



Aplicación de ensayos in vitro y modelo in vivo para evaluar la protección inducida por diferentes plataformas vacunales frente a SARS-CoV-2

Tesina para optar por el título de Licenciada en Biotecnología

Autora: Malena Tejerina Cibello

Directora: Eliana F. Castro

Co-Directora: Josefina Caillava

Laboratorio de Virología Molecular - Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio)

Universidad Nacional de San Martín - Diciembre 2022

Agradecimientos

A la UNSAM y a todos los docentes que tuve la suerte de tener en la carrera por haberme formado para ser biotecnóloga.

Al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, EByN, UNSAM y al Laboratorio de Virología Molecular por permitirme realizar mi trabajo de tesina en sus instalaciones.

A la Secretaría de Relaciones Internacionales de UNSAM por seleccionarme en las becas PIME para realizar una pasantía de investigación en el exterior. Al grupo de investigación dirigido por la Dra. Juliana Cassataro por permitirme usar su prototipo de vacuna para realizar parte de los ensayos de esta tesina y ser parte de la gestión para que mi estadía en el exterior sea posible. A la Universidad de Nueva York y específicamente al Laboratorio de Virología Molecular allí instalado liderado por el Dr. Benjamin TenOEver por acceder a la propuesta para que realice una pasantía en sus instalaciones.

A Diego Álvarez por incluirme en su grupo de trabajo, por acompañarme desde el principio con paciencia en este proyecto y por confiar en mí para seguir trabajando junto al grupo.

A Jose por enseñarme casi todo lo que sé hacer en el laboratorio, por tenerme paciencia día a día con esos protocolos que no salían tan fácil y por hacer del espacio de trabajo un lugar divertido.

A Eli por estar en la dirección de este proyecto, por ayudarme a terminar con los experimentos y por sus sugerencias en la escritura que me ayudaron mucho en la formación.

A May, Vero, Lean, Euge y Claudia por acompañarme en el laboratorio, por ayudarme siempre con mis inquietudes y por sumar momentos con muchas risas.

A Lucía y Álvaro por la buena predisposición para ayudarme a realizar los experimentos con hámsters y por llevarme a conocer las playas de Nueva York.

A Mile por transmitirme la pasión por la ciencia, por motivarme a seguir, por estar siempre ahí al lado mío bancando mis mil horas de estudio de este último año de la carrera, por compartir lindos momentos y, no menos importante, por enseñarme estadística.

A mi familia, por apoyarme desde un inicio con la carrera que elegí y ver el potencial en mí. En especial a mi abuela Julia por ser mi ejemplo a seguir, entenderme siempre, saber de lo que hablo, apoyarme en mis horas silenciosas de estudio y estar siempre atenta a cómo me iba en los exámenes.

A todos aquellos que supieron ser mis compañeros/as y amigos/as de la facu por hacer divertidas las cursadas, por las horas de estudio y por hacer más amena la insólita cursada pandémica.

Gracias a todos los que formaron parte de mi vida en estos cinco años.

Índice

Resumen	4
Abreviaturas	5
Introducción	6
1. Características generales de SARS-CoV-2	6
a. Características estructurales	7
b. Filogenia	8
2. Ciclo de vida del virus	10
a. Mecanismos de entrada a las células	11
b. Sitio de corte por furinas: Adaptación evolutiva	12
3. Patogénesis de SARS-CoV-2	13
a. Tropismo de tejido	14
b. Modelos animales para el estudio de COVID-19	14
4. Respuesta inmune montada ante la infección	15
a. Respuesta humoral	16
b. Respuesta celular	16
c. Respuesta de memoria	17
5. Variantes de preocupación (VOCs)	17
a. Epidemiología de las VOCs en Argentina	19
6. Desarrollo de vacunas	20
a. Correlatos de protección	21
7. Pseudovirus basados en lentivirus de SARS-CoV-2	22
Hipótesis	25
Objetivo General	25
Objetivos específicos	25
Metodología	26
1. Diseño experimental 1: Ensayo longitudinal de seguimiento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en individuos vacunados con SPUTNIK V.	26
Muestras de suero	26
Línea celular HEK293-hACE2	26
Obtención de los vectores de expresión de la proteína Spike de SARS-CoV-2	26
Producción de pseudovirus tipificados	27
Titulación de stocks virales	27
Determinación de la incorporación y procesamiento de Spike mediante Western Blot	28
Incorporación de la mutación R683G a Spike	29
Diseño de primers	29
Obtención de megaprimers	30
Mutagénesis dirigida mediante PCR	30
Selección de clones	31
Secuenciación y caracterización de mutantes	31
Titulación de anticuerpos neutralizantes	32

2. Diseño experimental 2: Evaluación de la protección de ARVAC frente a la infección por SARS-CoV-2 en modelo de hámster.	33
Homogeneización de tejidos y extracción de RNA	33
RT-qPCR	34
Ensayo de formación de placas de lisis	35
Histología de tejido pulmonar	35
3. Gráficos y análisis estadísticos	35
Resultados	36
1. Obtención y purificación de vectores de expresión de Spike	36
2. Producción y titulación de stocks virales pseudotipados	37
3. Incorporación de la mutación R683G	39
a. Producción y titulación de pseudovirus mutantes	40
4. Caracterización de la incorporación y procesamiento de Spike	43
5. Capacidad neutralizante de anticuerpos inducidos por la vacunación con SPUTNIK V frente a las VOCs	44
a. Seguimiento de la respuesta neutralizante	46
b. Reactividad cruzada de la respuesta neutralizante	47
c. Correlación TN Pseudovirus vs. SARS-CoV-2 vivo	49
6. Protección brindada por ARVAC frente a SARS-CoV-2 en modelo de hámster	49
a. Variación de peso	50
b. Carga viral en vías respiratorias	51
c. Histopatología del tejido pulmonar	54
Discusión	55
1. Caracterización de la infectividad de los pseudovirus e incorporación de la mutación R683G	55
2. Capacidad neutralizante de anticuerpos inducidos por SPUTNIK V	57
3. Protección brindada por ARVAC frente a SARS-CoV-2 en modelo de hámster	59
Conclusiones	62
Perspectivas a futuro	63
Referencias bibliográficas	64
Anexo	71

Resumen

La vacunación resulta esencial para el control de las infecciones por SARS-CoV-2 y los títulos de anticuerpos neutralizantes han sido empleados hasta el momento como mejor correlato de protección. La proteína Spike (S) se encuentra expuesta en la superficie del virión y es suficiente para mediar la entrada de los virus a las células susceptibles. A raíz de ello, es el principal blanco de la respuesta neutralizante y del desarrollo de vacunas. Entre los años 2020 y 2022, emergieron variantes virales clasificadas como de preocupación con elevada transmisibilidad, virulencia y cierta evasión a la respuesta inmune del hospedador inducida por la infección previa y/o vacunación. Por eso mismo, resulta relevante evaluar la capacidad neutralizante frente a las variantes de SARS-CoV-2 de anticuerpos en cohortes de individuos vacunados para entender el impacto de las mismas y estimar la eficiencia de la vacunación frente a ellas. Particularmente, las variantes Gamma, Delta y Ómicron han sido las más relevantes en nuestra región. Debido a que SARS-CoV-2 debe manipularse en BSL3, como alternativa se desarrollaron pseudovirus tipificados con la proteína S que pueden manipularse en BSL2 y resultan adecuados para la evaluación de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2. Por otro lado, el uso de modelos animales que sean capaces de mimetizar tanto la infección como las características distintivas de la enfermedad COVID-19 en humanos son aquellos más valiosos para investigar parámetros inmunológicos y evaluar la eficacia y seguridad de vacunas u otros tratamientos frente a SARS-CoV-2 durante estudios pre-clínicos.

