; J, Z.; P, W.; JR, M.; R, H. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003, 300, 1763–1767, doi:10.1126/SCIENCE.1085658.
79. JK, M.; GR, W. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2015, 202, 120–134, doi:10.1016/J.VIRUSRES.2014.11.021.
80. Y, Z.; J, S.; Y, Y.; C, L.; Y, W.; Q, G.; M, W.; R, B.; F, L. Lysosomal Proteases Are a Determinant of Coronavirus Tropism. *J. Virol.* 2018, 92, doi:10.1128/JVI.01504-18.
81. Pastrian-Soto, G.; Pastrian-Soto, G. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). *Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. Int. J. Odontostomatol.* 2020, 14, 331–337, doi:10.4067/S0718-381X2020000300331.

82. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150360/> (accessed on Nov 3, 2021).
83. Guo, Y.R.; Cao, Q.D.; Hong, Z.S.; Tan, Y.Y.; Chen, S.D.; Jin, H.J.; Tan, K. Sen; Wang, D.Y.; Yan, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. *Mil. Med. Res.* 2020, 7, doi:10.1186/S40779-020-00240-0.
84. Aspectos clínicos relacionados con el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) Available online: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2020000400003 (accessed on Nov 3, 2021).
85. MJ, C.; JF, B.-M.; A, D.; MP, M.; DJ, K. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Res.* 2008, 133, 13–19, doi:10.1016/J.VIRUSRES.2007.02.014.
86. Vijay, R.; Perlman, S. Middle East respiratory syndrome and severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Virol.* 2016, 16, 70, doi:10.1016/J.COVIRO.2016.01.011.
87. Rosales, F.J.E. Inmunopatología de la infección por virus SARS-CoV-2. *Acta Pediátrica México* 2020, 41, 42–50, doi:10.18233/APM41NO4S1PPS42-S502070.
88. G, L.; Y, F.; Y, L.; T, H.; Z, L.; P, Z.; P, P.; W, W.; D, H.; X, L.; et al. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 424–432, doi:10.1002/JMV.25685.
89. Zhang, H.; Zhou, P.; Wei, Y.; Yue, H.; Wang, Y.; Hu, M.; Zhang, S.; Cao, T.; Yang, C.; Li, M.; et al. Histopathologic Changes and SARS–CoV-2 Immunostaining in the Lung of a Patient With COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 2020, 172, 629–632, doi:10.7326/M20-0533.
90. Muecksch, F.; Wise, H.; Batchelor, B.; Squires, M.; Semple, E.; Richardson, C.; McGuire, J.; Cleary, S.; Furrie, E.; Greig, N.; et al. Longitudinal analysis of clinical serology assay performance and

- neutralising antibody levels in COVID19 convalescents. medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci. 2020, doi:10.1101/2020.08.05.20169128.
91. GJ, G.; MM, D.; GB, P.; S, B.; RH, L. Coronavirus and Other Respiratory Illnesses Comparing Older with Young Adults. *Am. J. Med.* 2015, 128, 1251.e11-1251.e20, doi:10.1016/J.AMJMED.2015.05.034.
 92. J, Z.; Q, Y.; H, W.; W, L.; X, L.; Y, S.; X, W.; J, Y.; T, L.; J, L.; et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 2027–2034, doi:10.1093/CID/CIAA344.
 93. R, Y.; J, L.; B, H.; R, A.; M, L.; W, W.; W, W.; W, L.; Y, D.; G, W.; et al. Lack of antibody-mediated cross-protection between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *EBioMedicine* 2020, 58, doi:10.1016/J.EBIOM.2020.102890.
 94. B, J.; Q, Z.; J, G.; R, W.; J, S.; X, G.; J, Y.; S, S.; B, Z.; S, S.; et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* 2020, 584, 115–119, doi:10.1038/S41586-020-2380-Z.
 95. Zeng, F.; Wu, M.; Wang, J.; Li, J.; Hu, G.; Wang, L. Over 1-year duration and age difference of SARS-CoV-2 antibodies in convalescent COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 2021, doi:10.1002/JMV.27152.
 96. N, L.B.; AT, T.; K, K.; CYL, T.; M, H.; A, C.; MHY, C.; M, L.; N, T.; M, L.; et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020, 584, 457–462, doi:10.1038/S41586-020-2550-Z.
 97. A, S.; S, C. Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns. *Nat. Rev. Immunol.* 2020, 20, 457–458, doi:10.1038/S41577-020-0389-Z.
 98. Chen, Z.; John Wherry, E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2020 209 2020, 20, 529–536, doi:10.1038/s41577-020-0402-6.
 99. Stephens, D.S.; McElrath, M.J. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA* 2020, 324, 1279–1281, doi:10.1001/JAMA.2020.16656.

