



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Identificación de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-
CoV-2 en suero y su relación con anticuerpos específicos contra
la proteína S1”

Tesis que presenta

QBC. Leonardo Cisneros González

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de tesis: Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Ciudad de México

Septiembre, 2022

ASESORES

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular y Coordinadora Académica del Departamento de
Biomedicina Molecular

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

Investigador Titular y Jefe del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Agradezco al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca que me permitió completar mi posgrado (CVU 1078875).

Agradezco al Fondo Conjunto de Cooperación México-Uruguay (convocatoria 2018) por el apoyo recibido para el proyecto “Generación y aplicación de herramientas serológicas, moleculares y rastreo de contactos y movilidad, en 6 hospitales y 3 entidades de México, para el estudio, mitigación y contención de la epidemia de COVID-19”.

Agradezco a Víctor Rosales y a su equipo de trabajo por la asesoría, reactivos y equipos para poder realizar la determinación de anticuerpos neutralizantes en su laboratorio.

Agradezco a la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN y a su laboratorio por donar la proteína recombinante S1.

“—De gente bien nacida es agradecer los beneficios que reciben, y uno de los pecados que más a Dios ofende es la ingratitud.”

Don Quijote de la Mancha». Primera parte. Capítulo XXII

Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Doc. Porque siempre apoyó mi desarrollo científico desde mis estancias de verano hasta mi posgrado, por corregirme siempre con la intención de ser mejor investigador y persona, por escucharme con atención cada que necesitaba hablar con él y por haber sido un padre académico para mí.

Agradezco a Carlos, por haber sido mi mayor mentor en el laboratorio diseñando y ejecutando los experimentos, sin embargo, le agradezco más por convertirse en mi amigo y permitirme tener todas las convivencias que disfrutamos a lo largo del posgrado.

De igual manera, quiero agradecer a mis compañeros Miza, Diana y Nelly por apoyarme en la discusión y diseño de los experimentos; sin sus consejos claramente la discusión no hubiera sido tan enriquecedora. Quiero de igual forma agradecerles por haberme recibido con gran alegría y calidez una vez me incorporé al lab, sin duda hicieron mi estancia más pasajera.

Al Doc Hector, por poner a mi disposición todos los reactivos que necesité, por apoyarme con datos esenciales del proyecto y enseñarme a utilizar los equipos del laboratorio.

A mis compañeros de generación, Sandra, Nelly, Anna y Guillermo, por mantener una energía de compañerismo y apoyarnos a lo largo de los bajones de las materias.

Finalmente, quiero agradecer a mi compañera sentimental, Vanessa. Por estar ahí apoyándome de la manera que lo necesitara. Por aceptarme y estar el uno para el otro a pesar de la distancia. Aunque nada asegura que continúe nuestra historia, tu estuviste acompañándome en esta etapa y se hace justicia mencionarte.

Gracias a todos :)

Dedicatorias

A mis padres, que sin ellos jamás estuviera escribiendo estas palabras. Por el esfuerzo de criar una familia de la manera que lo hicieron, siempre priorizando nuestro bienestar sobre sus necesidades. Por el incondicional apoyo moral y económico, por vernos siempre con orgullo. Los amo.

A mis hermanos, Santiago y Mauricio, que siempre nos alegramos cuando uno cumple sus proyectos. Por hablarnos con sinceridad y regañarnos si es necesario.

Lista de figuras y tablas

Figura 1. Organización genómica del SARS-CoV-2.....	3
Figura 2. Organización estructural de la proteína S y sus dominios.....	4
Figura 3. Modelo estructural y características de la proteína ACE2.....	5
Figura 4. Cambios conformacionales de la proteína S durante el ingreso al hospedero.....	6
Figura 5. Dos vías distintas de entrada de SARS-CoV-2.....	7
Figura 6. Ciclo viral del SARS-CoV-2.....	8
Figura 7. Respuesta inmune contra SARS-CoV-2.....	11
Figura 8. Funciones efectoras de los anticuerpos.....	12
Figura 9. Las bacterias <i>E. coli</i> transformadas adquirieron el plásmido de interés.....	23
Figura 10. La proteína ACE2-myc transmembranal se expresa principalmente en los lisados celulares.....	23
Figura 11. La proteína ACE2-IgG soluble puede identificarse hasta 5 días PT.....	24
Figura 12. La proteína ACE2-IgG soluble es capaz de unirse a la proteína recombinante S1.....	25
Figura 13. WB de las proteínas concentradas con sulfato de amonio.....	26
Figura 14. El concentrado de la proteína recombinante ACE2 se une a la proteína recombinante S1.....	26
Figura 15. Las personas de los grupos “hospitalizados graves” y “vacunados” presentan anticuerpos neutralizantes.....	27
Figura 16. Las personas de los grupos “no grave” y “vacunado” presentan la mayor cantidad de anticuerpos anti-S1.....	28
Figura 17. Los grupos “hospitalizados graves” y “vacunados” generan nAbs a medida que se producen abs anti-S1.....	29

Figuras suplementarias

Figura S1. Elementos que integran el kit de neutralización de la casa BioLegend.....	38
--	----

Figura S2. La generación de una curva estándar nos permite identificar la concentración de nAbs y la MFI emitida en diferentes puntos de la curva 38

Figura S3. Curva estándar graficada en concentración por MFI 39

Figura S4. Diferentes poblaciones de la curva estándar 39

Abreviaturas

Aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ACE/ACE2	Angiotensin-converting enzyme/2
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
H	Horas
HG	Hospitalizados Graves
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
L/mL	Litro/Mililitro
Min	Minutos
MFI	Mean fluorescence intensity
nAb	Anticuerpo neutralizante
NG	No grave
NSP	Non structural protein
ORF	Open reading frame
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer de Fosfatos
PP	Prepandémico
RNA/gRNA/sgRNA	Ribonucleic acid/genomic/subgenomic
SARS-CoV/SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus/2
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
V	Vacunados
Vo	Voltios/Voltaje
WB	Western Blot
°C	Grado centígrado

Índice

I.	RESUMEN	
.....		1
II.	SUMMARY	
.....		2
III.	INTRODUCCIÓN	
.....		3
Antecedentes y generalidades estructurales del SARS-CoV-2.....		3
S y ACE2 son proteínas topológicamente similares que pueden interaccionar formando trímeros o dímeros, respectivamente.....		4
SARS-CoV-2 puede entrar a las células del hospedero por dos vías distintas dependientes de ACE2.....		5
Ciclo viral del SARS-CoV-2.....		7
Manifestaciones clínicas y transmisión del SARS-CoV-2		9
Respuesta inmune contra el SARS-CoV-2		10
IV.	JUTIFICACIÓN	
.....		13
V.	HIPÓTESIS	
.....		14
VI.	OBJETIVOS	
.....		15
Objetivo general.....		15
Objetivos específicos.....		15
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	
.....		16
Obtención de bacterias competentes		16
Vectores de expresión para ACE2		16
Obtención y crecimiento de bacterias transformadas.....		16
Extracción y digestión del DNA plasmídico.....		17
Cultivo de células HEK293		17

Transfección de células HEK293 con vectores de expresión para ACE2 pCEP4-myc-ACE2 y pcDNA3-sACE2-WT (732)-IgG1	18
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	18
Ensayos de Western blot	19
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	19
Proteína S1.....	20
Ensayo de unión	20
Concentración por Sulfato de amonio	20
Determinación de anticuerpos neutralizantes	21
VIII.	RESULTADOS
.....	22
1. Amplificación del DNA plasmídico.....	22
2. Producción de la proteína recombinante ACE2-myc y ACE2-IgG.....	23
3. Ensayo de unión de ACE2-IgG con S1	24
4. Concentración de la proteína ACE2	25
5. Determinación de anticuerpos neutralizantes en 4 grupos distintos	26
6. Determinación de anticuerpos anti-S1 en 4 grupos distintos.....	28
7. Análisis de correlación de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos anti-S1 en los 4 grupos.....	28
IX.	DISCUSIÓN
.....	30
1. Las proteínas recombinantes ACE2-myc y ACE2-IgG se expresan en sistemas eucariontes	30
2. La proteína recombinante ACE2-IgG es capaz de unirse a la subunidad S1 de la proteína del SARS-CoV-2	30
3. Las personas con síntomas graves y vacunados presentan el mayor título de anticuerpos neutralizantes	30
4. La correlación en la producción de abs anti-S1 y nAbs está determinada por la gravedad de la enfermedad y su vacunación	31
X.	CONCLUSIONES
.....	32
XI.	PERSPECTIVAS
.....	33

XII.	BIBLIOGRAFÍA
.....	34
XIII.	IMÁGENES SUPLEMENTARIAS
.....	38

I. RESUMEN

La enfermedad de la COVID19 ha afectado a toda la población mundial. La COVID19 puede presentarse asintomática, con síntomas leves o derivar hasta una enfermedad grave. El agente causal de la COVID19 es un coronavirus denominado SARS-CoV-2 (del inglés severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), quien comienza su infección gracias a la unión de la subunidad S1 en la membrana del virus con su receptor ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) en las células humanas. Las personas infectadas pueden generar una respuesta humoral específica contra la subunidad S1 con diferentes funciones efectoras, entre ellas el bloqueo de la unión S1-ACE2 por anticuerpos neutralizantes. En el presente trabajo se encontró que las personas hospitalizadas graves y las personas vacunadas, en claro contraste con las personas con una infección leve, producen más anticuerpos neutralizantes correlacionado con una mayor presencia de anticuerpos anti-S1. Estos hallazgos nos podrían ayudar a entender las condiciones que favorecen una respuesta con anticuerpos neutralizantes en la respuesta inmunológica contra este virus.

II. SUMMARY

The COVID19 disease has affected the entire world population. COVID19 can present asymptotically, with mild symptoms, or lead to severe illness. The causal agent of COVID19 is a coronavirus called SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), which begins its infection thanks to the union of the S1 subunit in the virus membrane with its receptor ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) in human cells. Infected individuals can generate a specific humoral response against the S1 subunit with different effector functions, including blocking the S1-ACE2 binding by neutralizing antibodies. In the present work, it was found that seriously hospitalized and vaccinated people, in contrast to people with a mild infection, produce more neutralizing antibodies correlated with a more significant presence of anti-S1 antibodies. These findings could help us understand the conditions that favor response with neutralizing antibodies in the immune response against this virus.

III. INTRODUCCIÓN

Antecedentes y generalidades estructurales del SARS-CoV-2

A finales de diciembre de 2019, surgió una nueva enfermedad en personas que presentaron síntomas parecidos a una neumonía. Estos primeros casos fueron asociados a su visita en un mercado local de mariscos en la ciudad de Wuhan, China. Sin embargo, se desconocía el agente etiológico [1]. Para enero de 2020 se lograría secuenciar el genoma de este germen y se reconocería como un nuevo coronavirus [2]. Finalmente, un mes después se nombraría al agente causal como SARS-CoV-2 (por sus siglas en inglés, *severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*) y a la enfermedad provocada por este virus como COVID-19 (corona-virus disease 19 representa el año en que surgió la enfermedad) [3, 4].

La secuenciación del genoma del SARS-CoV-2 le permitió a la comunidad científica entender con mayor facilidad la naturaleza de este coronavirus. SARS-CoV-2 es un virus envuelto, en su interior se encuentra un RNA genómico (gRNA) de polaridad positiva de cadena sencilla con una longitud de alrededor 30 kilobases (Fig. 1) [5]. En su extremo 5' podemos encontrar 2 unidades transcripcionales importantes, ORF1a y ORF1ab que codifican para las poliproteínas PP1a y PP1ab, las cuales darán origen a las proteínas no estructurales (NSPs, del inglés, nonstructural proteins) necesarias para formar los complejos de transcripción-replicación. Por otro lado, en el extremo 3' se encuentran 9 marcos de lectura abierto putativos que codifican para proteínas accesorias involucradas en la virulencia e interacción con moléculas del hospedero en otros coronavirus [9]; además de intercalarse 4 proteínas estructurales del SARS-CoV-2: nucleocápside (N), membrana (M), envoltura (E) y espiga (S) (Fig. 1) [6].

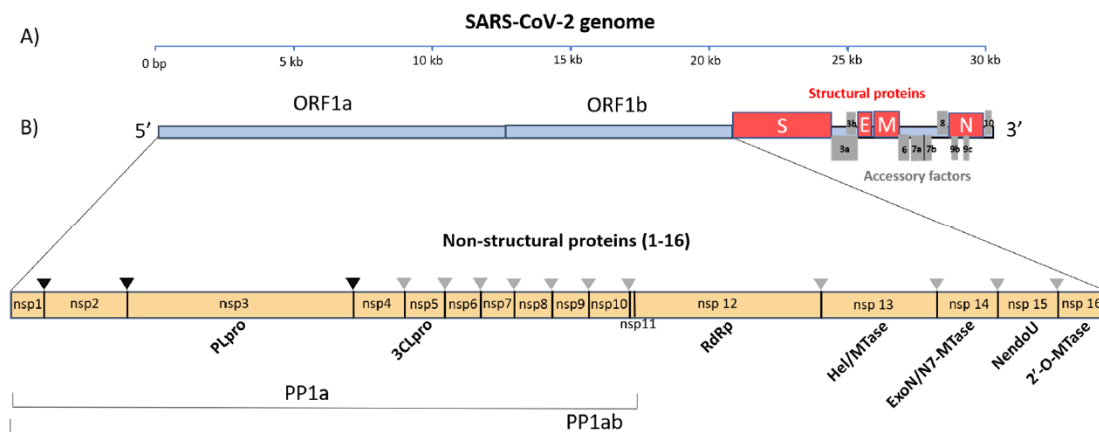


Figura 1. Organización genómica del SARS-CoV-2. (A) Longitud de genoma del SARS-CoV-2. (B) La poliproteína 1ab abarca 16 NSPs; los triángulos negros y grises indican los sitios de

escisión de las proteasas PLpro y 3CLpro, respectivamente. Se indican asimismo los nombres de los dominios funcionales putativos y confirmados en las NSPs. Recuperado de [6].