Dada la versatilidad que presenta el sistema de pseudovirus, el presente proyecto propone, en primer lugar, la tipificación de pseudovirus basados en lentivirus con las proteínas S de las variantes pandémica de SARS-CoV-2 (D614G), Gamma, Delta y Ómicron para realizar un seguimiento de la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por la vacunación con SPUTNIK V en humanos. En segundo lugar, propone el uso del modelo in vivo de hámster sirio, naturalmente susceptible a SARS-CoV-2, para evaluar la protección brindada por la vacunación con ARVAC mediante la determinación de la variación en el peso, la patogénesis en tejido pulmonar y la cuantificación de la carga viral en órganos de las vías respiratorias a distintos tiempos. Los resultados obtenidos demostraron que el sistema de pseudovirus desarrollado fue de utilidad para la determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes y permitieron evidenciar una caída en el tiempo de los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos por SPUTNIK V, pero con un mantenimiento de la capacidad neutralizante contra las diferentes VOCs con respecto a la variante pandémica, una de las primeras identificadas. Por otro lado, se ha demostrado que en un modelo in vivo ARVAC induce protección contra SARS-CoV-2 ya que, si bien no provoca una inmunidad esterilizante, posibilita una rápida eliminación de la infección en las vías respiratorias inferiores y reduce la patogénesis.

Abreviaturas

+ssRNA: RNA simple cadena de polaridad positiva

BSL2: Nivel de Bioseguridad de tipo 2

BSL3: Nivel de Bioseguridad de tipo 3

cDMEM: DMEM completo

CMV: Citomegalovirus

CoVs: Coronavirus

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

dpi: Días post-infección

hACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2 humana

HCoVs: Coronavirus humanos

IM: Intramuscular

MP: Megaprimer

mRNA: RNA mensajero

Mut: Mutante

nAbs: Anticuerpos Neutralizantes

NTD: Dominio N-terminal

ON: *overnight*, toda la noche

ORF: *open reading frame*, marco abierto de lectura

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEI: Polietilenimina

Pv: Pseudovirus

qPCR: PCR en tiempo real

RBD: *receptor binding domain*, Dominio de unión al receptor

RBM: *receptor binding motif*, Motivo de unión al receptor

RNA: Ácido Ribonucleico

RT: Retrotranscripción

S: Spike

SFB: Suero Fetal Bovino

spv: Semanas post-vacunación

TN: Título Neutralizante

UFF: Unidades Formadoras de Focos

UFP: Unidades Formadoras de Placas

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

WT: Wild-Type

Introducción

Los coronavirus (CoVs) son un grupo de virus que pueden infectar diversas especies animales y, en humanos, están asociados a infecciones respiratorias con manifestaciones clínicas leves y/o severas. De acuerdo a su estructura genómica, los CoVs se encuentran divididos en cuatro subgrupos: α -CoVs, β -CoVs, γ -CoVs y δ -CoVs, pero sólo los primeros dos son capaces de infectar humanos y otros mamíferos. Previo al año 2019 se conocían sólo dos coronavirus humanos (HCoVs) de origen zoonótico causantes de brotes epidémicos de infección respiratoria aguda a nivel mundial, SARS-CoV y MERS-CoV, identificados en China y Arabia Saudita en los años 2002 y 2012, respectivamente (Ganesh et al., 2021). Hasta el momento se ha postulado al murciélago como hospedador y reservorio natural principal a partir del cual se originan los HCoVs. Asimismo, debido a la divergencia que los CoVs de humanos y murciélagos presentan a nivel de secuencia genómica se continúa estudiando la implicación de otros mamíferos como hospedadores intermedios, donde ocurriría la evolución viral que facilitaría la posterior transmisión a humanos y determinaría la patogenicidad de los virus (Alanagreh et al., 2020).

En diciembre de 2019 en Wuhan, China, emergió un nuevo coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo, o SARS, en humanos. El mismo ha sido denominado SARS-CoV-2 y ha generado una pandemia que lleva reportadas más de 6 millones de muertes por la enfermedad del coronavirus (COVID-19) debido a su alta transmisibilidad y patogénesis. En la actualidad existen más de 10 vacunas licenciadas para la prevención de COVID-19 y hasta el 30 de noviembre del corriente año ya se han administrado más de 13 mil millones de dosis de diversas plataformas vacunales contra este virus (World Health Organization, s.f.).

1. Características generales de SARS-CoV-2

Como miembro del subgénero *Sarbecovirus*, género *Betacoronavirus*, familia *Coronaviridae*, SARS-CoV-2 posee material genético de RNA simple cadena de polaridad positiva (+ssRNA) con un tamaño aproximado de 30 kb. El genoma de este virus contiene seis marcos abiertos de lectura (ORFs) funcionales, comenzando con ORF1a/ORF1b en su extremo 5' que codifican para las poliproteínas 1a y 1ab (pp1a, pp1ab). Estas son procesadas mediante clivaje proteolítico en 16 proteínas no estructurales (nsps), que participan de la transcripción y replicación viral, entre las cuales se encuentran proteasas, la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la helicasa. El extremo 3' codifica para las proteínas estructurales Spike (S), Envoltura (E), Membrana (M) y Nucleocápside (N). Además, el genoma posee ORFs de proteínas accesorias especie-específicas intercalados entre los genes estructurales (Fig. 1) (Alanagreh et al., 2020; Septisetyani et al., 2021).