100. Hashem, A. Development and validation of different indirect ELISAs for MERS-CoV serological testing. *J. Immunol. Methods* 2019, 466, 41–46, doi:10.1016/j.jim.2019.01.005.
101. Dittadi, R.; Afshar, H.; Carraro, P. The early antibody response to SARS-Cov-2 infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020, 58, e201–e203, doi:10.1515/CCLM-2020-0617.
102. Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Strich, J.R.; Chertow, D.S.; Davey, R.T.; Cohen, J.I. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *medRxiv* 2020, 2020.04.20.20071423, doi:10.1101/2020.04.20.20071423.
103. Mariën, J.; Ceulemans, A.; Michiels, J.; Heyndrickx, L.; Kerkhof, K.; Foque, N.; Widdowson, M.A.; Mortgat, L.; Duysburgh, E.; Desombere, I.; et al. Evaluating SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins as targets for antibody detection in severe and mild COVID-19 cases using a Luminex bead-based assay. *J. Virol. Methods* 2021, 288, 114025, doi:10.1016/J.JVIROMET.2020.114025.
104. Borremans, B.; Gamble, A.; Prager, K.C.; Helman, S.K.; McClain, A.M.; Cox, C.; Savage, V.; Lloyd-Smith, J.O. Quantifying antibody kinetics and RNA shedding during early-phase SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* 2020, doi:10.1101/2020.05.15.20103275.
105. Dobaño, C.; Vidal, M.; Santano, R.; Jiménez, A.; Chi, J.; Barrios, D.; Ruiz-Olalla, G.; Melero, N.R.; Carolis, C.; Parras, D.; et al. Highly sensitive and specific multiplex antibody assays to quantify immunoglobulins M, A and G against SARS-CoV-2 antigens. *bioRxiv* 2020, doi:10.1101/2020.06.11.147363.
106. Ainsworth, M.; Andersson, M.; Auckland, K.; Baillie, J.K.; Barnes, E.; Beer, S.; Beveridge, A.; Bibi, S.; Blackwell, L.; Borak, M.; et al. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, 1390–1400, doi:10.1016/S1473-3099(20)30634-4.
107. Houlihan, C.F.; Beale, R. The complexities of SARS-CoV-2

