



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

***Análisis inmunológico de antígenos recombinantes contra  
SARS-CoV-2 variantes Wuhan y Alfa-Beta en modelo murino***

Tesis que presenta

**Q.F.B.T Lady Laura Trejo Ayala**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de la Tesis:

**Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares**

**Dr. Roberto Ruiz Medrano**

**Ciudad de México**

**Septiembre, 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicio por agradecer al Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 1077550 que me brindaron en este periodo de maestría y que gracias a ella puede concluir esta etapa en mi carrera profesional.

Más que agradecida con la Doctora Beatriz Xoconostle Cazares y con el Doctor Roberto Ruiz Medrano por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por poder hacer uso de las instalaciones del laboratorio 12, 24 y el área nueva, por siempre guiarme en los experimentos y compartir sus conocimientos, por resolver mis dudas y por toda su ayuda que siempre me dieron para estar mejor preparada.

A la Doctora Berenice Calderón por siempre ayudarme a entender los experimentos y por guiarme en la realización de éstos. Gracias por siempre tener disponibilidad para orientarme y porque gracias a sus conocimientos pude resolver confusiones durante mi proyecto.

Al M.C Leandro Núñez Muñoz por todo el apoyo técnico en los ensayos de bióloga molecular, a la M.C Brenda Vargas por su técnico en los ensayos cortes histológicos y tinciones.

A todos mis compañeros de laboratorio que siempre contribuyeron a un ambiente muy relajado y divertido dentro de los laboratorios y que estuvieron ahí para apoyar en lo que podían.

Al M.C Víctor Hugo Rosales García por su ayuda en el procesamiento de muestras en el citómetro de flujo y en el análisis de los resultados.

A mi familia por su amor, por escucharme y creer en mí, a mis hermanas y mamá por estar al pendiente y ser un apoyo para mí en todo momento, en especial a mi hermana Liliveth. A mi novio Ernesto por motivarme día a día, por su apoyo incondicional, por creer en mí y alentarme a seguir mis sueños y crear nuevos.

Sin todos ustedes esta meta profesional no la hubiera alcanzado, gracias infinitas.

## **Resumen**

El nuevo coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es un virus de RNA monocatenario que pertenece a la familia *Coronaviridae* que causa la enfermedad COVID-19. La necesidad de una vacuna eficaz, segura, accesible y de bajo costo es esencial como medida de contención de este virus y sus variantes de preocupación. Muchas de estas vacunas se han centrado en el uso de la proteína spike (S) como antígeno, quien a través de su dominio de unión al receptor (RBD) facilita la entrada del virus al interior celular. Sin embargo, el uso de la proteína S puede provocar respuestas autoinmunes debido a las glicosilaciones presentes en su superficie, que poseen patrones similares a los patrones encontrados en proteínas humanas. Por lo anterior, en este trabajo se realizó la purificación y evaluación inmunológica de dos antígenos vacunales contra las variantes Wuhan y Alfa-Beta, producidos a partir de genes sintéticos basados en regiones no glicosiladas del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Los antígenos se expresaron en *E.coli*, se purificaron por cromatografía líquida de alta presión y se formularon con hidróxido de aluminio como adyuvante. Los estudios preclínicos de los antígenos se realizaron en modelo murino BALB/c mediante un análisis de la respuesta inmune celular y humoral, a través de la cuantificación de citocinas, marcadores celulares y biometría hemática por citometría de flujo, determinación de la producción de anticuerpos específicos y neutralizantes por enzimoimmunoanálisis de adsorción, así como ensayos histopatológicos.

## **Abstract**

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a single-stranded RNA virus that belongs to the *Coronaviridae* family and causes coronavirus disease (COVID-19). The need for an effective, safe, accessible, and low-cost vaccine is essential as a containment measure against the virus and its variants of concern. Many of these vaccines are based on the use of the spike (S) protein as an antigen, which through its receptor-binding domain (RBD) facilitates the entry of the virus into the cell interior. However, the use of protein S could potentially trigger an autoimmune response in the individuals because the glycosylation patterns present in the S protein are similar of those found in human proteins.

Therefore, in this work, the purification and immunological evaluation of two vaccine antigens against the Wuhan and Alpha-Beta variants, we performed. Antigens were produced from a recombinant protein based on non-glycosylated regions of the RBD of the SARS-CoV-2. High levels of the antigens were obtained in *E.coli*, purified by high performance liquid chromatography and formulated with aluminum hydroxide as adjuvant. Preclinical studies of the antigens were performed in the BALB/c murine model by analyzing cytokines, cell markers and blood counts by flow cytometry, determining the production of specific and neutralizing antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays, as well as histopathological tests.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción.....</b>	<b>9</b>
1.1 Coronavirus.....	9
1.1.1 SARS-CoV-2 .....	10
1.1.2 Estructura genómica del SARS-CoV-2.....	11
1.1.3 Variantes del SARS-CoV-2 .....	12
1.2 Vacunas .....	13
1.3 Respuesta inmune adaptativa .....	15
1.3.1 Propiedades de la respuesta inmune adaptativa.....	15
1.3.2 Clasificación .....	16
1.3.2.1 Respuesta inmune activa y pasiva .....	16
1.3.2.2 Respuesta inmune humoral y celular .....	17
1.4 Adyuvantes.....	20
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos específicos .....	23
<b>5. Estrategia experimental.....</b>	<b>24</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
6.1 Expresión y purificación de las proteínas Wuhan y Alfa-Beta.....	25
6.2 Lisis celular .....	26
6.3 Lavado de los cuerpos de inclusión.....	26
6.4 Purificación de las proteínas Wuhan y Alfa-Beta mediante FPLC.....	26
6.5 SDS-PAGE .....	28
6.6 Formulación de la vacuna.....	28
6.6.1 Escáner diferencial por fluorometría .....	30
6.7 Inmunización de ratones BALB/c por vía intramuscular e intranasal y recolección de muestras.....	32
6.8 Pruebas de inmunogenicidad de la respuesta inmune humoral .....	34
6.8.1 Ensayo de neutralización en Suero .....	35
6.8 Pruebas de inmunogenicidad de la respuesta inmune celular .....	36
6.9 Análisis de citocinas en suero.....	37

6.9.1 Medición de citocinas en linfocitos.....	38
6.9.2 Obtención y preparación de esplenocitos para la re-estimulación .....	39
6.9.2.1 Activación de esplenocitos .....	40
6.10 Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot con suero de ratones .....	41
6.11 Análisis histológico.....	42
6.11.1 Tinción de tejidos con hematoxilina y eosina .....	43
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
7.1 Expresión y purificación de proteínas Wuhan y Alfa-Beta .....	45
7.2. Purificación del antígeno Wuhan por FPLC .....	46
7.3 Purificación del antígeno Alfa-Beta por FPLC .....	49
7.4 Formulación de la vacuna .....	52
7.5 Barrido diferencial por fluorometría (DSF).....	52
7.6 Respuesta inmune humoral .....	57
7.7 Respuesta inmune celular.....	61
7.7.1 Análisis de citocinas.....	61
7.7.2 Medición de citocinas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, lote uno.....	62
7.7.3 Medición de citocinas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, lote 2.....	65
7.7.4 Medición de citocinas secretadas en suero, lote uno .....	68
7.7.5 Medición de citocinas secretadas en suero, lote dos.....	70
7.7.6 Medición de citocinas en el ensayo de activación de esplenocitos.....	72
7.7.7 Medición de células fagocíticas en sangre.....	72
7.8 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot .....	74
7.9 Análisis de la seguridad en ensayos histopatológicos .....	75
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>82</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de formulación para el antígeno, lote 1 .....	29
<b>Tabla 2.</b> Esquema de formulación para los antígenos, lote 2.....	31
<b>Tabla 3.</b> Paneles de citocinas medidas en linfocitos mediante citometría de flujo. ....	39
<b>Tabla 4.</b> Estandarización de las concentraciones de los antígenos y anticuerpos para el ensayo de Western-Blot. ....	42
<b>Tabla 5.</b> Órganos extraídos de ratones del lote 2 para un análisis histológico.....	42
<b>Tabla 6.</b> Orden de soluciones para la tinción con hematoxilina y eosina. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización del SARS-CoV-2 .....	12
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de activación de la respuesta immune adaptativa. ....	16
Figura 3. Comparación de la respuesta inmune activa y pasiva. ....	17
<b>Figura 4.</b> Estrategia experimental del proyecto .....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema de inmunización de ratones BALB/c, lote 1. ....	33
<b>Figura 6.</b> Esquema de inmunización de ratones BALB/c, lote 2 .....	34
<b>Figura 7.</b> Análisis SDS-PAGE de la expresión de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en E.coli .....	45
<b>Figura 8.</b> Gel de glicina SDS-PAGE de la lisis celular y lavados de los cuerpos de inclusión del antígeno Wuhan. ....	47
<b>Figura 9.</b> Purificación de intercambio catiónico del antígeno Wuhan. ....	48
<b>Figura 10.</b> Purificación de intercambio aniónico del antígeno Wuhan. ....	49
<b>Figura 11.</b> Gel de glicina SDS-PAGE de la lisis celular y lavados de los cuerpos de inclusión del antígeno Alfa-Beta. ....	50
<b>Figura 12.</b> Purificación de la proteína Alfa-Beta por intercambio catiónico .....	51
<b>Figura 13.</b> Purificación de la proteína Alfa-Beta por intercambio aniónico. ....	52
<b>Figura 14.</b> Kits de soluciones para evaluar la Solubilidad y Estabilidad mediante Thermal- Shift. ....	54
<b>Figura 15.</b> Kit de soluciones para la evaluación de aditivos ideales para los antígenos mediante Thermal-Shift. ....	55
<b>Figura 16.</b> Kit de soluciones para evaluar el pH óptimo en la formulación de los antígenos mediante Thermal-Shift. ....	56
<b>Figura 17.</b> Análisis de la respuesta humoral del lote 1 .....	58
<b>Figura 18.</b> Respuesta humoral de los ratones del lote 2. ....	61
<b>Figura 19.</b> Análisis por citometría de flujo de citocinas encontradas en linfocitos de animales lote 1. ....	63
<b>Figura 20.</b> Análisis por citometría de flujo de citocinas encontradas en linfocitos de animales lote 2. ....	68
<b>Figura 21.</b> a) Citocinas medidas en suero sanguíneo lote 1 .....	69
<b>Figura 22.</b> Citocinas medidas en suero sanguíneo del grupo WT20 lote 2. ....	71
<b>Figura 23.</b> Fenotipos celulares medidos en sangre por citometría de flujo, lote 1 y 2 .....	73
<b>Figura 24.</b> Inmunodetección de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta por Western-Blot. ....	75
<b>Figura 25.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Timo .....	76
<b>Figura 26.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Riñón. ....	77
<b>Figura 27.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Pulmón. ....	77
<b>Figura 28.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Cerebro. ....	78
<b>Figura 29.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Piel. ....	78
<b>Figura 30.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Bazo .....	79
<b>Figura 31.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Corazón. ....	79
<b>Figura 32.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Hígado. ....	80
<b>Figura 33.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Ovario. ....	80
<b>Figura 34.</b> Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Intestino. ....	81



# 1. Introducción

A fines de 2019 surgió un nuevo coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), que provoca la enfermedad por coronavirus (COVID-19), una infección respiratoria grave que ha representado una amenaza para la salud mundial (Rodríguez et al., 2020). El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró pandemia a la COVID-19 (WHO, 2020). Este virus pertenece a la familia *Coronaviridae* que abarca varios virus que pueden causar enfermedades humanas que van desde el resfriado común hasta manifestaciones clínicas graves (Sharma, et al. 2021). El genoma del SARS-CoV-2 codifica varias proteínas no estructurales (NSP1-NSP10 y NSP12-16) y accesorias, así como cuatro proteínas estructurales, que incluyen spike o espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (Arashkia, et al. 2020). La proteína S tiene una estructura homotrimérica, cada monómero consta de un péptido señal (SP), subunidades S1 y S2 (la primera responsable de la unión al receptor y la segunda con una función de anclaje a la membrana viral). La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD) y dentro de él, el motivo de unión al receptor (RBM) (Sainz et al., 2005). La proteína S también desempeña papeles importantes en la unión, fusión y entrada viral (He et al., 2021). Además, puede unirse a la enzima convertidora de angiotensina (ACE2) a través del RBD, empleándola como receptor (Tai et al. 2020; Chan et al., 2020).

## 1.1 Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son un grupo de virus envueltos que tienen un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva. Su genoma viral varía de 26 a 32 kb de longitud y pertenecen a la familia *Coronaviridae* del orden Nidovirales (Wu, et al., 2020). Su nombre se

debe a que bajo el microscopio los CoVs tienen grandes peplómeros o espículas que los hacen parecer una corona. Se han clasificado en cuatro géneros que incluyen:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -coronavirus. Los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* infectan a las aves y mamíferos, incluyendo al humano y causando enfermedades respiratorias; mientras que en animales causan enfermedades gastrointestinales (Alanagreh et al., 2020, Wu et al., 2020). Por lo general, los síntomas de CoV en humanos incluyen secreción nasal, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza y fiebre que puede durar varios días. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos existe la posibilidad de que los virus puedan causar una enfermedad de las vías respiratorias inferiores, como neumonía y bronquitis (Wang et al., 2006). Hasta la fecha se han reportado tres brotes importantes de CoV; el más reciente, el nuevo coronavirus 2019 o SARS-CoV-2.

### **1.1.1 SARS-CoV-2**

El nuevo coronavirus fue detectado por primera vez en pacientes con neumonía en Wuhan, China en el mes de diciembre de 2019; fue nombrado SARS-CoV-2 y causa la COVID-19. El SARS-CoV-2 es un virus de RNA de la familia *Coronaviridae* y pertenece al género *Betacoronavirus*, su genoma es de RNA monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 30 kb (Sun et al., 2021). Consta de seis marcos abiertos de lectura (ORF) funcionales que codifican varias proteínas estructurales (S, E, M y N) y no estructurales.

Este virus comparte una identidad de secuencia genómica del 79% con el CoV del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y 50% con el CoV del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) (Hu et al., 2021). Al igual que los otros CoV, para ingresar a las células hospedadoras, primero se une a un receptor de superficie celular para la unión viral, luego

ingresa a los endosomas y finalmente se fusionan las membranas virales y lisosomales. La proteína S es la encargada de la entrada del virus a las células humanas a través de la unión con el receptor ACE2. Se ha demostrado que la proteasa transmembranal de serina 2 (TMPRSS2) y las proteasas lisosomales son importantes en la entrada del virus (Li, et al. 2003).

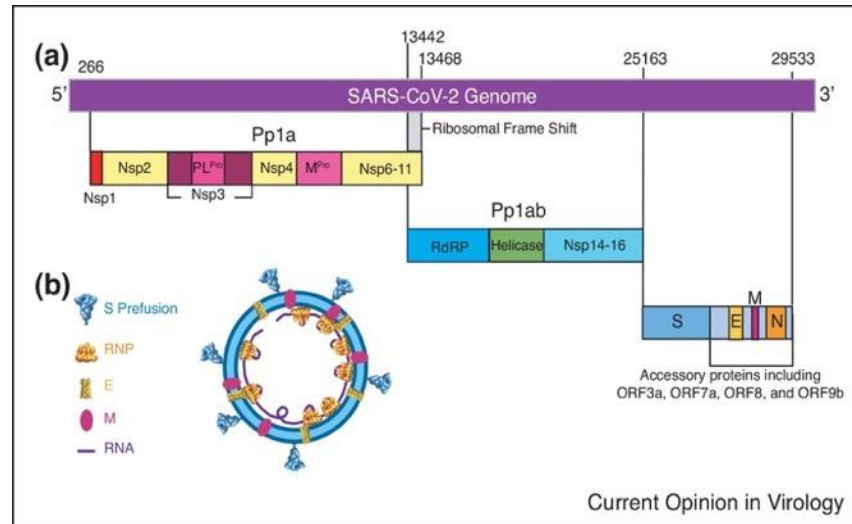
Los síntomas notificados en personas con COVID-19 varían desde síntomas leves hasta quienes enferman gravemente, estos síntomas pueden aparecer de 2 a 14 días posterior a la exposición con el virus (CDC 2021).

### **1.1.2 Estructura genómica del SARS-CoV-2**

Mediante el uso de tomografía crioelectrónica y otras herramientas, varias investigaciones han obtenido información sobre la arquitectura y organización molecular de viriones del SARS-CoV-2. Los viriones del SARS-CoV-2 toman una forma esférica o elipsoidal con un diámetro promedio de  $108 \pm 8$  nm (Hardenbrook & Zhang, 2022). La superficie externa del virión está cubierta con proteínas S en una conformación principalmente de prefusión. La membrana externa contiene las proteínas M y E (Fig. 1b). Dentro del virión se encuentran los complejos de ribonucleoproteínas (RNP) que consisten en la proteína N y el genoma viral de RNA monocatenario.

El virus también codifica para proteínas no estructurales (Nsps), como Nsps 1-16, que se producen a partir de la autoescisión de las poliproteínas precursoras Pp1a y Pp1ab por proteasas virales. La proteasa similar a papaína ( $PL^{Pro}$ ) Nsp3 escinde tres sitios que dan como resultado Nsp1-3 libres, mientras que la proteasa principal ( $M^{Pro}$ ) Nsp5 escinde los 11 sitios restantes (Hardenbrook & Zhang, 2022). Esto permite que las Nsps realicen sus funciones en la célula

huésped, generando vesículas de doble membrana para la replicación del genoma viral, la transcripción y el transporte de RNA (Fig. 1a).



**Figura 1.** Organización del SARS-CoV-2. (a) Organización genómica, las poliproteínas no estructurales Nsp 1-16 se expresan por poliproteínas Pp1a y Pp1ab, las proteínas estructurales S, E, M y N están codificadas por sus respectivos genes (b) Estructura y proteínas estructurales

### 1.1.3 Variantes del SARS-CoV-2

Todos los virus, incluido el SARS-CoV-2, evolucionan con el tiempo a medida que se producen mutaciones genéticas durante la replicación del genoma de RNA, molécula que tiene baja actividad de reparación. A la fecha se han documentado múltiples variantes del SARS-CoV-2 durante esta pandemia debido a que no se ha contenido adecuadamente al virus a nivel global. Considerando que las mutaciones ocurren al azar, se generan cambios que pueden alterar la biología del virus. Desde el punto de vista antropogénico, con base en sus atributos y características compartidas que pueden requerir medidas de salud pública, la OMS clasifica a las variantes virales como: variante de preocupación (VOC), variante de interés (VOI) o variante bajo monitoreo (VBM) (CDC, 2021). Las VOC se definen como una variante del SARS-Cov-2 que se ha demostrado que está asociada con un aumento de transmisibilidad, aumento de la

virulencia, disminución de la neutralización por los anticuerpos generados durante una infección anterior o la vacunación, así como reducción de la eficacia de las medidas de salud pública, vacunas y tratamientos disponibles. Por otro lado, las VOI son aquellas donde se han identificado cambios en la unión al receptor, una menor neutralización por los anticuerpos generados contra una infección anterior o la vacunación, así como una menor eficacia de los tratamientos. Las VBM son aquellas cuyos datos indican que existe un impacto claro o potencial sobre las contramedidas médicas autorizadas o que se han asociado a casos de enfermedad más graves o a una mayor transmisión, pero que ya no se detectan o circulan a niveles muy bajos (Choi et al., 2021; CDC, 2021).

Actualmente, según la OMS, entre las VOC se encuentran: Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron; mientras que las VOI actuales según son: Lambda y Mu, mismas que están siendo monitoreadas y caracterizadas (WHO, 2021).

## **1.2 Vacunas**

El acceso mundial a vacunas seguras y eficaces es fundamental para controlar la pandemia COVID-19 y mitigar los daños colaterales. La carrera por estas vacunas se inició con agencias gubernamentales y las principales compañías farmacéuticas como líderes, en búsqueda de un biológico que active tanto el sistema inmunitario adaptativo para generar respuestas de las células T citotóxicas, así como respuestas de anticuerpos neutralizantes, evitando al mismo tiempo respuestas inmunitarias patológicas que pudieran dar como resultado daño tisular o exacerbación de la enfermedad (Hofman et al., 2021). Para satisfacer la necesidad de una vacuna, se ha propuesto un nuevo paradigma de desarrollo de vacunas pandémicas que reduce el cronograma de desarrollo de 10-15 años a 1-2 años (Lurie et al., 2020).

Como parte del proceso de desarrollo, las vacunas deben someterse a rigurosos ensayos clínicos que avalen su seguridad y eficacia antes de que las autoridades permitan su uso para el público en general. Los ensayos clínicos tienen como fin la comprensión de la seguridad de la vacuna, averiguar qué efecto protector generan, así como medir su eficacia e inmunogenicidad, en diferentes grupos de personas, basados en edad y condiciones de salud (WHO, 2022).

La capacidad de una vacuna para proteger contra cuadros graves de la enfermedad y la mortalidad, son los criterios de valoración de la eficacia más importantes. Para COVID-19, que presenta una amplia variedad de síntomas, la eficacia se puede medir incluyendo la reducción en infecciones asintomáticas, infecciones sintomáticas, hospitalizaciones y muertes. Sin embargo, la inmunogenicidad es una medida más compleja que ayuda a comprender qué tan bien funciona una vacuna y mide el tipo de respuestas inmunitarias que genera la vacuna y su magnitud a lo largo del tiempo (Hodgson et al., 2021).

Para el diseño de vacunas se hace la selección de antígenos, plataformas de vacunas, rutas y regímenes de vacunación. En la selección de los antígenos de SARS-CoV-2, todas las vacunas en desarrollo incluyen al menos una parte de la proteína S, ya que se ha demostrado que solo los anticuerpos dirigidos a la proteína S pueden neutralizar el virus y prevenir la infección (Jeyanathan et al., 2020).

En cuanto a las plataformas de vacunas se dividen en seis categorías en función de su origen y composición: virus atenuado, vacunas con vectores virales recombinantes, virus inactivados, vacunas con subunidades de proteínas, partículas similares a virus (VLP) y vacunas basadas en ácidos nucleicos (DNA o RNAm). En general, las vacunas necesitan de dos componentes: un antígeno del patógeno objetivo y una señal de infección que alerte o active el sistema inmunitario del huésped, que son conocidos como adyuvantes (Jeyanathan et al., 2020).

### **1. 3 Respuesta inmune adaptativa**

La respuesta inmune (RI) se define como la respuesta coordinada y colectiva de los integrantes del sistema inmune frente a la introducción de sustancias extrañas (microorganismos, macromoléculas, etc.) al organismo. La RI adaptativa es aquella respuesta inmunitaria que es estimulada por la exposición a microorganismos infecciosos que aumentan en magnitud y capacidades defensivas con cada exposición sucesiva a un microbio en particular. La repuesta no es inmediata, requiere de algunos días para manifestarse e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos “sensibilizados”. Las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción, de aquí el término de inmunidad específica e inmunidad adquirida. Esta respuesta tarda más tiempo en producirse que la RI innata; sin embargo, la RI adaptativa tiene memoria inmunológica (Clem, 2011).

#### **1.3.1 Propiedades de la respuesta inmune adaptativa**

La RI adaptativa está integrada principalmente por linfocitos y sus productos. Los linfocitos poseen receptores muy diversos en sus membranas plasmáticas capaces de reconocer un enorme número de antígenos. Hay dos poblaciones principales de linfocitos, los linfocitos T y linfocitos B. También, cuenta con compuestos solubles como los anticuerpos producidos por linfocitos B y mediadores como las citocinas. La RI adaptativa es activada por los elementos de la RI innata, por lo que es necesario que la RI innata genere una buena respuesta inflamatoria, ya que se requieren estos elementos activos para inducir la RI adaptativa (Fig. 2) (Clem., 2011).

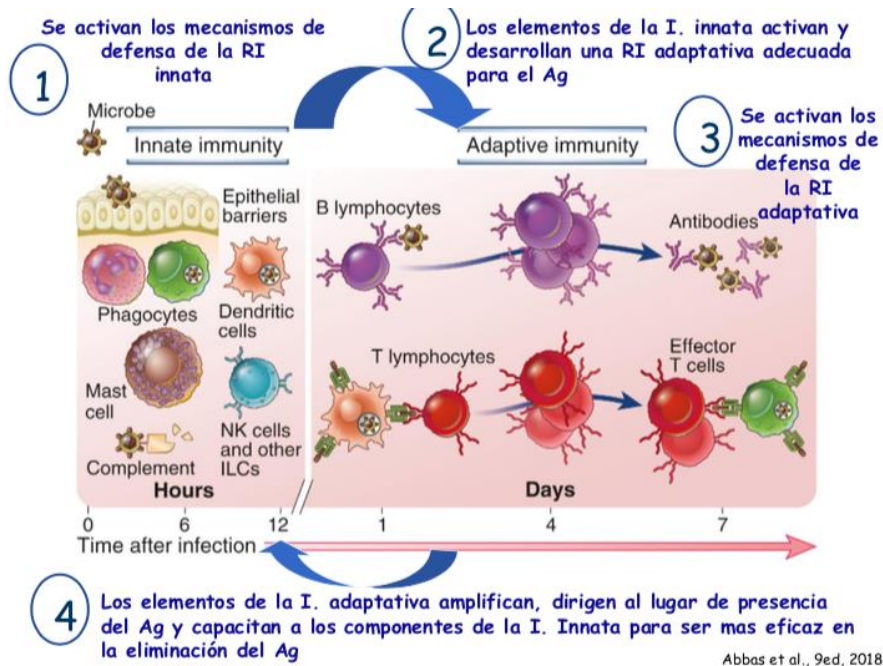


Figura 2. Mecanismo de activación de la respuesta inmune adaptativa.

### 1.3.2 Clasificación

Existen dos principales clasificaciones de la RI adaptativa, la primera depende de la forma en la que se desarrolla (que puede ser activa o pasiva) y la segunda está basada en el principal elemento que media la RI (puede ser de tipo humoral o celular).