Las proteínas estructurales son fundamentales ya que forman parte de la partícula viral madura y perfectamente ensamblada. Por ejemplo, la proteína N se encuentra unida al gRNA ayudando al empaquetamiento del material genético, además de ser altamente inmunogénica [7, 8]. Por su parte, la envoltura viral está constituida por las proteínas E, M y S. La proteína M es la más grande de todas y se encuentra embebida en la membrana viral permitiendo curvarse durante su salida del hospedero [10]. La proteína E es la más pequeñas de todas y se ha reportado que oligomeriza y forma canales iónicos [11], asociando así la patogénesis de SARS-CoV-2 con esta proteína [12]. La proteína S además de ayudar al ensamblaje del genoma viral [13] y darle el aspecto de “picos de corona”, es la proteína responsable de reconocer a su receptor en su hospedero, la *angiotensin converting enzyme 2* (ACE2). [14].

S y ACE2 son proteínas topológicamente similares que pueden interaccionar formando trímeros o dímeros, respectivamente.

S es una proteína transmembranal de tipo I de aproximadamente 1300 aminoácidos (aa) y se divide en 2 subunidades: S1 y S2. La subunidad S1 se une con su receptor (ACE2) en la célula huésped, a través de su dominio *receptor binding domain* (RBD); y la subunidad S2 promueve la fusión de la membrana viral con la membrana celular (Fig. 2) [15]. S es una proteína con 26 sitios de glicosilación que le permite evadir la respuesta del sistema inmune además de participar en el proceso de unión con ACE2 y la fusión de las membranas [16, 23]. Esta glicoproteína se asocia con otras dos proteínas S, formando así homotrímeros que se expresarán en la envoltura viral [21].

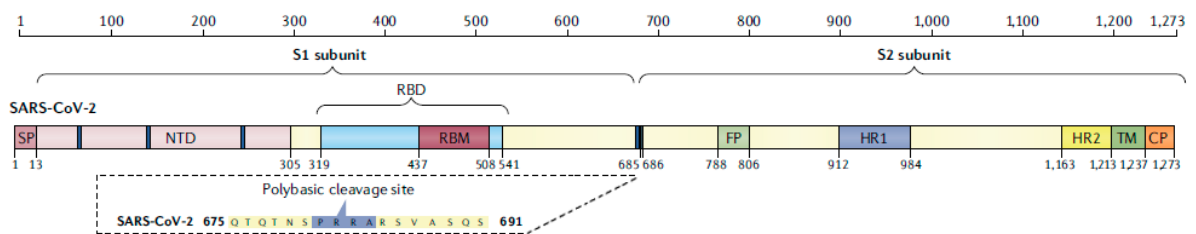


Figura 2. Organización estructural de la proteína S y sus dominios. La subunidad S1 abarca los dominios péptido señal (SP), N-terminal (NTD) y un dominio de unión al receptor (RBD) que a su vez contiene un motivo de unión al receptor (RBM). La subunidad S2 tiene los siguientes dominios: péptido de fusión (FP), repetidos heptados 1/2 (HR1 / HR2), región transmembranal (TM) y cola citoplásmica (CT). Ambas subunidades están divididas por un sitio polibásico de escisión (RRAR) susceptible a furinas. Los números indican la posición de los aa. Recuperado de [15].

ACE2 también es una proteína transmembranal de tipo I de 805 aa [17]. Esta es una metaloproteasa que participa regulando el volumen sanguíneo y la resistencia vascular en el sistema renina-angiotensina al degradar un vasoconstrictor (angiotensina II) hacia un vasodilatador (angiotensina 1-7) [18]. ACE2 puede asociarse para formar homodímeros a través de su región globular [19] y además puede secretarse de forma soluble gracias a los cortes de proteasas como disintegrinas y metaloproteína 17 (Fig. 3 A) [22]. La expresión de esta metaloproteasa es un poco más restringida que su homólogo ubicuo ACE, y se encuentra en varios órganos como riñón, corazón, testículos, pulmón, intestino, riñón y endotelio (Fig. 3 B) [20]. Sin embargo, el reciente interés de la comunidad científica se debe a que ACE2 es el receptor para el SARS-CoV-2, siendo así, el paso inicial para la infección al hospedero.

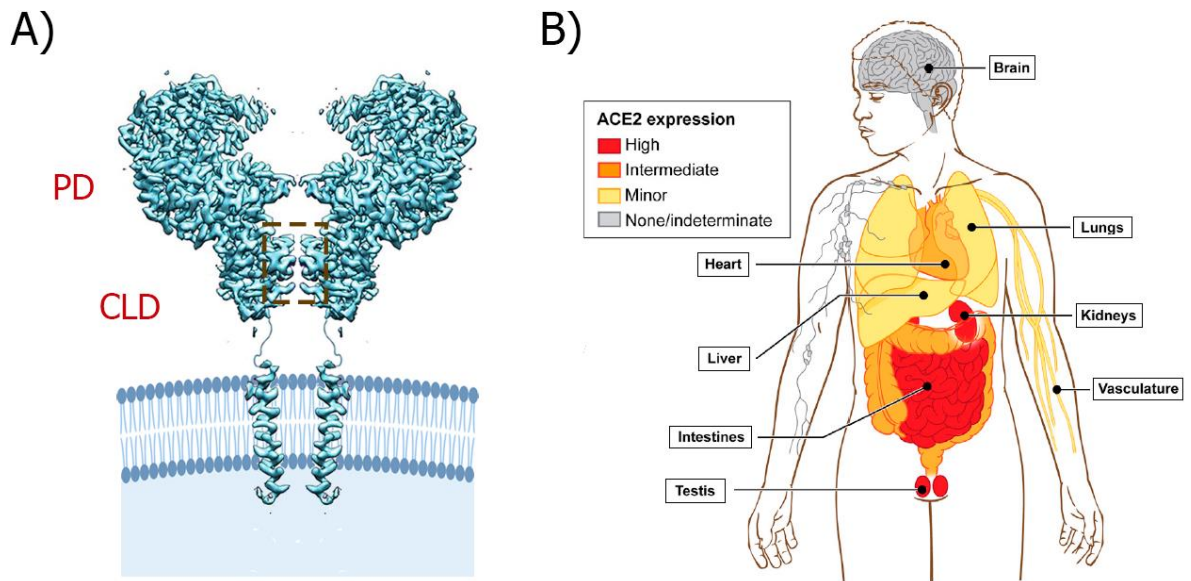


Figura 3. Modelo estructural y características de la proteína ACE2. A) La proteína ACE2 tiene un dominio peptidasa (PD, aa 19 a 615) en el extremo amino terminal donde reside su actividad enzimática; adicionalmente existe un segundo dominio parecido a citrulina (CLD, aa 616 a 768) que tendrá un pequeño motivo extracelular, un “linker” largo, un dominio transmembranal y ≈ 40 residuos intracelulares. La región “cuello” (café) es la principal responsable de la formación de homodímeros de ACE2 y se encuentra entre los dominios PD y CLD. B) Abundancia de la expresión de ACE2 en los distintos órganos. Recuperado y adaptado de [19 y 20].

SARS-CoV-2 puede entrar a las células del hospedero por dos vías distintas dependientes de ACE2.

Actualmente se han descrito dos rutas de entrada para la infección del SARS-CoV-2 en humanos. En la primera vía, la proteína S debe encontrarse en un estado

energéticamente estable para posteriormente sufrir arreglos conformacionales que le permitan activarse y unirse a la membrana celular. Esta primera transición hacia un estado “metaestable” ocurre cuando las subunidades S1 y S2 se separan gracias al corte de una furina en el sitio polibásico de escisión. Este rompimiento le permitirá a S1 exponer su dominio RBM y así interactuar con el ACE2 más cercano. Una vez establecida la unión entre S1 y su receptor, la proteasa del hospedero TMPRSS2 (del inglés *transmembrane protease, serine 2*) realizará un nuevo corte en un sitio denominado S2', río arriba del dominio FP. Este segundo corte le permitirá a la subunidad S2 exponer aa no polares previamente ocultos en FP y sufrir arreglos conformacionales que alargarán la estructura de S2. Durante estos cambios estructurales S1 será escindida y FP podrá interactuar con la membrana más cercana gracias a los aa hidrofóbicos, comenzando así con la formación de un poro de fusión entre la membrana viral y celular (Fig. 4) [24]. Una vez completado este proceso el material genético del virus será depositado en la célula hospedera.

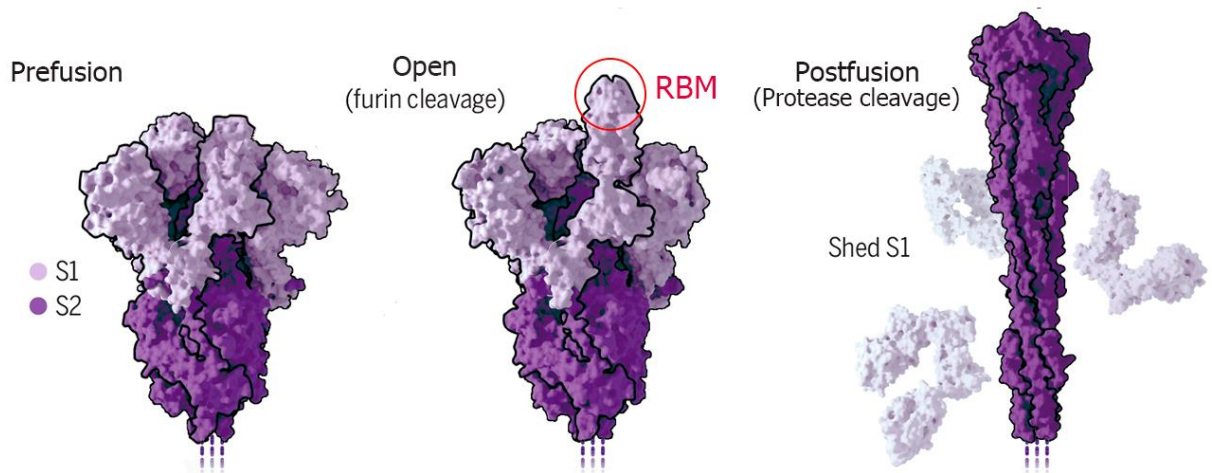


Figura 4. Cambios conformacionales de la proteína S durante el ingreso al hospedero. La proteína S, específicamente la subunidad S1, puede sufrir cortes por proteasas como la furina pasando de una conformación cerrada a una abierta durante la maduración del virus en una célula infectada. Este evento le permite a la subunidad S1 exponer su dominio (receptor binding motif) RBM y entonces unirse con su receptor ACE2. Una vez establecida la interacción con su receptor, la subunidad S2 sufre otro corte río arriba de FP que le permitirá alargarse y alcanzar a la membrana celular más próxima, comenzando así la fusión entre membranas. Recuperado de [25].

TMPRSS2 no es la única proteasa que puede cortar en S2'. Una vez establecida la unión S-ACE2, el virus puede ser internalizado por endocitosis mediada por clatrina. Durante la formación del endolisosoma tardío una nueva proteasa del hospedero (catepsina L) realizará el corte en el sitio S2' y fusionará su membrana con la del hospedero, depositando así su material genético (Fig. 5) [24]. Es importante

mencionar que la infección por endocitosis de este coronavirus es un proceso lento además que puede ser reconocido por proteínas antivirales, de aquí la preferencia de SARS-CoV-2 por la primera vía siempre que TMPRSS2 se exprese. Por último, si S no ha sido previamente cortada por furina, pasarán por alto TMPRSS2 y entrará por la vía endosomal [26].