- serology. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, 1350–1351, doi:10.1016/S1473-3099(20)30699-X.
108. Chia, W. Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections. *Emerg. Microbes Infect.* 2020, 9, 1497–1505, doi:10.1080/22221751.2020.1780951.
109. La OMS publica su primera validación para uso en emergencias de una vacuna contra la COVID-19 y hace hincapié en la necesidad de un acceso mundial equitativo Available online: <https://www.who.int/es/news/item/31-12-2020-who-issues-its-first-emergency-use-validation-for-a-covid-19-vaccine-and-emphasizes-need-for-equitable-global-access> (accessed on Sep 24, 2021).
110. Patel, M. mRNA Vaccine: The Next Generation Vaccine Revolution in Medical Science & Vaccinology. *Sci. Posters 2020*, doi:10.14293/S2199-1006.1.SOR-.PPSVHLH.V1.
111. Kallen, K.-J.; Theß, A. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. *Ther. Adv. Vaccines* 2014, 2, 10, doi:10.1177/2051013613508729.
112. ¿Puede la tecnología ARNm revolucionar la medicina? | El Mundo | DW | 28.07.2021 Available online: <https://www.dw.com/es/puede-la-tecnología-arnm-revolucionar-la-medicina/a-58679539> (accessed on Sep 24, 2021).
113. N Lurie, M.S.R.H.J.H. Developing Covid-19 Vaccines at pandemic speed. *N Engl J Med* 2020, 382, 1969–73, doi:10.1056/nejmp2005630.
114. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020, 586, 516–27, doi:10.1038/s41586-020-2798-3.
115. Forni, G.; Mantovani, A. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death Differ.* 2021 282 2021, 28, 626–639, doi:10.1038/s41418-020-00720-9.
116. Diferentes vacunas contra el COVID-19 | CDC Available online: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines.html> (accessed on Sep 24,

- 2021).
117. Vacuna de AstraZeneca: por qué Reino Unido dejará de ofrecerla a los menores de 30 años - BBC News Mundo Available online: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-56662264> (accessed on Sep 24, 2021).
 118. Mexico approves China's CanSino and Sinovac COVID-19 vaccines | Reuters Available online: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-mexico-cansino-idUSKBN2AA12W> (accessed on Sep 24, 2021).
 119. Coronavirus - gob.mx Available online: <https://coronavirus.gob.mx/> (accessed on Sep 24, 2021).
 120. COVID-19 vaccine tracker and landscape Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed on Sep 24, 2021).
 121. Nair, N.; Gans, H.; Lew-Yasukawa, L.; Long-Wagar, A.C.; Arvin, A.; Griffin, D.E. Age-dependent differences in IgG isotype and avidity induced by measles vaccine received during the first year of life. *J. Infect. Dis.* 2007, 196, 1339–1345, doi:10.1086/522519.
 122. Pulendran, B.; Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 2011, 12, 509–517, doi:10.1038/NI.2039.
 123. Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Araki, K.; Ahmed, R. From vaccines to memory and back. *Immunity* 2010, 33, 451–463, doi:10.1016/J.IMMUNI.2010.10.008.
 124. Siegrist, C.A. The Challenges of Vaccine Responses in Early Life: Selected Examples. *J. Comp. Pathol.* 2007, 137, doi:10.1016/J.JCPA.2007.04.004.
 125. Grassly, N.C.; Kang, G.; Kampmann, B. Biological challenges to effective vaccines in the developing world. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015, 370, doi:10.1098/RSTB.2014.0138.
 126. Zimmermann, P.; Curtis, N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019, 32, doi:10.1128/CMR.00084-18.
 127. M, P.; B, P.-G.; R, P.-B.; J, O.; MA, H.; M, P.-O.; JL, S.; A, F.-G.; I,