#### 1.3.2.1 Respuesta inmune activa y pasiva

La RI frente a un microorganismo puede inducirse por la respuesta del hospedador frente al microbio (inmunidad activa) o la transferencia de anticuerpos que lo protegen frente al microbio (inmunidad pasiva) (Fig. 3). Se denomina inmunidad activa a la forma de inmunidad que se despierta por la exposición a un antígeno extraño, donde la persona inmunizada cumple una función activa en la respuesta al antígeno. Esta inmunidad se puede obtener a través de la enfermedad o por medio de la inmunización. Una persona también puede adquirir la inmunidad



mediante transferencia de anticuerpos de una persona previamente inmunizada a otra que no ha tenido contacto con el antígeno, a esta inmunidad se le conoce como inmunidad pasiva. Un ejemplo de esta inmunidad con gran importancia fisiológica lo ofrece el paso de los anticuerpos de la madre al feto mediante la placenta (Netea et al., 2016).

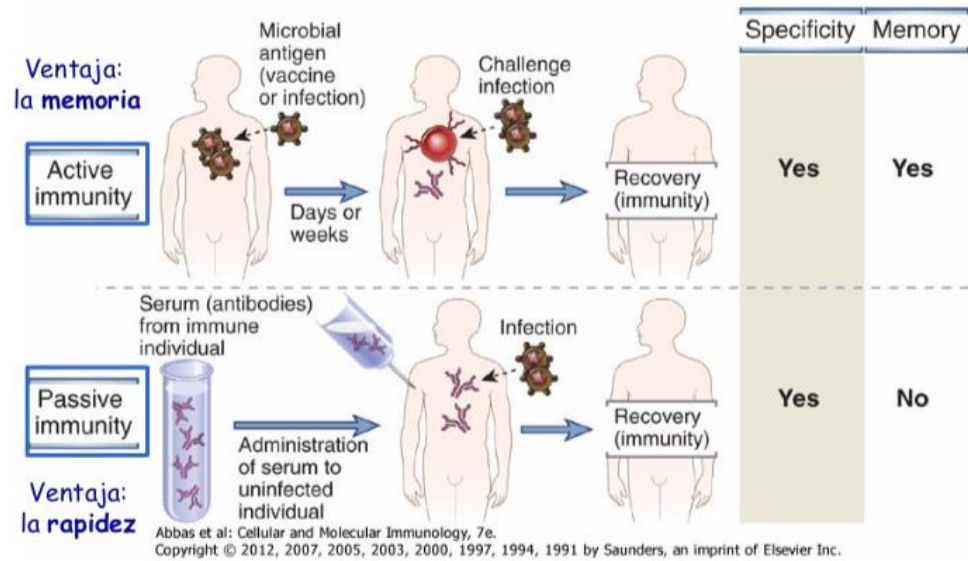


Figura 3. Comparación de la respuesta inmune activa y pasiva.

### 1.3.2.2 Respuesta inmune humoral y celular

Existen dos tipos de RI adaptativa llamadas inmunidad celular e inmunidad humoral, en las que intervienen diferentes componentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microbios de distintos tipos.

La inmunidad humoral cuenta con moléculas presentes en la sangre y en las mucosas que son producidas por las células B, llamadas anticuerpos. Esta inmunidad funciona contra agentes patógenos extracelulares y toxinas (Clem, 2011). Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infecciosidad de los microorganismos y los marcan para su eliminación mediante fagocitosis y el sistema del complemento. Las células B son producidas

en la médula ósea y maduran en los ganglios linfáticos. A diferencia de las células T, las células B pueden reconocer antígenos en su forma nativa, lo que significa que las células B pueden reconocer antígenos sin necesidad de que el antígeno sea procesado por una célula presentadora de antígeno y luego presentado por una célula T colaboradora (Margolick et al., 2006). Estos antígenos son denominados antígenos T independientes porque no se requiere la activación de las células T para activar las células B. La activación de las células B con la activación de las células T auxiliares da como resultado una respuesta inmunitaria alta y una memoria más eficaz. Esta respuesta inmunitaria eficaz a largo plazo es el tipo de reacción que es el objetivo de las inmunizaciones (Goldsby, 2003). A partir de las células B estimuladas, surgirán clones de células B con especificidad por el antígeno particular. Estas células pueden convertirse en células plasmáticas que producen anticuerpos o células de memoria que permanecerán en los ganglios linfáticos para estimular una nueva RI a ese antígeno en particular. Este proceso de selección y expansión clonal tardará varios días en ocurrir (1-7 días) e implica principalmente la producción de la inmunoglobulina IgM, la cual es el primer anticuerpo que se produce durante una respuesta inmunitaria primaria. A medida que la RI avanza, los anticuerpos que se producen son de la clase IgG, éstos son mejores anticuerpos neutralizantes ya que se unen con mayor eficacia al antígeno y ayudan con la opsonización (Goldsby, 2003, Netea et al., 2016).

Por su parte, la inmunidad celular queda a cargo de las células T o linfocitos T, que funcionan principalmente contra patógenos intracelulares como aquellos que son ingeridos por los fagocitos y sobreviven en su interior; también son dirigidos sobre virus que infectan a varias células del hospedador y se replican en ellas. En estos lugares, los microbios son inaccesibles a los anticuerpos circulantes. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la

eliminación de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Netea et al., 2016).

Los linfocitos T maduran en el timo y luego se liberan al torrente sanguíneo. Su receptor para reconocer el antígeno se denomina TCR, y requiere que una célula presentadora de antígeno (APC) se lo muestre unido a una molécula particular que la APC expresa en su superficie. Hay dos principales tipos de linfocitos T: los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ (Clem, 2011). Los linfocitos T CD4+, también conocidos como linfocitos T cooperadores (Th), se pueden diferenciar en un tipo de célula efectora (Th1, Th2, Th17, Threg, Thfollicular, etc) y según su diferenciación secretan un grupo particular de citocinas. En general las citocinas producidas por los linfocitos Th participan en la activación de los propios linfocitos T, los linfocitos B y las células inflamatorias; o pueden suprimir la RI. Los linfocitos Th1 ayudan a promover la inmunidad mediada por células, y los Th2 ayudan a promover la inmunidad mediada por anticuerpos (Margolick et al., 2006). Los linfocitos Th tienen un correceptor CD4 y solo reconocen el antígeno unido al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. La proteína MHC II se encuentra en todas las células inmunitarias y actúa como marcador de éstas.

Por otra parte, los linfocitos T CD8 o linfocitos T citotóxicos (Tc) pueden diferenciarse en un tipo de célula efectora (Tc1, Tc2, Tc17, Tcreg) y según su diferenciación secretan un grupo particular de citocinas. Además, tienen una gran actividad citotóxica sobre células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares (por ejemplo, virus), principalmente la subpoblación Tc1. Estos linfocitos tienen el correceptor CD8 y solo reconocen la proteína del MHC de clase I que se encuentra en todas las células nucleadas y actúa como marcador de células corporales.

Los linfocitos CD8 son esenciales para la inmunidad mediada por células y para ayudar a controlar los patógenos intracelulares (Sigal, 2016).

#### **1.4 Adyuvantes**

La elección del adyuvante adecuado para una vacuna es esencial para producir e incrementar una RI robusta. Los adyuvantes pueden ayudar a sesgar la RI adaptativa en una dirección en particular y según el tipo de vacuna serán las consideraciones para la selección del adyuvante. Para las vacunas contra la COVID-19, el adyuvante ideal debería conferir una RI adaptativa sesgada Th1 generando una alta capacidad de neutralización, al mismo tiempo que una respuesta de células T CD8+ de larga duración (Hofman et al., 2021). Se ha observado que, en las vacunas de subunidades, el antígeno debe encapsularse en nanopartículas para su absorción en las células y el procesamiento proteolítico.

El hidróxido de aluminio es un ejemplo de adyuvante que ha sido utilizado como un adyuvante clásico. Como mecanismo de acción crea una emulsión que retiene al antígeno en el sitio de inyección, lo que permite que el antígeno sea mayormente captado por las APC y, por ende, una presentación a las células T (Brewer, J. (2006). Se ha demostrado su uso seguro en animales y humanos, además de que se ha reportado su uso en vacunas anti-COVID-19, estimulando los anticuerpos neutralizantes de virus e induciendo una respuesta inmune celular Th2 en ratones (Pollet et al., 2021).

## **2. Hipótesis**

Los antígenos producidos a partir de las regiones no glicosiladas de RBD de la proteína spike del SARS-Cov-2 y sus variantes, pueden inducir una respuesta inmune celular y humoral protectora contra el virus.

## **3. Justificación**

Más de dos años después de la actual pandemia por COVID-19 se han registrado en el mundo 575, 022, 974 casos positivos y alrededor de 6, 402, 965 muertes, según la OMS (WHO, 2022). Como medida de contención, con esfuerzos procedentes de gobiernos y laboratorios alrededor del mundo, se ha logrado el desarrollo de vacunas seguras para la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, estas vacunas están disponibles para países como Reino Unido y Estados Unidos, pero la mayoría de los países con bajos recursos aún carecen de acceso a las vacunas COVID-19 (Hotez et al., 2021). En este proyecto se caracterizó la respuesta inmunológica de dos potentes antígenos vacunales contra el SARS-CoV-2 y sus variantes Alfa (B.1.1.7) y Beta (B1.351) desarrollados por el equipo de trabajo, los cuales están basados en regiones no glicosiladas de RBD de la proteína S del SARS-CoV-2, ya que la proteína S media la entrada viral al huésped a través del RBD mediante el reconocimiento de ACE2 como su receptor. Una ventaja de estos antígenos es su capacidad para minimizar la inmunopotenciación del huésped. Además, a través de la generación de anticuerpos contra la proteína S, se podría prevenir la entrada del virus y permitiría una respuesta inmunitaria humoral y celular protectora para inactivar las partículas virales.

La producción de estos antígenos vacunales de subunidad proteica se generó mediante síntesis recombinante de antígenos proteicos que permiten una alta producción y eficiencia del proceso,

lo cual reduce significativamente gastos de producción y, por lo tanto, ayuda a producir una vacuna más económica pero segura y eficaz.

Como candidatos vacunales es necesario probar la inmunogenicidad y seguridad de éstos antes de que sean avalados por las instituciones de regulación sanitaria del país. Por lo que aquí se presentan los ensayos preclínicos de estos antígenos, evaluando la respuesta inmune y celular, así como la seguridad del uso de éstos.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad y seguridad de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta como candidatos vacunales para prevenir la enfermedad COVID-19 en modelo murino.

### 4.2 Objetivos específicos

- Purificar mediante FPLC los candidatos vacunales Wuhan y Alfa-Beta, expresados en *E.coli*.
- Evaluar los candidatos vacunales Wuhan y Alfa-Beta a través de barrido diferencial por fluorometría.
- Caracterizar la respuesta inmune humoral en modelo murino de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta, mediante ensayos de neutralización en virus subrogados y perfiles de expresión de IgGs.
- Caracterizar de la respuesta inmune celular en modelo murino de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta, mediante marcadores celulares y citocinas.
- Analizar la seguridad de los antígenos en modelo murino mediante ensayos histológicos de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta.

## 5. Estrategia experimental

La estrategia experimental fue basada en los objetivos particulares y dividida en 6 etapas (Fig. 4), que incluyen la purificación de los antígenos recombinantes Wuhan y Alfa-Beta mediante FPLC; evaluación de la estabilidad de los antígenos mediante barrido diferencial por fluorimetría; inmunización de ratones; caracterización de la respuesta inmune humoral y celular; inmunodetección de los antígenos por Western Blot; así como el análisis de la seguridad de los antígenos en modelo murino mediante ensayos histológicos.

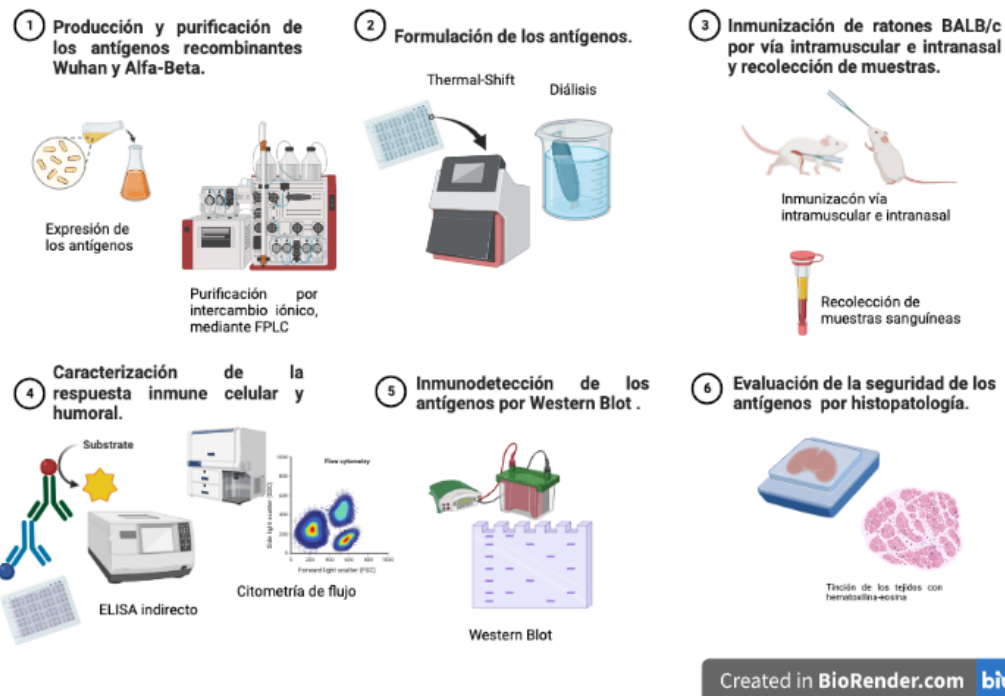


Figura 4. Estrategia experimental del proyecto.



## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Expresión y purificación de las proteínas Wuhan y Alfa-Beta

Anteriormente, en el grupo de trabajo se realizó el diseño y clonación de los candidatos antigénicos vacunales basados en las regiones no glicosiladas del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2, que comprenden los residuos S371 a F541 (Nuñez Muñoz et al., 2021; Olivares-Martínez 2021) (Anexo 1). Se empleó una alícuota de la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pCri8b con el inserto NG19m/ NG19 20H (Wuhan y Alfa-Beta respectivamente) y se inoculó en una placa de agar Luria Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 15 g/L de agar) suplementada con kanamicina (50 µg / ml). La placa se incubó a 37°C por 16 h y posteriormente mediante un raspado de caja se pasó el contenido diluido en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg / ml), con el fin de crecer el pre-inóculo; las condiciones de crecimiento fueron 37°C a 120 rpm por 2 h. Posteriormente, este cultivo se empleó para inocular 1 L de medio Terrific Broth (TB) (11.8 g/L triptona, 24 g/L extracto de levadura, 9.4 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.2 g/L, 4 ml/L glicerol) suplementado con kanamicina (50 µg/ml) a un volumen de inoculación al 1% (v/v). El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (OD<sub>600nm</sub>) entre 0.6 y 0.8 (aproximadamente 2.5-3 h). Al llegar a esta OD se agregó 1mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich) a 16° C durante 16 h para inducir la expresión de las proteínas de interés. Tras la inducción, se centrifugó el medio de cultivo a 6,000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se colectó para mantenerla en ultracongelación a -70°C hasta su uso.

## **6. 2 Lisis celular**

El pellet de la biomasa obtenida se resuspendió en 50 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM y DTT 1 mM) y se mezcló por agitación orbital hasta que la biomasa quedó completamente resuspendida. Posteriormente, se realizó la sonicación en baño de hielo para evitar el calentamiento de la proteína y su degradación; el ciclo aplicado fue de 20 segundos sonicando y 40 segundos en reposo durante 8 minutos con una amplitud máxima de 40%. El equipo utilizado fue el Ultrasonic Processor 750 a 20 kHz (Cole-Parmer, EUA).

La muestra obtenida se centrifugó a 6,000 rpm a 4°C por 30 minutos, conservando solo la pastilla que corresponde a los cuerpos de inclusión donde se encuentran principalmente las proteínas Wuhan y Alfa-Beta; ya que, por su elevada expresión, tienden a formar agregados insolubles.

## **6. 3 Lavado de los cuerpos de inclusión**

Al lisado insoluble se le añadió 20 ml de buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) se homogenizó y se añadieron 100 µl de lisozima. Se dejó homogenizar durante 30 minutos, se añadieron 100 ml de buffer de lavado (MES pH 6.0, NaCl 150 mM, Tritón 1%) y se resuspendió con el homogeneizador de alto cizallamiento T 18 digital ULTRA-TURRAX® (IKA, DE) durante 2 minutos. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se conservó la fracción insoluble. La fracción insoluble recuperada se volvió a homogenizar con 100 ml de buffer de lavado hasta concluir 6 lavados.

## **6. 4 Purificación de las proteínas Wuhan y Alfa-Beta mediante FPLC**

El pellet obtenido tras los lavados se resuspendió en 100 ml de buffer A (MES 50 mM, urea 8 M y DTT 5 mM, pH 6.0) usando el homogeneizador de alto cizallamiento T 18 digital ULTRA-

TURRAX (IKA, DE) por 2 min y se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C, recuperando solo el sobrenadante para filtrarlo en 0.22 µm (Millipore, USA).

Se llevó a cabo la purificación por intercambio iónico en dos pasos utilizando un equipo de FPLC (ÄKTA pure, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). La primera purificación fue por intercambio catiónico usando la columna HiTrap SP HP (GE Healthcare, USA) que previamente se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) de buffer A. La muestra se cargó a una velocidad de flujo constante de 2.5 ml/min, se continuó con el lavado de la columna usando buffer A con 5 VC. Posteriormente se procedió a la fase de elución de las proteínas a través de un gradiente lineal (1-100%) de buffer B (MES 50 mM, urea 4 M, NaCl 1 M y DTT 5 mM, pH 6) con 10 VC colectando las fracciones de elución en alícuotas de 5 ml.

Subsecuentemente se procedió con un segundo paso de purificación mediante intercambio aniónico de las fracciones obtenidas en el primer paso de purificación que contenían proteína recombinante. Debido a que el buffer B que se utilizó en la elución del intercambio catiónico contiene sal, estas muestras se diluyeron con buffer A de intercambio aniónico (bis-Tris 20 mM, urea 4 M y DTT 5 mM, pH 6.0) para bajar la concentración de NaCl presente y, posteriormente, se cargaron en una columna de intercambio aniónico HiTrap Capto Q de 5 ml (GE Healthcare, USA) previamente lavada y equilibrada con 5 VC de buffer A (bis-Tris 20 mM, urea 4 M y DTT 5 mM, pH 6.0) a un flujo constante de 2.5 ml/min. Se procedió a lavar la columna con 3 VC de buffer A con el fin de eliminar las proteínas no unidas y la elución se realizó con un gradiente lineal (1-100%) de buffer B (bis-Tris 20 mM, urea 2 M, NaCl 1M, DTT 5 mM) con 5 VC colectando las fracciones en alícuotas de 5 ml.

## **6. 5 SDS-PAGE**

Para evaluar el tamaño y pureza de las proteínas Wuhan y Alfa-Beta se llevó a cabo una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) 8-17% de tricina y glicina respectivamente. Para el análisis se utilizaron las fracciones colectadas en el proceso de purificación. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue y se determinó su pureza mediante el análisis densitométrico del gel de electroforesis usando el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories Inc).

La concentración se midió a partir de las alícuotas resultantes de la purificación, por medición de absorbancia a 280 nm (considerando  $1 A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ ) en un nanoespectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher Scientific).

## **6. 6 Formulación de la vacuna**

Se emplearon 2 lotes de ratones BALB/c los cuales fueron inmunizados con diferentes antígenos y condiciones. El primer lote de ratones fue inmunizado con el antígeno Wuhan en solución estabilizadora por vía nasal y con el adyuvante Rehydragel™ (Chemtrade Solutions, Toronto Canadá) por vía intramuscular (Tabla 1), el cual es un gel de hidróxido de aluminio que es ampliamente utilizado como adyuvante en vacunas de uso veterinario y humano. Como referencia para conocer la cantidad de Rehydragel™ permitida en ratas se siguieron las recomendaciones del fabricante, donde se menciona que la LD50 es de  $>5000 \text{ mg/kg}$  (Chemtrade Logistics 2018). Esta LD50 nos indica la cantidad máxima que puede ser utilizada en ratas sin que sea tóxico o letal para el animal. Con esta información se tomó la decisión de agregarlo a la formulación final en una proporción de 10% v/v contemplando que el Rehydragel™ contiene un 1.8 a 2.2% de hidróxido de aluminio.

El cambio de solución de la proteína a solución salina en las dos primeras dosis se llevó a cabo mediante el uso de un filtro centrifugo Amicon Ultra-15 (MWC0=10,000 kDa) (Millipore, USA). El cambio de solución de las siguientes dosis fue mediante el uso de FPLC en el equipo AKTA pure (GE Healthcare, USA) y la columna HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare). La proteína quedó finalmente en una mezcla de solución estabilizadora como se menciona en la Tabla 1 y las fracciones obtenidas se combinaron y formularon con Rehydrigel™ al 10% (para la administración intramuscular), dejando en agitación toda la noche a 4°C para procurar la mayor adsorción posible del antígeno por el gel.

**Tabla 1.** Esquema de formulación para el antígeno Wuhan, administrado en el lote 1 de ratones BALB/c. dpi: días posteriores a la inmunización, IM: intramuscular, SC: subcutáneo

<b>Dosis de</b> <b>Vía administración</b>	<b>Primera dosis, 0dpi</b>	<b>Segunda dosis, 15 dpi</b>	<b>Tercera dosis, 34 dpi</b>	<b>Cuarta dosis, 50 dpi</b>
<b>IM/SC</b>	6 µg de Wuhan en solución salina 0.9% + 10% Rehydrigel™	28 µg de Wuhan en solución salina 0.9% + 10% Rehydrigel™	20 µg de Wuhan en sol. estabilizadora (sacarosa 5%, NaCl 150 mM, Metionina 5 mM, Fosfato de sodio 50 mM) + 10% Rehydrigel™	20 µg de Wuhan en sol. estabilizadora (sacarosa 5%, NaCl 150 mM, Metionina 5 mM, Fosfato de sodio 50 mM, Glutación 0.4 mM) + 10% Rehydrigel™
<b>Intranasal</b>	6 µg de Wuhan en solución salina 0.9%,	28 µg de Wuhan en solución salina 0.9%,	14 µg de Wuhan en sol. estabilizadora (sacarosa 5%, NaCl 150 mM, Metionina 5 mM, Fosfato de sodio 50 mM)	6 µg de Wuhan en sol. estabilizadora (sacarosa 5%, NaCl 150 mM, Metionina 5 mM, Fosfato de sodio 50 mM, Glutación 0.4 mM)

Para el segundo lote de ratones BALB/c, los antígenos Wuhan y Alfa-Beta fueron administrados exclusivamente por vía intramuscular, adyuvados con gel hidróxido de aluminio (30 mg/ml) y,

según las recomendaciones de PRONABIVE, el gel hidróxido de aluminio se debe usar en un rango de 0.1-0.76 mg/ml, por lo que se determinó usarlo en el rango de límite a 0.70 mg/ml.

En la Tabla 2 se describe la formulación utilizada en cada grupo, donde el cambio de buffer se llevó a cabo por diálisis contra PBS 1X y gel de hidróxido de aluminio estéril a una concentración de 0.7 mg/ml. Para evitar la precipitación del antígeno, asegurar el cambio y adsorción de la proteína por el gel de hidróxido de aluminio, también se agregó al interior de la bolsa de diálisis hidróxido de aluminio a una concentración final de 0.7 mg/ml y se agitó para lograr su homogenización antes de la diálisis.

Una vez que el antígeno contenía el gel hidróxido de aluminio se procedió a realizar la diálisis en una proporción de 1:50 (v/v) con agitación constante a 4°C con tres cambios de solución cada 2 h y el último cambio se dejó toda la noche.

#### **6.6.1 Barrido diferencial por fluorometría**

Las formulaciones de los antígenos anteriormente mencionadas fueron descritas y tomadas de Olivares, 2021; sin embargo, se consideró que aún se podían mejorar las condiciones de estabilidad y solubilidad de la proteína. Por lo que se llevó a cabo un ensayo de barrido diferencial por fluorometría (DSF) con el objeto de identificar la composición ideal de una solución que permita mantener al antígeno soluble y estable. Se ensayaron 480 soluciones con diferentes aditivos, pH y amortiguadores.