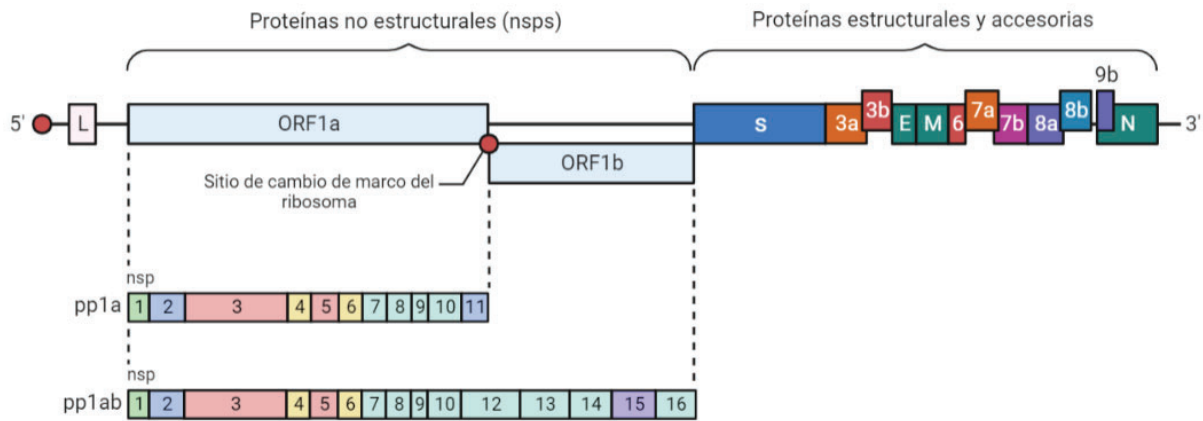


Figura 1. Estructura del genoma de +ssRNA de SARS-CoV-2 con los ORFs que codifican para proteínas no estructurales, estructurales y accesorias. Creado en: Biorender.

a. Características estructurales

SARS-CoV-2 es un virus envuelto con una doble membrana lipídica asociada a tres proteínas estructurales: la glicoproteína de superficie Spike, la proteína de membrana responsable de dar forma a los viriones localizada en la parte interna de la envoltura, y la proteína de envoltura que propicia el ensamblaje de las partículas virales. Además, la nucleocápside empaqueta el genoma de RNA y juntos forman una ribonucleoproteína que se encuentra dentro de los viriones (Fig. 2) (Alanagreh et al., 2020; M. Y. Wang et al., 2020).

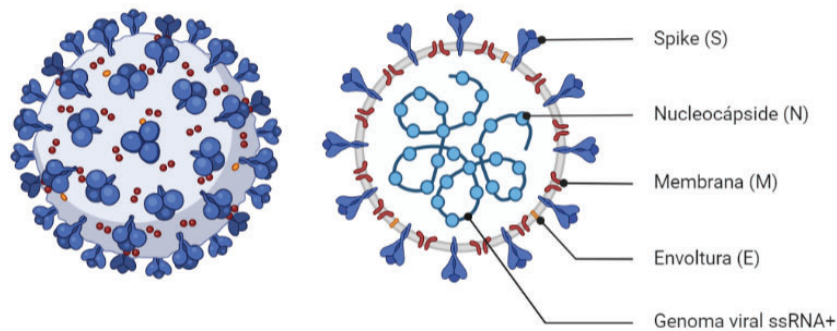


Figura 2. Estructura del virión de SARS-CoV-2 vista desde el exterior (izquierda) y vista desde el interior (derecha) con la mención de sus componentes más relevantes. Se observa la ribonucleoproteína con el genoma viral y las tres proteínas que componen la envoltura viral: M, E y S. Creado en: Biorender.

La proteína S forma homotrímeros expuestos en la superficie de la partícula viral y múltiples copias de ellos se encuentran insertos en la membrana del virión dándole su apariencia de corona. Asimismo, es la proteína que media la entrada del virus a la célula huésped. Sus monómeros se componen de dos subunidades, S1 y S2, que median la unión al receptor celular y la fusión de membranas con la célula huésped, respectivamente. La subunidad S1 se encuentra conformada por el dominio N-terminal (NTD) y el dominio de unión al receptor (RBD) que contiene el motivo de unión al receptor (RBM). Los componentes más importantes que caracterizan a la subunidad S2 son el péptido de fusión (FP) y el sitio de clivaje S2' (Fig. 3A). Las proteínas S de los CoVs son proteínas de fusión de clase 1, por lo

que requieren un clivaje proteolítico que active su potencial fusogénico. Dichas proteínas son metaestables por su capacidad para adquirir distintos estados conformacionales y su clivaje proteolítico es el mecanismo crítico para que ocurra la fusión de membranas (Ou et al., 2020; M. Y. Wang et al., 2020). En los viriones infectivos, la S trimérica se encuentra en un estado pre-fusión donde los dominios RBD alternan su conformación entre los estados *abierto* ('up') y *cerrado* ('down') y es en el primer caso donde se expone el sitio del dominio que interactúa con el receptor. En el estado post-fusión los cambios conformacionales provocan que S1 se disocie de S2, la cual se fusiona con la membrana target llegando a una estructura estable y elongada luego de una cascada de eventos de cambios conformacionales (Fig. 3B) (M. Y. Wang et al., 2020; Juraszek et al., 2021). En conclusión, la glicoproteína S es necesaria y suficiente para mediar la internalización del genoma viral a partir de su unión con la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE2), proteína de membrana que fue reconocida como el receptor humano del virus (Ou et al., 2020).