- C.; N, F. de L.; et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* (London, England) 2020, 396, 535–544, doi:10.1016/S0140-6736(20)31483-5.
128. García-Cordero, J.; Mendoza-Ramírez, J.; Fernández-Benavides, D.; Roa-Velazquez, D.; Filisola-Villaseñor, J.; Martínez-Frías, S.P.; Sanchez-Salguero, E.S.; Miguel-Rodríguez, C.E.; Montero, J.L.M.; Torres-Ruiz, J.J.; et al. Recombinant Protein Expression and Purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications. *Diagnostics* 2021, Vol. 11, Page 1808 2021, 11, 1808, doi:10.3390/DIAGNOSTICS11101808.
129. Panamericana La Salud, O. DE : MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD PARA LOS LABORATORIOS DE SEROLOGIA DE LOS BANCOS DE SANGRE.
130. Li, K.; Huang, B.; Wu, M.; Zhong, A.; Li, L.; Cai, Y.; Wang, Z.; Wu, L.; Zhu, M.; Li, J.; et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.* 2020 111 2020, 11, 1–11, doi:10.1038/s41467-020-19943-y.
131. Jin, J.M.; Bai, P.; He, W.; Wu, F.; Liu, X.F.; Han, D.M.; Liu, S.; Yang, J.K. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front. Public Heal.* 2020, 8, doi:10.3389/FPUBH.2020.00152.
132. JP Dudley, N.L. Disparities in age-specific morbidity and mortality from SARS-CoV-2 in China and the Republic of Korea. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 863–865, doi:10.1093/cid/ciaa354.
133. Crotty, S. Hybrid immunity. *Science* (80-.). 2021, 372, 1392–1393, doi:10.1126/SCIENCE.ABJ2258.
134. LG vom Steeg, S.K. SeXX matters in infectious disease pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2016, 12, doi:10.1371/journal.ppat.1005374.
135. Schurz, H. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Hum. Genomics* 2019, 13, 2,

- doi:10.1186/s40246-018-0185-z.
136. Piasecka, B. Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2018, 115, E488-E497., doi:10.1073/pnas.1714765115.
 137. S Ghosh, R.K. Sex drives dimorphic immune responses to viral infections. *J. Immunol.* 2017, 198, 1782–90., doi:10.4049/jimmunol.1601166.
 138. Naaber, P.; Jürjenson, V.; Ainika Adamson, synlabee; Epp Sepp, synlabee; Tserel, L.; Kisand, K.; Peterson, P. Antibody response after COVID-19 mRNA vaccination in relation to age, sex, and side effects., doi:10.1101/2021.04.19.21255714.
 139. Parry, H.M.; Tut, G.; Faustini, S.; Stephens, C.; Saunders, P.; Bentley, C.; Hilyard, K.; Brown, K.; Amirthalingam, G.; Charlton, S.; et al. BNT162b2 Vaccination in People Over 80 Years of Age Induces Strong Humoral Immune Responses with Cross Neutralisation of P.1 Brazilian Variant. *SSRN Electron. J.* 2021, doi:10.2139/SSRN.3816840.
 140. Obesidad Available online: https://www.who.int/es/health-topics/obesity#tab=tab_1 (accessed on Oct 28, 2021).
 141. De Assis, R.R.; Jain, A.; Nakajima, R.; Jasinskas, A.; Felgner, J.; Obiero, J.M.; Norris, P.J.; Stone, M.; Simmons, G.; Bagri, A.; et al. Analysis of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 convalescent blood using a coronavirus antigen microarray., doi:10.1038/s41467-020-20095-2.
 142. Evaluation of nine serological rapid tests for the detection of SARS-CoV-2 Available online: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53057> (accessed on Sep 29, 2021).
 143. Rostad, C.A.; Chahroudi, A.; Mantus, G.; Lapp, S.A.; Teherani, M.; Macoy, L.; Tarquinio, K.M.; Basu, R.K.; Kao, C.; Linam, W.M.; et al. Quantitative SARS-CoV-2 Serology in Children With Multisystem Inflammatory Syndrome (MIS-C). *Pediatrics* 2020, 146, doi:10.1542/PEDS.2020-018242.