*Tabla 2. Esquema de formulación para los antígenos Wuhan y Alfa-Beta, administrados en el lote 2 de ratones BALB/c.*

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Concentración (ug/uL)</b>	<b>Total (ug)</b>
1	Control negativo	PBS 1x + 0.7 mg/ml de Al(OH) <sub>3</sub>	IM/SC	-	-
2	Wuhan	Antígeno Wuhan en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>	IM/SC	0.3	20
3	Alfa-Beta	Antígeno Alfa-Beta en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>	IM	0.4	20
4	Wuhan/ Alfa-Beta (10/10 µg)	Antígeno Wuhan en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>	IM	0.3	10
		Antígeno Alfa-Beta en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>		0.4	10
5	Wuhan/ Alfa-Beta (20/20 µg)	Antígeno Wuhan en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>	IM/SC	0.3	20
		Antígeno Alfa-Beta en PBS 1x + 0.7 mg/ml Al(OH) <sub>3</sub>		0.4	20

Usando el antígeno Wuhan se probaron 5 kits que contenían 96 soluciones diferentes cada uno, los kits fueron los siguientes: Solubility & Stability Screen 1 (HR2-413) y Solubility & Stability Screen 2 (HR2-072), Slice pH (HR2-072), Additive Screen 1 (HR2-138) y Additive Screen 2 (HR2-459) todos del fabricante Hampton Research, CA, USA. Para cada kit se diluyeron 300 µl del antígeno Wuhan a una concentración de 0.15 mg/ml en TSA Sample Buffer y se añadieron 2 µl del fluorocromo Sypro Orange 1X. En condiciones de esterilidad y de enfriamiento se añadió a una placa para PCR de 96 pozos 10 µl de la muestra diluida con SyproOrange y 10 µl del buffer según el kit a evaluar en el momento (Solubility & Stability Screen 1 y 2, Slice pH ó Additive Screen 1 y 2). Una vez depositado el buffer y la muestra en cada pozo de la placa para

PCR, se procedió a sellarla con una película de sellado transparente, la placa se centrifugó a 2500 g por 30 segundos para llevar el contenido de la placa al fondo. Finalmente se programó el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems) para leer la placa de PCR siguiendo las siguientes condiciones:

- Propiedades del experimento: Equipo: StepOnePlus™ de 96 pozos  
Tipo de ensayo: Melt Curve  
Reactivo que se detecta: Otros  
Velocidad de la rampa: Rápida
- Configuración de la placa: Reportero: ROX  
Quencher: None  
Referencia pasiva: Ninguno
- Método de corrida: 25°C por 1 min (rampa= +0.5°C/s)  
95°C por 15 s

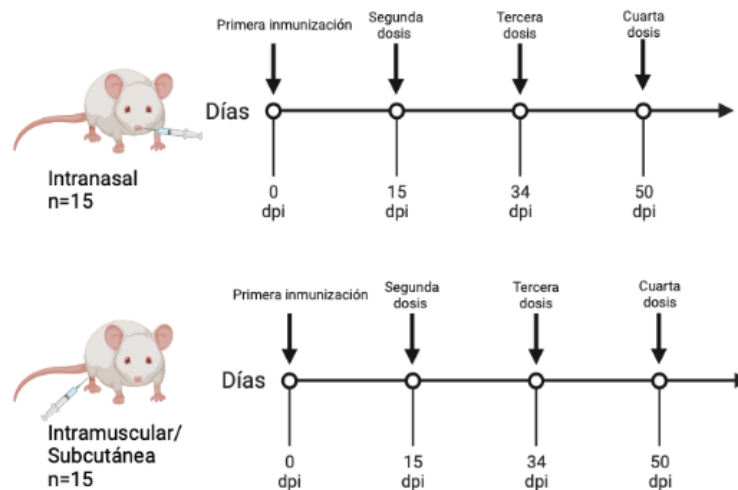
Una vez programado el equipo, se realizó la lectura de la fluorescencia emitida por la placa con las diferentes condiciones establecidas. Los datos obtenidos fueron analizados y graficados en Excel.

## **6. 7 Inmunización de ratones BALB/c por vía intramuscular e intranasal y recolección de muestras**

Este estudio se realizó con base en los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL- Cinvestav). Como parte del diseño de experimentación se emplearon dos lotes de animales experimentales. El primer lote de ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad fueron inmunizados 4 veces vía



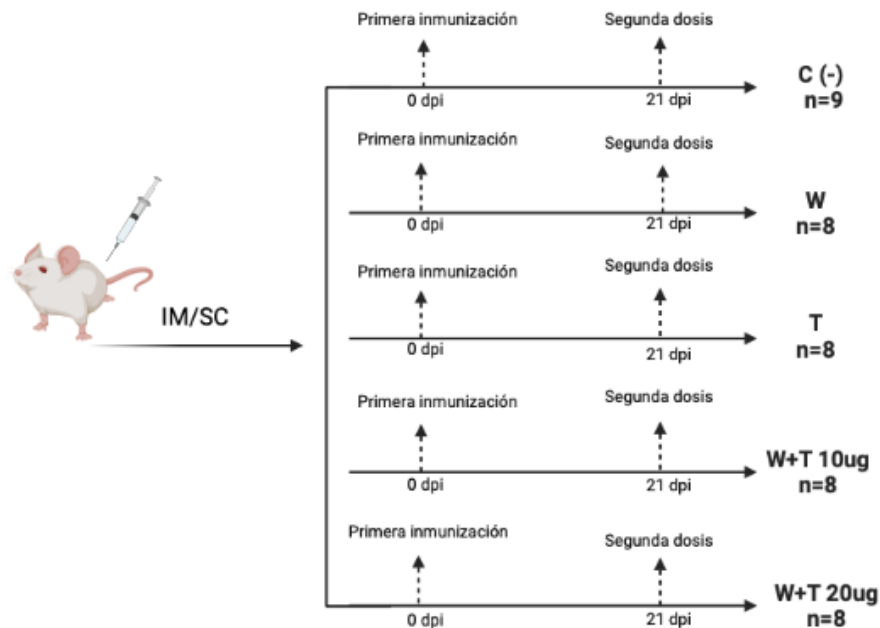
intramuscular/subcutánea y otros por vía intranasal con el antígeno Wuhan (Fig. 5). La proteína se formuló de diferente manera de acuerdo con la vía de inmunización como se mencionó anteriormente (Tabla 1). En el caso de los controles solo se administró solución salina al 0.9% para el caso de los ratones inmunizados por vía intranasal, y para el caso de la inmunización por vía subcutánea/intramuscular solo contenía solución salina al 0.9% y Rehydrigel™ al 10%.



*Figura 5. Esquema de inmunización de ratones BALB/c del lote 1. Dpi: después de la primera inmunización.*

Se realizó un muestreo de todos los individuos, previo a la inmunización, mediante la toma de sangre periférica para la obtención de suero sanguíneo. El segundo muestreo se realizó a todos los individuos 15 días después de la primera inmunización (dpi). El tercer muestreo se realizó a los 30 dpi y, en esta ocasión, fueron elegidos al azar 7 ratones inmunizados por vía intranasal y 7 por vía subcutánea/intramuscular. A los 45 dpi se tomó el cuarto muestreo, nuevamente a 7 miembros de cada vía. El quinto muestreo se llevó a cabo 60 días dpi, en esta ocasión solo se muestreo la vía intramuscular/subcutánea. De igual manera se llevó a cabo el ultimo muestreo a los 100 dpi.

En cuanto al segundo lote (ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad) el cual se dividió en 5 grupos, los animales se inmunizaron dos veces (con una diferencia de 21 días entre cada inmunización) por vía intramuscular, con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta separados o en conjunto (Fig. 6). Las condiciones y formulación de las dos dosis se mencionaron en la Tabla 2.



*Figura 6. Esquema de inmunización de ratones BALB/c del lote 2. IM: intramuscular, SC: subcutánea, C: control, W: Wuhan, T: Alfa-Beta.*

El muestreo correspondiente al lote dos, se llevó a cabo mediante la toma de sangre periférica para la obtención de suero sanguíneo de todos los individuos previo a la inmunización, y posterior a la inmunización se tomó de los días 35 y 91 dpi.

## 6. 8 Pruebas de inmunogenicidad de la respuesta inmune humoral

Para examinar los anticuerpos específicos de RBD producidos en suero de ratón y con ello la respuesta humoral, se realizaron ELISAS indirectos de las muestras recolectadas previo a la inmunización (pre-inmune) y posteriores a la inmunización. Se recubrieron placas de ELISA

Nunc-Immuno MicroWell (Sigma-Aldrich) de noventa y seis pocillos con 1 ng/ $\mu$ l del antígeno Wuhan en 100  $\mu$ l de buffer de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6) por pocillo y se incubaron toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se desechó el contenido de los pocillos, se lavaron con solución de lavado o PBST (PBS 1X, Tween 20 al 0.05%), se bloquearon las placas con 300  $\mu$ l de solución de bloqueo (PBS 1X, BSA al 1%) y se dejaron incubando a 37°C por 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado y se añadieron a la placa 100  $\mu$ l de las muestras de suero de ratón diluidas 1:1000 en PBS 1X. Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C antes de lavarlas 3 veces con PBST para añadir 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (molécula completa)-acoplado a HRP producido en conejo (Sigma-Aldrich) diluido en PBS 1X (dilución 1:40,000) y se dejó incubando a 37°C por una hora. Las placas se lavaron 4 veces con PBST, seguido de la adición de 100  $\mu$ l por pocillo de solución de sustrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante 15 minutos a 25°C protegiéndolas de la luz. Después de la incubación, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ l por pocillo de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) e inmediatamente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm usando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan Sky (ThermoScientific). Los valores duplicados de cada muestra se promediaron y se les restó el valor del control negativo que era el pocillo que no tenía antígeno.

### **6.8.1 Ensayo de neutralización en suero**

Para el ensayo de neutralización de anticuerpos con suero de ratones se utilizaron los sueros sanguíneos obtenidos en el día 60 y 30 para el lote 1 y 2 respectivamente, mediante el kit de Prueba de Neutralización de Virus Sustituto (sVNT) de SARS-CoV-2 (GenScript, Piscataway NJ). Se diluyó la solución de lavado (wash solution 20X) con agua destilada estéril en una relación 1:19. Por separado, se diluyó RBD-HRP con buffer de dilución HRP 1:1000 según la

cantidad de muestras a analizar y se procedió a diluir las muestras y los controles en Buffer de Dilución de Muestras (Sample Dilution Buffer) en una relación 1:9 en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Una vez que los sueros estaban diluidos, se mezclaron con RBD-HRP (diluido previamente) en una relación 1:1, se incubó cada tubo a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se homogenizaron y se añadieron 100 µl de cada reacción en cada pozo de la placa que contiene al receptor ACE2 y se dejó incubar a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, se lavó 4 veces la placa con 260 µl de solución de lavado 1x, agitando suavemente la placa y removiendo la solución de lavado por inversión. Al final, se eliminó por completo el líquido residual de los pozos mediante un golpeteo sobre servilletas. A continuación, se añadieron 100 µl de TMB a cada pozo y se incubó la placa en oscuridad cubierta en papel de aluminio a 25°C durante 15 minutos. El cronómetro se inició justo luego de añadir el TMB al primer pozo. Finalmente, se añadieron 50µl de Solución de Paro (Stop Solution) a cada pozo para detener la reacción e inmediatamente después se leyó la absorbancia a 450 nm usando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific). Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la formula siguiente:

$$Inhibición(\%) = \left( 1 - \left( \frac{Absorbancia\ de\ la\ muestra}{Absorbancia\ promedio\ del\ control\ negativo} \right) \times 100 \right)$$

### **6.8 Pruebas de inmunogenicidad de la respuesta inmune celular**

Para evaluar la respuesta celular se midieron los niveles de citocinas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, en suero sanguíneo y en esplenocitos que fueron aislados de los ratones de ambos lotes y, posteriormente, re-estimulados. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Dickinson, Franklin Lakes, NJ) del

Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del Cinvestav por el M.C Víctor Hugo Rosales García.

## **6.9 Análisis de citocinas en suero**

Para este ensayo se usaron las muestras sanguíneas obtenidas de los animales del lote uno y dos al día 60 y 35 respectivamente centrifugadas a 2500 rpm para la recuperación de suero sanguíneo, el suero fue separado y almacenado a -20°C hasta su uso. Se utilizó el kit LEGENDplex MU Th Cytokine Panel (12-plex) w/ VbP V03 (no. de catalogo 741044), (BioLegend).

Previo a la lectura de las citocinas en el citómetro de flujo, se prepararon los reactivos para la curva estándar siguiendo las especificaciones en el inserto. Se reconstituyó el estándar liofilizado (Mouse Th Panel Standar Cocktail) con 250 µl de buffer de ensayo (Assay Buffer), se mezcló y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se preparó la curva de concentraciones con el estándar.

Por separado se diluyó 25 ml del buffer de lavado (Wash Buffer) con 475 ml de agua bidestilada. Se continuó con la preparación de la muestra, para lo cual en un tubo cónico de 1.5 ml se añadieron 5 µl de buffer de ensayo (Assay Buffer), 5 µl de perlas de captura previamente mezcladas con vortex durante 30s (Beads), y 5 µl del suero de ratón. Se dejó incubar a temperatura ambiente en agitación por 2 h. Pasado el tiempo se añadieron 200 µl de buffer de lavado diluido previamente (Wash Buffer), la muestra se centrifugó a 8500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 5 µl del reactivo Mouse Th Panel Detection Antibodies y se dejó incubar 1 h en agitación. Pasado el tiempo se agregaron 200 µl de buffer de lavado y se centrifugó a 8500 rpm durante 5 minutos, se recuperó el pellet

y se añadieron 5  $\mu$ l del reactivo SA-PE y se dejó incubar la muestra por 30 minutos en agitación. Se realizó un lavado más con 200  $\mu$ l de buffer de lavado y se centrifugó a 8500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 200  $\mu$ l de buffer de lavado. Para la lectura de las muestras en el citómetro se diseñó un panel de lectura específico para los tamaños de las perlas de captura (perlas A, B) contenidas en el kit de citocinas; se siguieron las especificaciones del fabricante. Una vez definido el panel de lectura se leyeron las muestras de la curva estándar, iniciando con la concentración más baja a la más alta, inmediatamente se leyeron las muestras.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software LEGENDplex v8.0 y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism v9.0.1.

### **6.9.1 Medición de citocinas en linfocitos**

En cuanto a este ensayo las muestras utilizadas fueron de sangre obtenidas de los animales del lote uno y dos. Se midieron citocinas de superficie e intracelulares de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+. Todas las citocinas utilizadas fueron adquiridas de la empresa Becton Dickinson de México (Anexo 2) y para el análisis se optó por dividir las citocinas en seis paneles (Tabla 3). Se inició por rotular un tubo para cada panel (panel 1-6). En cuanto a la tinción para citocinas de superficie, se agregó 1  $\mu$ l del anticuerpo de superficie correspondiente a cada tubo y se colocaron 20  $\mu$ l de muestra de sangre total, se mezcló en vórtex. Los tubos se incubaron por 20 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo, para llevar a cabo la tinción de las citocinas intracelulares se agregaron 50  $\mu$ l de Intra Prep (solución permeabilizadora) a cada uno de los tubos y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Se agregó 1  $\mu$ l del anticuerpo intracelular correspondiente a cada uno de los tubos según el panel y 100  $\mu$ l de PBS. Los tubos

se centrifugaron a 1500 rpm, el sobrenadante se desechó. Posteriormente se añadieron 500 µl de Optilyse (solución de lisis) y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las muestras se leyeron en el citómetro.

*Tabla 3. Paneles de citocinas medidas en linfocitos mediante citometría de flujo.*

<b>Panel</b>	<b>Anticuerpos de superficie</b>	<b>Anticuerpos intracelulares</b>
Panel 1	CD3 CD8a CD4	IL-2 IL-17a INFg CD107a
Panel 2	CD8a CD4	IL2 IL-4 IL-17a INFg IL-10
Panel 3	CD8a CD4	IL-21
Panel 4	CD3 CD8a CD4 CD127 CD90.2 CD62L CD40 CD44	
Panel 5	CD8 CD44 CD62L CD4 CD90.2 CD185	TNF
Panel 6	CD103 CD3 CD127 CD8a	FOX P3

### **6.9.2 Obtención y preparación de esplenocitos para la re-estimulación**

Para la obtención de esplenocitos totales, se seleccionó el animal al cual se le llevó a cabo un proceso de eutanasia por exanguinación cardiaca, previa anestesia y dislocación cervical. Una vez que se realizó la eutanasia se extrajo el bazo y se colocó en medio RPMI con antibiótico

(Pen/Strep1X). En campana de flujo laminar estéril, se pasó el órgano a solución salina estéril y se inyectó suavemente para liberar las células, hasta la decoloración del tejido.

Se transfirió el órgano a un colador celular de 70 µm para su disgregación con solución salina al 0.9%, se utilizó un émbolo de jeringa para una mejor ruptura; las células resultantes se colectaron cuidadosamente con una micropipeta y se pasaron a un tubo falcón de 50 ml. Una vez que se tenían recolectadas las células se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 min a 4°C, se decantó teniendo cuidado de no perturbar la pastilla.

Para la obtención de esplenocitos totales se realizó una lisis celular con 2 ml de una solución de ruptura de membrana de eritrocitos (Red blood cell lysing buffer, SIGMA), que contiene cloruro de amonio 8.3 g/L en buffer Tris-HCl 0.01 M, se incubó y homogenizó por dos minutos. Se añadió 40 ml de solución salina al 0.9% para detener la reacción por dilución y la muestra se centrifugó a 1500 rpm a 4°C por 3 min.

Las células resultantes se resuspendieron en 3 ml de medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y Pen/Strep 1X.

#### **6.9.2.1 Activación de esplenocitos**

Para la lectura de esplenocitos en el citómetro, se requiere un mínimo de  $2 \times 10^6$  células en 2 ml de medio, por lo cual se realizó el conteo de los esplenocitos obtenidos en el equipo Countess (Invitrogen). Se emplearon 10 µl de células:azul de tripano (1:1). Se realizó el ajuste en la concentración de las células mediante dilución con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y Pen/Strep 1x. Se colocaron 2 ml de las células en una placa de 12 pozos, según los tratamientos establecidos: control negativo (PBS), control positivo (activador de leucocitos y concavalina A), antígeno Wuhan, antígeno Alfa-Beta, ambos antígenos (Wuhan+ Alfa-Beta).



Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% durante 24 h o 48 h según el lote.

#### **6.10 Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot con suero de ratones**

Los antígenos recombinantes Wuhan y Alfa-Beta previamente purificados fueron cargados en diferentes concentraciones (Tabla 4) y separados en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Posteriormente, se llevó a cabo una transferencia a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), para lo cual se armó un cassette de transferencia que incluía el gel de electroforesis y la membrana de PVDF. Una vez armado el cassette se colocó en una cámara con buffer de transferencia (metanol 20%, glicina 200 mM, Tris Base 25 mM) y se dejó toda la noche a 30 V a 4°C. Se continuó con el bloqueo de membrana con solución de bloqueo (TBS 1X + Tween 20 0.05% + leche descremada 5%) por dos horas, posteriormente se efectuaron 3 lavados con solución de lavado (TBS 1X + Tween 20 0.05%). Para realizar el inmunoacoplamiento de anticuerpos, se tomó como anticuerpo primario el suero pre-inmune (ratones control) e inmune (ratones inmunizados con 20 µg de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta), los sueros fueron probados en diferentes diluciones (Tabla 4). Una vez que se añadió el anticuerpo primario se incubó 1 h a 37°C. Tras la incubación, las membranas se lavaron 5 veces con solución de lavado y se incubaron 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (molécula completa) acoplado a HRP producido en conejo (Sigma-Aldrich) en diferentes diluciones (Tabla 4). Finalmente se llevaron a cabo 6 lavados de las membranas con solución de lavado. Para el revelado de todas las membranas se utilizó el fijador y revelador GBX (Carestream), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

*Tabla 4. Estandarización de las concentraciones de los antígenos y de los anticuerpos primarios y secundarios para el ensayo de Western-Blot.*

No. de experimento	Concentración de antígeno	Dilución de Ab primario	Dilución de Ab secundario
1	10ug, 5ug	1:1000	1:40000
2	2ug, 0.5ug	1:1000	1:40000
3	2ug, 0.5ug	1:5000	1:40000
4	2ug, 0.5ug	1:1000	1:80000
5	2ug, 0.5ug	1:5000	1:80000

### 6.11 Análisis histológico

Acorde al protocolo autorizado por el Comité de Ética para el manejo de animales de laboratorio de la UPEAL, al día 175 tras haber recibido dos dosis de los antígenos se llevó a cabo el proceso de eutanasia mediante exanguinación cardiaca, previa anestesia y dislocación cervical de 6 ratones del lote dos para la extracción de órganos, en los cuales se evaluó la seguridad de los antígenos mediante ensayos histológicos. Los órganos extraídos fueron los siguientes (Tabla 5):

*Tabla 5. Órganos extraídos de ratones del lote 2 para un análisis histológico.*

Bazo	Cerebro
Corazón	Hígado
Intestino Delgado	Ovario
Piel (Sitio de inoculación)	Músculo
Pulmón	Riñón
Timo	

Los órganos se recibieron individualmente en un tubo que contenía solución de formaldehído al 4% en PBS 1X y se incubaron a temperatura ambiente toda la noche en esta solución. Al día siguiente se retiró la solución y se añadió etanol al 30%, se dejaron incubando a temperatura ambiente por 3 h en esta solución. Transcurrido el tiempo se cambió la solución a 50% de etanol

por 3 h; posteriormente, se cambió la solución a una concentración de 70% de etanol y se dejó toda la noche. Al siguiente día se descartó la solución y se añadió etanol al 85%, los tejidos se mantuvieron por 3 h en esta solución; finalmente se agregó etanol absoluto y se dejaron incubar por 3 h. Se realizaron 2 cambios con esta solución, el siguiente cambio fue a acetona en la que se dejaron los tejidos toda la noche. Posteriormente los tejidos se pasaron a cassettes bien identificados con el nombre del tejido y ratón y se contuvieron en un frasco para la adición de CitriSolv (Fisher) e incubación por 2 h a 56°C. Pasado el tiempo se añadió parafina en un volumen total de 1/3 del CitriSolv y se dejaron incubando toda la noche. Al siguiente día se realizó un cambio a parafina al 100% y se dejaron en las mismas condiciones de incubación una noche más. Se realizaron dos cambios idénticos con parafina al 100%. Finalmente, los tejidos se sacaron de los cassettes para embeberlos individualmente; se precalentó la plancha (Slides Warmer XH-2001, Premiere) a 56°C y se realizaron cortes longitudinales de los tejidos, se colocaron en un casete nuevo y se cubrieron con parafina para crear bloques. Se dejaron reposar por una semana.

#### **6.11.1 Tinción de tejidos con hematoxilina y eosina**

Una vez que se tenían los tejidos embebidos en parafina (bloques) se realizaron cortes con ayuda del micrótopo (Microm, HM 315), se obtuvieron cortes delgados de un grosor de 5  $\mu\text{m}$  que fueron colocados en un portaobjetos para posterior fijación y tinción con hematoxilina según Harris (Sigma-Aldrich) y eosina en solución acuosa al 0.5% (Sigma-Aldrich). Previo a la tinción se llevó a cabo el desparafinamiento y rehidratación de los tejidos seguido de la tinción. El proceso se siguió según las recomendaciones del proveedor (Tabla 6).

*Tabla 6. Orden de soluciones para la tinción con hematoxilina y eosina.*

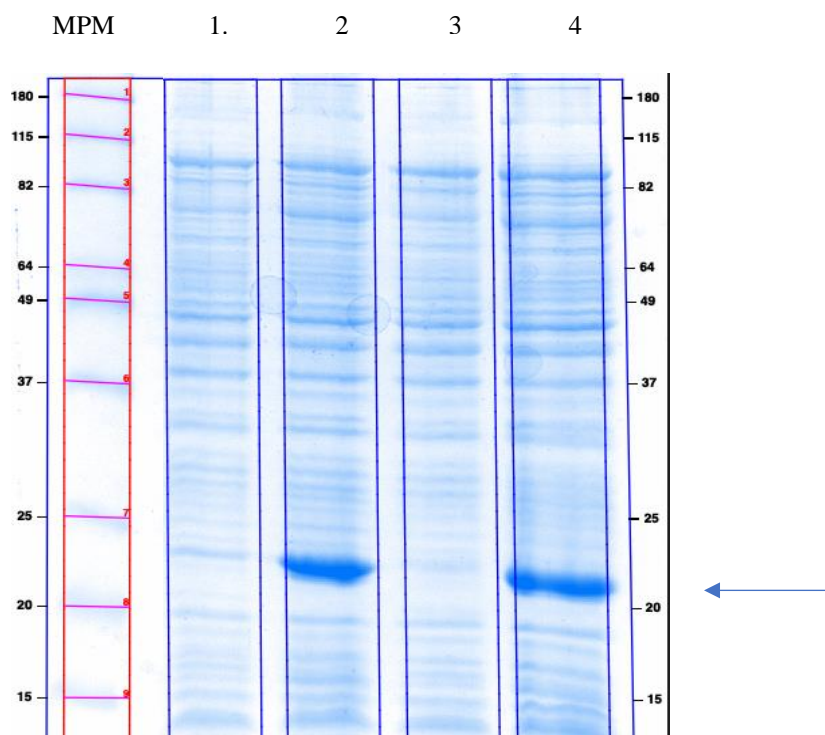
<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
CitriSolv	5 minutos
Etanol al 100%	5 minutos
Etanol al 95%	2 minutos
Etanol al 85%	2 minutos
Etanol al 70%	2 minutos
Etanol al 50%	2 minutos
Etanol al 30%	2 minutos
Lavado con agua destilada	1 minuto
Solución de hematoxilina según Harris	3 minutos
Ácido clorhídrico al 0.1%, acuoso	2 segundos
Lavado con agua corriente del grifo	3- 5 minutos
Eosina Y al 0.5% en solución acuosa	3 minutos
Lavado con agua corriente del grifo	30 segundos
Etanol al 70%	2 minutos
Etanol al 85%	2 minutos
Etanol al 100%	2 minutos
CitriSolv	10 minutos

Una vez realizada la tinción de los tejidos cada portaobjetos se agregó una gota de resina plástica ultra clara y se cubrió con un cubreobjetos y se dejaron reposar durante 24 h, posteriormente los tejidos teñidos se examinaron en un microscopio de contraste (Nikon SMZ 745T) con el objetivo 40X, y se documentaron fotográficamente para su análisis.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Expresión y purificación de proteínas Wuhan y Alfa-Beta

A partir de las células transformadas de *E.coli* BL21 (DE3), se procedió a realizar la expresión de los antígenos recombinantes. Mediante un análisis por SDS-PAGE (Fig. 7) se pudo corroborar la sobreexpresión de los dos antígenos deseados. Las bandas sobreexpresadas corresponden al peso molecular según de las propiedades fisicoquímicas de los antígenos calculadas con la herramienta ProtParam desde el servidor ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>), para el antígeno Wuhan el peso molecular es de 20.052 kDa y el del antígeno Alfa-Beta es de 20.008 kDa. Desde el punto de vista analítico, son indistinguibles por peso molecular.