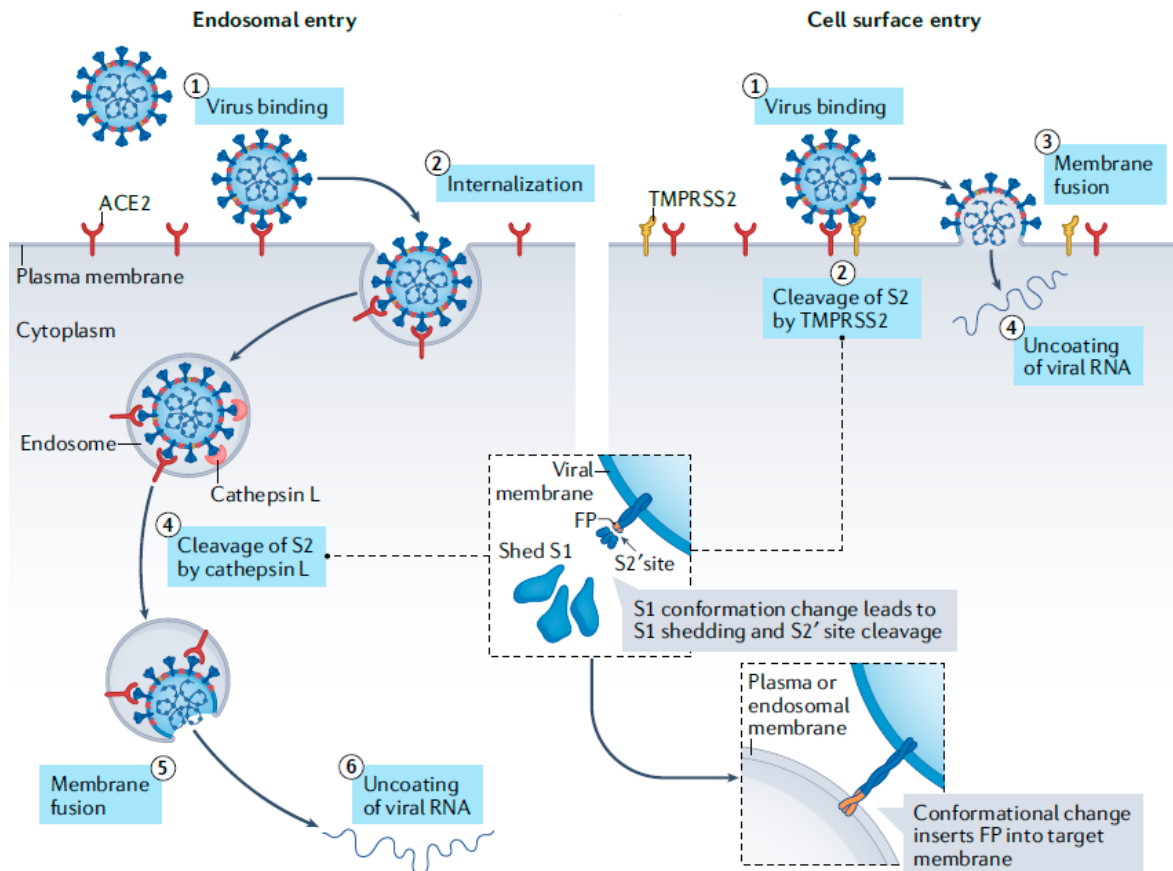


Figura 5. Dos vías distintas de entrada de SARS-CoV-2. Izquierda: si un complejo virus-ACE2 no encuentra a TMPRSS2 o se expresa insuficientemente, el complejo virus-ACE2 se internaliza mediante endocitosis mediada por clatrina en los endolisosomas, donde la escisión de S2' la realizan las catepsinas en un ambiente ácido. Derecha: en presencia de TMPRSS2, la escisión de S2' se produce en la superficie celular. Recuperado de [24].

Ciclo viral del SARS-CoV-2

Una vez depositado el material genético del virus en la célula, su RNA será traducido a las poliproteínas de replicación-transcripción viral gracias a la maquinaria de la célula. Estas poliproteínas en el citosol serán escindidas a NSPs individuales por proteasas virales y del hospedero (PLpro y 3CLpro) y se dirigirán al retículo endoplasmático (RE) para la replicación del gRNA y transcripción de los RNAs subgenómicos (sgRNA); estos últimos se traducirán en las proteínas estructurales y accesorias. Posterior a la producción de las proteínas en el RE, estas biomoléculas

serán transportadas en lisosomas o en los compartimentos intermedios del RE-Golgi (ERGIC) donde se formarán los viriones (Fig. 6). Una vez ensamblados y de camino a su salida, el SARS-CoV-2 sufrirá un último evento por la acción de una furina en el sitio polibásico de escisión, esto es de gran importancia ya que preparará a la subunidad S1 para la unión con su receptor [26, 27]. Una vez expulsado el virus podrá invadir más células del hospedero, el cual comenzará a presentar diversos síntomas que podrán sugerir la infección por SARS-CoV-2.

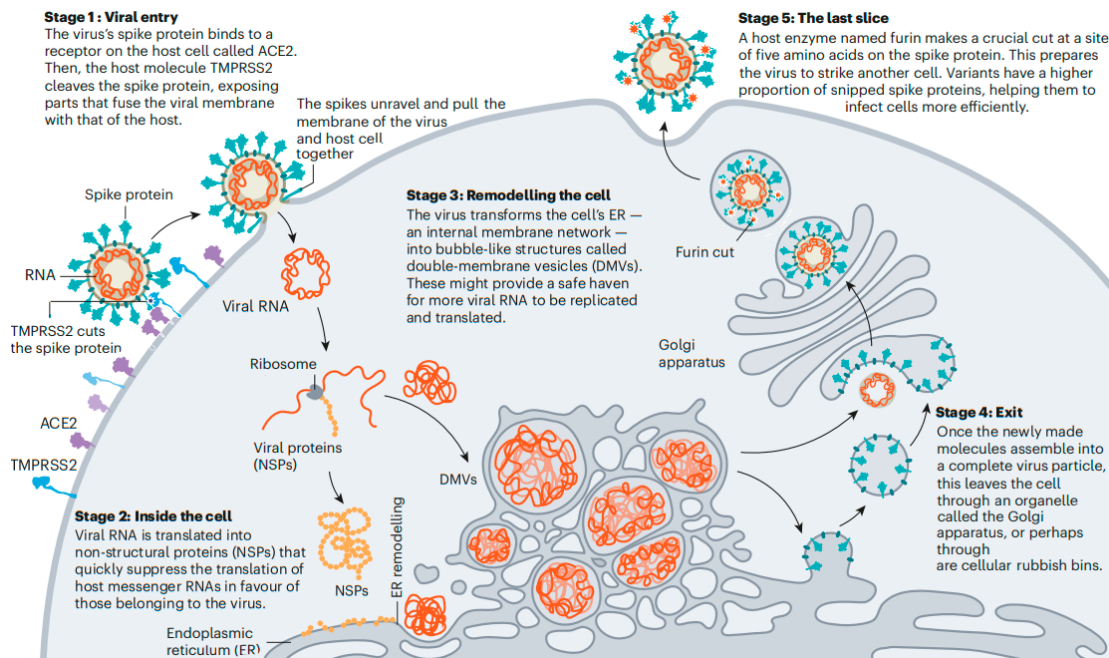


Figura 6. Ciclo viral del SARS-CoV-2. El ciclo viral del SARS-CoV-2 puede dividirse en varias etapas: la primera es el proceso de reconocimiento que se describió en los dos párrafos anteriores. Una vez depositado el material genético del SARS-CoV-2, este traducirá sus marcos de lectura ORF1a y ORF1ab en los ribosomas para sintetizar las NSPs. Estas proteínas son muy importantes ya que ayudan a la eficiencia de traducción de proteínas virales y a retrasar la respuesta del sistema inmune (NSP1). Sin embargo, su papel más importante es la formación de complejos de replicación-transcripción en el RE. Para este propósito, el virus se apodera y remodela al RE en vesículas de doble membrana (DMVs del inglés, double membrane vesicles) utilizándolos como sitios de replicación y transcripción libres de la respuesta inmune de la célula. Una vez producidos los gRNA durante la replicación y las proteínas estructurales y accesorias en la transcripción de los sgRNA, se comenzará con el ensamblaje de los viriones y su transporte ya sea por ERGIC o en lisosomas para su salida. Justo antes de su expulsión, la proteína S sufrirá un corte por furina que preparará al virus para la infección de nuevas células. Recuperado de [26].

Manifestaciones clínicas y transmisión del SARS-CoV-2

Aún no es posible establecer las manifestaciones clínicas específicas de la COVID-19, sin embargo, sí se han asociado algunos síntomas. Las manifestaciones para la enfermedad van desde personas asintomáticas hasta enfermedad leve, severa y crítica. Los signos más comunes para pacientes hospitalizados son fiebre, tos seca, dificultad para respirar, fatiga y dolor de cabeza; otros síntomas menos comunes son problemas gastrointestinales, olfatorios, gustativos y trombóticos, entre otros [28]. Para las personas que presentan un cuadro crítico se ha reconocido que las complicaciones más importantes son la neumonía severa y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS del inglés, Acute respiratory distress syndrome) que eventualmente pueden llegar a la muerte del paciente [29]. La población de riesgo son las personas de la tercera edad, en parte, atribuible a trastornos crónicos subyacentes y a una función inmunológica disminuida. Por otro lado, los niños se ven menos afectados debido a la mayor cantidad de anticuerpos, una menor exposición previa al virus y niveles relativamente bajos de citocinas inflamatorias [30]. Finalmente, los factores de riesgo más importantes para desarrollar una manifestación crítica de la COVID-19 son hipertensión, obesidad, diabetes, entre otros [31]. La tos será uno de los síntomas más significativos ya que será la principal forma de expulsión del virus y su transmisión.

Al igual que todos los virus respiratorios, el SARS-CoV-2 se transmite por el aire. De esta manera, una persona puede contagiarse de estos virus por aerosoles, gotas o fomites. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. han reconocido oficialmente la inhalación de aerosoles cargados de virus como el principal modo de transmisión de la COVID-19 a corto y largo alcance [31, 32]. Estos aerosoles son partículas de <5 µm que pueden mantenerse suspendidas en el aire hasta 5 m de distancia. Estas partículas pueden ser generadas en varias actividades espiratorias como respirar, hablar e importantemente, toser. Una vez inhaladas estas partículas por un sujeto sano, estas se depositarán en las vías respiratorias superiores y las regiones alveolares de los pulmones para la infección del hospedero. Finalmente, este virus será expulsado en aerosoles para repetir el ciclo de transmisión: transporte al aire, inhalación por un hospedero susceptible, depositado en el tracto respiratorio, infección y expulsión en aerosoles [33]. Algunas de las recomendaciones para frenar la rapidez con la que infecta este virus es el uso del cubrebocas, estar en espacios abiertos, ventilados, filtrados del aire y la desinfección con UV [33].

Respuesta inmune contra el SARS-CoV-2

Una vez que el SARS-CoV-2 infecta las células del epitelio alveolar pulmonar, estas comenzarán a liberar patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés, damage-associated molecular patterns) como pueden ser ácidos nucleicos. Estos DAMPs serán reconocidos por células epiteliales adyacentes y dispararán entonces citocinas inflamatorias y quimiocinas, las cuales atraerán a macrófagos al sitio de infección fagocitando así a las células infectadas. Estos macrófagos, al igual que las células dendríticas, presentarán al virus en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés, major histocompatibility complex) a las células T. Las células T CD8+ reconocerán al MHC comenzando así una respuesta citotóxica para eliminar células infectadas con este virus. Por otro lado, los linfocitos T CD4+ reconocerán los antígenos presentados en el MHCII y podrán polarizarse a una población Th1 y ayudar a los linfocitos T citotóxicos o células NK a eliminar al virus, o también pueden diferenciarse a células T de memoria. Además de la población Th1, los linfocitos T CD4+ también pueden polarizarse a células Th2 y ayudar a la diferenciación de una célula B (previamente activada) hacia una célula de memoria o plasmática (Fig. 7) [34].

Los anticuerpos son los efectores de la respuesta humoral y serán producidos por las células plasmáticas. Estos anticuerpos tendrán una gran variedad de funciones efectoras como se muestra en la figura 8. Por ejemplo, los anticuerpos pueden activar la vía clásica del complemento al unirse a los microbios y ser reconocidos por C1; este evento es de gran importancia ya que puede ayudar a la eliminación del microbio de 3 formas distintas: 1) promoviendo la fagocitosis, ya que C3b unido a la membrana del microbio servirá como opsonina y podrá ser reconocido por un fagocito con su receptor específico; 2) se estimula el reclutamiento leucocitario al obtener los productos proteolíticos C5a, C3a y C4a los cuales promueven la inflamación y 3) generan la lisis de bacterias formando un complejo de ataque a la membrana (MAC por sus siglas en inglés, membrane attack complex). Otro de los mecanismos efectores es la unión de los anticuerpos sobre la superficie del germen, este anticuerpo será reconocido por un receptor específico (FcγRIII) en las células NK y eliminará al microbio por mecanismos citotóxicos. De forma parecida, los anticuerpos (IgG) pueden promover la fagocitosis al opsonizar al microbio y ser reconocidos por un receptor específico (FcγRI) de los fagocitos. Finalmente, los anticuerpos tienen también la capacidad de neutralizar la infección del germen al unirse a éste, evitando así la infección de las células del hospedero [35]. Este último mecanismo efector es importante para SARS-CoV-2 ya que se ha documentado la participación de este tipo de anticuerpos, relacionando su presencia con el grado de protección inmunitaria y éxito en las vacunas [36].