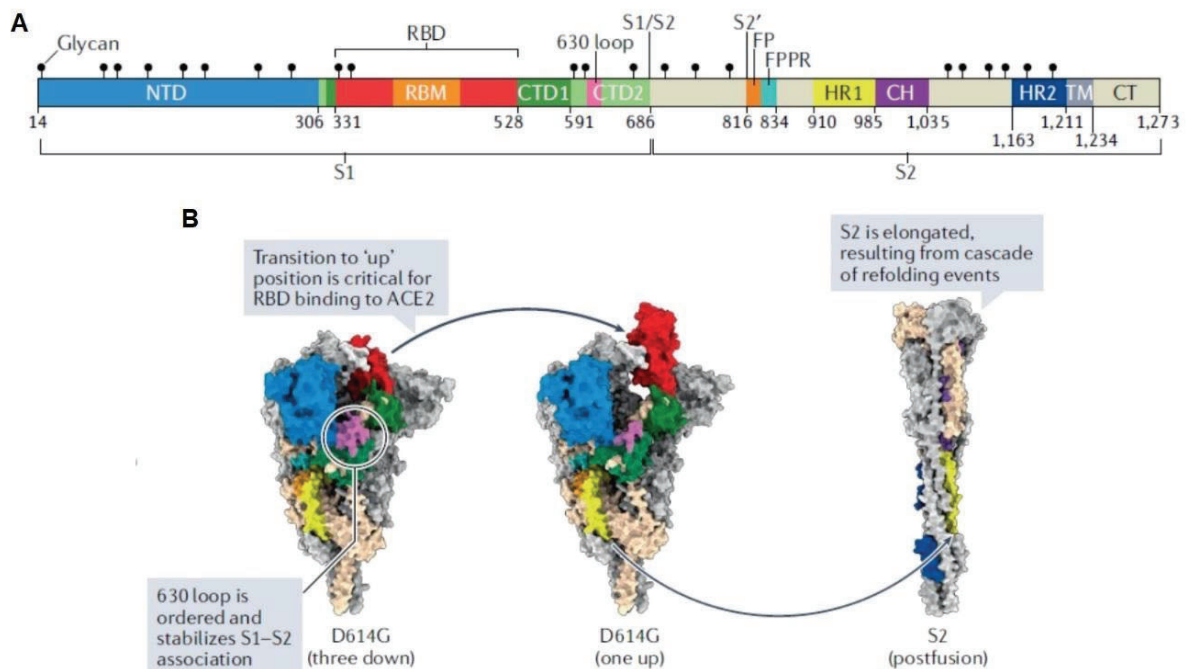


Figura 3. (A) Esquemización de la secuencia aminoacídica completa de la proteína Spike de SARS-CoV-2 con sus subunidades junto con los dominios y sitios de clivaje presentes en cada una de ellas. Se indican sitios de glicosilación en la totalidad de la proteína. (B) Estructuras resueltas por Cryo-EM de trímeros de S de la variante pandémica en su conformación pre-fusión cerrada con los tres RBD hacia abajo; su conformación pre-fusión abierta con un RBD hacia arriba; y la conformación post-fusión compuesta por la subunidad S2 en su forma elongada. Adaptado de Jackson et al. (2021).

b. Filogenia

A principios de 2020, con la obtención de los primeros aislamientos y secuenciación del genoma completo de SARS-CoV-2, se determinó la presencia de un 79% de identidad de secuencia con SARS-CoV y de un 96% de identidad con el genoma de un coronavirus de murciélago, Bat-CoV-RaTG13. A raíz de ello, inicialmente se postuló al murciélago como el

hospedador original y reservorio del virus y el análisis filogenético a partir del genoma completo lo agrupó junto a SARS-CoV y otros coronavirus relacionados hallados en murciélagos y pangolines como parte del subgénero *Sarbecovirus* (Fig. 4). De todas formas, la proteína S y particularmente el dominio RBD, son los componentes más divergentes en cuanto a identidad aminoacídica entre CoVs de distintos mamíferos, denotando la presencia de una brecha evolutiva. Este hecho es consistente con la adaptación del virus a los distintos hospedadores ya que Spike es la proteína clave mediadora de la infección. Diversos grupos de investigación han hallado una mayor identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica de S y RBD de SARS-CoV-2 con coronavirus de pangolín. Más aún, el RBM de coronavirus de pangolín de Guangdong (provincia del sur de China) contiene un sólo aminoácido diferente y la secuencia es 100% idéntica en cinco residuos críticos para la unión a ACE2. En consecuencia, se comenzó a estudiar dicho mamífero como un hospedador intermedio de SARS-CoV-2 hipotetizando la evolución de RBD mediante recombinación entre virus relacionados con Bat-CoV-RaTG13 y coronavirus de pangolín. Sin embargo, aún el virus más cercano a SARS-CoV-2 tiene una baja tasa de identidad lo que implica que posiblemente aún se desconocen huéspedes intermedios (Hu et al., 2020; Thakur et al., 2022).

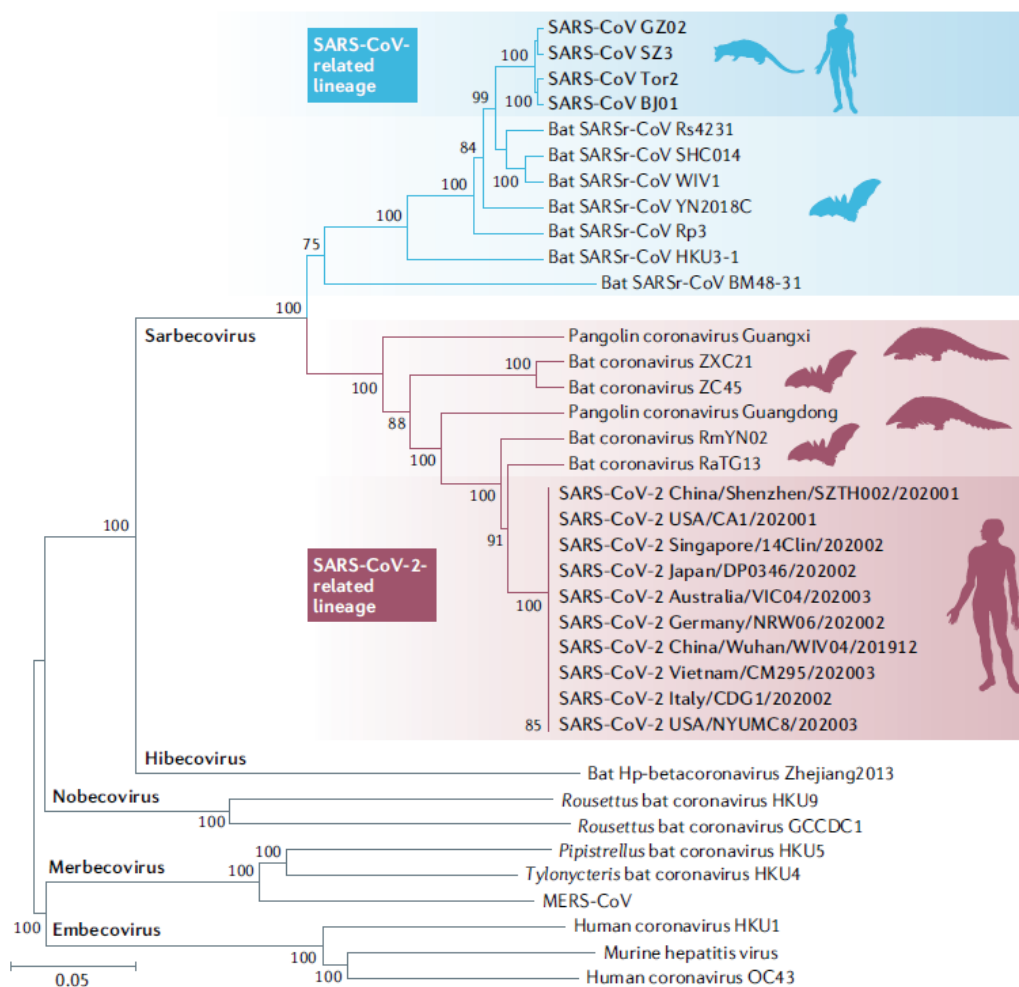


Figura 4. Árbol filogenético de SARS-CoV-2 donde se agrupan diferentes aislamientos del virus en el subgénero *Sarbecovirus* junto con coronavirus estrechamente relacionados de murciélago y pangolín

y junto SARS-CoV. El árbol fue construido con el método de Neighbor Joining utilizando las secuencias genómicas completas de los coronavirus considerados. Recuperado de: Hu et al. (2020).