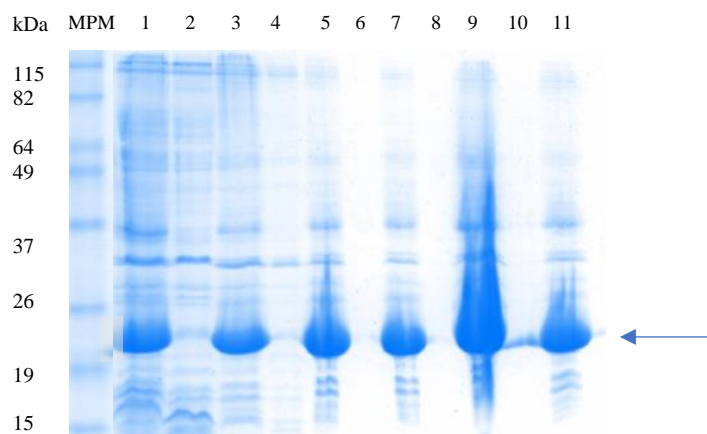


*Figura 7. Análisis SDS-PAGE de la expresión de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en E.coli, MPM marcador de peso molecular. Carril 1 y 2: antígeno Wuhan antes y después de la inducción, respectivamente. Carril 3 y 4 antígeno Alfa-Beta antes y después de la inducción.*

## **7.2. Purificación del antígeno Wuhan por FPLC**

Una vez que se tenía la biomasa de cada antígeno, se procedió con la purificación. Primero, se llevó a cabo los lavados de los cuerpos de inclusión de los diferentes antígenos. Con el objetivo de alejarse del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, que para el caso del antígeno Wuhan el pI es de 8.52 y para el antígeno Alfa-Beta es de 8.68, para mantener a los antígenos ionizados y, por lo tanto solubles, el buffer de lavado (MES pH 6.0, NaCl 150 mM y Tritón 1%) tenía un pH ácido (6.0).

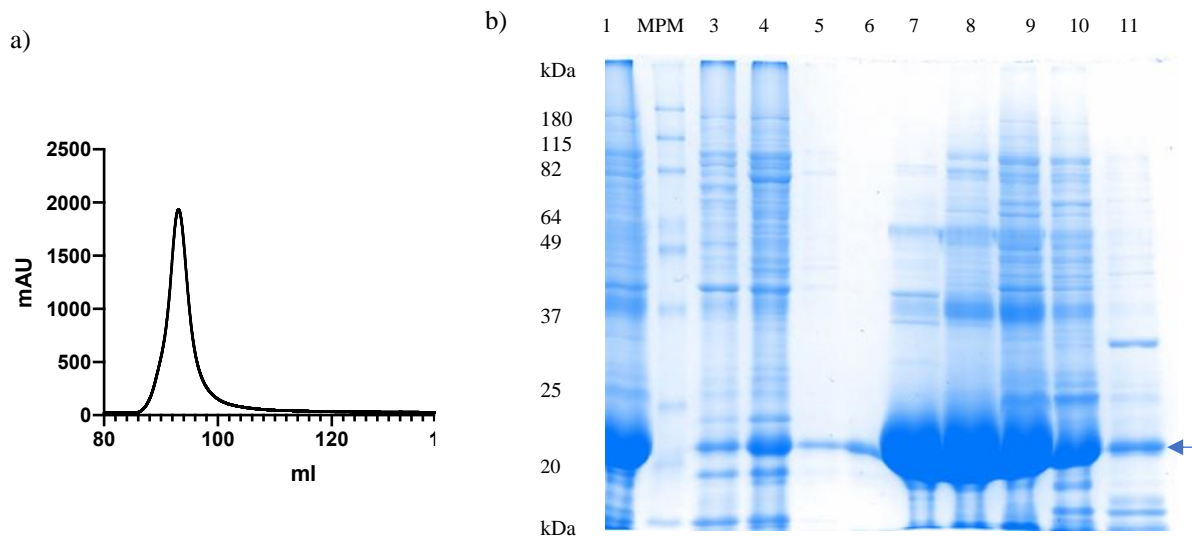
En cuanto al antígeno Wuhan se llevaron a cabo 6 lavados para poder eliminar las proteínas del hospedero y tener en mayor concentración y pureza de la proteína sobreexpresada. Para verificar la localización de la proteína, así como monitorear las pérdidas de la proteína en cada lavado se tomaron muestras las cuales se centrifugaron para obtener un sobrenadante y una pastilla conteniendo proteínas insolubles en el buffer elegido. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de glicina. En la Figura 8 se muestra el análisis SDS-PAGE de los lavados de la proteína. En cada lavado se puede observar cómo se van eliminando las proteínas del hospedero que no son de interés y que están presentes en el sobrenadante (carriles pares), mientras que la proteína de interés se encuentra en la fase insoluble (carriles nones). Al final de los 6 lavados se recuperó la fracción insoluble que es donde se encuentra el antígeno recombinante, y presentó un aspecto color grisáceo y poco compacto.



**Figura 8.** Gel de glicina SDS-PAGE al 15% de la lisis celular y lavados de los cuerpos de inclusión del antígeno Wuhan. MPM marcador de peso molecular. En los carriles nones se muestra el pellet de los lavados, mientras que en los pares se muestra el sobrenadante de los lavados.

Continuando con la purificación de dos pasos por intercambio iónico, se comenzó con la purificación por intercambio catiónico. Para ello cual se tomó la pastilla que resultó de los lavados de los cuerpos de inclusión y se dejó solubilizando (en agitación) toda la noche en buffer A de intercambio catiónico; al día siguiente, el aspecto de la solución era homogéneo, lo cual sugiere que la proteína se encontraba soluble. Después, la muestra se centrifugó para la recuperación del sobrenadante que es donde estaba la proteína de interés, se filtró con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para ser purificado por FPLC en una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP (GE Healthcare, EUA).

Se realizó un gel de glicina SDS-PAGE para separar las proteínas por peso molecular, presentes en las muestras obtenidas en la purificación (Fig. 9b). De acuerdo con el cromatograma del FPLC (Fig. 9a) obtenido, en el gel de glicina se observó que la proteína de interés eluyó con el buffer B en mayor proporción (Fig. 9b carriles 7, 8 y 9). Estas fracciones se tomaron para una posterior purificación por intercambio aniónico, ya que como se observa, la proteína aún no estaba pura.



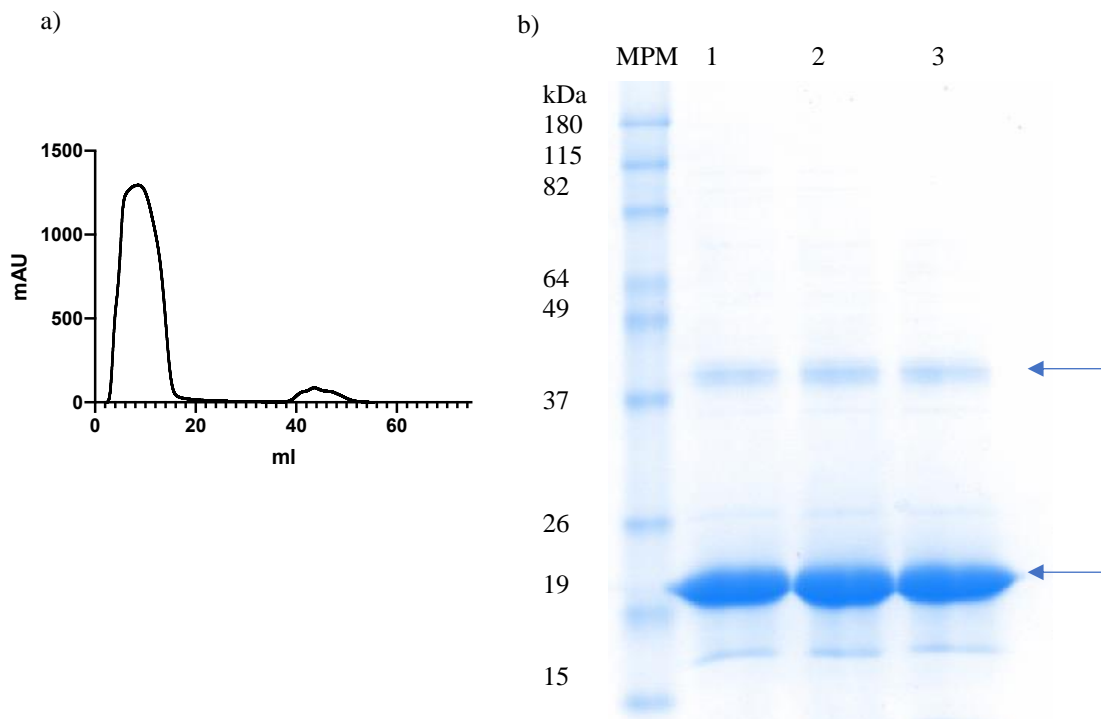
*Figura 9. Gel de glicina SDS-PAGE al 15% de la purificación de intercambio catiónico del antígeno Wuhan. a) Cromatograma de intercambio catiónico. b) Gel de glicina SDS-PAGE al 15%, en el carril 1 se muestra como el antígeno entró a la columna de intercambio catiónico. En el carril dos se encuentra el marcador de peso molecular (MPM). En carril 3 y 4 se muestran las fracciones correspondientes al frente de la purificación por la columna. En los carriles 5 a 11, se muestran las fracciones que se eluyeron con el buffer B.*

Se procedió a realizar la purificación de intercambio aniónico. Se sabía que, en esta purificación dado el pH de los buffers, la proteína de interés probablemente no se uniría a la columna y saldrían en el frente de la corrida y todas las demás proteínas se quedarían pegadas en la columna. Además, como en la purificación de intercambio catiónico la proteína de interés eluyó con el buffer B que contenía sal, para esta purificación se diluyó la muestra con buffer A de intercambio aniónico, para disminuir la cantidad de sal presente. Una vez que se tenía la proteína diluida, se filtró nuevamente con una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  y se procedió a cargar la muestra en la columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP de 5 ml (GE Healthcare).

Como se esperaba según el cromatograma obtenido en esta purificación (Fig. 10a), la proteína de interés salió en el frente y las proteínas del hospedero se quedaron retenidas en la columna hasta la elución con buffer B correspondiente. Una vez que se cargaron las muestras en un gel SDS-PAGE (Fig. 10b) se pudo evaluar que realmente era la proteína de interés por el peso



molecular calculado en 20 kDa. También se observó que la proteína podría encontrarse en forma de dímero según las bandas que se observan en el gel con un peso molecular aproximado de 40.5 kDa (aproximadamente el doble del peso molecular del antígeno). Después de un análisis por densitometría se encontró que la proteína tenía un porcentaje de pureza del 94% en su conformación de monómero y dímero.

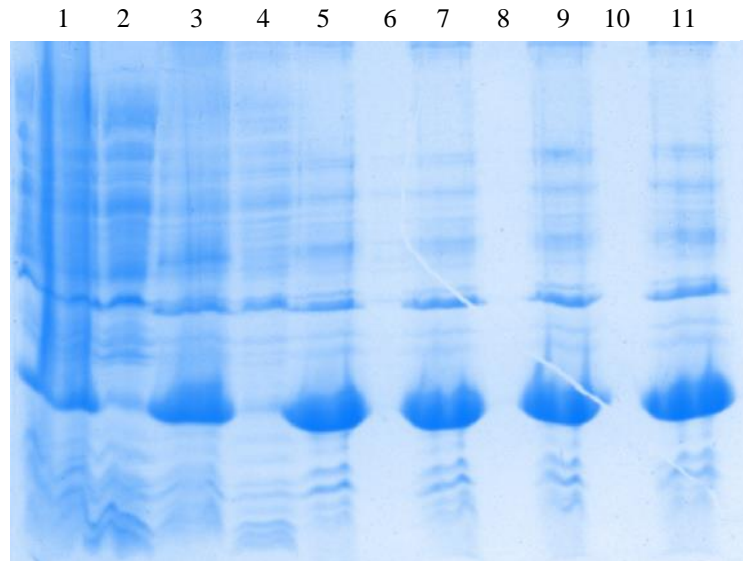


**Figura 10.** Purificación de intercambio aniónico de la proteína Wuhan. a) cromatograma de intercambio aniónico. b) Gel de glicina SDS-PAGE al 17% en el carril 1, 2 y 3 frente de la corrida donde se encuentra la proteína de interés.

### 7.3 Purificación del antígeno Alfa-Beta por FPLC

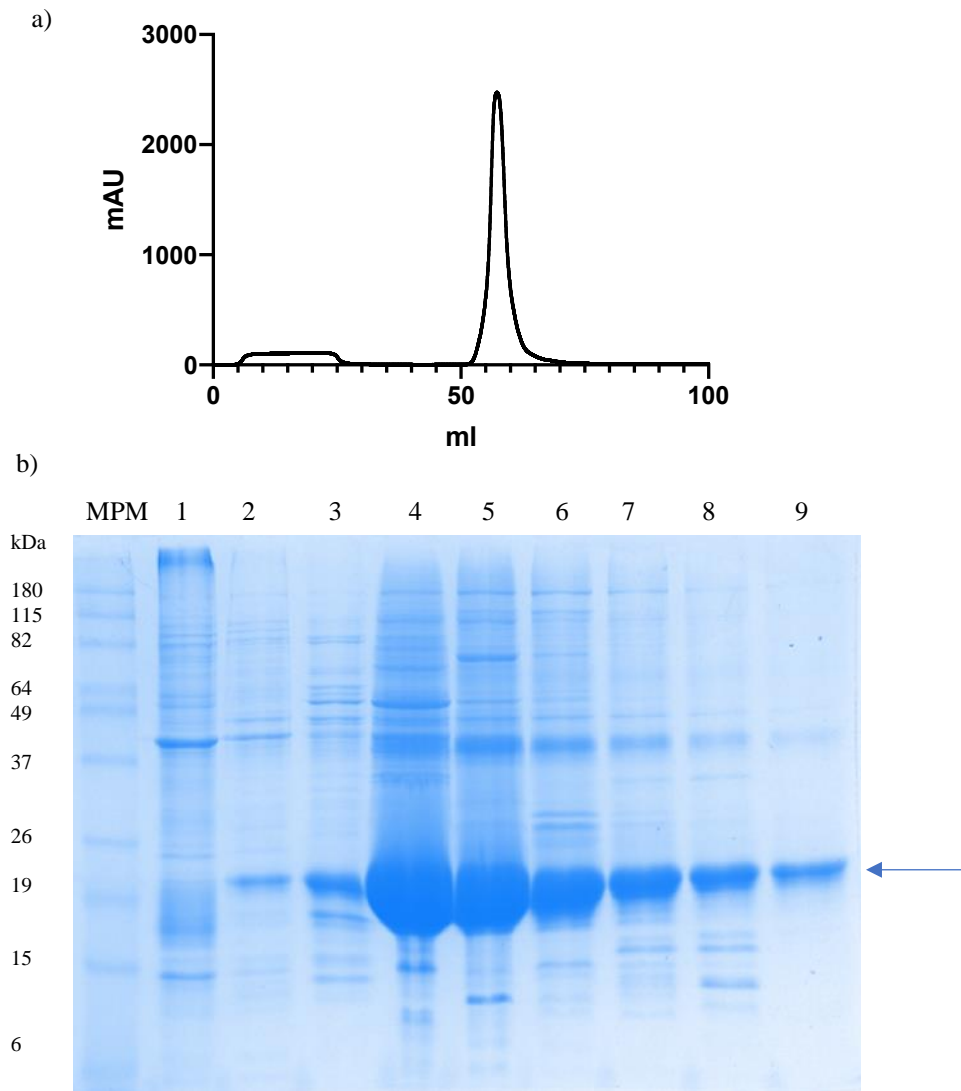
En cuanto al antígeno Alfa-Beta se realizó el mismo proceso de purificación utilizado con el antígeno Wuhan. Se comenzó con los lavados de los cuerpos de inclusión con el buffer de lavado (Fig. 11), de igual manera este antígeno se encontró en la fracción insoluble (pellet). Después

de 6 lavados se colectó la fracción insoluble y se dejó solubilizando con buffer A de intercambio catiónico toda la noche.



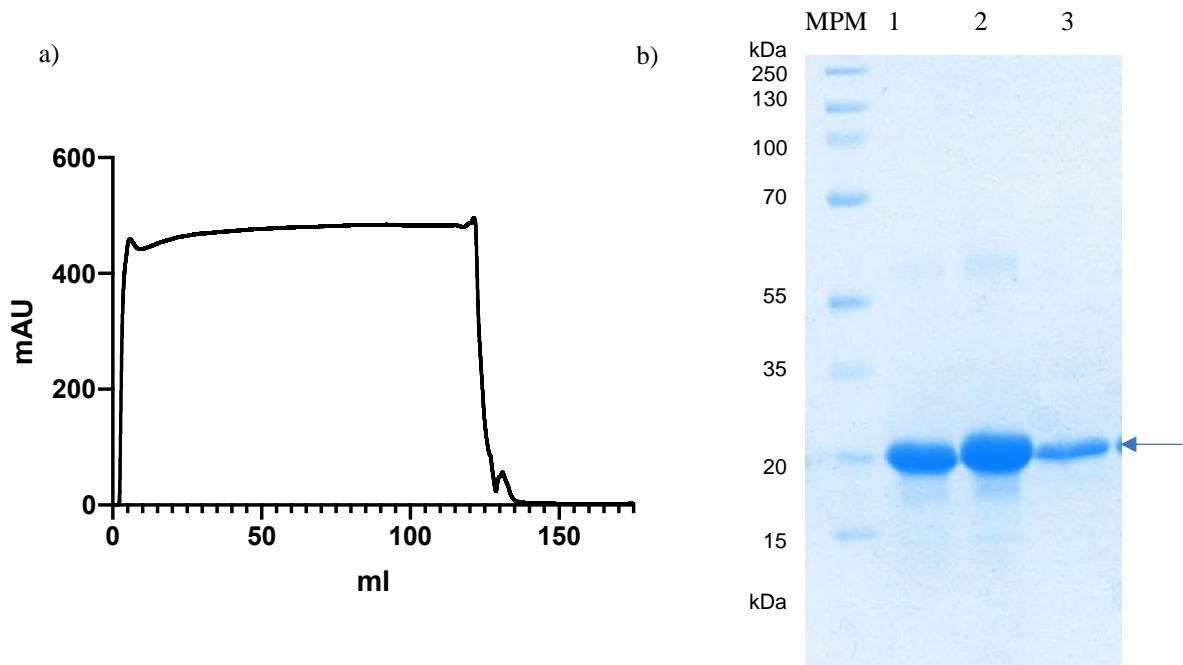
**Figura 11.** Gel de glicina SDS-PAGE al 15% de la lisis celular y lavados de los cuerpos de inclusión del antígeno Alfa-Beta. En los carriles nones se muestra el pellet de los lavados, mientras que en los carriles pares del gel se muestra el sobrenadante de los lavados.

Al día siguiente la proteína se centrifugó y filtró para proceder con la purificación por intercambio catiónico en la columna HiTrap SP HP (GE Healthcare, EUA). En esta purificación se recuperaron las fracciones eluidas con el buffer B (Fig. 12a) y que contenían la proteína de interés en mayor concentración (Fig. 12b carriles 4, 5 y 6) para una posterior purificación por intercambio aniónico.



**Figura 12.** Purificación de la proteína Alfa-Beta por intercambio catiónico, a) Cromatograma intercambio catiónico b) gel de glicina SDS-PAGE al 15%, marcador de peso molecular (MPM). Carriles 1, 2 y 3: frente de corrida, carriles 4-9: eluciones.

Finalmente, las fracciones tomadas del intercambio catiónico se diluyeron con buffer A de intercambio aniónico y se purificaron en la columna HiTrap Q HP de 5 ml (GE Healthcare). Según el cromatograma la proteína salió en el frente (Fig. 13a), lo cual se corroboró con el gel de glicina (Fig. 13b, carriles 1, 2 y 3). Según el análisis por densitometría el porcentaje de pureza de la proteína Alfa-Beta es del 95%, lo cual es un porcentaje adecuado para un antígeno vacunal.



*Figura 13. Purificación de la proteína Alfa-Beta por intercambio aniónico. a) cromatograma intercambio aniónico, b) SDS-PAGE AL 15%, MPM: marcador de peso molecular, carriles 1, 2 y 3: frente de corrida.*

#### **7.4 Formulación de la vacuna**

Los antígenos obtenidos de la purificación se formularon según lo descrito anteriormente (Tablas 1 y 2) para ser administrados a los lotes 1 y 2 de ratones. Sin embargo, posterior a esta formulación y, con el objetivo de mejorar las condiciones de los antígenos, se llevó a cabo el ensayo de barrido diferencial por fluorometría.

#### **7.5 Barrido diferencial por fluorometría (DSF)**

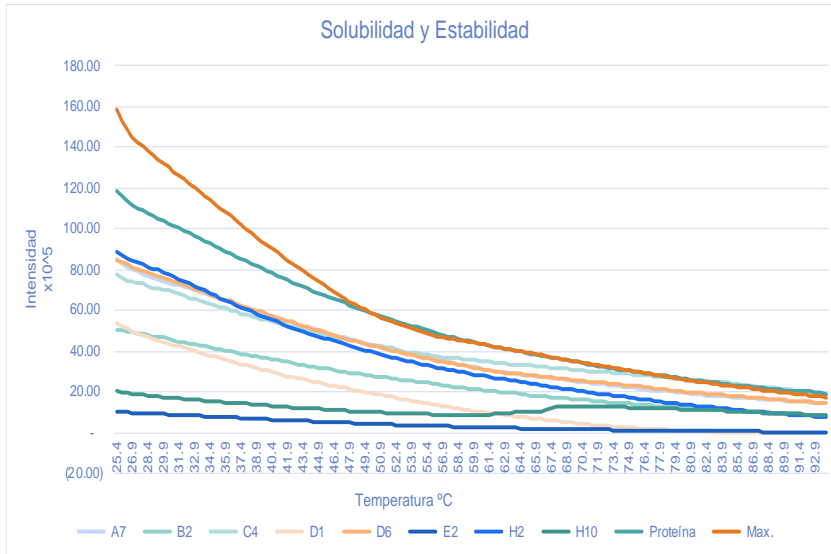
Con el objeto de identificar la composición ideal de una solución que permitiera mantener al antígeno soluble y estable, se ensayaron 480 soluciones con diferentes aditivos, pH y amortiguadores mediante ensayos de DSF. El antígeno utilizado fue el Wuhan que estaba soluble en buffer de replegamiento. Se puso en placas para PCR junto con el fluorocromo y la solución a analizar; una vez que estaba todo en la placa de PCR, se realizó la lectura de

fluorescencia en el equipo StepOnePlus. Se analizaron 5 kits con 96 soluciones diferentes cada uno, como control negativo se utilizó la proteína sola en solución con agua.

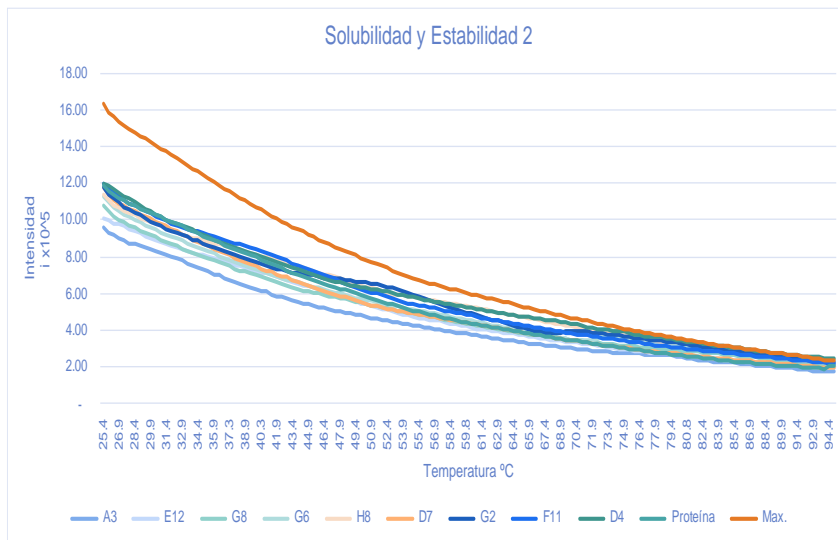
La técnica consiste en agregar un fluorocromo a la solución de proteína y calentarla paso a paso. Cuando la proteína se desnaturaliza, su núcleo hidrofóbico queda expuesto y el fluorocromo interactúa con él, produciendo un aumento de la fluorescencia (Pantoliano et al., 2001). La fluorescencia emitida se representa gráficamente en función de la temperatura para crear la curva de fusión de la proteína e identificar en qué condiciones es más estable el antígeno. De acuerdo con el comportamiento del antígeno Wuhan, se decidió seleccionar de cada kit aquellas soluciones en las que el antígeno tenía menor unión inicial al fluorocromo.

El programa arrojó una cantidad de datos de fluorescencia que se midieron en un rango de temperatura de 25-95°C con una lectura cada aumento de 0.5 grados. Para cada kit se seleccionaron las nueve lecturas iniciales más bajas de fluorescencia mediante el programa de Excel. En las gráficas siguientes se muestra el comportamiento de la proteína sin aditivos y como mejora su estabilidad con los buffers.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos de los kits para el análisis de solubilidad y estabilidad.