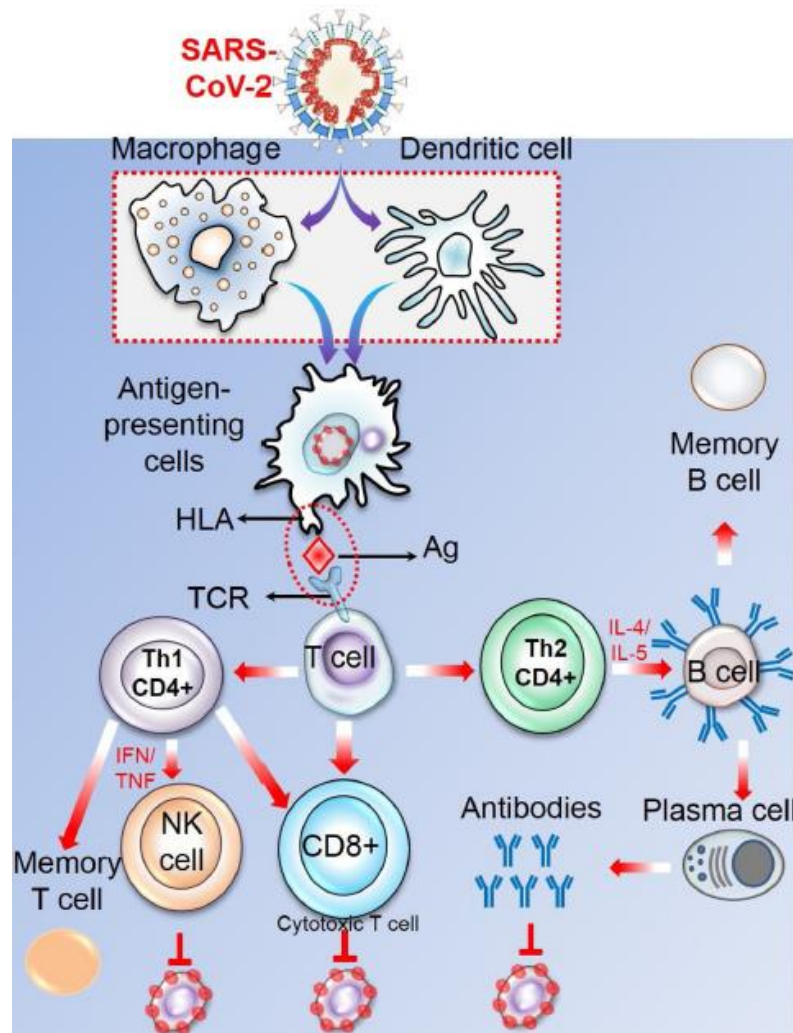


Figura 7. Respuesta inmune contra SARS-CoV-2. Una vez establecida la infección del SARS-CoV-2 en las células del hospedero, estas serán reconocidas por macrófagos o células dendríticas a través de PAMPs/DAMPs y serán presentadas a las células T. Las células T ayudarán tanto en la respuesta citotóxica para eliminar al germen, así como en la respuesta humoral para generar células plasmáticas de larga vida, con cambio de isotipo y recombinación somática. Esta activación T-dependiente de la célula B también generará células B de memoria. Recuperado de [34].

Los anticuerpos neutralizantes (nAbs del inglés, neutralizing antibodies) contra SARS-CoV-2 tienen diferentes mecanismos de acción de acuerdo al sitio reconocido. Generalmente estos anticuerpos están dirigidos contra la proteína S, y su clasificación será en relación con el dominio al que estén dirigidos. Por ejemplo, existen anticuerpos dirigidos al dominio NTD con gran capacidad neutralizante. Asimismo, también se han descrito nAbs para la subunidad S2, específicamente en el dominio FP. Estos nAbs se unirán a este dominio FP una vez expuesto con el corte de las proteasas del huésped y evitarán de esta forma la fusión entre las membranas

[38]. Por último, el principal blanco al que están dirigidos estos nAbs es al dominio RBD y se han descrito hasta 4 tipos, cada uno específico para una posible conformación adoptada en el trímero: 1) todos los RBDs en conformación cerrada; 2) un RBD abierto, 3) dos RBDs abiertos y 4) tres RBDs abiertos. Estos nAbs funcionarán ya sea evitando la unión con ACE2, manteniendo una estructura “abierta” (RBD arriba) o acelerando el cambio hacia una conformación post-fusión de la proteína S [37].

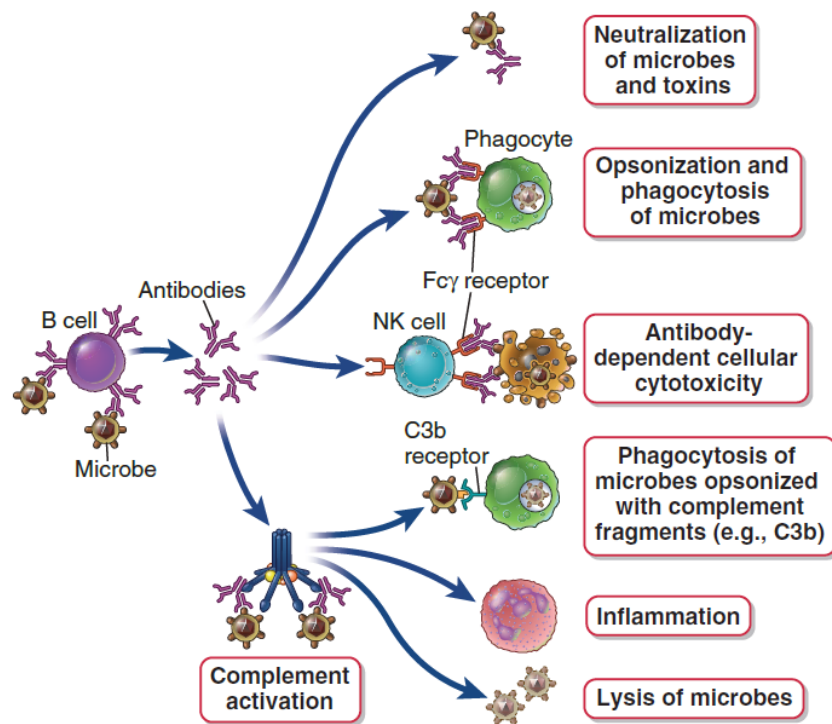


Figura 8. Funciones efectoras de los anticuerpos. Los anticuerpos contra los gérmenes pueden neutralizar los microbios, opsonizar para la fagocitosis, sensibilizar para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y activar el sistema del complemento. Estas diversas funciones efectoras pueden estar mediadas por diferentes isotipos de anticuerpos. Recuperado de [35].

Aunque RBD es el principal blanco para los nAbs, aún no se sabe si la cantidad de anticuerpos anti-RBD está directamente relacionada con la capacidad para neutralizar al SARS-CoV-2.

IV. JUTIFICACIÓN

La infección por SARS-CoV-2 es dependiente de la proteína S cuyo dominio RBD interacciona con el receptor humano ACE2. Los anticuerpos dirigidos contra RBD son importantes ya que este es el principal blanco para los anticuerpos neutralizantes. Al momento de la realización de este proyecto no se tiene claro si los títulos de anticuerpos anti-RBD están directamente relacionados con su capacidad neutralizante, por lo que comprobar esta asociación nos podrá sugerir los enfoques para las terapias humorales, diagnósticos y vacunas, así como entender con mayor cabalidad la respuesta inmune contra este virus.

Debido a la alta infectividad de este virus y al ser un microorganismo que requiere un nivel de contención III, no se cuenta en la institución con equipo de laboratorio tan especializado, por lo cual se optará por utilizar proteínas recombinantes que simulen la unión del virus con su receptor.

V. HIPÓTESIS

Existe una relación entre los títulos de anticuerpos anti-S1 y su capacidad para neutralizar a la proteína S1 del SARS-CoV-2.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Medir los anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 y asociarlos con los títulos de anticuerpos anti-S1 en sueros de pacientes vacunados y hospitalizados por COVID19.

Objetivos específicos

- Producir una proteína ACE2 recombinante en un sistema eucarionte.
- Corroborar la unión de la proteína recombinante ACE2 con la proteína recombinante S1.
- Montar un ensayo de detección de anticuerpos neutralizantes contra la proteína S1 de SARS-CoV-2.
- Buscar si existe una correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la proteína S1 del SARS-CoV-2 con los títulos de anticuerpos anti-S1.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de bacterias competentes

Se tomó una colonia de la cepa XL10-Gold y se sembró en 3 ml de medio Luria con tetraciclina (50 µg/ml), incubándose en agitación a 37°C toda la noche. Se realizó un subcultivo al día siguiente y se adicionaron 2.5 ml de cultivo a 250 ml de Luria con tetraciclina (50 µg/ml) en un matraz de 2-3 Lts. Una vez alcanzada una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600, se distribuyó el medio en cuatro tubos falcón de 50 ml, se colocaron en hielo (en adelante todo el procedimiento se realiza en frío y en esterilidad), se centrifugaron las células por 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C, y se eliminó totalmente el sobrenadante. Se resuspendió cada pastilla suavemente en 4 ml de la solución TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50mM, Acetato de Potasio 30 mM, CaCl₂ 10mM, Glicerol 15%, PH 5.8, esterilizado por filtración) y se mantuvo en hielo por 1 hora. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 3000 rpm a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se agregó 1.25 ml por tubo, de la solución TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75mM, glicerol 15% pH 8.0, esterilizado por filtración), finalmente se resuspendieron las células suavemente con punta de 1 ml. Se prepararon alícuotas de 50 a 100 µl en tubos de 1.5 ml, se colocaron en un baño de hielo seco/etanol, y se transportaron en hielo seco para almacenarse a -80°C (REVCO).

Vectores de expresión para ACE2

Las construcciones utilizadas en el presente trabajo fueron producto de una publicación de Procko E. y colaboradores (40) que posteriormente fueron puestas a su venta en AddGene. En este proyecto se utilizaron 2 construcciones, el primer plásmido adquirido pCEP4-myc-ACE2 (Addgene plasmid # 141185 ; <http://n2t.net/addgene:141185> ; RRID:Addgene_141185) codifica para una proteína recombinante ACE2 que se expresa en la membrana de la célula, esta tiene un fragmento de la proteína c-myc que servirá como bandera y se eligió así para tener un modelo celular de la proteína, de esta manera se podrán hacer experimentos en el citómetro para futuros objetivos. Por otro lado, también se adquirió un segundo plásmido pcDNA3-sACE2-WT (732)-IgG1 (Addgene plasmid # 154104; <http://n2t.net/addgene:154104>; RRID: Addgene_154104) que codifica para una proteína recombinante ACE2 pero en vez de su dominio transmembranal esta fusionado a la región Fc de un anticuerpo IgG1.

Obtención y crecimiento de bacterias transformadas

Se descongeló durante 3 minutos la bacteria competente *E. coli* y se añadieron 50-500µg del plásmido de interés en condiciones de esterilidad. Se incubó esta

asociación durante 20 min y se aplicó un choque térmico a 42°C por 45 seg; e inmediatamente se incubaron de nuevo en hielo por 2 min y se incubaron a 37°C durante 1 hora con 400µL de medio SOC (BRL, cat. no. 5544SA). Posteriormente se sembraron 400µL y 100µL en placas Petri con agar LB (sigma-aldrich cas. no. L3027) (ampicilina/ tetraciclina 100µg/mL) para incubarse durante la noche. Posteriormente se aíslan 4 colonias y se crecen en tubos de 50mL con caldo LB (sigma-aldrich cas. no. L3152) (ampicilina 250 mg/mL) a 37°C a 180 rpm durante 1 día.

Extracción y digestión del DNA plasmídico

El medio de cultivo donde crecieron las 4 distintas colonias de bacterias se centrifugaron a 6,000 xG por 15 min a 4°C, se decantó el medio y se resuspendió con 1 mL PBS en tubos de 1.5 mL. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se realizó la extracción del DNA plasmídico con el kit de la casa comercial de QIAGEN Plasmid Mini (cat nos. 12123 and 12125) y Maxi (cat. no. 12162) Kits. Para este paso, una vez realizada la “mini” extracción del DNA plasmídico, se cuantificó la muestra extraída en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000 ThermoScientific).

Una vez conocida la cantidad de DNA obtenido se corroboró la presencia del plásmido en ella. La digestión del DNA comienza con la incubación a 37°C por 3 horas de una reacción (tubo 0.6 mL) con los siguientes componentes en las cantidades indicadas:

H₂O	Aforar a 25 µL
Buffer Cut Smart (New England BioLabs) Cat. no. B7204S	2.5 µL
Xho I (Amersham Life Science) Cat. no. E1094Y	0.5 µL
Nhe I (New England BioLabs) Cat. no. R0131S	0.5 µL
DNA plasmídico	1 µg
Volumen total de reacción	25 µL

Una vez completada la incubación se preparó un gel de agarosa 0.8% con TAE (Tris base 4.84g, 1.142 g ácido acético glacial, 2 mL EDTA 0.5M para 1L). Se añadieron 8 µL del DNA digerido + 0.5 µL de Buffer de carga 6X (60mM EDTA pH 8, 0.3% SDS y 60% glicerol), 1 µg del DNA sin digerir y 2 µL del marcador (cas. no. 79061), y se corrió a 100 voltios durante 40 min. Posteriormente se incubó el gel en bromuro de etidio durante 15-30 min y se reveló con una cámara de UV (Gel Logic 440 imaging system).

Cultivo de células HEK293

Se crecieron células HEK293 en placas Corning de 75cm² (cas. no. 430720U) en 15 mL de medio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, cat. no. 12100-038)

suplementado con suero fetal bovino (Gibco cat. no. 26140079) al 10% con L-glutamina (cat.no. 25030081), pen-strep (15140122), aa no esenciales (11140050) y piruvato de sodio (cat. no. 11360070). Se permitió el crecimiento de estas células hasta llegar a una confluencia de $\approx 90\%$.