144. Fenwick, C.; Croxatto, A.; Coste, A.T.; Pojer, F.; André, C.; Pellaton, C.; Farina, A.; Campos, J.; Hacker, D.; Lau, K.; et al. Changes in SARS-CoV-2 Spike versus Nucleoprotein Antibody Responses Impact the Estimates of Infections in Population-Based Seroprevalence Studies. *J. Virol.* 2020, 95, doi:10.1128/jvi.01828-20.
145. Ojeda, D.S.; Lopez Ledesma, M.M.G.; Pallarés, H.M.; Costa Navarro, G.S.; Sanchez, L.; Perazzi, B.; Villordo, S.M.; Alvarez, D.E.; Echavarría, M.; Oguntuyo, K.Y.; et al. Emergency response for evaluating SARS-CoV-2 immune status, seroprevalence and convalescent plasma in Argentina. *PLoS Pathog.* 2021, 17, doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1009161.
146. Johari, Y.B.; Jaffé, S.R.P.; Scarrott, J.M.; Johnson, A.O.; Mozzanino, T.; Pohle, T.H.; Maisuria, S.; Bhayat-Cammack, A.; Lambiase, G.; Brown, A.J.; et al. Production of trimeric SARS-CoV-2 spike protein by CHO cells for serological COVID-19 testing. *Biotechnol. Bioeng.* 2021, 118, 1013–1021, doi:10.1002/bit.27615.
147. Castro, R.; Nobre, L.S.; Eleutério, R.P.; Thomaz, M.; Pires, A.; Monteiro, S.M.; Mendes, S.; Gomes, R.A.; Clemente, J.J.; Sousa, M.F.Q.; et al. Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance. *Biotechnol. Bioeng.* 2021, doi:10.1002/bit.27725.
148. Jalkanen, P.; Pasternack, A.; Maljanen, S.; Melén, K.; Kolehmainen, P.; Huttunen, M.; Lundberg, R.; Tripathi, L.; Khan, H.; Ritvos, M.A.; et al. A Combination of N and S Antigens with IgA and IgG Measurement Strengthens the Accuracy of SARS-CoV-2 Serodiagnostics. *J. Infect. Dis.* 2021, 224, 218–228, doi:10.1093/INFDIS/JIAB222.
149. Amanat, F.; Stadlbauer, D.; Strohmeier, S.; Nguyen, T.H.O.; Chromikova, V.; McMahon, M.; Jiang, K.; Arunkumar, G.A.; Jurczynszak, D.; Polanco, J.; et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *medRxiv* 2020.

150. CE, M. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 1978, 8, 283–298, doi:10.1016/S0001-2998(78)80014-2.
151. Pruebas autorizadas para COVID 19 | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios | Gobierno | gob.mx Available online: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/pruebas-autorizadas-para-covid-19?state=published> (accessed on Nov 18, 2021).
152. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* 2016, 3, 237–261.
153. Li, D.; Li, J. Immunologic testing for SARS-CoV-2 infection from the antigen perspective. *J. Clin. Microbiol.* 2021, 59, doi:10.1128/JCM.02160-20.
154. Li, K.; Huang, B.; Wu, M.; Zhong, A.; Li, L.; Cai, Y.; Wang, Z.; Wu, L.; Zhu, M.; Li, J.; et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nat. Commun.* 2020 111 2020, 11, 1–11, doi:10.1038/s41467-020-19943-y.
155. Beeckmans, S.; Van Driessche, E. Scrutinizing Coronaviruses Using Publicly Available Bioinformatic Tools: The Viral Structural Proteins as a Case Study. *Front. Mol. Biosci.* 2021, 8, doi:10.3389/FMOLB.2021.671923/FULL.
156. PD, B.; FX, R.; C, M.; S, R.; D, S.; S, D.; JR, S.; DS, C.; RT, D.; JI, C. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* 2020, 222, 206–213, doi:10.1093/INFDIS/JIAA273.
157. McBride, R.; Zyl, M. van; Fielding, B.C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014, 6, 2991–3018, doi:10.3390/V6082991.
158. Premkumar, L.; Segovia-Chumbez, B.; Jadi, R.; Martinez, D.R.; Raut, R.; Markmann, A.J.; Cornaby, C.; Bartelt, L.; Weiss, S.; Park, Y.; et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 2020, 5,

doi:10.1126/SCIIMMUNOL.ABC8413.