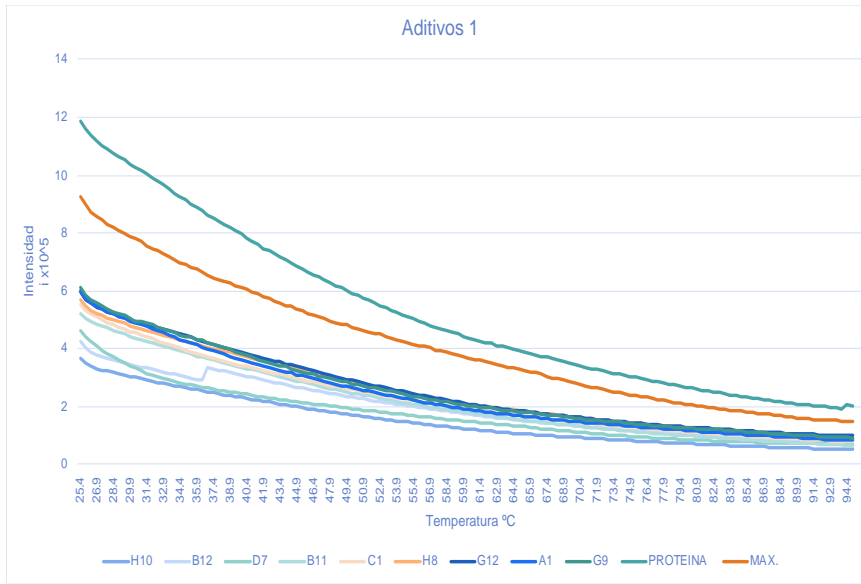
A7	120 mM L-Histidina
B2	200 mM Gly-gly-gly
C4	500 mM Ácido Glutámico
D1	150 mM Clorhidrato de TCEP
D6	100 mM Hidrato de cloruro de cadmio, cloruro de cobalto (II) hexahidrato 100 mM
E2	500 mM Ácido oxálico dihidrato
H2	25% v/v Etoxilato de pentaeritritol (15/4 EO/OH)
H10	80 mM $\alpha$ -Cyclodextrina



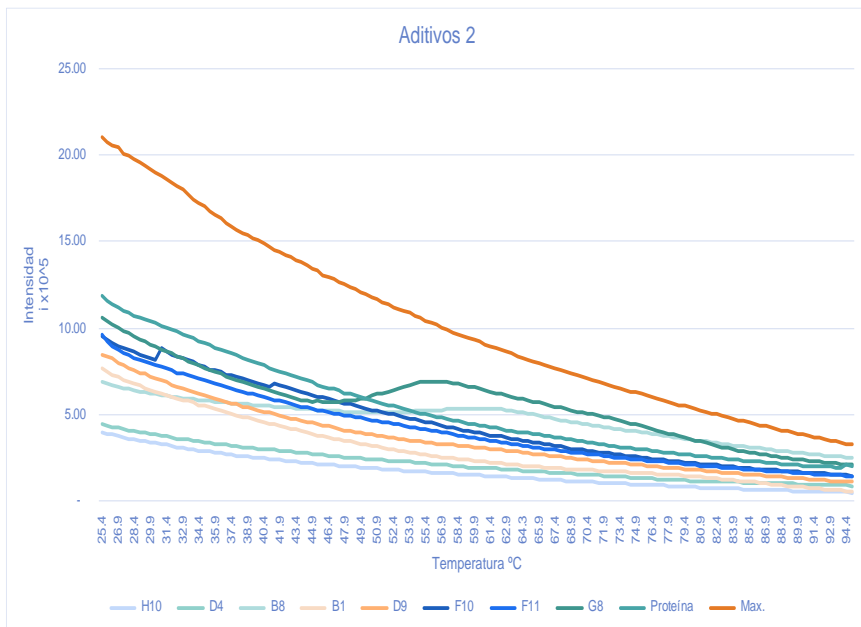
A3	0.2 M Citrato de sodio tribásico dihidratado pH 5.0
E12	0.2 M Glycina pH 9.5, 0.8 M Cloruro de sodio
G8	0.2 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Cloruro de sodio
G6	0.2 M BIS-TRIS pH 6.5, 2.0 M Cloruro de sodio
H8	0.2 M HEPES pH 7.5, 4.0 M Cloruro de sodio
D7	0.2 M Imidazol pH 7.0, 0.6 M Cloruro de sodio
G2	0.2 M Acetato de sodio trihidrato pH 4.5, 2.0 M Cloruro de sodio
F11	0.2 M AMPD pH 9.0, 1.0 M Cloruro de sodio
D4	0.2 M Ácido succínico pH 5.5, 0.6 M Cloruro de sodio

**Figura 14.** Kits de soluciones para evaluar la Solubilidad y Estabilidad mediante Thermal-Shift a) gráfica de las soluciones con la fluorescencia más baja obtenidas con el Kit 1, en la Tabla está la relación de los nombres de las 9 soluciones graficadas. B) Gráfica de las 9 soluciones con la fluorescencia más baja del kit 2, en la Tabla se muestra la relación de los nombres de esas soluciones.

Con el mismo criterio de selección se analizaron los kits para la evaluación de aditivos, el resultado se muestra a continuación (Fig. 15).



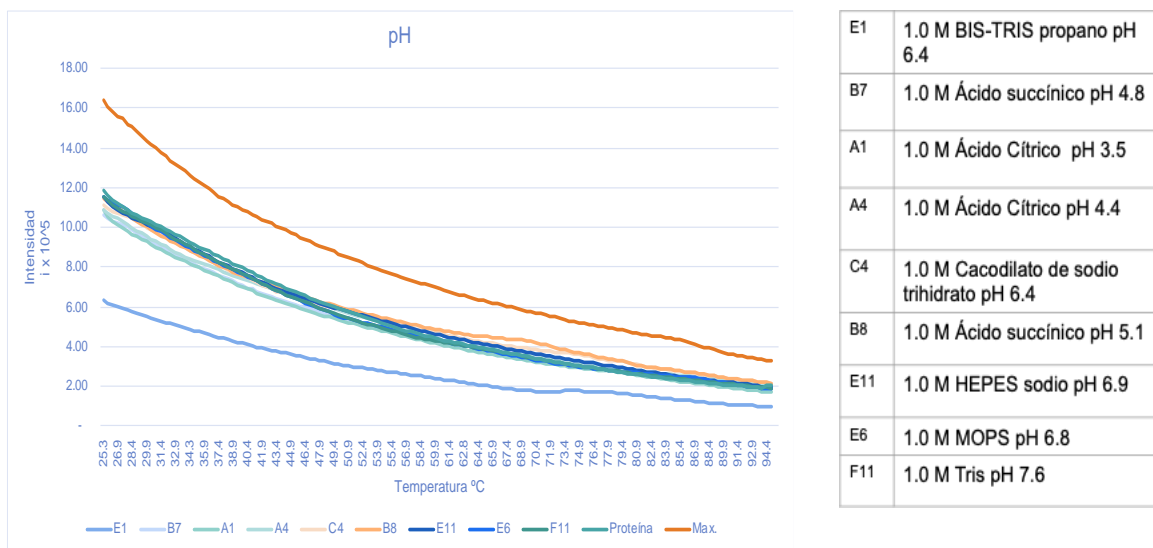
H10	30 mM Clorhidrato de tiamina
B12	5% w/v n-Octyl-b-D-glucosido
D7	30 mM Ácido melítico
B11	5% w/v N-óxido de laurildimetilamina
C1	10% w/v TWEEN® 20
H8	60 mM Piridoxina
G12	60 mM Ácido L-ascórbico
A1	30 mM Clorhidrato de éster etílico de Na-Benzoil-L-arginina
G9	50 mM B-glicerofosfato disódico tetrahidratado



H10	7% v/v 1-Butanol
D4	0.1 M Cloruro de hexamina cobalto (III)
B8	1.0 M Yoduro de sodio
B1	0.1 M Cloruro de cromo (III) hexahidratado
D9	0.1 M b-nicotinamida adenina dinucleótido hidratado
F10	5% w/v n-dodecil-N, N-dimetilamina-N-óxido
F11	5% w/v n-Octyl-b-D-glucosido
G8	40% v/v Polipropilenglicol P 400

**Figura 15.** Kit de soluciones para la evaluación de aditivos ideales para los antígenos mediante Thermal-Shift a) Gráfica de las soluciones con la fluorescencia más baja obtenidas con el Kit de aditivos 1, en la Tabla esta la relación de las 9 soluciones graficadas. b) Gráfica de las 9 soluciones con la fluorescencia más baja según el kit de aditivos 2, en la Tabla de a lado se muestra la relación de los nombres de esas soluciones.

Finalmente, los resultados que obtuvimos en el kit de pH se muestran en la Figura 16, en la Tabla se muestran los nombres de las 9 soluciones.



**Figura 16.** Kit de soluciones para evaluar el pH óptimo en la formulación de los antígenos mediante Thermal-Shift. La gráfica muestra las soluciones con la fluorescencia más baja obtenidas con el Kit de pH, en la Tabla esta la relación de las 9 soluciones graficadas.

En general, el comportamiento del antígeno en las diferentes soluciones fue similar, iniciaba con una fluorescencia alta, pero a medida que la muestra se iba calentando la unión del antígeno con las soluciones era más estable y permitía que el antígeno conservara su estructura, por lo que la fluorescencia disminuía. La mayoría de las soluciones que se identificaron como las mejores son principalmente sales y el uso de algunas de ellas en vacunas anti-COVID-19 ya ha sido descrito (EMA, 2020). Por lo que la formulación del antígeno que ya se tenía, se pudo ver mejorada con la adición de algunas de estas sales para mayor estabilidad del antígeno.



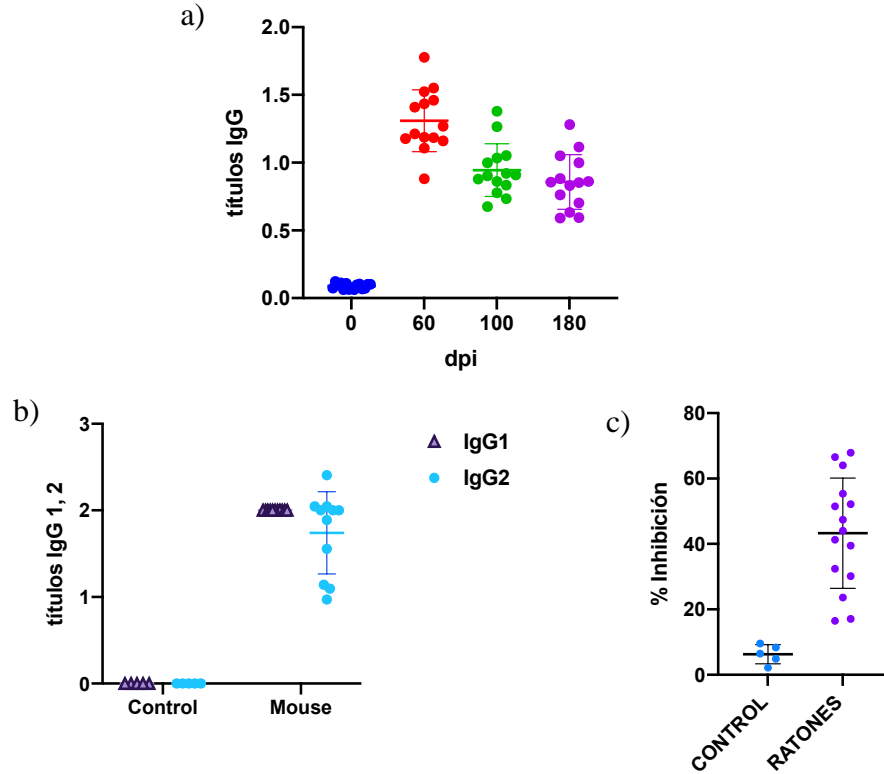
## **7.6 Respuesta inmune humoral**

Para evaluar la respuesta inmunológica específica para RBD de la proteína S y su duración, se llevaron a cabo ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

En cuanto al lote uno de ratones BALB/c que fueron inmunizados 4 veces vía subcutánea e intramuscular con el antígeno Wuhan formulado con Rehydragel™, se emplearon las muestras de suero preinmune e inmune de todos los ratones tomadas en los días 60, 100 y 180 para medir los títulos de anticuerpos clase IgG totales mediante un ensayo de ELISA indirecto. Tras un análisis de los resultados se puede decir que los animales inmunizados crearon una respuesta de protección hacia el SARS-Cov-2, también nos indican que en este lote en el día 60 después de recibir 4 dosis de vacuna, los animales inmunizados produjeron títulos de anticuerpos IgG más altos en comparación con los días 100 y 180 (Fig. 17a), en cuanto a la duración de los títulos detectados se puede decir que ésta se mantiene al menos seis meses.

También se evaluó la relación de los títulos obtenidos de los subtipos 1 y 2 de la clase IgG (Fig. 17b), como se puede ver en la gráfica, la respuesta que se obtuvo es una respuesta equilibrada de estos dos subtipos de IgG. Esta respuesta inmune equilibrada se considera buena ya que nos indica una regulación entre ambas inmunoglobulinas, que en el caso de IgG1 promueve citocinas antiinflamatorias, mientras que IgG2 promueve citocinas inflamatorias.

Para confirmar la presencia de anticuerpos protectores se llevó a cabo el ensayo de anticuerpos neutralizantes donde se midió el porcentaje de inhibición. Los anticuerpos neutralizantes son de gran importancia ya que estos actúan evitando la interacción que se da entre el dominio RBD de la proteína S y el receptor ACE2, por lo cual impiden la entrada del virus a las células.



*Figura 17. Análisis de la respuesta humoral del lote 1 mediante el programa de GraphPad,, a) Títulos totales de IgG medidos en los días 0, 60, 100 y 180 posteriores a la primera inmunización b) Gráfica de los títulos obtenidos de los subtipos IgG1 e IgG2 de los sueros del grupo control y de los ratones inmunizados, c) Porcentaje total de anticuerpos neutralizantes de los ratones controles e inmunizados.*

En el ensayo se utilizaron las muestras recolectadas en el día 60 debido a que en este día fue donde se encontró la mayor cantidad de IgG. Los resultados indican que todos los ratones inmunizados, en comparación con los controles, fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes. Debe considerarse que la medición de la neutralización cuantifica el bloqueo de la interacción entre la proteína S y su receptor ACE2, bloqueo que realizan los anticuerpos anti RBD de spike. Se obtuvo un porcentaje de inhibición con una media de 43.31% y un máximo de 67.88% de inhibición, el cual es un valor alto de porcentaje de inhibición contra la proteína S (Fig. 17c).

En cuanto al lote dos, el comportamiento de los anticuerpos IgG generados fue diferente. Las muestras de suero de los animales utilizadas para los ensayos se recolectaron en los días 35 y 90 tras haber recibido con un intervalo de 21 días dos dosis de los antígenos Wuhan o Alfa-Beta solos o en combinación a diferentes concentraciones según el grupo (estos antígenos fueron formulados con hidróxido de aluminio).

Al igual que en el lote uno, las muestras se procesaron mediante ensayos de ELISA indirecto y, como se esperaba, en el grupo control (C) la respuesta de IgG fue nula (Fig. 18a). En cuanto al grupo que se inmunizó con 20 $\mu$ g del antígeno Wuhan (W), los títulos de IgG fueron menores en ambos días medidos. En comparación el grupo que fue inmunizado con 20 $\mu$ g del antígeno Alfa-Beta (T) tuvo una alta respuesta de anticuerpos IgG desde el día 35 y con un aumento 90 dpi, siendo este grupo el que produjo una respuesta de IgG más robusta que los demás grupos (Fig. 18a). En el siguiente grupo inmunizado con 10 $\mu$ g de cada uno de los antígenos (W-T10  $\mu$ g) los animales produjeron una cantidad menor de títulos de IgG, pero del mismo modo en el día 35 ya presentaban una respuesta inmunológica que se vio mejorada al día 90 con un alza en los títulos de IgG. Por último, el grupo que fue inmunizado con 20 $\mu$ g de cada antígeno (W-T 20 $\mu$ g) los animales produjeron títulos similares a los del grupo anterior, observando el mismo comportamiento de incremento en los títulos para el día 90 (Fig. 18a). Debe enfatizarse que estos títulos obtenidos de neutralización *in vitro* describen la protección por anticuerpos, a lo que debe sumarse otros elementos de la respuesta humoral y celular. A continuación, se describe la caracterización de otros elementos que mostraron diferencias significativas cuando se compararon con la respuesta en los animales del grupo control.

Para caracterizar la respuesta humoral, con las muestras de los animales de cada grupo recolectadas en los días 35 y 90 dpi, también se llevó a cabo la medición de los subtipos IgG 1

e IgG 2 (Fig. 18b). Los títulos de IgG 1 y 2 de cada grupo coincidieron con los anticuerpos IgG obtenidos. En cuanto al grupo control (C) y al que fue inmunizado con el antígeno Wuhan (W) no se apreciaron cantidades de IgG de ningún subtipo. En el grupo inmunizado con el antígeno Alfa-Beta (T) el subtipo predominante fue el IgG 2 y el subtipo IgG1 parece estar presente en mínimas cantidades, lo cual indica la predominancia de una respuesta inflamatoria mediada por células Th1. En los grupos inmunizados con ambos antígenos (W+T) en cantidad de 10 y 20  $\mu$ g de cada uno, respectivamente, la respuesta fue similar mostrando valores más altos de IgG2 que de IgG1 en ambos casos (Fig. 18b), pero en cuanto a cantidad el grupo inmunizado con el antígeno Alfa-Beta fue el que presentó valores más altos de IgG2.

Por lo anterior, se cree que, en esas condiciones de formulación, el antígeno Alfa-Beta es el que despierta una mayor respuesta de anticuerpos IgG, y al mismo tiempo una respuesta inflamatoria en los animales estudiados. Esta respuesta inflamatoria se le atribuye al hidróxido de aluminio cuya función es exacerbar la respuesta a la presencia del antígeno (Pollet et al., 2021).

El siguiente ensayo fue el de neutralización de anticuerpos, se llevó a cabo con las muestras de suero obtenidas de los animales del lote dos al día 30 dpi. Las muestras se analizaron para corroborar la protección que brindan los antígenos contra el patógeno. Como en los ensayos anteriores se había observado que el grupo que recibió el antígeno Alfa-Beta fue el que había tenido una mayor cantidad de anticuerpos IgG, se esperaba que la respuesta de los anticuerpos neutralizantes fuera alta; sin embargo, el único grupo que presentó un porcentaje de inhibición de anticuerpos fue el grupo inmunizado con 20  $\mu$ g de cada antígeno (Fig.18c). La media de estos valores fue 58.65% con un valor máximo de 76.65%.

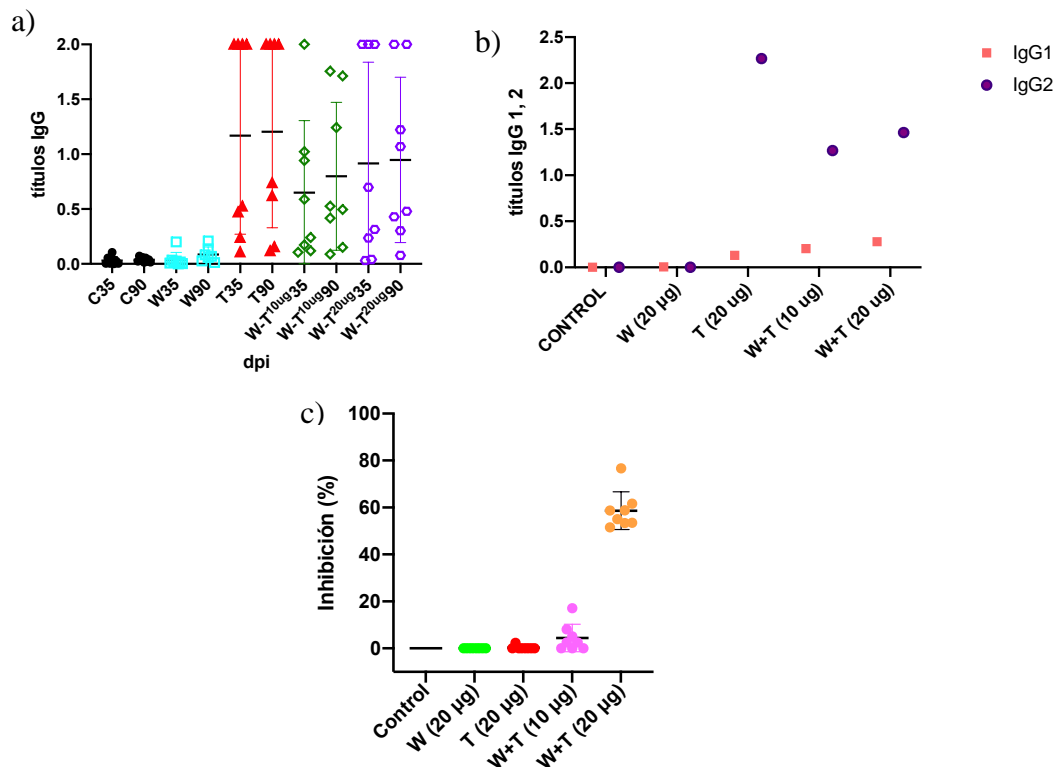


Figura 18. Respuesta inmune humoral de los ratones correspondientes al lote 2. a) Títulos obtenidos de IgG en cada grupo de inmunización en los días 35 y 90 posteriores a la inmunización, b) comparación de los títulos de IgG 1 y 2 en cada grupo de inmunización, c) porcentaje de inhibición de anticuerpos neutralizantes en cada grupo.

## 7.7 Respuesta inmune celular

### 7.7.1 Análisis de citocinas

También se caracterizó la respuesta inmune celular de los ratones inmunizados en ambos lotes mediante la medición citocinas y marcadores celulares encontrados en linfocitos, suero y después de la activación de esplenocitos. En cuanto a los linfocitos, se cuantificaron las citocinas intracelulares en células T CD4+, CD8+ y CD3+, al igual que en los esplenocitos después de la reestimulación con los antígenos; en cuanto al suero sanguíneo, se midieron las interleucinas secretadas. Para todas las muestras se usó citometría de flujo como técnica analítica.

Se midieron citocinas ya que éstas son proteínas producidas por muchos tipos celulares que median reacciones inflamatorias e inmunitarias, además de que comunican células del sistema inmune entre sí. A continuación, se presenta el análisis estadístico de las citocinas evaluadas que se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en GraphPad Prism. La diferencia se consideró estadísticamente significativa a alfa igual a 0,05.

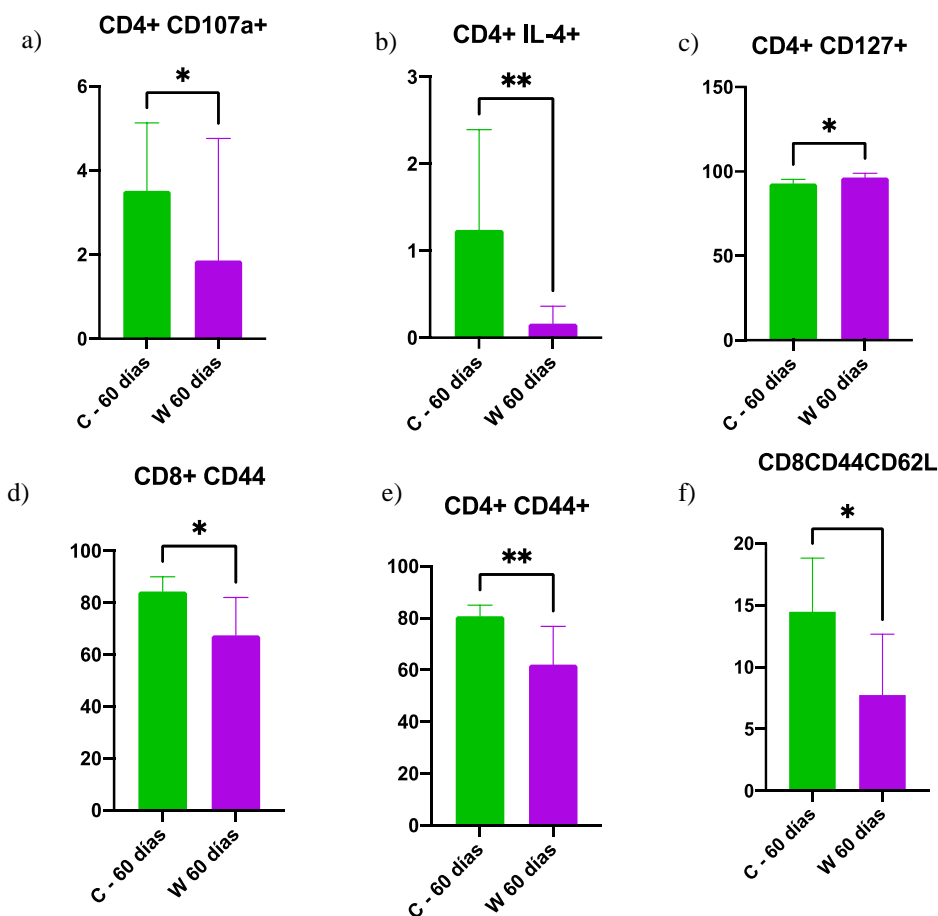
### **7.7.2 Medición de citocinas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, lote uno**

Para el lote uno se midieron las citocinas en linfocitos y en suero de todos los ratones al día 0 y al día 60 tras haber recibido 4 dosis del antígeno Wuhan, para el ensayo de activación de esplenocitos se sacrificaron dos animales (control e inmunizado) al día 98 tras haber recibido las mismas dosis. Se evaluaron varios paneles de citocinas; sin embargo, solo se muestran aquellas citocinas donde se encontró un valor estadísticamente significativo.

Las citocinas encontradas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+ que presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de ratones control y los inmunizados, indican que las células que tuvieron un mayor cambio en su proporción son las células T CD4+ con citocinas como CD107a, IL-4, CD127, CD44 mientras que en las células T CD8+ solo se observaron cambios en las citocinas CD44 y CD62L. (Fig. 19).

El marcador de superficie celular CD107A+ es un indicador de desgranulación en linfocitos activados, promueve la adhesión de células mononucleares de sangre periférica al endotelio vascular, por lo tanto, posiblemente su acción en la respuesta inmune del antígeno es la migración de células a los tejidos. Sin embargo, al hacer una comparación con el grupo control y los animales inmunizados, al día 60 dpi las células T CD4+ presentaron una disminución en la presencia de este marcador, sugiriendo que la activación de linfocitos T para el procesamiento

del antígeno ya se había realizado al momento de su detección (Fig. 19a). Recordando que las señales de la respuesta inmune adaptativa se producen en un periodo de 0 a 21 días posteriores a la exposición con el antígeno.