Transfección de células HEK293 con vectores de expresión para ACE2 pCEP4-myc-ACE2 y pcDNA3-sACE2-WT (732)-IgG1

Se sembraron $2-3 \times 10^6$ células en las placas de cultivo descritas, 24h posterior a la siembra en dos tubos independientes de 1.5mL se llevó a cabo la siguiente reacción. En un tubo **a** se añadieron 30 μ g de DNA plasmídico de interés y se aforaron a 500 μ L con medio OPTI-MEM (Gibco cas. no. 31985062); en un segundo tubo **b** se añadieron 30 μ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668019) y se aforaron igualmente a 500 μ L con medio OPTI-MEM. Ambos tubos se incubaron por 5 min y posteriormente el contenido del tubo **a** se vertió en el **b** cuidadosamente. Esta mezcla se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente (TA). Durante la incubación se retiró el medio de las células HEK293 y se añadieron 10 mL de PBS (NaCl 0.134M, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄), una vez pasados los 20 min de la incubación se retira el PBS de las células y se añade la mezcla por goteo. Finalmente, se añaden 5 μ L con medio OPTI-MEM e incubar a 37°C. Una vez transcurridos los 2 días se retira el sobrenadante y se añaden 8 μ L de OPTI-MEM para incubar por otros 3 días según sea el caso. Las células del sobrenadante se eliminan con una centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a TA.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

El gel de SDS-PAGE tiene dos tipos de geles, uno separador y otro concentrador. Primero se añade el separador y después el concentrador que queda arriba. El gel separador se preparó para 10 mL de la siguiente manera: 4 mL de H₂O, 3.3 mL de Acrilamida 30%, 2.5 mL Tris 1.5 M pH 8.8, 100 μ L de SDS 10%, 100 μ L de APS 10% y 4 μ L de TEMED, obteniendo así un gel al 10%. El gel concentrador se preparó de la siguiente manera para 3 mL: 2.1 mL de H₂O, 500 μ L de Acrilamida 30%, 380 μ L Tris 1.0 M pH 6.8, 30 μ L SDS 10%, 30 μ L APS 10% y 3 μ L TEMED. Una vez polimerizadas ambas fases del gel se cargan las muestras en los pozos del gel concentrador. Previamente las muestras fueron tratadas con Buffer Laemmli (H₂O 6.9 mL, Tris 1M pH6.8 1.0 mL, SDS 10% 1.0 mL, Glicerol 1.0 mL, β -mercaptoetanol 0.1 mL, Bromofenol c.b.p.). a una concentración final 1X y hervidas a 95°C por 5 min. Una vez lista la muestra para cargarse en el pozo se inició la electroforesis a un voltaje de 80 V por 2h y media equilibrado con buffer de corrida (0.025M glicina, 0.192 glicina, 0.1% SDS).

Ensayos de Western blot

Una vez resueltas las muestras en un gel de SDS-PAGE, este se ensambló en *sándwich* con una membrana de nitrocelulosa en el siguiente orden: 1 esponja, 2 hojas de papel Whatman 3 mm, el gel, 1 membrana de nitrocelulosa (BioRad Cat# 1620112, 0.2 μm , para proteínas o ácidos nucleicos de bajo peso molecular), 2 hojas de papel Whatman y 1 esponja. Posteriormente el *sándwich* se colocó en la cámara de transferencia y se corrió a 100 V durante 1h y media con buffer de transferencia (0.025M glicina, 0.192 glicina, 20% metanol) desde el polo negativo hacia el positivo. Para confirmar la transferencia de proteínas la membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 5 min, una vez verificada la transferencia se lavó con PBS-Tween 0.001%. Posteriormente la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% diluida con PBS-Tween 0.05% durante 1h a TA y se lavó de nuevo 3 veces con PBS-Tween 0.05% por 5 min a TA. Después del bloqueo la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-hACE2 Biotinylated (cat. no. BAF933) / anti-myc (cat. no. sc-40) a una dilución 1:1000 con PBS-Tween 0.05% durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween por 5 min a TA. Posterior a los lavados se incubó con el anticuerpo secundario (Streptavidin-HRP [cat. no. ab7403] dil. 1:5000 / anti-mouse-HRP [cat. no. 31430] dil. 1:3000) con PBS-Tween 0.05% durante 1h a TA. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05% por 5 min.

Para revelar la interacción antígeno-anticuerpo se utilizó el “kit” de bioluminiscencia Clarity Western ECL Substrate (BIORAD cat. no. 1705061). Brevemente, en un cuarto oscuro la membrana se colocó en acetatos que contenía la mezcla de los reactivos 1 y 2 en una proporción 1:1 durante 1 min en agitación para finalmente exponerse la membrana en un fotodocumentador (ChemiDoc MP no. de serie 731BR00166)

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

La cuantificación de proteínas por el método de Lowry se comenzó por la generación de una curva estándar con albúmina a diferentes concentraciones (2 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL y 0.1 mg/mL). Posteriormente se utilizó el “kit DC protein assay” (Bio-Rad), en este se utilizan 20 μL del Reactivo S por cada 1000 μL del Reactivo A. Después se añadirán en una placa de ELISA (ver ensayo de unión) 25 μL de la mezcla Reactivo S-A, 200 μL del Reactivo B y 5 μL de muestra/curva estándar en cada pozo por duplicado durante 15 min en oscuridad. Finalmente, las muestras y curva fueron analizadas en un lector de placas de ELISAS (TECAN sunrise art.-nr F03930002663) a 700 nm.

Proteína S1

La proteína recombinante utilizada en este trabajo fue donada por el laboratorio de la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN (41).

Ensayo de unión

El ensayo de unión entre las proteínas recombinantes S1 y ACE2 se realizó con la técnica de ELISA (indirecto). Primero se sensibilizaron placas de ELISA de alta sensibilidad de fondo plano (Invitrogen cas. no. 44240421) durante toda la noche (≈ 18 h) a 4°C con la proteína S1 a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen final de 50 μL por pozo. A la mañana siguiente se lavaron las placas en el lavador de placas Wellwash, (3 ciclos de lavado con PBS-tween 0.05% a 250 μl por pozo). Se bloqueó durante 2 horas a TA con 200 μL de PBS-t 0.05% + imidazol 0.004M + leche 1% (Solución de bloqueo KPL 1X Cat: 5150-0008 (50-63-00) modificada) y se lavó la placa de la misma manera ya descrita. Por otro lado, la proteína ACE2-IgG se diluye en PBS + leche 1% obteniendo 3 diluciones distintas: 1:1000, 1:100, 1:10 y sin diluir. Se añadieron 50 μl por pozo de la proteína ACE2 por duplicado en los pozos durante 1h a 37°C y se lavó la placa nuevamente una vez terminada la incubación.

Posteriormente se utilizaron 50 μL por pozo de un anticuerpo anti-IgG-HRP (cas. no. 109-036-088) diluido 1:15'000 en PBS y se incubó durante 1h a 37°C. Después se lavó la placa y se reveló la asociación añadiendo 50 μL del Buffer de sustrato TMB (Chem Cruz, cas. no. sc-286967A) durante 30 min y se detuvo la reacción con H_2SO_4 . 10 min después se leyó la señal en el espectrómetro a 450 nm.

Como control se tomó el promedio de la señal por duplicado de pozos sin sensibilizar, sin ACE2 y sin anticuerpo.

Concentración por Sulfato de amonio

Con el objetivo de reducir el volumen del sobrenadante donde se encontraba la proteína ACE2-IgG, se decidió concentrar la proteína por precipitación con sulfato de amonio. Para este fin se mezclaron por goteo 80 partes de sulfato de amonio en 20 partes del sobrenadante con las proteínas en frío y agitación. Una vez se mezcló todo el sobrenadante se centrifugó 15'000 rpm a 4°C por 30 min, se descartó el sobrenadante y se diluyó el precipitado con 4 mL de PBS. Posteriormente se añadieron estos 4 mL en una membrana de diálisis (poros de 10 kDa) con 1L de solución fisiológica 0.85% realizándose cambios cada 12h por 5 días a 4°C. Se realizó una prueba de precipitación con BaCl_2 y se extrajo el contenido de la membrana una vez no haya trazas de sulfatos en la proteína.

Determinación de anticuerpos neutralizantes

El "kit" comercial de la casa BioLegend indica la generación de una curva estándar a partir de su buffer estándar. Se tomaron de este buffer 12.5 μ L y se añadió en un tubo (C7), se tomaron 6.25 μ L de este tubo y se añadieron a un segundo tubo C6 con 6.25 μ L de buffer assay. Se repitió la dilución hasta tener un tubo C1. Finalmente, se rotuló un séptimo tubo como C0 y se añadieron 12.5 μ L de buffer assay y 6.25 μ L de la mezcla del tubo C1. Posteriormente las muestras se diluyeron 1:50, añadiendo 2 μ L de muestra y 198 μ L de PBS en tubos independientes. Finalmente, la reacción llevó 4 componentes diferentes: 12.5 μ L del tubo con la muestra diluida (1:50), 12.5 μ L del buffer assay, 12.5 μ L del buffer de neutralización y 6.25 μ L del buffer beads (en ese orden). De esta manera tuvimos nuestra curva estándar y nuestras muestras. Se vortexearon y se incubaron los tubos por 1:30h en suspensión a TA. Se añadió la Strep-PE y se incubó 30 min a TA y se añadió el PBS hasta tener un volumen de 200 μ L.

VIII. RESULTADOS

1. Amplificación del DNA plasmídico

El primer paso para la producción de la proteína ACE2 recombinante es la amplificación del DNA plasmídico. Para esto, una vez adquiridos los vectores de expresión se continuó con su amplificación en bacterias competentes. Para corroborar la identidad del plasmido o para caracterizarlo, se extrajo el DNA plasmídico y se analizó con las enzimas de restricción (NheI, Xho I) para obtener el inserto flanqueado por dos sitios mencionados arriba y se analizó en un gel de agarosa.

Como se muestra en la figura 9, el primer gel(A) en el tercer carril nos indica la presencia de tres bandas, una de $\approx 12K$ bp correspondiente a una digestión parcial gracias al corte de una sola enzima de restricción, también se puede apreciar una segunda banda de $\approx 10K$ bp que representa el vector de expresión sin el inserto y una última banda de $\approx 2K$ bp que nos indica la presencia del inserto. En el caso del segundo gel los resultados obtenidos tienen la misma interpretación. El primer gel corresponde al plásmido que codifica para la proteína ACE2 con etiqueta de myc y el segundo para ACE2 con etiqueta de IgG.

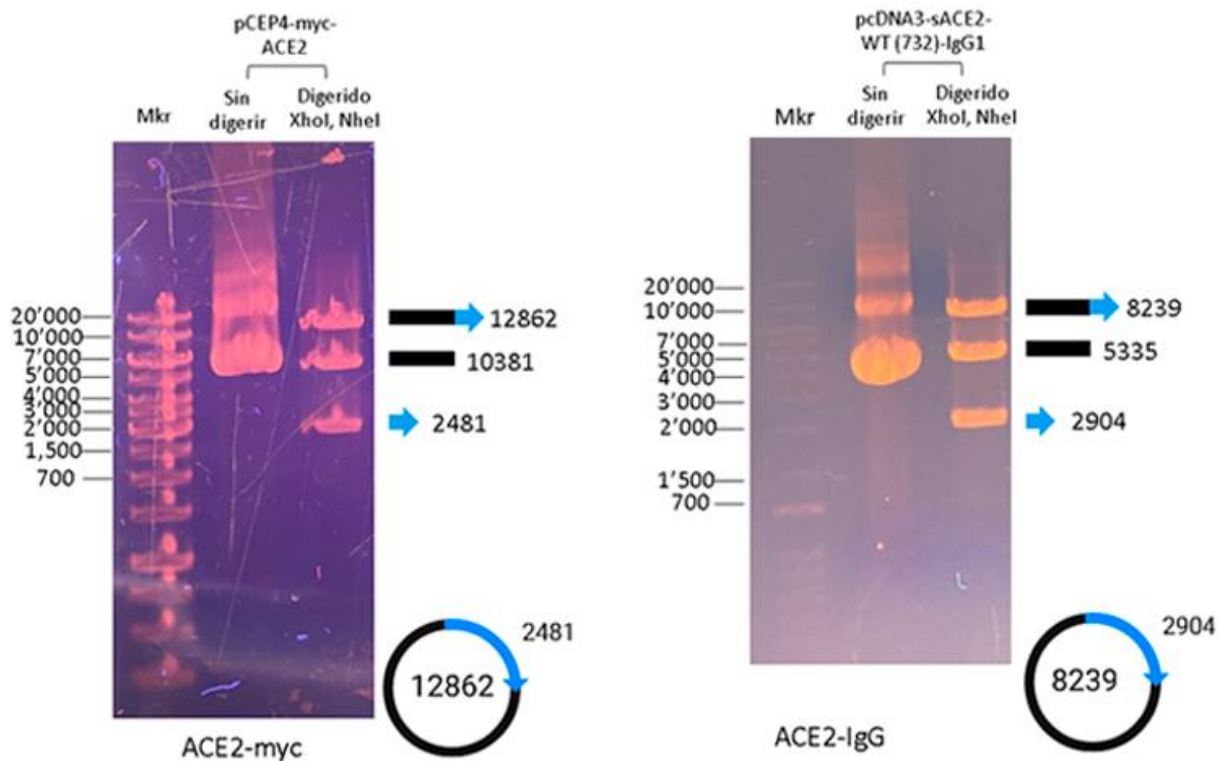


Figura 9. Las bacterias *E. coli* transformadas adquirieron el plásmido de interés. El primer gel corresponde a DNA plasmídico de ACE2-myc, el segundo para ACE2-IgG. El DNA digerido fue tratado con enzimas de restricción que flanqueaban el inserto. Se muestra el tamaño del plásmido/inserto en las señales obtenidas.