159. Channappanavar, R. Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Immunol.* 2017, 198, 4046–53., doi:10.4049/jimmunol.1601896.
160. Marquez, E. Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nat. Commun.* 2020, 11, doi:10.1038/s41467-020-14396-9.
161. J Karlberg, D.C.W.L. Do men have a higher case fatality rate of severe acute respiratory syndrome than women do? *Am. J. Epidemiol.* 2004, 159, 229–231, doi:10.1093/aje/kwh056.
162. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.M.; Wang, W.; Song, Z.G.; Hu, Y.; Tao, Z.W.; Tian, J.H.; Pei, Y.Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020, 579, 265–269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3.
163. Wedderburn, L.; Peckham, H.; De Grujter, N.; Raine, C.; Radziszewska, A.; Ciurtin, C.; Rosser, E.; Deakin, C.; Webb, K. Male sex identified by global COVIS-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nat. Commun.* 2020, doi:10.21203/RS.3.RS-23651/V2.
164. Scully, E.P.; Haverfield, J.; Ursin, R.L.; Tannenbaum, C.; Klein, S.L. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. *Nat. Rev. Immunol.* 2020 207 2020, 20, 442–447, doi:10.1038/s41577-020-0348-8.
165. Wu, F.; Liu, M.; Wang, A.; Lu, L.; Wang, Q.; Gu, C.; Chen, J.; Wu, Y.; Xia, S.; Ling, Y.; et al. Evaluating the Association of Clinical Characteristics With Neutralizing Antibody Levels in Patients Who Have Recovered From Mild COVID-19 in Shanghai, China. *JAMA Intern. Med.* 2020, 180, 1356–1362, doi:10.1001/JAMAINTERNMED.2020.4616.
166. Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Strich, J.R.; Chertow, D.S.; Davey, R.T.; Cohen, J.I. Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.* 2020, 222, 206–213, doi:10.1093/infdis/jiaa273.

167. Bernal, J.L.; Andrews, N.; Gower, C.; al., et Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study. *BMJ* 2021, 13, 373.
168. Ebinger, J.E.; Fert-Bober, J.; Printsev, I.; Wu, M.; Sun, N.; Prostko, J.C.; Frias, E.C.; Stewart, J.L.; Van Eyk, J.E.; Braun, J.G.; et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2021, 27, 981–984, doi:10.1038/S41591-021-01325-6.

Anexo 1. Criterios de elegibilidad de voluntarios

Inclusión

Población mexicana con edad mayor de 18 años.

Pacientes mexicanos con un diagnóstico molecular RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 con algún síntoma clínico, con o sin comorbilidades.

Voluntarios mexicanos convalecientes con un antecedente diagnóstico RT-PCR positivo para infección por SARS-CoV-2 con más de 30 días de alta médica, con o sin comorbilidades.

Voluntarios mexicanos pertenecientes al hospital Regional Numero 2 de Coyoacán CDMX con 20 días después a la primera dosis y posteriormente 120 días después de la segunda dosis, con o sin antecedentes de COVID-19, con o sin comorbilidades.

Voluntarios mexicanos con 20 días posteriores a la primera o segunda dosis de algún esquema de vacunación aplicado en México, con o sin antecedentes de COVID-19, con o sin comorbilidades.

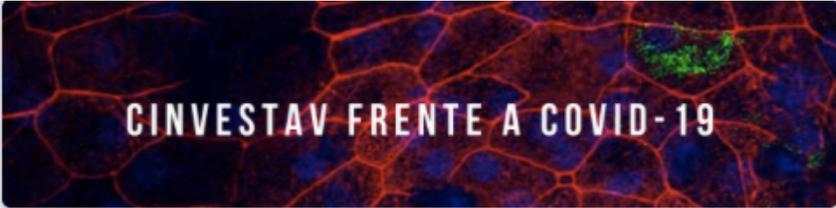
Exclusión

Población mexicana con edad menor a 18 años.

Voluntarios mexicanos con mas de 20 días posteriores a la aplicación de con primera o segunda dosis de algún esquema de vacunación.

Anexo 2. Cuestionario clínico para los voluntarios con 20 días post vacunación con esquema completo.