**Figura 19.** Citocinas con diferencias estadísticamente significativas encontradas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, de ratones del lote 1.

$p < 0.0332$  (\*),  $p < 0.0021$  (\*\*),  $p < 0.0002$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

Por otra parte, la IL-4 es una citocina pleiotrópica que tiene muchas funciones, como inducir la diferenciación de células T cooperadoras vírgenes (células Th0) a células Th2 e inhibir el desarrollo de la respuesta Th1 que propicia la producción de citocinas inflamatorias (Smiley et al., 1998). En este experimento se encontró una disminución de esta interleucina en el grupo

inmunizado (Fig. 19b) relacionado con una posible ausencia de respuesta inflamatoria en el tiempo en que se midió. Este resultado puede interpretarse como una respuesta inmune protectora que no evoca una respuesta inmune exacerbada.

El marcador celular CD127 es una glicoproteína de transmembrana, se encuentra en la mayoría de los linfocitos T periféricos. En el grupo inmunizado se encontró un aumento de esta glicoproteína en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Fig. 19c), se sabe que este marcador es útil para identificar la memoria ante un antígeno y los linfocitos T efectores (Beckman., 2022). Por lo que su aumento es buen indicador de la presencia de la respuesta inmune de memoria que se atribuye al antígeno.

En cuanto al marcador celular CD44 en el momento de análisis en las células T, al día 60 dpi se encontró una disminución de este marcador en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Fig. 19d, e). CD44 se conoce como una molécula de adhesión celular que participa en la migración celular, los niveles se ven aumentados transitoriamente por la activación de linfocitos T y B. En las células T media principalmente la adhesión al endotelio promoviendo el movimiento hacia el sitio de inflamación (Tak and Mary., 2006). Por lo siguiente podemos decir que, en este ensayo, al día 60 la respuesta inmune ya se había regulado. Además, la ausencia del marcador nos indica que los animales no presentaban una reacción inflamatoria que requiriera la activación de linfocitos T, lo cual corrobora lo obtenido en los marcadores celulares mencionados anteriormente. Dentro del mismo panel se evaluó a la selectina CD62L que al igual que CD44 tiene una función reguladora, además de una participación la activación de los linfocitos T de memoria (Gerberick et al., 1997). En las células T CD8<sup>+</sup> se encontraron niveles bajos de esta selectina (Fig. 19f), además de que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no producen cantidades



altas de citocinas como los linfocitos T CD4+, su disminución coincide con los datos obtenidos en CD44+.

### **7.7.3 Medición de citocinas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, lote 2**

En cuanto al lote dos, las citocinas encontradas en suero y linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+ se midieron al día 0 y al día 35 tras haber recibido dos dosis de los antígenos Wuhan o Alfa-Beta solos o en combinación según el esquema de inmunización (Fig. 6). Para la activación de esplenocitos se sacrificó a un animal de cada grupo y se midieron diferentes condiciones de los antígenos.

Aunque se tenían 5 grupos de animales se decidió analizar solo aquel grupo donde hubo una mayor respuesta en la generación de anticuerpos neutralizantes (W+T 20 µg). Para el análisis se compararon los animales del grupo control con los animales inmunizados con el antígeno Wuhan+Alfa-Beta 20 µg.

En este grupo de animales inmunizados se encontraron más diferencias estadísticas en las citocinas de linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+ en comparación con los animales del grupo control, la diferencia se observó como un aumento en las siguientes citocinas que se describen a continuación y están graficadas en la Fig. 20.

En los linfocitos T CD4+ y CD8+ la IL-2 aumentó significativamente en los animales inmunizados (Fig. 20a, b). La IL-2 es una citocina multifuncional que desempeña papeles fundamentales en la inmunidad y la tolerancia. La producen las células T activadas y afecta la activación, el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de varios tipos de células, incluidos los linfocitos T y B y sus precursores, las células Natural Killer y los monocitos/macrófagos. Tiene un papel crucial no solo para la inmunidad protectora, sino

especialmente para la tolerancia inmune periférica mediada por células T reguladoras CD4 + (T Reg) (Boyman, et al., 2012). El aumento de esta citocina al día 35 sugiere una fuerte activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como participación en la regulación de la respuesta inmune y en la generación de células T de memoria.

Recordando el papel del hidróxido de aluminio como adyuvante y su relación con la inflamación, se tienen varias citocinas que se vieron aumentadas por el efecto tanto del adyuvante y su poder para potenciar una respuesta inmune, así como la respuesta inmunológica ante al antígeno. La IL-17A fue una de las citocinas aumentadas en las células T CD8+ (Fig. 20c). La IL-17A es una citocina proinflamatoria que pertenece al subconjunto Th17A, está implicada en los mecanismos de activación, crecimiento y proliferación celular. Estudios actuales han demostrado una estrecha correlación en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria, entre la IL-17A y el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) (Maione, et al., 2021).

El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) es otra proteína proinflamatoria que también aumentó su expresión (Fig. 20d, e). El TNF $\alpha$  no solo promueve la producción de citocinas inflamatorias, sino que también mejora la adhesión y la permeabilidad de las células endoteliales e induce el reclutamiento de células inmunitarias como neutrófilos, monocitos y linfocitos a los sitios de inflamación. Por otro lado, el TNF $\alpha$  puede potenciar la síntesis de factores antiinflamatorios, para limitar la secreción de citocinas inflamatorias. En su conjunto, el TNF $\alpha$  inicia una reacción inmunitaria rápida y vigorosa, limitando la extensión y duración de la inflamación (Yang, et al., 2018) lo cual es indicador de regulación en el proceso pro y antiinflamatorio de la respuesta ante al antígeno.

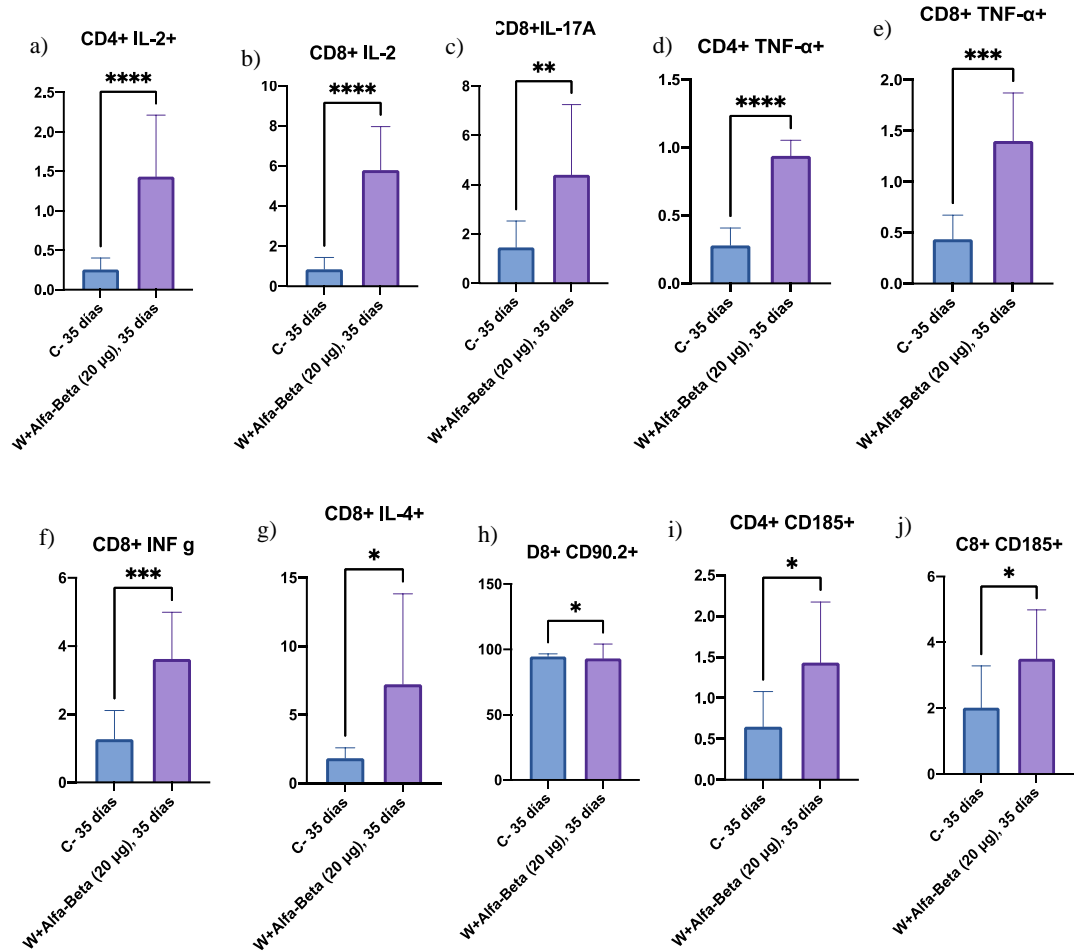
Otra citocina elevada fue interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en las células T CD8+ (Fig. 20f). El IFN $\gamma$  aumenta la actividad citotóxica y fagocítica de macrófagos e induce la expresión de moléculas del MHC clase I y II. El IFN $\gamma$  tiene un papel dual, es pro y antiinflamatorio, lo cual lo convierte en una proteína singular debido a que su comportamiento depende del medio en el que se encuentre (Boehm, et al., 1997). Por lo que en este grupo de animales podría estar regulando la respuesta inflamatoria o contribuyendo la secreción de IgG2 que, como se encontró en el análisis de la respuesta humoral es la que tiene predominio.

Como contraste del efecto inflamatorio, la interleucina IL-4 expresada por las células T CD8+ se vio aumentada (Fig. 20g). Esta interleucina participa en la regulación del sistema inmunitario, entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y actúa como antiinflamatorio. Por lo que el aumento de esta citocina podría estar contrastando la inflamación producida por otras citocinas, al mismo tiempo que ayuda a la proliferación de linfocitos B que son productores de anticuerpos.

CD90 (Fig. 20h), también conocida como Thy se encuentra en timocitos, células T periféricas, mioblastos, células epidérmicas y queratinocitos. Tiene funciones en la inflamación y la activación de linfocitos T.

La citocina CD185 aumentó su expresión tanto en células T CD4+ como en T CD8+ (Fig. 20i, j). CD185, también es conocida como receptor de quimiocinas CXCL5 (CXCR5) permite que las células B y T migren a los ganglios linfáticos y a las zonas de células B. Este receptor ayuda a que las células T puedan acceder a los folículos de las células B dentro de los órganos linfoides secundarios, lo cual es un paso clave en la producción de anticuerpos de alta afinidad, ya que las células B y las células T deben interactuar para activar el cambio de clase de inmunoglobulinas (Ig) (Junt, et al., 2005). Por lo que el aumento de esta citocina en ambas

células T es una buena señal por su relación producción de anticuerpos contra el antígeno administrado a los ratones.



**Figura 20.** Citocinas con diferencias estadísticamente significativas encontradas en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+, de ratones del lote 2 tras haber recibido dos dosis de los antígenos Wuhan+Alfa-Beta 20ug.  $p < 0.033$  2(\*)  $p < 0.0021$  (\*\*),  $p < 0.0002$  (\*\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

#### 7.7.4 Medición de citocinas secretadas en suero, lote uno

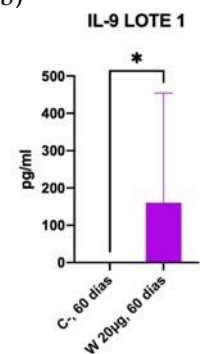
Como se mencionó anteriormente también se midieron citocinas secretadas en suero sanguíneo. En cuanto al lote 1, los ratones inmunizados, en comparación con los animales control, respondieron con niveles más altos de citocinas de tipo inflamatorias Th9 (IL-9) y Th17 (IL-17A), aunque también hubo niveles altos citocinas la IL-6 que tienen un efecto dual (pro y

antiinflamatoria) (Fig. 21a). Sin embargo, después del análisis estadístico la única citocina que presentó una diferencia estadísticamente significativa fue la IL-9 (Fig. 21b). Se sabe que la IL-9 tiene función en la promoción de mecanismos inflamatorios (por ejemplo, en las vías respiratorias), ejerce su efecto sobre múltiples tipos de células y diferentes tejidos y es considerada como un factor de crecimiento de las células T activadas. Además de los efectos mencionados se ha demostrado que tiene efectos antiinflamatorios que dependen de los tipos de células que la expresan, así como del microambiente en el que se produce (Rojas, et al., 2017). La secreción de esta citocina puede estar dada por células Tregs que participan en la inducción de tolerancia. Estos linfocitos T que regulan o suprimen a otras células del sistema inmune y ayudan a prevenir enfermedades autoinmunes. Por lo que una alta secreción de esta interleucina sugiere un control sobre la respuesta inmune ante al antígeno.

a)

	IFN- $\gamma$	IL-5	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-6	IL-4	IL-10	IL-9	IL-17A	IL-17F	IL-22	IL-23
CONTROL	3.9	77	48	21	8.8	24	61	0	10	4.8	7.6	27
RATONES	25	73	56	17	37	35	20	161	144	6.7	17	27

b)



**Figura 21.** a) Citocinas medidas en suero sanguíneo al día 60 dpi, lote 1. b) interleucina con diferencia estadística.

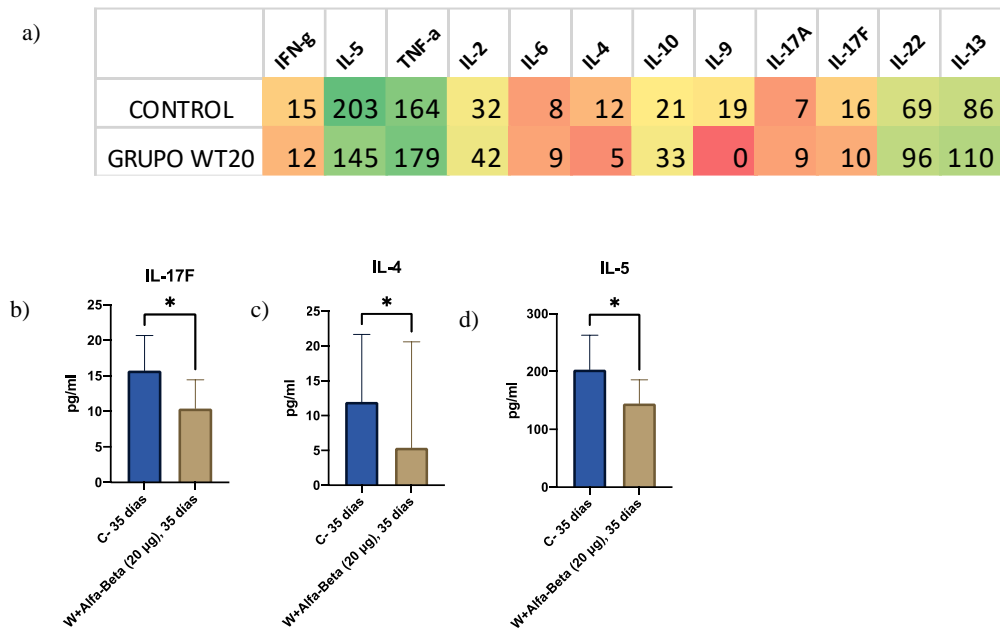
Las respuestas obtenidas en este lote se consiguieron después de haber inmunizado con tres refuerzos. Esto es acorde con los esquemas de inmunización en humanos, que se realizan en los países desarrollados, por ejemplo, en Estados Unidos se fomenta la vacunación hasta con 4 refuerzos, mientras que, en Israel, se aplican las necesarias para inducir una respuesta protectora.

### **7.7.5 Medición de citocinas secretadas en suero, lote dos**

En cuanto a las citocinas secretadas en mayor proporción en el suero sanguíneo de los animales del grupo inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta 20ug del lote 2, fueron las citocinas de los subtipos Th1 (TNF $\alpha$ , IL-22) y Th2 (IL-13) que corresponden a una respuesta inflamatoria y antiinflamatoria respectivamente (Fig. 22a). Sin embargo, las citocinas que tuvieron una diferencia estadísticamente significativa fueron la IL-17F, IL-4 e IL-5. Esta diferencia se vio en una disminución al comparar al grupo inmunizado con el grupo control.

En cuanto a la IL-17F, esta es producida por linfocitos Th17, participa principalmente en la inmunidad de mucosas. Es considerada como una citocina inflamatoria asociada con la inflamación de las vías respiratorias (Chang, et al., 2009). Para su liberación necesita de receptores y señalizaciones que induzcan su producción, además de que su liberación está relacionada a tejidos específicos. En suero sanguíneo se observó una disminución en la liberación de esta citocina que puede relacionarse con la baja presencia de procesos inflamatorios y la falta de señalización para la liberación de estas citocinas (Fig. 22b).

Con un efecto antagonista, la IL-4 es una citocina que promueve la diferenciación de células Th2 (respuesta antiinflamatoria), la secreción de inmunoglobulina E (IgE) e inmunoglobulina IgG1 y el reclutamiento de eosinófilos. Disminuye las funciones inflamatorias de los monocitos y macrófagos mientras mejora sus funciones de presentación de antígenos (Smiley, et al., 1998). En este análisis de suero sanguíneo sus niveles disminuyeron (Fig. 22c) a diferencia de los niveles encontrados en el ensayo de los linfocitos T CD8+ donde aparece un aumento de esta interleucina; la disminución de IL-4 en suero puede deberse a la baja señalización para su liberación pese a su presencia en células T CD8+.



*Figura 22. Citocinas encontradas en suero de animales del grupo WT20 lote 2, medidas mediante Citometría de flujo. a) Heatmap de la respuesta de citoquinas, b, c, d) citocinas con diferencia estadística posterior a la prueba de Mann-Whitney.  $p > 0.12$ (ns),  $p < 0.033$  (\*),  $p < 0.002$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)*

Otra interleucina del mismo subgrupo que presentó una disminución es la IL-5 (Fig. 22d) que es producida por los linfocitos Th2 y mastocitos. Sus funciones son estimular el crecimiento de las células B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Los niveles bajos de ambas citocinas podrían relacionarse con procesos inflamatorios controlados en el momento en que fueron tomadas además de que en ese momento no se estaba llevando a cabo el procesamiento de antígenos que requiriera activación de células B y T.

En cuanto al lote 2, de los 5 grupos inmunizados con diferentes condiciones de los antígenos, la combinación de W+T20  $\mu\text{g}$  fue el esquema de inmunización que generó una mejor respuesta inmunológica en modelo murino, misma que indujo la generación de anticuerpos neutralizantes en los animales.

Recordando el proceso de la respuesta inmune adaptativa que se desarrolla en un lapso de 21 días posteriores a la exposición con el antígeno hasta la creación de células de memoria, al día

35 que fue donde se caracterizó la RI celular la respuesta inmune inducida por los antígenos W+T20  $\mu\text{g}$ , sugiere que es una respuesta sólida y robusta. Además de que se encuentra bien regulada pues los niveles de citocinas encontrados parecen estar controlados, ya que las citocinas pro y antiinflamatorias encontradas tanto en suero como en linfocitos estaban equilibradas o no se encontraban secretadas.

#### **7.7.6 Medición de citocinas en el ensayo de activación de esplenocitos**

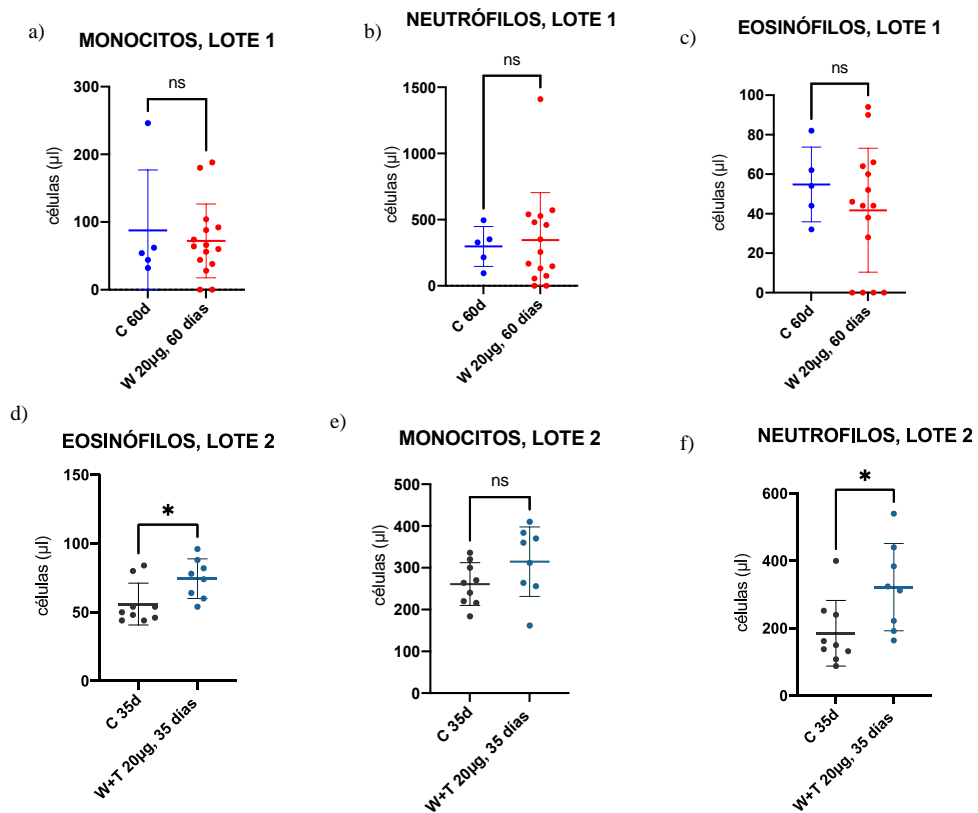
Por último, en ambos lotes se midieron las citocinas intracelulares en células T CD4+, CD8+ y CD3+ posteriores a la reestimulación de esplenocitos aislados de ratón. Los resultados se muestran en el Anexo 3 y se observa una tendencia de marcadores celulares que son clave en la activación de linfocitos y generación de anticuerpos específicos. Estos resultados son considerados bases preliminares ya que se necesita realizar más réplicas del experimento para cumplir con el criterio de reproducibilidad y estimar estadísticamente esta respuesta.

#### **7.7.7 Medición de células fagocíticas en sangre**

Otro elemento clave en la respuesta inmune son las células involucradas en el reconocimiento, fagocitosis, presentación y eliminación de los patógenos. Estas son llamadas células fagocíticas y también se ven afectadas en su proporción por la respuesta inmune ante el patógeno. Las células que son de interés para este trabajo son los monocitos, neutrófilos y eosinófilos que se han visto relacionados con procesos inflamatorios causados por las vacunas (Lee et al., 2019). Para la cuantificación de los fenotipos celulares se utilizó citometría de flujo. Para el lote 1, después del análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre la proporción de las células del ratón control y las del animal inmunizado (Fig. 23a,b,c). En



cambio, en el lote 2, las células medidas en las que se observaron cambios fueron los neutrófilos y eosinófilos (23d,e,f). Este resultado sugiere una RI robusta ya que como se mencionó estas células están presentes en las fases de reconocimiento como de eliminación del antígeno; por otro lado, la infiltración de estas células en pulmones sugiere una relación con el síndrome de tormenta de citocinas que pueden provocar el síndrome de dificultad respiratoria aguda (Gu et al., 2021).



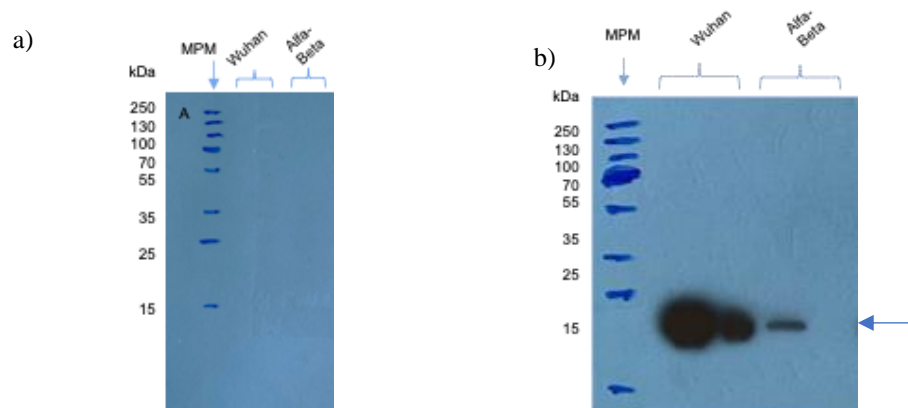
**Figura 23.** Fenotipos celulares medidos en sangre por citometría de flujo. Las gráficas a,b,c corresponden a las células medidas en animales del lote 1. d,e,f corresponden a las muestras del lote 2 de animales.

## **7.8 Inmunodetección de proteínas por Western-Blot**

Mediante el ensayo de Western-Blot se llevó a cabo la detección de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta con muestras de sueros de ratones inmunizados con los antígenos W+T20 $\mu$ g y con sueros de ratones no inmunizados (grupo control). El animal inmunizado había recibido 2 dosis de los antígenos Wuhan+Alfa-Beta 20 $\mu$ g, las muestras de suero se recolectaron 35 dpi.

Se llevo a cabo la optimización del ensayo y, tras varias pruebas de diluciones de los antígenos como de los anticuerpos se encontró que las mejores condiciones para realizar el ensayo es a una dilución 1:5,000 del anticuerpo primario, 1:40,000 del anticuerpo secundario y una concentración de los antígenos de 2 $\mu$ g. En estas condiciones con suero de ratón inmunizado se observó una señal que refleja la unión antígeno/anticuerpo (Fig. 24b) indicando que los ratones que fueron inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos contra los antígenos Wuhan y Alfa-Beta, recordando que son dos variantes del SARS-CoV-2.