2. Producción de la proteína recombinante ACE2-myc y ACE2-IgG

Posteriormente se continuó con la transfección de células HEK293 con el DNA plasmídico amplificado, esto con la finalidad de producir una proteína recombinante ACE2 transmembranal. Con este propósito se identificó mediante una electrotransferencia a la proteína recombinante con una etiqueta de Myc. Como se puede observar en el primer WesternBlot (WB) en la figura 10, la mayor cantidad de ACE2 se encuentra en el lisado celular y en menor medida en el sobrenadante de las células transfectadas. Curiosamente, también se puede observar una tenue señal en las células control sin transfectar, por lo que se realizó una segunda electrotransferencia identificando la etiqueta myc. Como se muestra en la segunda electrotransferencia, las células sin transfectar no expresan la proteína recombinante ACE2-myc.

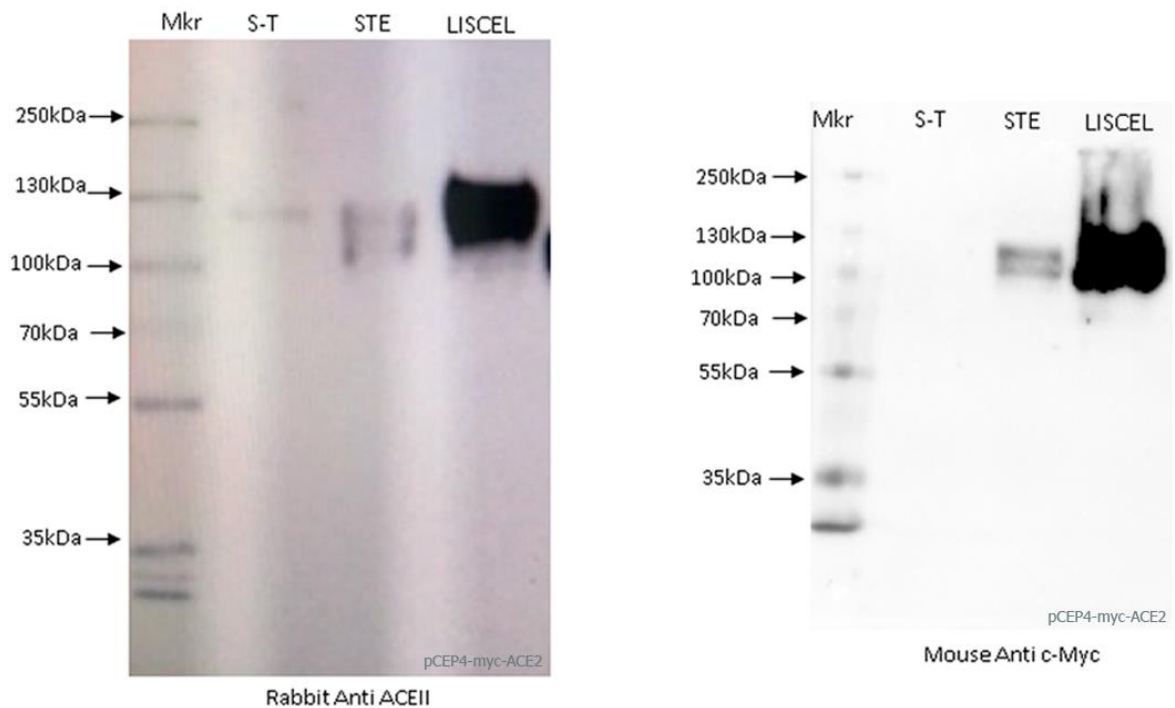


Figura 10. La proteína ACE2-myc transmembranal se expresa principalmente en los lisados celulares. Las células transfectadas con el plásmido pCEP4-myc-ACEII se analizaron y se observó una tenue banda en las células sin transfectar que corresponde a una expresión nativa de ACE2 en las células HEK293. 20 μ L de muestra se añadieron a los últimos 4 carriles. s-t: sin transfectar, ste: sobrenadante, liscel: lisado celular.

Una vez comprobada la presencia de la proteína recombinante ACE2 en el sistema transmembranal, se continuó con la producción de la proteína recombinante ACE2 soluble. Para este propósito se transfectaron nuevamente células HEK293 con la construcción pACE2-IgG y se colectó el sobrenadante a los 2 y 5 días post-transfección (PT). Como se muestra en la figura 11, la presencia de esta proteína puede identificarse a los 2 y 5 días PT. Igualmente pueden identificarse más bandas cerca de los 68 KDa, lo que sugiere la presencia de una proteína ACE2 de menor tamaño (42).

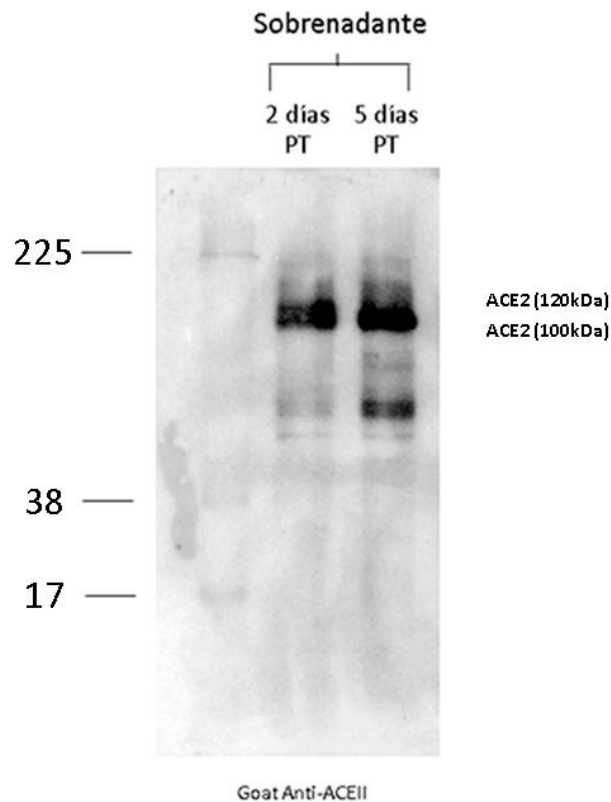


Figura 11. La proteína ACE2-IgG soluble puede identificarse hasta 5 días PT. Se recolectó el sobrenadante a los 2 y 5 días PT y se reveló con un anticuerpo anti-ACE2. PT= post-transfección.

3. Ensayo de unión de ACE2-IgG con S1

Una vez producidas las proteínas recombinantes ACE2, se eligió utilizar la proteína soluble por su mayor rendimiento en una eventual purificación, además de simplificarse el protocolo ya que el sistema transmembranal implicaría utilizar un ELISPOT. De esta manera, se evaluó su capacidad de unión de ACE-IgG a diferentes diluciones con una proteína S1 recombinante del SARS-CoV-2 (0.5 µg/mL) en un ensayo de ELISA. Como se muestra en la figura 12, la unión se puede apreciar

cuando ACE2 se diluye 1:10 o cuando no está diluida. La adición de inhibidores de proteasas se utilizó para evitar la degradación de ACE2.

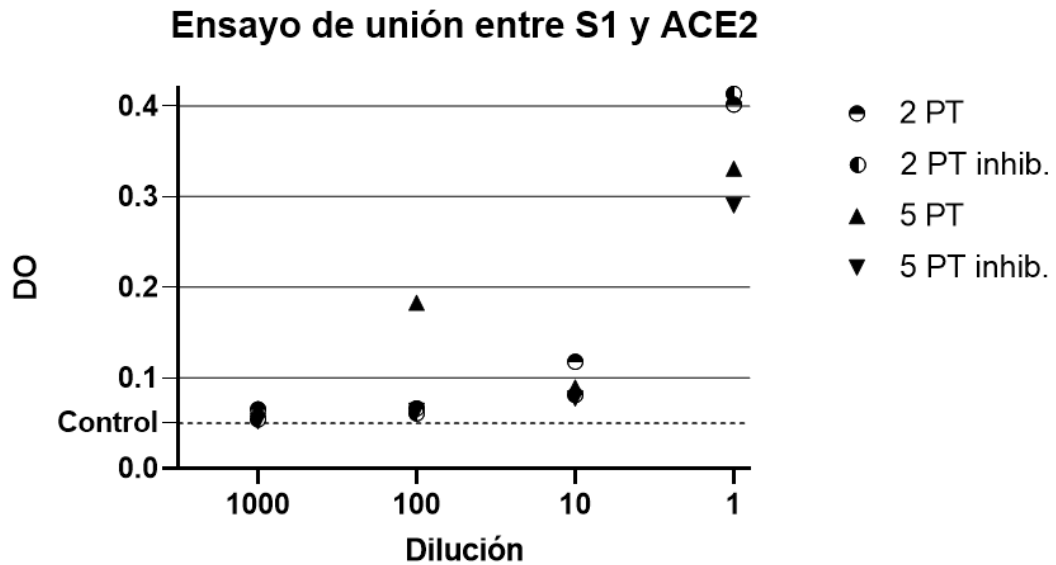


Figura 12. La proteína ACE2-IgG soluble es capaz de unirse a la proteína recombinante S1.

En el eje de las abscisas se muestran las diferentes diluciones utilizadas para ACE2 (desde 1:1000 hasta sin diluir) y en el eje de las ordenadas se muestran las densidades ópticas obtenidas del ensayo. n=1, PT= post-transfección, inhib= inhibidores de proteasas.

4. Concentración de la proteína ACE2

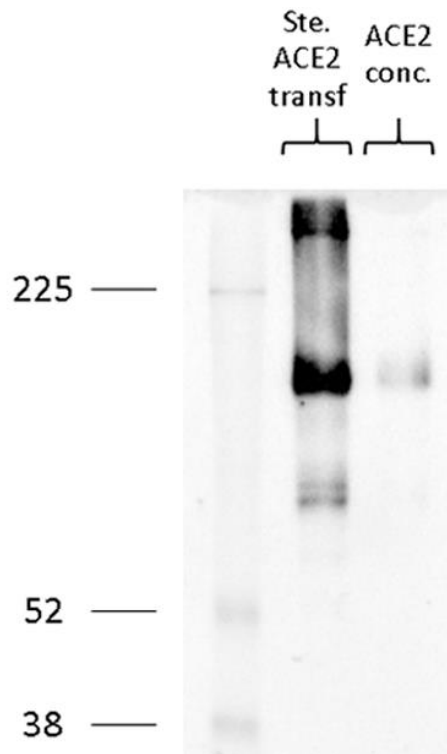


Figura 13. WB de las proteínas concentradas con sulfato de amonio. Tanto el sobrenadante de la transfección como el concentrado presentan una banda alrededor de los 120 KDa, peso de la proteína ACE2.

Dado que la proteína recombinante ACE2 aún se encuentra en el sobrenadante donde se cultivaron las células transfectadas, la proteína se encuentra suspendida en un gran volumen junto con otras proteínas. Por lo tanto, se decidió concentrar las proteínas del sobrenadante para obtener una mejor eficiencia en la purificación. Para este fin se eligió la precipitación con sulfato de amonio y una posterior diálisis. Como se muestra en la figura 13, durante este proceso se pierde una gran cantidad de muestra total, sin embargo, se lograron reducir 28 mL de muestra en 4 mL.

Finalmente, antes de comenzar con la purificación se verificó que la proteína concentrada no perdiera su conformación. Para esto se realizó el mismo ensayo de unión por ELISA con diferentes diluciones de la proteína (concentrada) ACE2-IgG y su ligando S1. Como se muestra en la figura 14, nuevamente la dilución 1:10 y la muestra sin diluir son las únicas sensibles para el sistema, aunque con menor medida respecto a la muestra con el sobrenadante.

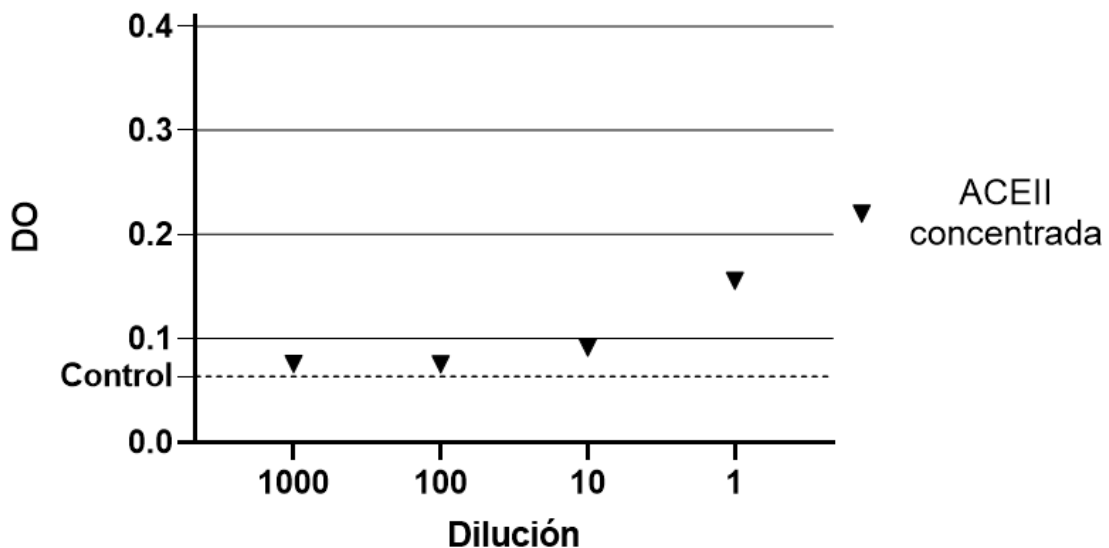


Figura 14. El concentrado de la proteína recombinante ACE2 se une a la proteína recombinante S1. Se utilizan diluciones de la proteína recombinante ACE2 desde 1:1000 hasta sin diluir y la proteína S1 a una concentración 0.5 µg/mL. n=1

5. Determinación de anticuerpos neutralizantes en 4 grupos distintos

Debido a las dificultades técnicas a lo largo del proyecto, el plazo para desarrollar el ensayo de neutralización, se decidió responder la pregunta del presente trabajo

utilizando un “kit” comercial que ofrece la casa BioLegend para medir nAbs. Este Multi-Analyte Flow Assay Kit (cat.no. 741127) está conformado por diferentes elementos como perlas conjugadas con la proteína ACE2, una proteína de detección (quimera S1-Fc biotinilada), un anticuerpo estándar de neutralización (anti-S1) y la proteína señal (strep-PE) como se muestra en la figura supl. S1; además de la muestra de suero. De esta manera, a mayor capacidad y concentración de nAbs en el suero, menor será la unión de la proteína de detección y señal del ensayo.