A pesar de estar filogenéticamente relacionado con otros coronavirus, SARS-CoV-2 tiene características a nivel de secuencia que lo hacen único. Se ha encontrado una inserción peptídica en la proteína S de este virus que no está presente en otros coronavirus de mamíferos conocidos hasta el momento. Se trata de una inserción de cuatro residuos aminoacídicos (PRRA) entre la unión de las subunidades S1 y S2 que adiciona a esta proteína un motivo polibásico de corte por furinas (RRAR). Este hallazgo ha sido importante ya que es probable que dicha característica se encuentre implicada en el aumento de la eficiencia de transmisión del virus y en superar la barrera entre especies (Zhao et al., 2020; Thakur et al., 2022).

2. Ciclo de vida del virus

Debido a la naturaleza del genoma de los coronavirus y su estructura semejante a un mRNA eucariota, el mismo sirve como molde para la traducción de las proteínas virales una vez que el material genético es liberado al citoplasma de la célula permisiva. La replicación de SARS-CoV-2 es citoplasmática y comienza con la traducción de las poliproteínas pp1a y pp1ab que, al ser procesadas, permiten el ensamblaje del complejo de replicación-transcripción conformado principalmente por la RdRp. A raíz de ello, comienza la replicación del genoma con la síntesis de un RNA doble cadena (dsRNA) cuya cadena con polaridad negativa (ssRNA-) sirve como molde para generar nuevos ssRNA+ virales. Al mismo tiempo, se produce RNA subgenómico (sgRNA) a partir del cual ocurre la traducción de los ORFs de las proteínas estructurales y accesorias, entre las cuales se encuentra la nucleocápside (N) que se une al genoma viral. El péptido señal de las proteínas S, M y E dirige su síntesis que ocurre asociada a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Luego, estas proteínas transitan por los compartimentos membranosos intermedios RE-Golgi donde la proteína S adquiere sus glicosilaciones y donde la interacción con la nucleocápside permite la encapsidación del RNA viral. Finalmente, los nuevos viriones transitan el camino secretorio en compartimentos vesiculares para salir de la célula infectada mediante exocitosis (Fig. 5) (Alanagreh et al., 2020; V'kovski et al., 2020).

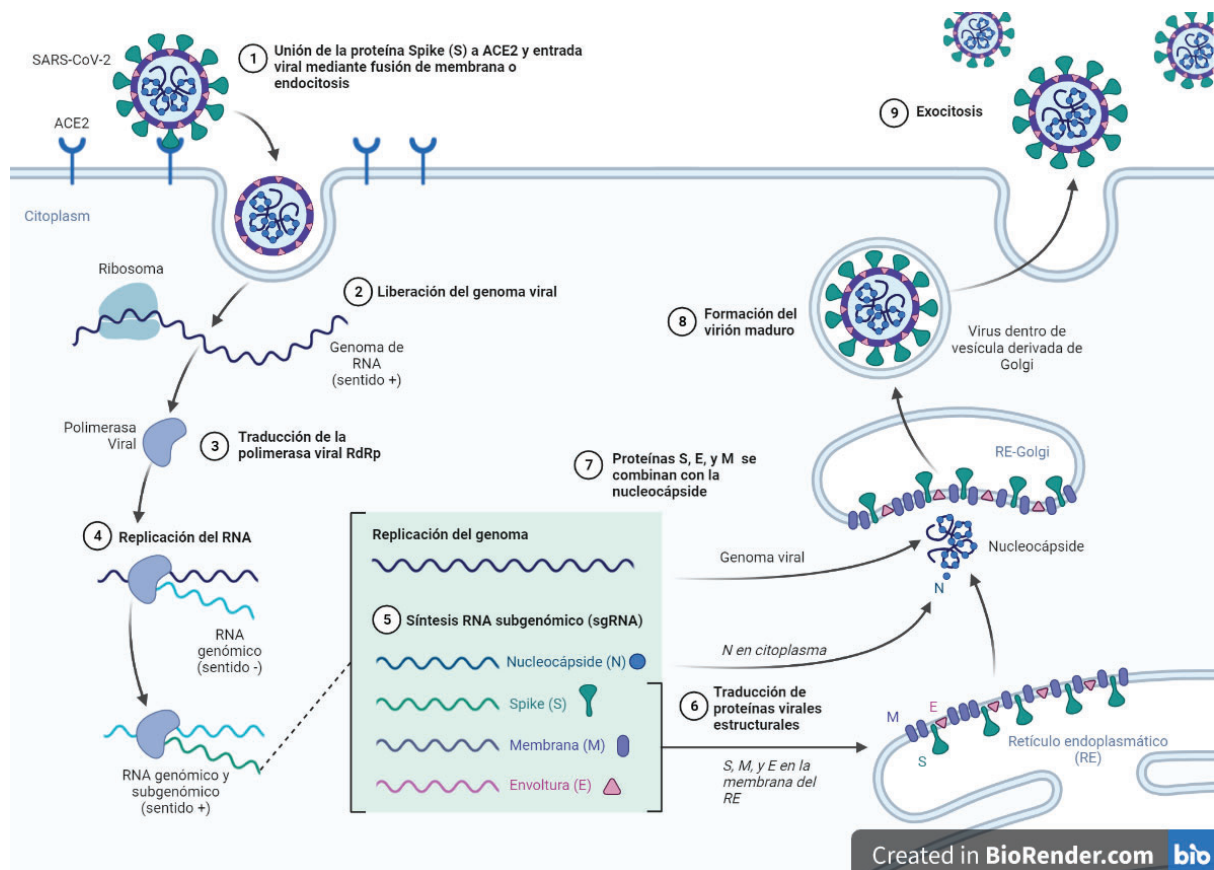


Figura 5. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2 detallado desde su ingreso a células susceptibles y permisivas a partir de la interacción con el receptor ACE2 hasta la formación de nuevas partículas virales. Los pasos del ciclo de vida se numeran de acuerdo al orden de los sucesos. Creado en: Biorender.

a. Mecanismos de entrada a las células

Para ingresar a la célula blanco, la proteína Spike entra en contacto con el receptor ACE2 mediante RBD y la subunidad S2 se fusiona con la membrana celular. Para que dicha fusión ocurra la proteína S debe sufrir un clivaje proteolítico en el sitio S2', el cual es expuesto a partir de cambios conformacionales en S1 una vez que entra en contacto con el receptor. Esto le proporciona al virus dos mecanismos posibles para liberar su genoma en el citoplasma de las células ya que el clivaje puede ocurrir en la superficie celular, mediado por TMPRSS2, o en endolisosomas, mediado por catepsinas. Dicho accionar expone el péptido de fusión (FP) y la disociación de las subunidades S1 impulsa la inserción del péptido en la membrana. TMPRSS2 es la proteasa transmembrana más estudiada por su co-expresión con ACE2 en la superficie celular permitiendo optar por el mecanismo de entrada a través de la superficie celular. Sin embargo, si no hay presencia de proteasas en la superficie celular, el complejo virus-ACE2 es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina y el clivaje es catalizado por catepsinas en endosomas acidificados, ambiente necesario para la actividad de dichas proteasas. Finalmente, en ambos casos, la fusión de membranas genera un poro por donde se libera el RNA viral al citoplasma de la célula (Fig. 6) (Jackson et al., 2021).