Como control se llevó a cabo otro ensayo de Western-Blot, donde los antígenos fueron probados con suero de ratón del grupo control (no inmunizado). En la Figura 24a podemos ver el resultado del ensayo en el que no se observa ninguna señal que indique la unión del antígeno/anticuerpo, lo cual es lo esperado ya que los ratones al no ser inmunizados con los antígenos no deberían tener anticuerpos contra éstos.



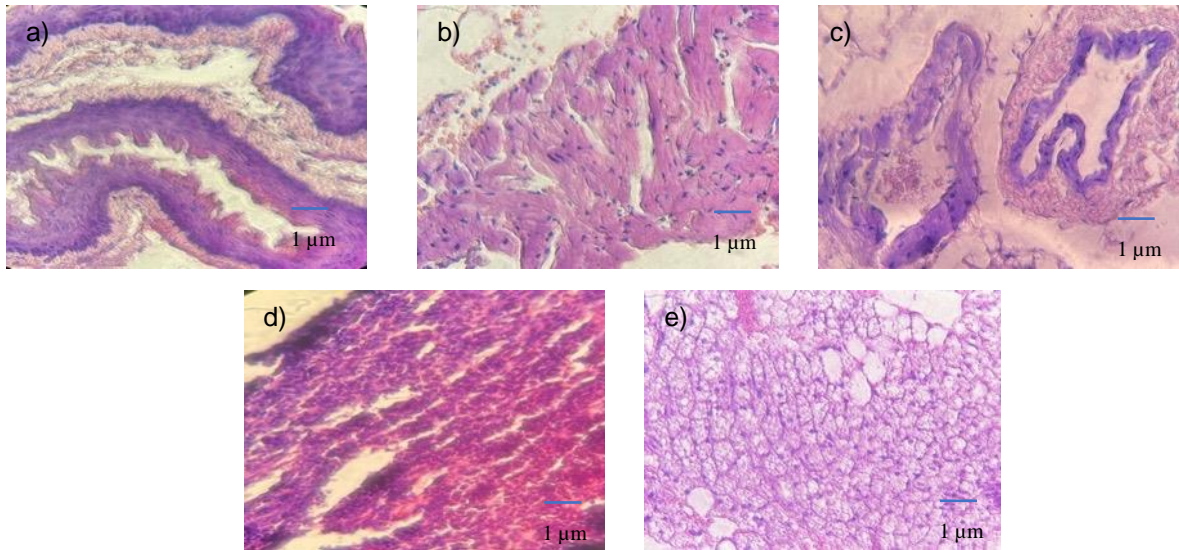
**Figura 24.** Inmunodetección de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta por Western-Blot, a) Western-Blot con suero de ratón control (sin inmunizar) donde no se aprecian bandas de reconocimiento de los antígenos, b) ensayo con suero de ratón inmunizado con ambos antígenos (Wuhan y Alfa-Beta 20  $\mu$ g) donde se aprecian las bandas de reconocimiento de los anticuerpos creados por el ratón inmunizado hacia los antígenos. La flecha muestra la banda detectada de 20 kDa.

## 7.9 Análisis de la seguridad en ensayos histopatológicos

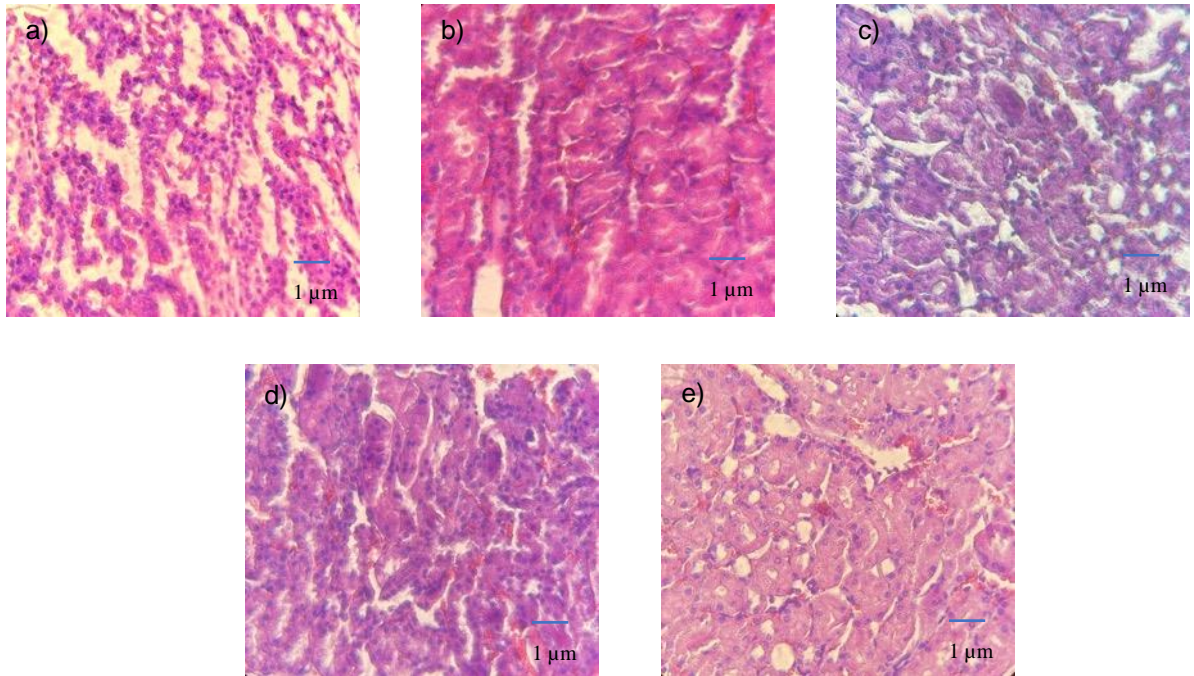
Para verificar la seguridad de los antígenos empleados, se realizó un análisis histológico de algunos órganos de cada grupo de animales del lote 2. Todos los órganos extraídos presentaron una apariencia normal en las observaciones macroscópicas sin presencia de edema, flogosis (inflamación patológica), pigmentación o cambios de forma (Anexo 4).

Se realizó la tinción de los tejidos con hematoxilina y eosina con el fin de identificar microscópicamente diferentes tipos de células y tejidos, y para obtener información sobre las características, forma y estructura celular del tejido. La hematoxilina es una tinción básica y tiñe las estructuras basófilas de color violeta azulado intenso, por ejemplo, los ribosomas, la cromatina (material genético) dentro del núcleo y otras estructuras. La eosina es una tinción ácida que tiñe de rosa anaranjado o rojizo las estructuras acidófilas como el citoplasma, la pared celular, el colágeno, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean y sostienen la célula.

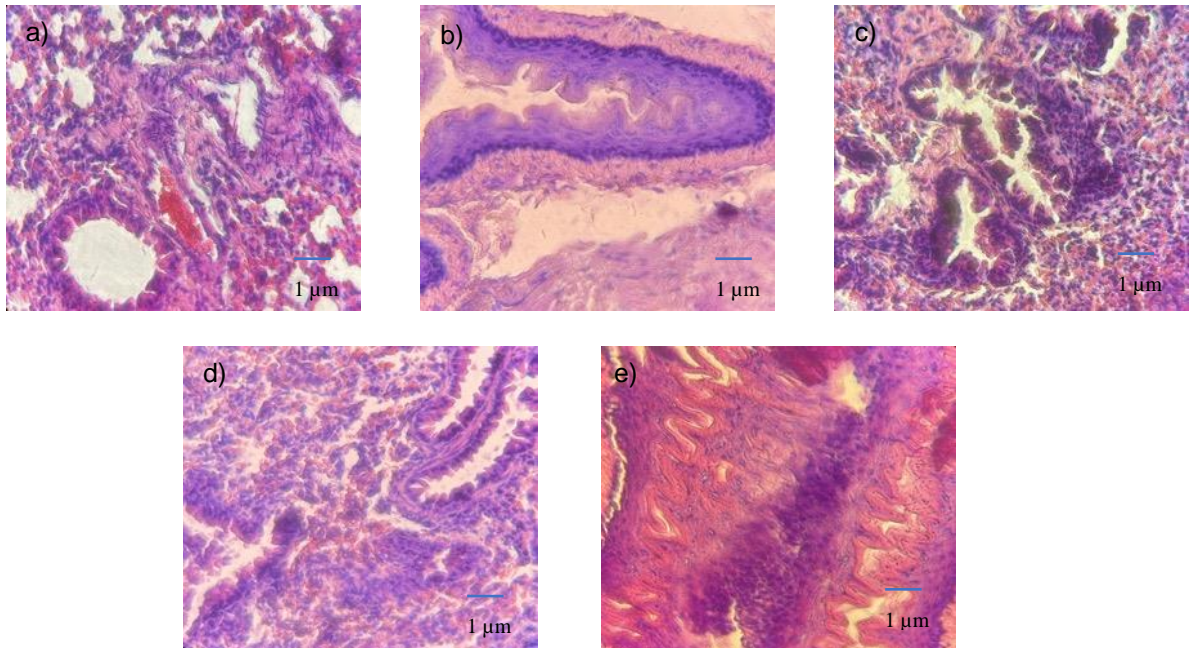
Las tinciones de los tejidos se muestran agrupados según el órgano, la comparación se realizó con base a lo observado en los tejidos del ratón control comparado con los tejidos de los grupos inmunizados. A continuación, se muestran los resultados en las siguientes figuras (25-34):



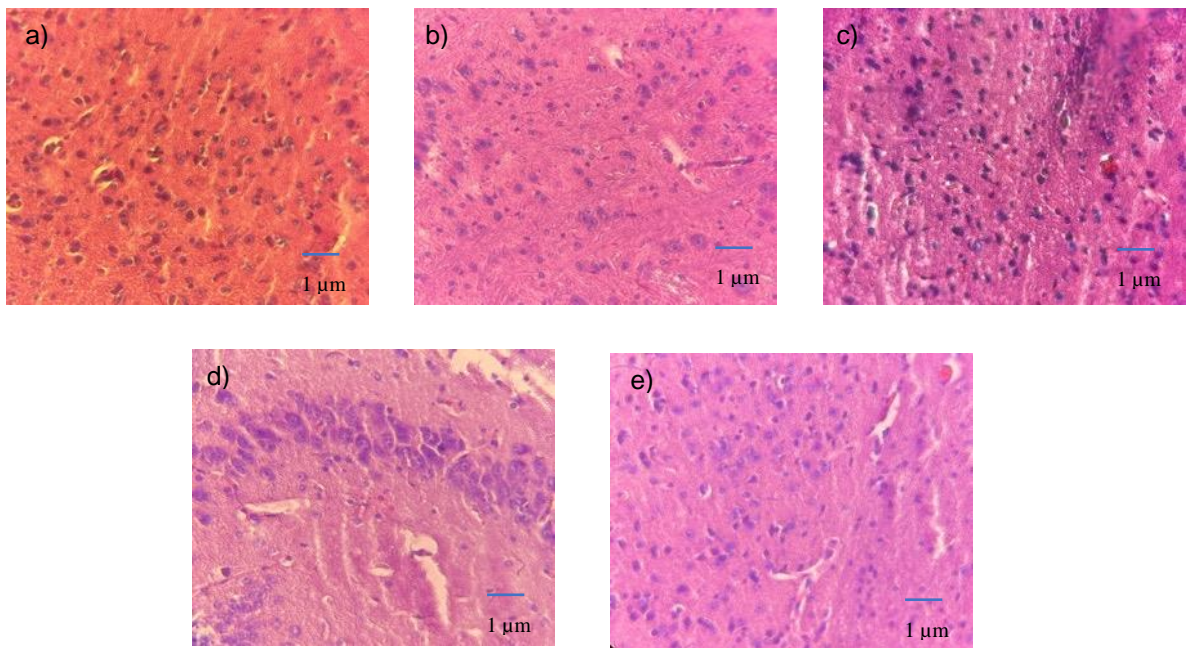
**Figura 25.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Timo, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 2µg. La estructura de los tejidos presenta una apariencia normal las células presentes son timocitos y algunas células epiteliales.



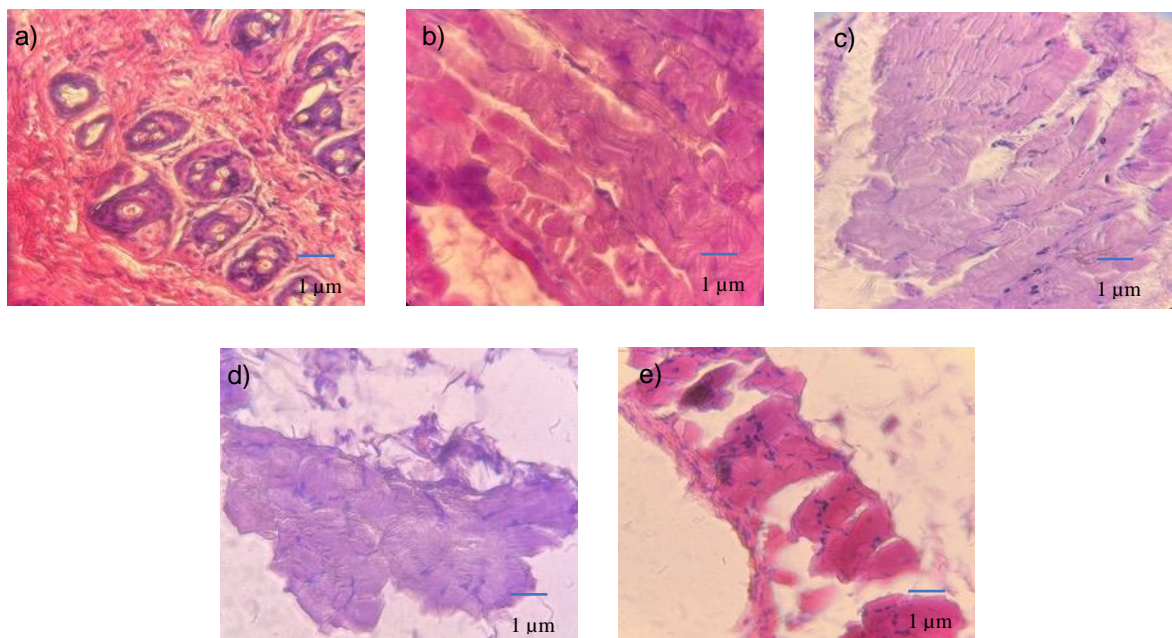
**Figura 26.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Riñón, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En todas las imágenes se observa corteza renal normal.



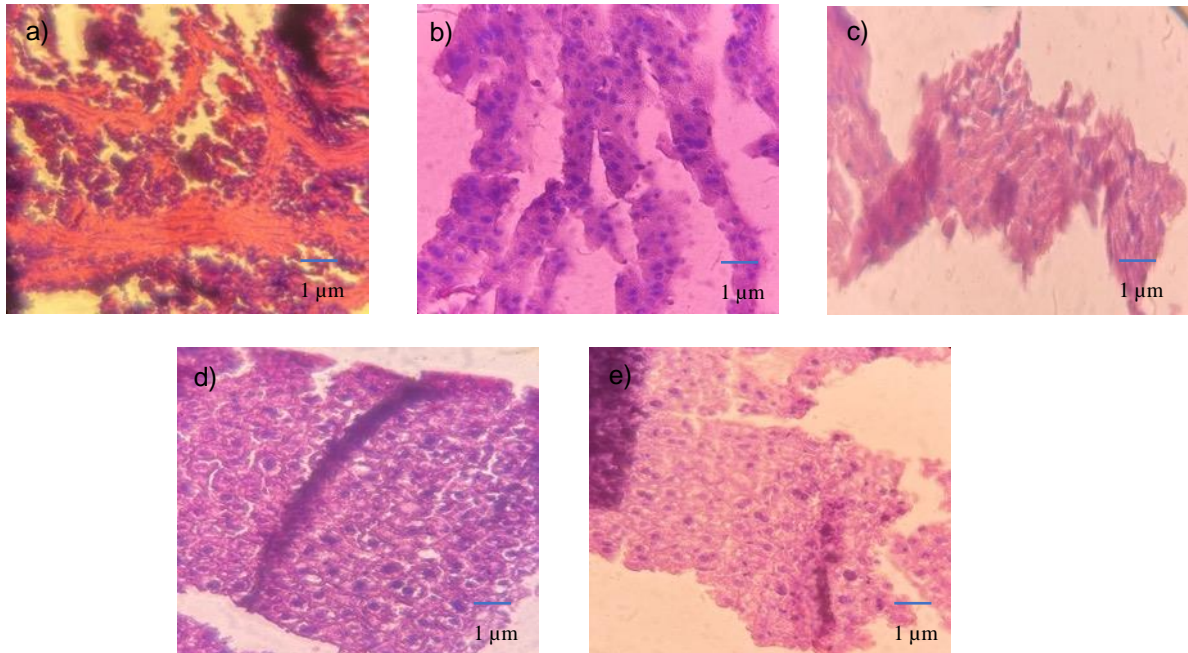
**Figura 27.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Pulmón, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. Las principales células observadas son las células clara de los pulmones. Las paredes alveolares de todos los tejidos parecen normales.



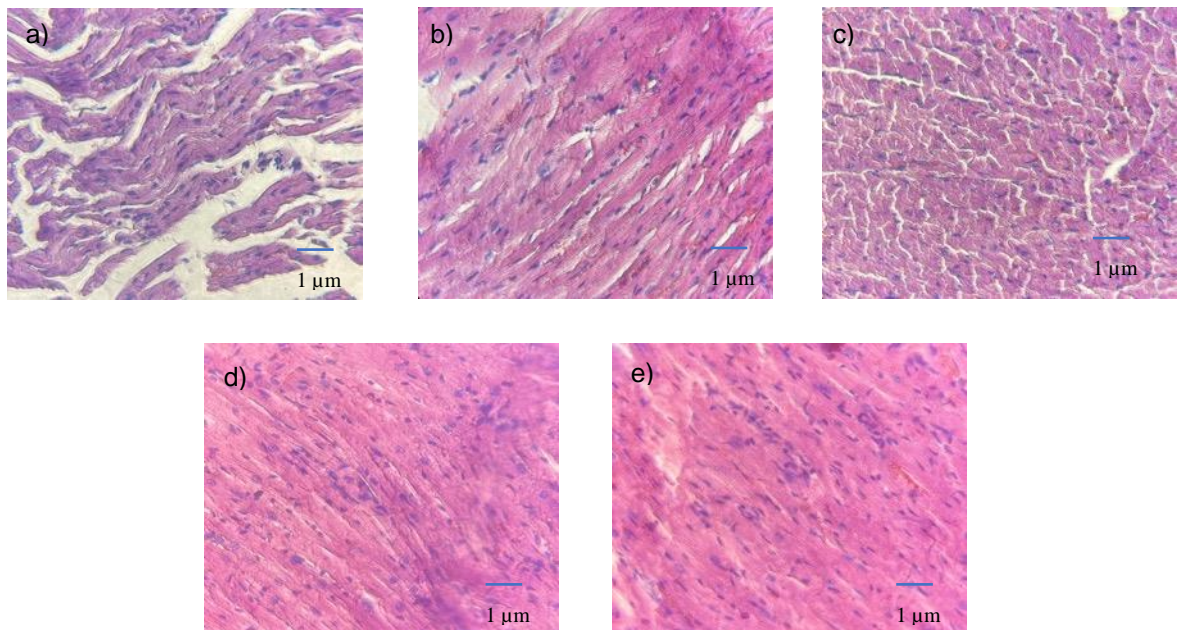
**Figura 28.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Cerebro, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. Las principales células observadas son neuronas (color morado) y una capa de eosinófilos (color rosa). Estas células son comunes por lo que no se observa ninguna anomalía.



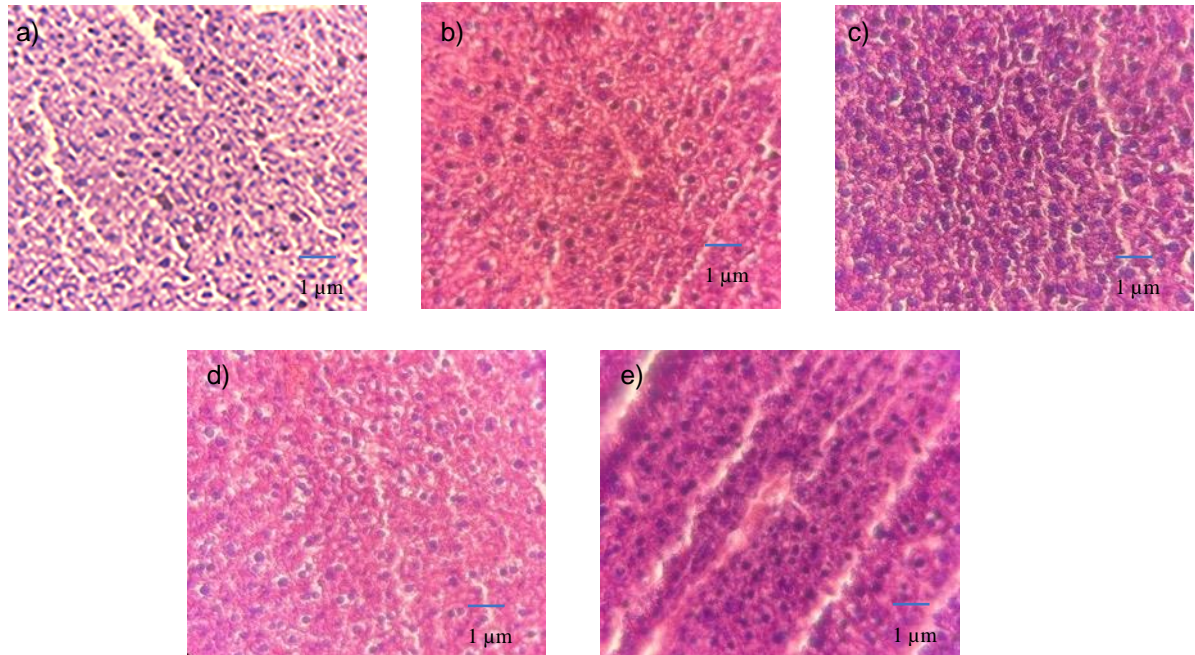
**Figura 29.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Piel, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En la imagen a) podemos observar algunos conductos de la glándula sudorípara ecrina, en las siguientes imágenes se observa la dermis reticular, con una apariencia normal.



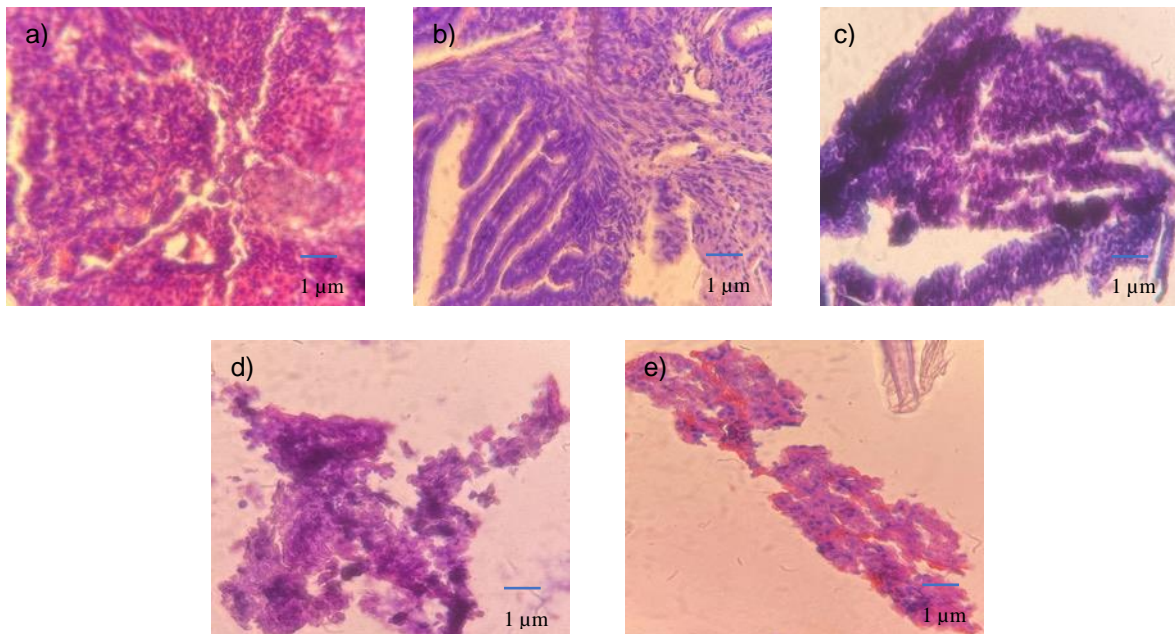
**Figura 30.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Bazo, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. La morfología del tejido parece estar sin alteraciones, las células teñidas de morado son linfocitos.



**Figura 31.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Corazón, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En las imágenes podemos observar la estructura del miocardio, en su mayor parte es el citoplasma eosinofílico de los cardiomiocitos lo que podemos observar, las células teñidas de morado son fibroblastos y células endoteliales teñidos de rojo están los eritrocitos.