Con este “kit” primeramente se realizó una curva estándar con un anticuerpo neutralizante ya caracterizado (fig. supl. S2). Se capturan las correspondientes señales obtenidas para diferentes diluciones de este nAb y se grafican (fig. supl. S3); finalmente, una vez corrida la muestra, la señal se asocia con un punto en la gráfica y se le determina tanto la cantidad de nAb correspondiente con el estándar y el porcentaje de neutralización.

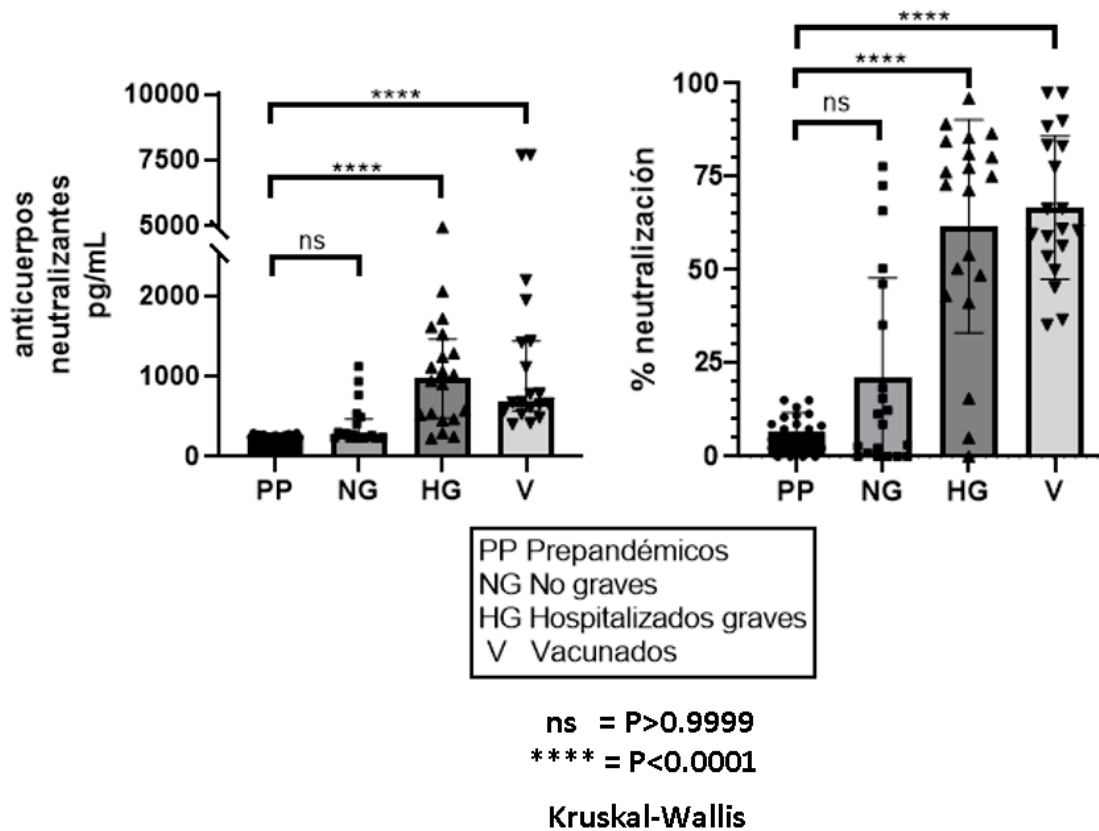


Figura 15. Las personas de los grupos “hospitalizados graves” y “vacunados” presentan anticuerpos neutralizantes. La determinación de nAbs y % de neutralización en los diferentes grupos está conformado por ≈ 20 muestras.

Para la determinación de estos nAbs se utilizaron 4 grupos diferentes. El primer grupo corresponde a pacientes no graves (NG), el segundo a pacientes

hospitalizados graves (HG), otro más con personas sanas, vacunadas (V) y como control sirvió un grupo de sueros pre pandémicos de personas sanas (PP). Como se puede observar en la figura 15, la primera gráfica nos indica que las personas hospitalizadas graves y vacunadas fueron las que tuvieron las concentraciones más altas para los nAbs, a diferencia de los otros dos grupos que parecen no desarrollar nAbs contra el SARS-CoV-2. En la segunda gráfica se evalúa el porcentaje de neutralización y se repite el comportamiento.

6. Determinación de anticuerpos anti-S1 en 4 grupos distintos

Posterior a la determinación de los nAbs se determinó la cantidad de abs específicos contra la subunidad S1 en los mismos 4 grupos por un ensayo de ELISA. En esta ocasión el grupo HG es el que presenta el menor título de abs específicos, seguido se encuentra el grupo NG con una diferencia mayor y finalmente el grupo de personas vacunadas es el que presenta la mayor cantidad de estos anticuerpos con gran diferencia.

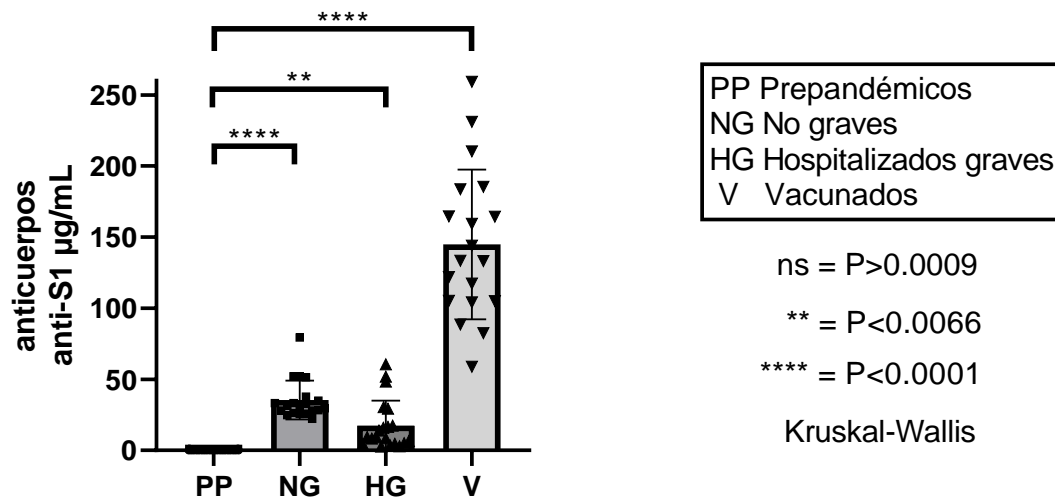


Figura 16. Las personas de los grupos “no grave” y “vacunado” presentan la mayor cantidad de anticuerpos anti-S1. La determinación de nAbs y % de neutralización en los diferentes grupos está conformado por ≈ 20 muestras.

7. Análisis de correlación de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos anti-S1 en los 4 grupos

Finalmente, se realizó un análisis correlación no paramétrica entre los datos de nAbs y abs anti-S1 para los grupos de personas NG, HG y V. Como se puede ver en la figura 17, el grupo NG no tienen ninguna correlación entre sus datos, el grupo HG

tiene una correlación positiva moderada entre sus datos y el grupo V una correlación positiva fuerte.

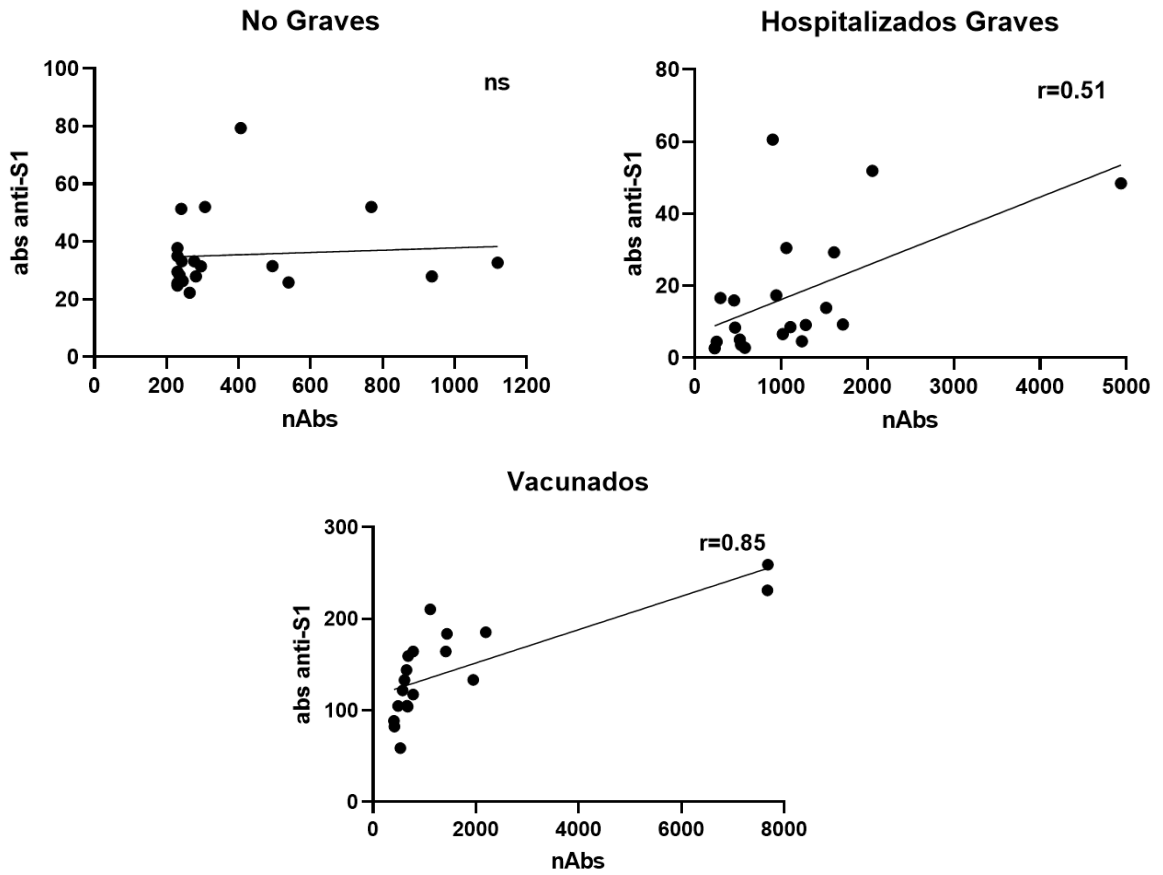


Figura 17. Los grupos “hospitalizados graves” y “vacunados” generan nAbs a medida que se producen abs anti-S1. Cada grupo está conformado por ≈ 20 muestras.

IX. DISCUSIÓN

1. Las proteínas recombinantes ACE2-myc y ACE2-IgG se expresan en sistemas eucariontes

Como ya ha sido reportado por (40), el plásmido que codifica para la proteína ACE2-myc transmembranal es expresado con éxito en la línea celular de mamífero HEK293. Esta expresión se encuentra principalmente en los lisados celulares y curiosamente en el sobrenadante, lo que puede explicarse con las células transfectadas que murieron antes de la cosecha. Es importante tener en cuenta que esta línea celular expresa a la proteína ACE2 de manera natural en bajas cantidades (como se puede observar en la primera electrotransferencia de la figura 10), por lo que también resulta útil la identificación de la proteína recombinante a través de su etiqueta con myc. Por otro lado, la proteína recombinante ACE2-IgG soluble se expresa de igual manera exitosa en sistemas eucariontes; su expresión se encuentra claramente en el sobrenadante hasta 5 días post-transfección demostrando así cierta estabilidad, esto puede explicarse en parte por la presencia de la proteína de fusión IgG1 teniendo estabilidad hasta los 5 días.

2. La proteína recombinante ACE2-IgG es capaz de unirse a la subunidad S1 de la proteína del SARS-CoV-2

La proteína recombinante ACE2-IgG soluble fue la elegida para realizar el ensayo de unión por su practicidad en el ensayo de ELISA. Para esta proteína recombinante ya se ha descrito que puede unirse con la proteína S completa del SARS-CoV-2 (40), de manera que los resultados obtenidos en la figura 12 fueron los esperados. Para sostener esta aseveración hace falta repetir varias veces este experimento.