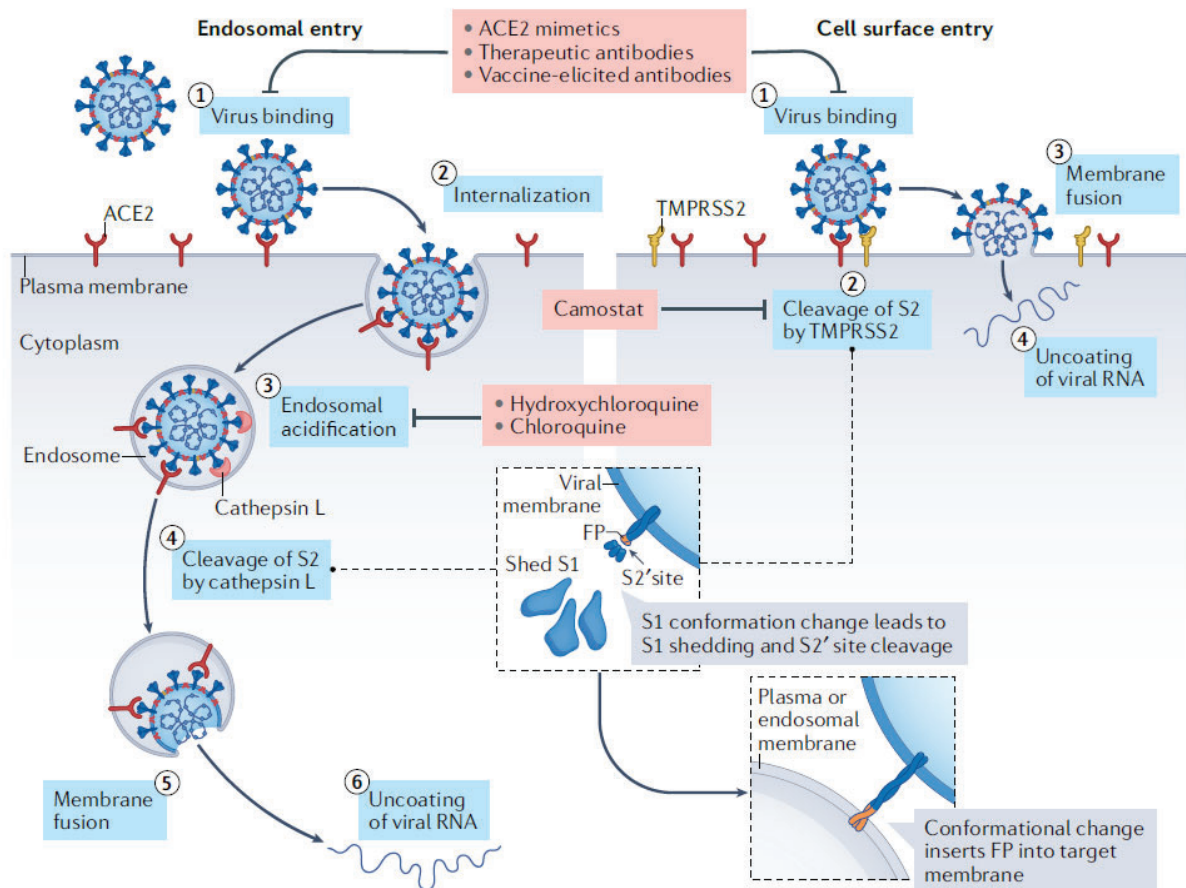


Figura 6. Mecanismos de entrada de SARS-CoV-2 a células blanco. Izquierda: si no hay expresión de TMPRSS2, el modo de entrada es vía endocitosis y el clivaje en S2' ocurre en los endolisosomas mediado por catepsinas. Derecha: en presencia de TMPRSS2 el virus ingresa libera su genoma en el citoplasma a través de la superficie celular ya que allí ocurre el clivaje en S2' que induce la fusión con la membrana plasmática de la célula. Recuperado de Jackson et al. (2021)

b. Sitio de corte por furinas: Adaptación evolutiva

Como ya fue previamente mencionado, la aparición de un nuevo sitio polibásico de corte por furinas (PRRAR) comprendido entre las posiciones aminoacídicas 681-685 presentes entre ambas subunidades de Spike es una característica únicamente presente en SARS-CoV-2 (Fig. 7A). Asimismo, no se ha determinado la aparición natural de sustituciones dominantes que anulen la función de este sitio destacando su importancia en el fitness viral. Dicho corte ocurre en el aparato de Golgi durante la maduración de los viriones en células infectadas provocando que S1 y S2 se mantengan asociadas en cada monómero de Spike mediante interacciones no covalentes (Fig. 7B) (Jackson et al., 2021). El origen evolutivo de este clivaje se ha explicado a partir del estudio de su efecto sobre la estructura de la proteína S. En primer lugar se observó que reduce la estabilidad de la proteína S, lo cual facilita los cambios conformacionales necesarios para la adopción de una conformación abierta, requerida para la exposición de RBD (Wrobel et al., 2020). En segundo lugar, a partir de ensayos con virus pseudotipados en los cuales se pueden incorporar mutaciones en S por mutagénesis sitio-dirigida, se ha demostrado que la ausencia del sitio perjudica la entrada del virus en

algunos tipos celulares atribuyendo una mejora en la eficiencia de dicho mecanismo a la preactivación de Spike por la escisión (Shang et al., 2020).