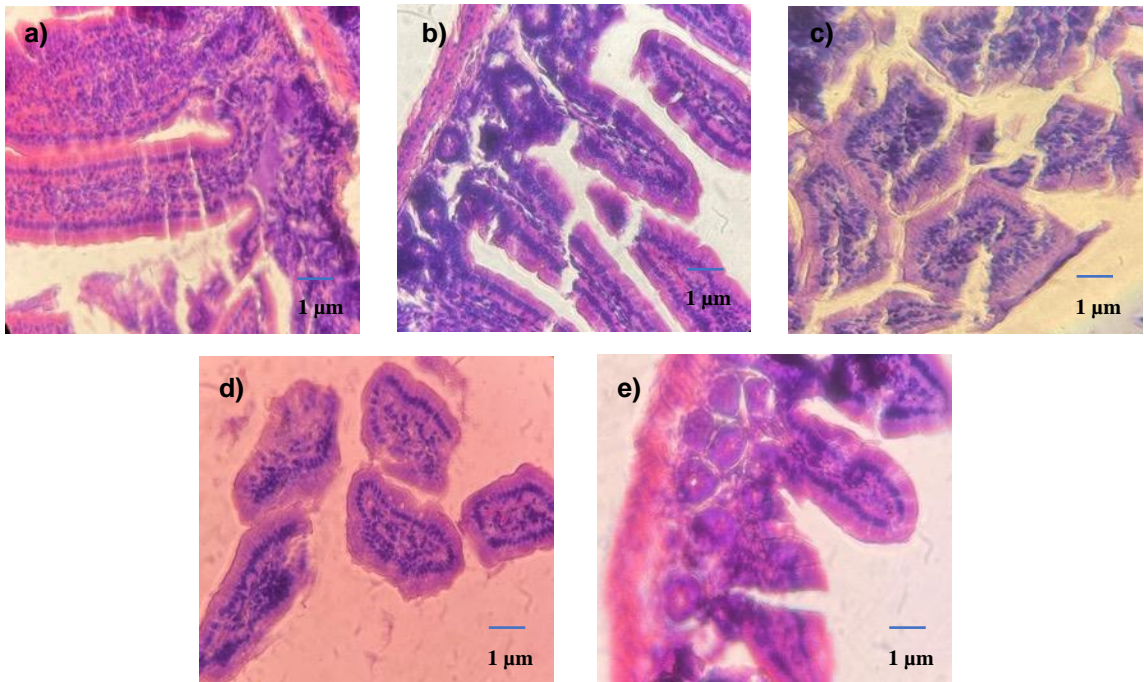


**Figura 32.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Hígado, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En las imágenes se observa la presencia de hepatocitos dispuestos sobre lobulillos hepáticos.



**Figura 33.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Ovario, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En las imágenes se aprecian diferentes estructuras, ya que la apariencia de este órgano depende de la fase de ovulación en la que se encuentren. En la imagen b) se puede apreciar parte de la trompa de Falopio.





**Figura 34.** Tinción con hematoxilina y eosina, órgano: Intestino, obtenido de: a) animal control, b) animal inmunizado con el antígeno Wuhan, c) animal inmunizado con el antígeno Alfa-Beta, d) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 10µg, e) animal inmunizado con los antígenos Wuhan y Alfa-Beta en una concentración de 20µg. En las imágenes se observa parte del duodeno que es identificado por las vellosidades o píloris de un tamaño grande.

Todos los órganos presentaron un aspecto normal tanto en las observaciones macroscópicas como microscópicas. No se observaron cambios morfológicos o estructurales, incluidos edema, necrosis, inflamación o pigmentación, en todos los órganos del estudio histopatológico. Para la examinación de los tejidos se utilizó el libro Comparative Anatomy and Histology de Rendi, M.H (2012).

## 8. Conclusiones

En este trabajo se realizó la purificación por dos pasos de intercambio iónico de los antígenos Wuhan y Alfa-Beta según las condiciones establecidas por Olivares, 2021. Se observó que con la purificación por intercambio catiónico seguida de intercambio aniónico los antígenos obtienen un porcentaje de pureza de hasta el 95%. Los candidatos vacunales Wuhan y Alfa-Beta a través de barrido diferencial por fluorometría mostraron una mayor estabilidad en soluciones que contienen sales.

Después del análisis de los resultados obtenidos en las mediciones de citocinas, marcadores celulares y anticuerpos neutralizantes nos permite concluir que la formulación que crea una respuesta inmune más sólida, robusta y equilibrada es la combinación de los antígenos Wuhan+Alfa-Beta 20 µg adyuvados con hidróxido de aluminio.

El esquema de vacunación de dos dosis de esta formulación, en modelo murino generó la capacidad para neutralizar el SARS-CoV-2 y sus variantes Wuhan y Alfa-Beta, según lo observado en el ensayo de neutralización y de Western-Blot. Además, según los datos arrojados en la caracterización de la respuesta inmune celular de los antígenos, en modelo murino se produjo una respuesta inmune equilibrada (Th1:Th2), a diferencia de otras vacunas que reportan la prevalencia de una respuesta inmune de tipo Th1 debido al blanco terapéutico que utilizan, así como los adyuvantes utilizados.

En cuanto a la seguridad, ambos antígenos sugieren ser seguros ya que en modelo murino no se observaron cambios morfológicos en los tejidos.

## 9. Referencias

- Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto (consultado el 19 de julio de 2022) en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_es.pdf)
- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19 : Its Origin , Characteristics , and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, 9, 331–342.
- Alhajj, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Arashkia, A., Jalilvand, S., Mohajel, N., Afchangi, A., Azadmanesh, K., Salehi-Vaziri, M., Fazlalipour, M., Pouriayevali, M. H., Jalali, T., Mousavi Nasab, S. D., Roohvand, F., Shoja, Z., & SARS CoV-2 Rapid Response Team of Pasteur Institute of Iran (PII) (2021). Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 spike (S) protein based vaccine candidates: State of the art and future prospects. *Reviews in medical virology*, 31(3), e2183. <https://doi.org/10.1002/rmv.2183>.
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2012 12:3, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749-95.
- Brewer, J. M. (2006). (How) do aluminium adjuvants work? *Immunology Letters*, 102(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2005.08.002>
- CDC.(2022) Symptoms of COVID-19. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
- CDC, (2022) Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2 <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>, 11,ENERO,2022
- CD127 (IL-7R $\alpha$ ). (n.d.). Retrieved June 25, 2022, from <https://www.beckman.mx/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd127-il-7ra>
- Clem A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of global infectious diseases*, 3(1), 73–78. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>
- Chang, S. H., & Dong, C. (2009). IL-17F: Regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*, 46(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.12.024>
- Chemtrade Logistics. (2018). Aluminum Hydroxide Fluid Gel SECTION 1: IDENTIFICATION Product Identifier. [www.chemtradelogistics.com](http://www.chemtradelogistics.com)
- Choi, J. Y., & Smith, D. M. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Medical Journal*, 62(11), 961–968. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2021.62.11.961>
- Du, L., Zhao, G., Chan, C. C. S., Sun, S., Chen, M., Liu, Z., Guo, H., He, Y., Zhou, Y., Zheng, B.-J., & Jiang, S. (2009). Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. *Virology*, 393(1), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.018>

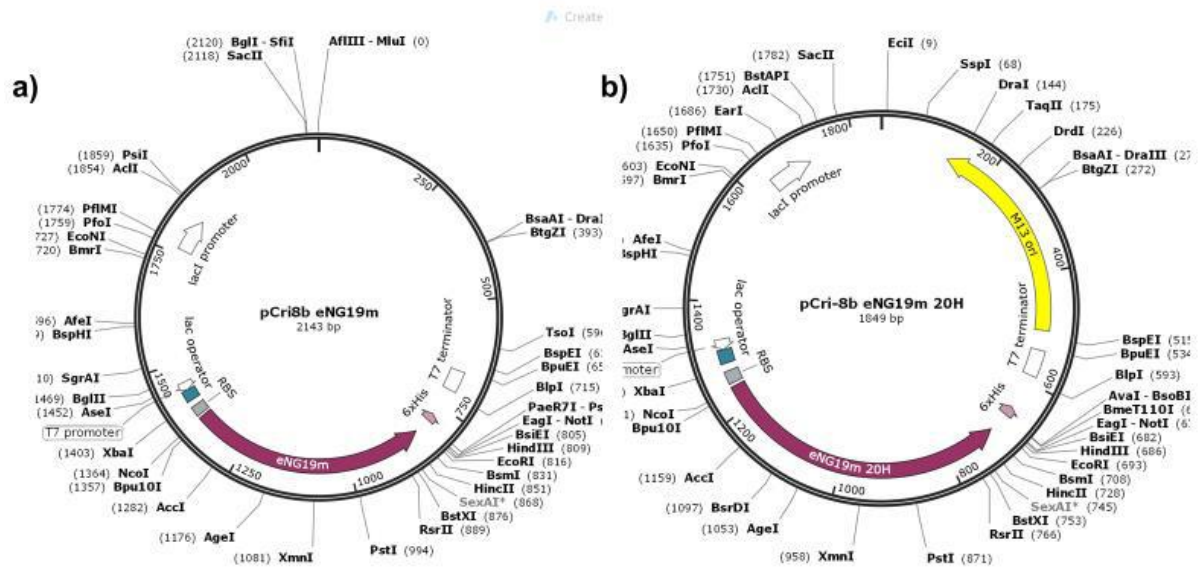
- D. Sterlin, A. Mathian, M. Miyara, A. Mohr, F. Anna, L. Claër, P. Quentric, J. Fadlallah, H. Devilliers, P. Ghillani, C. Gunn, R. Hockett, S. Mudumba, A. Guihot, C.-E. Luyt, J. Mayaux, A. Beurton, S. Fourati, T. Bruel, O. Schwartz, J.-M. Lacorte, H. Yssel, C. Parizot, K. Dorgham, P. Charneau, Z. Amoura, G. Gorochov, IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd2223 (2021).
- Elgert, C., Rühle, A., Sandner, P., & Behrends, S. (2020). Thermal shift assay: Strengths and weaknesses of the method to investigate the ligand-induced thermostabilization of soluble guanylyl cyclase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 181, 113065. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113065>
- Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Miller, C. M., Sikorski, E. E., & Ridder, G. M. (1997). Selective modulation of t cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146(1), 1–10. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1997.8218>
- Goldsby, R., Kindt, T.J., Osborne, B.A. and Kuby, J. (2003) Chapter 2: Cells and Organs of the Immune System. In: *Immunology*, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 24-56.
- Gu, T., Zhao, S., Jin, G., Song, M., Zhi, Y., Zhao, R., Ma, F., Zheng, Y., Wang, K., Liu, H., Xin, M., Han, W., Li, X., Dong, C. D., Liu, K., & Dong, Z. (2021). Cytokine Signature Induced by SARS-CoV-2 Spike Protein in a Mouse Model. *Frontiers in Immunology*, 11, 621441. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.621441/FULL>
- Hardenbrook, N. J., & Zhang, P. (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology*, 52, 123–134. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2021.11.011>
- He, Y., Qi, J., Xiao, L., Shen, L., Yu, W., Hu, T., Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. *Eng. Life Sci.* 2021, 21, 453– 460. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000106>
- Hofman, K., Shenoy, G. N., Chak, V., & Balu-Iyer, S. V. (2021). Pharmaceutical Aspects and Clinical Evaluation of COVID-19 Vaccines. *Immunological Investigations*, 50(7), 1. <https://doi.org/10.1080/08820139.2021.1904977>
- Hotez PJ, Narayan KMV. Restoring Vaccine Diplomacy. *JAMA*. 2021;325(23):2337–2338. doi:10.1001/jama.2021.7439
- Hodgson, S. H., Mansatta, K., Mallett, G., Harris, V., Emary, K. R. W., & Pollard, A. J. (2021). What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), e26–e35. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30773-8/ATTACHMENT/0A955426-1883-4C8E-83BB-7D88770E73DB/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30773-8/ATTACHMENT/0A955426-1883-4C8E-83BB-7D88770E73DB/MMC1.PDF)
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current protocols in protein science*, 79, 28.9.1–28.9.14. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459->
- Jeyanathan, M., Afkhami, S., Smaill, F. et al. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat Rev Immunol* 20, 615–632 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00434-6>
- Junt, T., Fink, K., Förster, R., Senn, B., Lipp, M., Muramatsu, M., Zinkernagel, R. M., Ludewig, B., & Hengartner, H. (2005). CXCR5-Dependent Seeding of Follicular Niches

- by B and Th Cells Augments Antiviral B Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7109–7116. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.11.7109>
- Lee, Y., Ko, E. J., Kim, K. H., Lee, Y. T., Hwang, H. S., Kwon, Y. M., Graham, B. S., & Kang, S. M. (2019). A unique combination adjuvant modulates immune responses preventing vaccine-enhanced pulmonary histopathology after a single dose vaccination with fusion protein and challenge with respiratory syncytial virus. *Virology*, 534, 1. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2019.05.010>
  - Li, W.; Moore, M.J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S.K.; Berne, M.A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T.C.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the SARS Coronavirus. *Nature* 2003, 426, 450–454, doi:10.1038/nature02145.
  - Liu, S. et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 363, 938–947 (2004).
  - Li, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454 (2003).
  - Lurie, N., Saville, M., Hatchett, R. & Halton, J. Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *N. Engl. J. Med.* 382, 1969–1973 (2020).
  - Maione, F., Casillo, G. M., Raucci, F., Salvatore, C., Ambrosini, G., Costa, L., Scarpa, R., Caso, F., & Bucci, M. (2021). Interleukin-17A (IL-17A): A silent amplifier of COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 111980. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111980>
  - Margolick JB, Markham RB, Scott AL. Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice. Chapter 10. In: Nelson KE, Masters CF, editors. The immune system and host defense against infections. Boston: Jones and Bartlett; 2006. pp. 317–43.
  - M. B. Mazanec, C. L. Coudret, D. R. Fletcher, Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J. Virol.* 69, 1339–1343 (1995).
  - M.W. Pantoliano, E.C. Petrella, J.D. Kwasnoski, V.S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B.A. Springer, P. Lane, F.R. Salemme High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery *J. Biomol. Screen.*, 6 (2001)
  - Netea M, Joosten L, Latz E, Mills K, Natoli G, Stunnenberg H, O'Neill L, Xavier R. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*.2016; 352(6284):aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098.
  - Niesen F, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols*. 2007;2(9):2212–2221.
  - Núñez-Muñoz, L., Marcelino-Pérez, G., Calderón-Pérez, B., Pérez-Saldívar, M., Acosta-Virgen, K., González-Conchillos, H., Vargas-Hernández, B., Olivares-Martínez, A., Ruiz-Medrano, R., Roa-Velázquez, D., Morales-Ríos, E., Ramos-Flores, J., Torres-Franco, G., Peláez-González, D., Fernández-Hernández, J., Espinosa-Cantellano, M., Tapia-Sidas, D., Ramírez-Pool, J. A., Padilla-Viveros, A., & Xoconostle-Cázares, B. (2021). Recombinant Antigens Based on Non- Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19. *Vaccines* 2021, Vol. 9, Page 928, 9(8), 928. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9080928>

- Pollet, J., Chen, W. H., Versteeg, L., Keegan, B., Zhan, B., Wei, J., Liu, Z., Lee, J., Kundu, R., Adhikari, R., Poveda, C., Villar, M. J., de Araujo Leao, A. C., Altieri Rivera, J., Momin, Z., Gillespie, P. M., Kimata, J. T., Strych, U., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2021). SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 17(8), 2356–2366. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1901545>
- Rendi, M. H., Muehlenbachs, A., Garcia, R. L., & Boyd, K. L. (2012). Comparative Anatomy and Histology, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00017-2>
- Rodríguez-Morales AJ, Bonilla-Aldana DK, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Sah R, Paniz-Mondolfi A, Pagliano P, Esposito S. 2020. La historia se repite: probable desbordamiento zoonótico como causa del 2019 nueva epidemia de coronavirus. *Infez Med* 28: 3-5.
- Rojas-Zuleta, W. G., & Sanchez, E. (2017). IL-9: Function, sources, and detection. *Methods in Molecular Biology*, 1585, 21–35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0\\_2/FIGURES/1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0_2/FIGURES/1)
- Sainz, B.; Rausch, J.M.; Gallaher, W.R.; Garry, R.F.; Wimley, W.C. Identification and Characterization of the Putative Fusion Peptide of the Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Spike Protein. *J. Virol.* 2005, 79, 7195–7206, doi:10.1128/JVI.79.11.7195-7206.2005.
- Schwartz, R. S. (2006). *The Immune Response: Basic and Clinical Principles* By Tak W. Mak and Mary E. Saunders. 1194 pp., San Diego, CA, Elsevier Academic Press, 2006. *New England Journal of Medicine*, 355(22). <https://doi.org/10.1056/nejmbkrev39838>
- Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021). COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, 13(2), 202. <https://doi.org/10.3390/v13020202>
- Sigal, L. J. (2016). Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections. *Encyclopedia of Immunobiology*, 4, 286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.14009-3>
- Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1998). Interleukin 4. *Encyclopedia of Immunology*, 1451–1453. <https://doi.org/10.1006/RWEI.1999.0368>
- Sun, L., Li, P., Ju, X., Rao, J., Huang, W., Ren, L., Zhang, S., Xiong, T., Xu, K., Zhou, X., Gong, M., Miska, E., Ding, Q., Wang, J., & Zhang, Q. C. (2021). In vivo structural characterization of the SARS-CoV-2 RNA genome identifies host proteins vulnerable to repurposed drugs. *Cell*, 184(7), 1865–1883.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.008>
- Tai, W., He, L., Zhang, X., Pu, J., et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol. Immunol.* 2020, 17, 613–620.
- Wang L.-F., Shi Z., Zhang S., Field H., Daszak P., Eaton B.T. Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:1834–1840. doi: 10.3201/eid1212.060401.
- World Health Organization WHO Director-General’s Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19–11 March 2020, fecha de consulta 27 de julio de 2021; <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

- Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27:325–328.
- WHO. (2022) Tracking SARS-CoV-2 variants, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Enero 12.
- World Health Organisation, Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. 2016. [https://www.who.int/biologicals/BS2287\\_Clinical\\_guidelines\\_final\\_LINE\\_NOs\\_20\\_July\\_2016.pdf](https://www.who.int/biologicals/BS2287_Clinical_guidelines_final_LINE_NOs_20_July_2016.pdf). Acceso 13 enero 2022.
- Yang, S., Wang, J., Brand, D. D., & Zheng, S. G. (2018). Role of TNF-TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 784. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00784/BIBTEX>

**Anexo 1.** Los antígenos Wuhan y Alfa-Beta fueron tomados de Núñez., et al. 2021. Las condiciones de expresión y purificación de estos antígenos fueron descritas por Olivares-Martínez 2021.



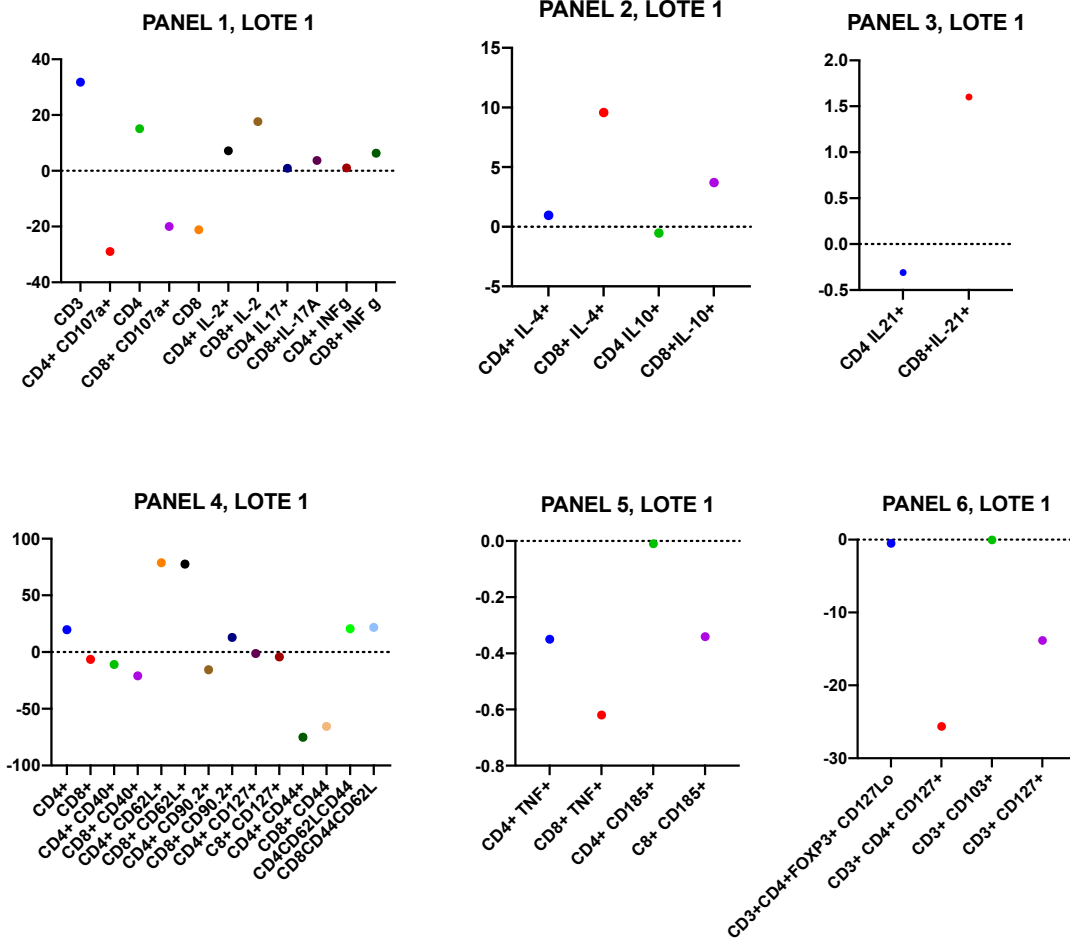
**Anexo 2.** Descripción de citocinas medidas en linfocitos.

	Abreviación	Citocina	Número de Catálogo
<b>Citocinas intracelulares</b>	IL-2	APC Rat Anti-mouse IL-2	554429
	TNF	PE Rat Anti-Mouse TNF	554419
	INF-g	PE-CyTM7 Rat Anti-Mouse INF-g	557649
	IL-4	Alexa Fluor 488 Rat Anti-Mouse IL-4	557728
	IL-10	PE Rat Anti-Mouse IL-10	554467
	FOX P3	Alexa Fluor 488 Rat Anti-Mouse Foxp3	560403
	IL-17a	PE-CF594 Rat-Mouse IL-17A	562542
	CD107a	FITC Rat Anti-Mouse CD107a	553793
	IL-21	PE Rat anti-Mouse CD360 (IL-21 Receptor)	558607
	CD185	PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD185 (CXCR5)	562856
	CD90.2	APC-CyTM 7 Rat Anti-Mouse CD90.2	561641
	CD127	PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD127	562419
	CD44	PE-CyTM5 Rat Anti-Mouse CD44	553135
	CD8a	V500 Rat anti-Mouse CD8a	560778

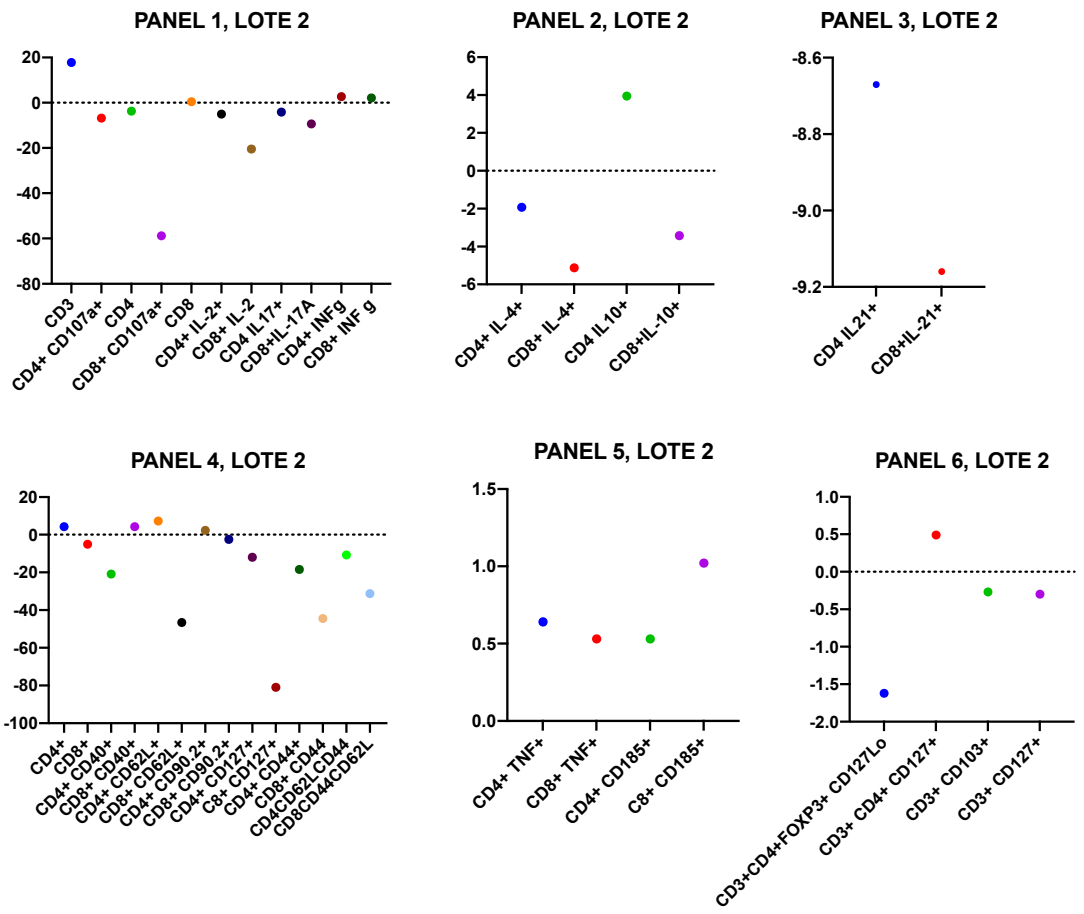


<b>Citocinas de superficie</b>	CD3	PE Rat Anti-Mouse CD3 Molecular Complex	555275
	CD62L	Alexa Fluor 700 Rat Anti-Mouse CD62L	560517
	CD103	PerCP-CyTM5.5 Rat-Anti-Mouse CD103	563637
	CD40	Alexa Fluor 647 Hamster Anti-Mouse CD40	563638

**Anexo 3.** Paneles de citocinas medidas en la activación de esplenocitos.



Para el cálculo de las concentraciones de las citocinas de los diferentes paneles, los resultados de los controles no inmunizados y no estimulados se restaron a las muestras reestimuladas.



**Anexo 4. Órganos de ratón observados macroscópicamente**