3. Las personas con síntomas graves y vacunados presentan el mayor título de anticuerpos neutralizantes

La producción de los nAbs está relacionada con la severidad de la enfermedad, es decir, el grupo de HG presenta mayor nAbs que el grupo NG; este comportamiento ya se ha descrito previamente (43) proporcionándole validez a nuestros datos. Por otro lado, el grupo V también presenta títulos altos de nAbs como ya ha sido descrito con anterioridad. La producción de anticuerpos anti-S1 no tiene el mismo comportamiento que de nAbs para los diferentes grupos

La severidad de la enfermedad parece no determinar la cantidad de abs anti-S1 ya que el grupo HG tiene menos títulos que el grupo NG. Interesantemente, el grupo V sí tiene una producción importante de estos anticuerpos.

4. La correlación en la producción de abs anti-S1 y nAbs está determinada por la gravedad de la enfermedad y su vacunación

Curiosamente, aunque la producción de abs anti-S1 en el grupo HG no es la más sustancial, la cantidad de nAbs en este grupo sí es considerable. Esto nos indica que los pacientes graves tienen una fuerte eficiencia en la producción de nAbs específicos contra la subunidad S1, que ya ha sido descrita como blanco de los nAbs (39, 45). Además, los niveles de abs anti-S1 determinarán la cantidad de nAbs, es decir, a mayor producción de abs anti-S1 mayor será el número de nAbs. Por otro lado, las personas vacunadas tienen una importante producción de abs anti-S1 y nAbs, indicándonos que estos abs anti-S1 producidos tienen otras funciones efectoras además de la neutralización. Para el caso de las personas vacunadas existirá una mejor correlación entre los niveles de abs anti-S1 y nAbs, seguramente por el acertado diseño de estas vacunas donde se incluye a la proteína S además de su posible infección previa con el virus. Este resultado va acorde a lo descrito en la bibliografía donde los mejores resultados de respuesta de anticuerpo es la que se genera de manera híbrida (vacunados e infectados).

Finalmente, las personas que no cursan un cuadro grave de COVID19 generan abs anti-S1 sin que estos representen una prevención importante de la unión a través de la unión receptor-ligando, es decir, estos abs tiene una función que no sea la neutralización.

X. CONCLUSIONES

La generación anticuerpos neutralizantes está relacionada con la producción de anticuerpos anti-S1 en personas vacunadas y cuando se presenta un cuadro severo de la enfermedad.

XI. PERSPECTIVAS

Producir en grandes cantidades a la proteína recombinante ACEII-IgG.

Generar un anticuerpo monoclonal neutralizante y utilizarlo para generar una curva estándar.

Montar un ensayo de neutralización por ELISA.

Comparar los resultados de un ensayo comercial de neutralización con el montado en el laboratorio.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2001017>
2. W. Tan, X. Zhao, X. Ma, A novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases—Wuhan, China 2019–2020. <https://weekly.chinacdc.cn/fileCCDCW/journal/article/ccdcw/2020/4/PDF/Wuhan.pdf>
3. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z.pdf>
4. World Health Organization (WHO), Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report – 22. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf>
5. National Center for Biotechnology Information. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reference genome; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1798174254>
6. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1267>
7. Assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Packaging Signal into Virus-Like Particles Is Nucleocapsid Dependent. https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.22.13848-13855.2005?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
8. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1931524421000293?dgcid=coauthor>
9. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354214001752?via%3Dihub>
10. Coronavirus envelope protein: current knowledge. <https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1182-0>
11. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215000483>
12. Coronavirus infections and immune responses. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25685>

13. The Infectious Bronchitis Coronavirus Envelope Protein Alters Golgi pH To Protect the Spike Protein and Promote the Release of Infectious Virus.
https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00015-19?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
14. Structural insights into coronavirus entry.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352719300284>
15. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19.
<https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
16. UniProtKB - PODTC2 (SPIKE_SARS2). <https://www.uniprot.org/uniprot/PODTC2>
17. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9.
<https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.RES.87.5.e1>
18. ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system.
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1043-2760%2804%2900056-6>
19. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2.
<https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.abb2762>
20. Immunology of COVID-19: Current State of the Science.
[https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(20\)30183-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761320301837%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(20)30183-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761320301837%3Fshowall%3Dtrue)
21. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
<https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.abb2507>
22. Tumor Necrosis Factor- α Convertase (ADAM17) Mediates Regulated Ectodomain Shedding of the Severe-acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) Receptor, Angiotensin-converting Enzyme-2 (ACE2).
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820794330?token=DA3036EADB95773064709FA392A0B2E11AADA7CB32C0EACFD31F59CE239F0DC3D1043CD443B2C6C64B266753E62C8CB6&originRegion=us-east-1&originCreation=20220627234439>
23. Glycosylation of SARS-CoV-2: structural and functional insights.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00216-021-03499-x.pdf>
24. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells.
<https://www.nature.com/articles/s41580-021-00418-x.pdf>
25. How SARS-CoV-2 first adapted in humans.
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abi4711#:~:text=The%20research%20team%20reported%20that,have%20not%20yet%20been%20identified.>

26. HOW THE CORONAVIRUS INFECTS OUR CELLS.
<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-021-02039-y/d41586-021-02039-y.pdf>
27. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis.
[https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(20\)30233-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490620302337%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(20)30233-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490620302337%3Fshowall%3Dtrue)
28. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review.
<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391>
29. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7366121/pdf/main.pdf>
30. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). <https://pmj.bmj.com/content/postgradmedj/96/1142/753.full.pdf>
31. World Health Organization (WHO), "Coronavirus disease(COVID-19): How is it transmitted?" (2021);www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted.49
32. U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), "Scientific brief: SARS-CoV-2 transmission" (2021);www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html
33. Airborne transmission of respiratory viruses.
<https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.abd9149>
34. Intermittent fasting, a possible priming tool for host defense against SARSCoV-2 infection: Crosstalk among calorie restriction, autophagy and immune response. Recuperado de:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247820303497?via%3Dihub>
35. cellular and molecular immunology. A. K. Abbas. Nineth edition
36. S.A. Plotkin. Correlates of protection induced by vaccination.
<https://academic.oup.com/cid/article/47/3/401/315995>
37. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8424621/pdf/41423_2021_Article_752.pdf
38. ACE2-binding exposes the SARS-CoV-2 fusion peptide to broadly neutralizing coronavirus antibodies.
<https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.abq2679>

39. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. <https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/science.abc6952>
40. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc0870>
41. Recombinant Protein Expression and Purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications. <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/10/1808>
42. A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection. <https://www.nature.com/articles/s41588-020-00759-x>
43. COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867420316858?token=1BFE49D85691F53FE0EA05337E7F239580D55A3D9877E98A8BAD4C8659C9E8CEDDACD7E53D6A782D75F739010B53734C&originRegion=us-east-1&originCreation=20220923091103>
44. SARS-CoV-2 S2-targeted vaccination elicits broadly neutralizing antibodies. <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abn3715>
45. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abd0827>

XIII. IMÁGENES SUPLEMENTARIAS

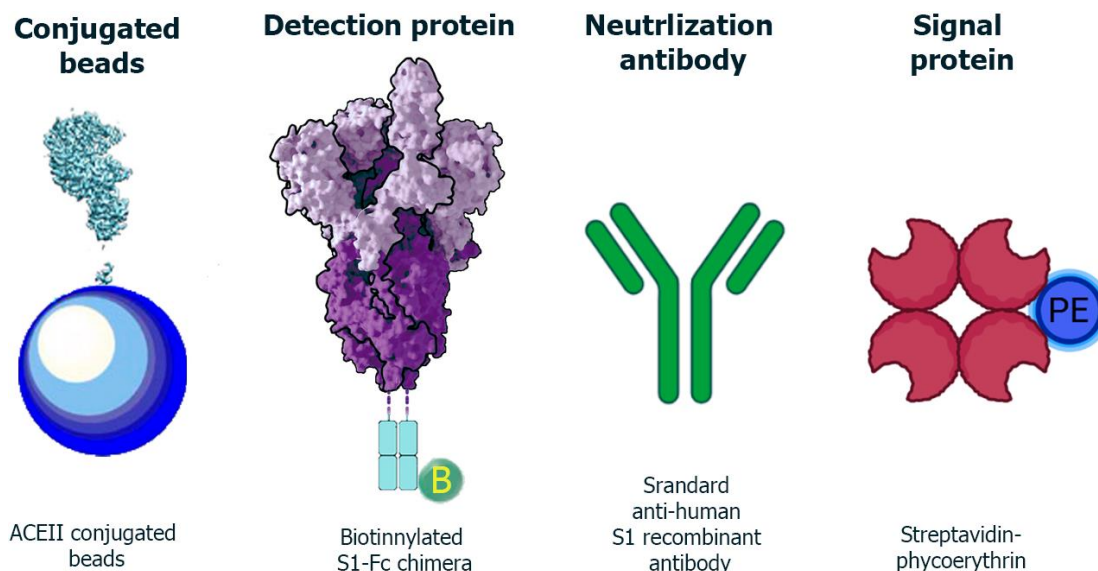


Figura S1. Elementos que integran el kit de neutralización de la casa BioLegend. Los diferentes elementos mostrados se utilizan para la curva estándar, también debe considerarse la muestra entre estos.

Name	Expected pg/ml	Avg(MFI)	pg/ml
C0	0.00	220833.00	2.33
C1	2.44	208179.00	2.55
C2	9.77	73152.00	8.09
C3	39.06	13164.00	42.04
C4	156.25	3520.00	466.43
C5	625.00	2507.00	2289.75
C6	2500.00	2580.00	1894.17
C7	10000.00	2760.00	1282.52

Figura S2. La generación de una curva estándar nos permite identificar la concentración de nAbs y la MFI emitida en diferentes puntos de la curva.

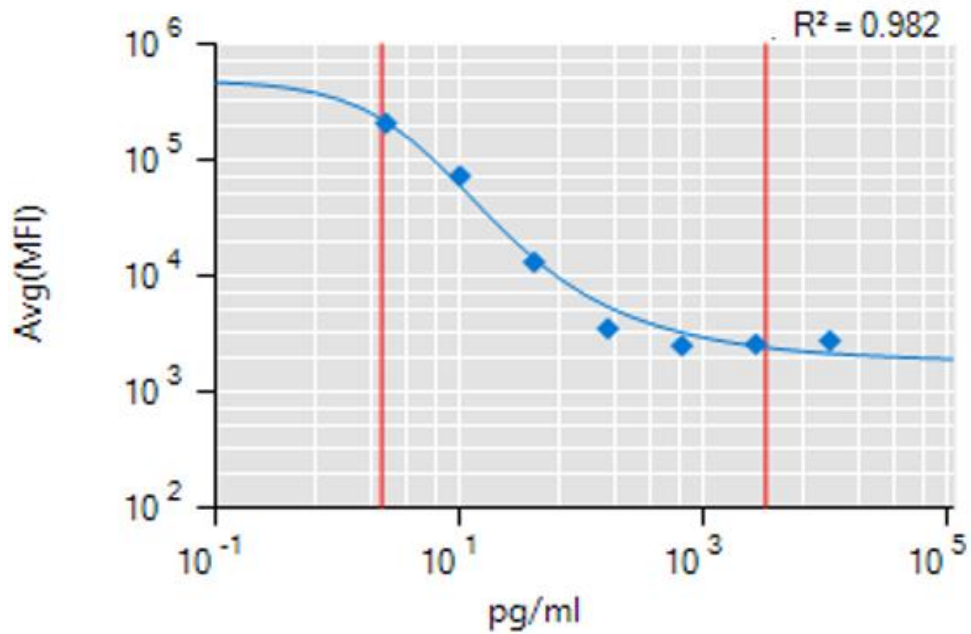
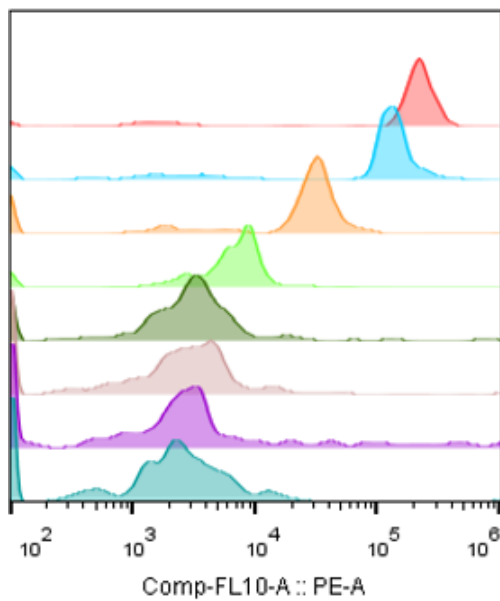


Figura S3. Curva estándar graficada en concentración por MFI. La sensibilidad del sistema reconoce hasta C5, es decir, ≈ 2500 MFI.



	Sample Name	Subset Name	Count
■	CT0 1.fcs	Ungated	210
■	CT1 1.fcs	Ungated	210
■	CT2 1.fcs	Ungated	210
■	CT3 1.fcs	Ungated	210
■	CT4 1.fcs	Ungated	210
■	CT5 1.fcs	Ungated	210
■	CT6 1.fcs	Ungated	210
■	CT7 1.fcs	Ungated	210

Figura S4. Diferentes poblaciones de la curva estándar. La sensibilidad del sistema reconoce hasta C5, es decir, ≈ 2500 MFI.