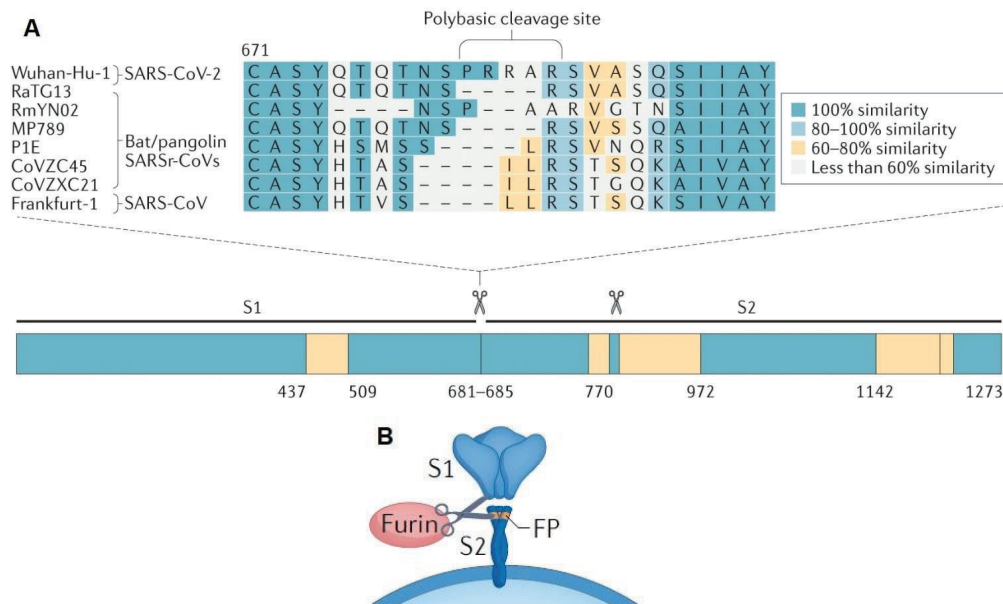


Figura 7. (A) Ilustración esquemática de la proteína S de coronavirus junto con un alineamiento de secuencias de diversos coronavirus de mamíferos de la región donde surgió la inserción de un sitio de corte por furinas en SARS-CoV-2. El color designa el porcentaje de similitud entre secuencias obtenido a partir de la matriz BLOSUM62. A nivel de secuencia no se observa un sitio con características similares en otros coronavirus. Adaptado de V'kovski et al. (2020). (B) Sitio de la proteína S donde ocurre el corte por furinas escindiendo las subunidades S1 y S2 que permanecen asociadas de forma no covalente. Adaptado de Jackson et al. (2021).

Se ha reportado que la interrupción del sitio de corte por furinas resulta de una adaptación del virus a cultivo celular. En particular, se observó que el virus SARS-CoV-2 con una delección del sitio presenta ventajas en la replicación y diseminación en comparación con el virus wild-type en células Vero E6. En este sentido, también se encontró que stocks de SARS-CoV-2 generados en dicha línea celular incorporan mutaciones que interrumpen la función del sitio de corte por furinas (Johnson et al., 2021). Además, se han hecho observaciones similares con virus quiméricos y pseudotipados en la línea celular 293T/ACE2. En pasajes sucesivos de un virus quimérico replicativo conteniendo la proteína Spike en un background de VSV se detectó la aparición dominante de las sustituciones R683G y R683M en la proteína S de las nuevas poblaciones virales alterando el sitio de corte por furinas y acelerando la replicación viral en esta línea celular (Schmidt et al., 2020).

3. Patogénesis de SARS-CoV-2

La enfermedad denominada COVID-19 causada por SARS-CoV-2 manifiesta una gran diversidad de síntomas que van desde individuos completamente asintomáticos hasta cuadros graves que pueden terminar con la muerte. Los síntomas más comunes están relacionados con la afección del sistema respiratorio, fiebre y fatiga, aunque también la patogenicidad de este virus puede perjudicar el sistema gastrointestinal, cardiovascular y el neuronal, en este último caso generando afecciones temporales o crónicas de pérdida de olfato y/o gusto. La

patogénesis de este virus está asociada a una primera fase de daño tisular, principalmente en los pulmones, mediado por la replicación viral, seguido de una segunda fase de inmunopatología caracterizada por el reclutamiento de células efectoras del sistema inmune que causan un cuadro inflamatorio a nivel sistémico que puede persistir incluso una vez terminada la infección viral (Merad et al., 2022). En conclusión, COVID-19 inicialmente puede presentar síntomas similares a una gripe pudiendo luego progresar a una inflamación sistémica que involucre una tormenta de citoquinas, lo cual puede terminar en fallo multiorgánico y muerte del paciente. Asimismo, factores como la inmunosupresión y la edad de los pacientes son considerados para determinar el riesgo asociado a la infección (Harrison et al., 2020).

a. Tropismo de tejido




Los HCoV se transmiten de humano a humano mediante aerosoles formados por gotas de respiración de individuos infectados, contacto con superficies contaminadas y por la vía oral-fecal (Harrison et al., 2020). El establecimiento del tropismo viral depende de la presencia de células susceptibles y permisivas y, particularmente para SARS-CoV-2, se encuentra definido por la proteína S, por lo que el único requisito para la infección es la presencia de la proteína transmembrana ACE2 en la superficie de las células. Por lo tanto, la expresión de este receptor y su distribución en múltiples órganos explica la diversidad de desenlaces clínicos de la enfermedad. Se ha identificado a las células epiteliales de las vías respiratorias, las alveolares y las endoteliales vasculares como el primer sitio de replicación del virus, luego de su entrada al sistema respiratorio del hospedador. Todas las células del tracto respiratorio expresan en menor o mayor medida ACE2 por lo que favorecen la replicación viral en etapas tempranas de la infección. De todas maneras, los mayores niveles de expresión de ACE2 han sido encontrado en el intestino, riñones, músculo cardíaco, entre otros tejidos u órganos, lo cual determina la diversidad de síntomas de COVID-19 (Banerjee et al., 2022).

b. Modelos animales para el estudio de COVID-19

Los modelos animales son comúnmente utilizados para investigar parámetros inmunológicos y evaluar la eficacia y seguridad de vacunas u otros tratamientos durante estudios pre-clínicos. Además, el uso de animales que sean capaces de imitar tanto la infección como las características distintivas de la enfermedad en humanos son aquellos más valiosos para entender los mecanismos de patogénesis de SARS-CoV-2 en pos del desarrollo de terapias efectivas contra el virus. Los modelos murinos son los más frecuentemente usados ya que se encuentran muy bien caracterizados y son fáciles de manipular. Sin embargo la afinidad del virus por el receptor ACE2 murino es limitada provocando que estos animales sean menos susceptibles. A raíz de ello, como estrategia se han utilizado ratones transgénicos que expresan hACE2 con una distribución tisular similar a los humanos. Otras dos especies animales empleadas son los hámsters sirios dorados y los primates no humanos por su susceptibilidad al virus, capacidad de transmisión, manifestaciones clínicas, entre otras características que los hacen modelos de estudio in vivo representativos de la infección con

SARS-CoV-2 que validan hallazgos realizados in vitro (Tabla 1) (Johansen et al., 2020; S. Wang et al., 2021).