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdiVSd-bxGOelrj8_by3uuETwuG7IBkTxibiAb28DD5a5qb7w/viewform?usp=sf_link



Cuestionario para Voluntarios que han sido vacunados contra SARS-CoV-2 (2021) (20dpv)

Muchas gracias por participar en el proyecto "Evaluación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el dominio RBD del virus SARS-CoV-2 en la población mexicana".

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo y abandonarlo en el momento que lo desee. Para este proyecto es necesario extraer dos o tres muestras sanguíneas (4 ml) en diferentes días.

Al llenar el siguiente cuestionario electrónico usted acepta formar parte de nuestro proyecto de investigación.

Le compartimos las instrucciones generales para su participación:

- Le pediremos sus datos personales una sola vez en el apartado de "Datos generales", con ellos se le generará un ID. El ID generado se le hará llegar mediante un correo electrónico o por mensaje de texto.*
- Usted deberá contestar una serie de preguntas de índole epidemiológico y clínico que serán de utilidad para la comunidad científica, médica y clínica.
- Cuando los resultados se encuentren listos, se le hará llegar un gentil recordatorio para que usted pueda acceder a ellos.
- Continúe cuidándose.

*Con esta estrategia comprobamos su información y mantenemos la confidencialidad de ella.

Cuestionario clínico para los voluntarios con 90 o 180 días post vacunación con esquema completo.

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLScKDD_btjXwlFH4XCsy6rylqwEqGhcky3HcHPIA7L5s463mBA/viewform?usp=sf_link



CINESTAV ante COVID-19

Cuestionario para personal de salud con más de 120 días post vacunación contra SARS-CoV-2 (2021)

Muchas gracias por participar en el proyecto "Evaluación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el dominio RBD del virus SARS-CoV-2 en la población mexicana".

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo y abandonarlo en el momento que lo desee. En esta etapa del proyecto, evaluaremos la presencia de anticuerpos post vacunación posterior a 120 días de contar con el esquema completo de vacunación a fin de evaluar la memoria humoral generada. Para esta etapa del proyecto es necesario extraer una muestra sanguínea (4 ml).

Al llenar el siguiente cuestionario electrónico usted acepta formar parte de nuestro proyecto de investigación.

Le compartimos las instrucciones generales para su participación:

- Le pediremos sus datos personales en el apartado de "Datos generales", con ellos se le generará un ID el cual se le hará llegar mediante un correo electrónico.*
- Usted deberá contestar una serie de preguntas de índole epidemiológico y clínico que serán de utilidad para la comunidad científica, médica y clínica.
- Cuando los resultados se encuentren listos, se le hará llegar un gentil recordatorio para que usted pueda acceder a ellos.
- Continúe cuidándose.

*Con esta estrategia comprobamos su información y mantenemos la confidencialidad de ella.

Anexo 3. Consentimiento informado toma de muestra

No de Folio _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTIMADO PARTICIPANTE: Se le invita a participar en el proyecto "Evaluación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra la proteína de espina (spike) S1 y RBD del virus SARS-CoV-2 en la población mexicana" Coordinado por la Dra. Leticia Cedillo Barrón.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO:

Las pruebas serológicas representan herramientas de primer contacto por su costo bajo y por su factibilidad inmediata para un mejor control de la transmisión de la enfermedad.

En este estudio, se propone implementar un sistema para detectar anticuerpos IgM, IgG e IgA contra SARS-CoV-2. Empleando proteínas recombinantes S, RBD mediante un ensayo de ELISA indirecto, ocupando a) muestras de población recuperada de la enfermedad, b) población con 15 días posteriores a la primera y segunda dosis de la vacuna contra COVID-19.

PROCEDIMIENTOS:

Para participar en este estudio:

- Un médico calificado tomará una muestra de sangre de 5 ml empleando material nuevo estéril.
- De la misma forma, deberá responder un breve cuestionario epidemiológico referente a la infección (<https://www.cinvestav.mx/Login?returnurl=%2festudio-epidemiologico>).

BENEFICIOS Y RIESGOS

Usted no recibirá ningún pago por su participación en este estudio. Se le podrán compartir sus resultados a petición del donante. Sin embargo, es importante recalcar que su colaboración ayudará a entender mejor la enfermedad del COVID19. Los resultados del estudio también serán de utilidad para la comunidad médica y científica. En cuanto a la toma de sangre, los riesgos del procedimiento son mínimos, podrían incluir un pequeño hematoma y dolor en el sitio de la punción que no persistirá más de unas horas.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS

Los resultados de la prueba de diagnóstico por ELISA indirecta se le comunicarán dentro de las primeras 72 h.

PARTICIPACIÓN O RETIRO

Durante mi participación en la investigación se asegura el respeto a la dignidad y la protección de mis derechos e información. Se me ha informado que puedo retirarme del estudio en cualquier momento si así lo decido, sin ninguna consecuencia o restricción.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

La información derivada de este estudio será manejada de forma confidencial.

Los investigadores se han comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que pudiera surgir a lo largo de éste proyecto.

Al firmar el consentimiento informado, usted autoriza que los investigadores o miembros del Comité de Ética puedan revisar su expediente clínico con el objeto de evaluar que se esté llevando a cabo adecuadamente el estudio. Los datos se manejarán de manera confidencial con un número de folio, y serán resguardados por los encargados del estudio.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio, otorgo mi consentimiento para participar voluntariamente en el proyecto *Evaluación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra la proteína de espina (spike) S1, RBD del virus SARS-CoV-2 en la población Mexicana.*

En caso de tener alguna duda, puede comunicarse con la responsable del estudio, Dra. Leticia Cedillo Barrón y al teléfono 5747-3800 ext. 5021/5024.

Nombre del participante

Firma del participante

Testigo 1

Testigo 2

Nombre impreso con letra de molde

Nombre impreso con letra de molde

Relación con el paciente

Relación con el paciente

Firma del testigo 1

Firma del testigo 2

Responsable de la toma de muestra

Investigadores Responsables

Médico Sandra Paola Martínez Frías

Dra. Leticia Cedillo Barrón
Dr. Julio García Cordero
Dr. Garrido Soto José Vicente
Dra. Clara Luz Aguilar Ortigoza
Dra. Ana Celia Garza Hernández

Ciudad de México, a _____ de _____ de 2021

15. Firmas jurado, aprobación tesis



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS

AVANZADOS DEL I.P.N.

Departamento de Biomedicina Molecular

NOTA: máximo 3 asesores, tutor y cotutor, de los cuales la mayoría deben ser del CINVESTAV.

Ciudad de México a 23 de Noviembre del 2021.

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía,
Coordinador Académico
Presente.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que hemos revisado la tesis Titulada:

Evaluación de la respuesta de anticuerpos en población mexicana infectada con SARS-CoV-2, convaleciente de COVID-19 y vacunado contra SARS-CoV-2

del C. Sandra Paola Martínez Frias.

Estudiante del programa de maestría del departamento de Biomedicina Molecular y el material reunido es suficiente para que se proceda a la realización de examen de grado correspondiente.

Atentamente

Dra Leticia Cedillo Barron
Investigadora titular
CVU: 13822
Correo: lcedillo@cinvestav.mx

Asesores

Dra Carmen Sánchez Torres
Investigadora titular
CVU: 19302
Correo: csanchez@cinvestav.mx

Dr Vianpey Francisco Ortiz Navarrete
Investigador titular
CVU: 6610
Correo: vortiz@cinvestav.mx

Dr Leopoldo Santos Argumedo
Investigador titular
CVU: 5618
Correo: lsantos@cinvestav.mx

Nota: Todo el comité deberá incluir correo electrónico y No. de CVU.