Tabla 1. Modelos animales comúnmente utilizados para el estudio de la patogénesis de SARS-CoV-2 y para ensayos pre-clínicos de vacunas y/o tratamientos contra COVID-19. Se describen las características más relevantes que hacen a estos animales buenos modelos de infección de este virus.

Modelo animal	Características frente a COVID-19	Referencias
<p>Ratones transgénicos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Altamente susceptibles a la infección. -Se han determinado altos títulos virales en pulmones, pérdida de peso significativa, signos de neumonía y elevada expresión de citoquinas. -La diversidad genética de los modelos murinos disponibles permite combinar factores de riesgo con la infección viral. 	<p>(Johansen et al., 2020; S. Wang et al., 2021)</p>
<p>Hámsters sirios dorados</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Son naturalmente susceptibles a SARS-CoV-2. -Se observa replicación viral en las vías respiratorias con signos de edema pulmonar, muerte celular e inflamación de tejidos y manifiestan pérdida de peso. -Resuelven la infección sin desarrollar patologías graves -Son capaces de transmitir la enfermedad vía contacto directo y aerosoles siendo un modelo adecuado para el estudio de las características de transmisión del virus. 	<p>(Johansen et al., 2020)</p>
<p>Primates no humanos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Por sus características biológicas similares a humanos son considerados el modelo <i>gold standard</i> -Se ha visto una respuesta de anticuerpos e inmunidad celular post infección que refleja la cinética de lo estudiado en humanos -Se han utilizado para el estudio de la edad como factor de riesgo en la susceptibilidad a SARS-CoV-2 y su patología. 	<p>(Johansen et al., 2020)</p>

4. Respuesta inmune montada ante la infección

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa y juega un rol importante tanto en la detección como en el control inicial de SARS-CoV-2. Debido a que este virus ingresa por el tracto respiratorio superior, la barrera física conformada por las mucosas tiene un rol inicial importante en frenar la diseminación del mismo. Cuando esta barrera es atravesada, los sensores del sistema inmune reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMPs, del virus. El RNA viral es reconocido por receptores endosomales o citosólicos de células infectadas, lo que lleva a la activación de diversos factores de transcripción derivando tanto en la secreción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias como en la activación

sistémica de una respuesta antiviral dominada por un perfil de respuesta de tipo I, el cual es amplificado por la expresión de interferones de tipo I (IFN). Como consecuencia, diversas células del sistema inmune se dirigen al sitio de infección. Entre ellas, los macrófagos, monocitos y células dendríticas, células fagocíticas por excelencia, procesan los componentes proteicos de SARS-CoV-2 y pasan por un proceso de maduración a células presentadoras de antígenos gracias a la presencia de IFN. Posteriormente, unos días luego de la exposición viral se dará comienzo al desarrollo de la respuesta adaptativa, el segundo brazo del sistema inmune crucial para la eliminación del virus (Diamond & Kanneganti, 2022).

a. Respuesta humoral

La seroconversión en la mayor parte de individuos infectados con SARS-CoV-2 ocurre rápidamente dentro de las dos semanas posteriores al inicio de síntomas produciendo los isotipos de anticuerpos IgM, IgA e IgG. Dicha respuesta humoral principalmente está dirigida hacia las proteínas virales S y N. A pesar de que los anticuerpos sistémicos ayuden al control de la diseminación del virus en diversos tejidos, los anticuerpos de mucosas, particularmente IgA secretorio, juega un papel fundamental en prevenir tanto la transmisión de SARS-CoV-2 por vía aérea como la re-infección. En algunos individuos se ha observado una persistencia en los niveles de estos anticuerpos en fluidos nasales por meses (Qi et al., 2022). Por otra parte, la aparición de anticuerpos neutralizantes (nAbs) es rápida pero no así la maduración de su afinidad. Estos están mayormente dirigidos hacia el RBD y actúan bloqueando la interacción con el receptor ACE2, lo que evita la entrada del virus a la célula. Sus niveles en suero exhiben un pico en las primeras semanas post-infección y declinan en el tiempo, lo cual se traduce en una protección reducida y un incremento en el riesgo de reinfección. De todas formas, las respuestas neutralizantes varían ampliamente entre individuos (Sette & Crotty, 2021; Qi et al., 2022). Sin embargo, los altos niveles de carga antigénica y la severidad de la enfermedad COVID-19 se correlacionan con un título excesivo de anticuerpos que puede ocasionarse por una alteración desmedida en la respuesta innata que desregula la cinética de la respuesta adaptativa (Sette & Crotty, 2021; Mistry et al., 2022).

b. Respuesta celular

Contrariamente a los nAbs que reconocen epitopes conformacionales de proteínas de superficie del virus, las células T reconocen epitopes lineales de proteínas del virus que han pasado por un procesamiento intracelular para ser presentados en contexto de MHC por APCs (células presentadoras de antígenos). Por ello mismo, las células T no pueden prevenir la infección inicial, pero pueden responder rápidamente una vez que la infección ocurrió limitando la replicación viral ya que es necesario que ocurra el ingreso de los virus a las células huésped susceptibles y permisivas (Wherry & Barouch, 2022). La importancia de la respuesta celular radica en la protección ante una reinfección con variantes que evaden los nAbs, como las VOCs, y/o ante la ausencia de una respuesta humoral. Se ha reportado una eficiente protección cruzada al mantenerse un 70-80% de la respuesta CD4+ y CD8+ específica contra Spike entre las variantes Beta, Delta y Ómicron. Los epitopes de la respuesta T son abundantes y se localizan en la totalidad de las proteínas virales, sugiriendo

que la mayor parte de la respuesta T se dirige contra determinantes antigénicos conservados y es por ello que la evasión viral de la respuesta celular estaría limitada (Gurevich et al., 2022; Keeton et al., 2022).

c. Respuesta de memoria

A pesar del decaimiento progresivo de los niveles de nAbs posterior a la vacunación y/o infección, se ha demostrado que la respuesta celular de memoria es robusta y se mantiene por al menos 9 meses post-COVID-19 incluso en pacientes seronegativos. Una respuesta más efectiva del sistema inmune en re-infecciones involucra componentes de la memoria celular, los cuales se encuentran programados para responder rápidamente ante el encuentro de antígenos. Se ha determinado un mayor porcentaje de células T CD4+ de memoria con un perfil Th1, productoras de IFN- γ , lo cual es característico de una respuesta antiviral (Gurevich et al., 2022). Por su parte, la mayor parte de las células B de memoria específicas de Spike halladas han sido productoras de IgG, con sólo un 5% de IgA. Una característica particular de la población celular B de memoria es su incremento en el tiempo, ya que se determinó la presencia de una mayor cantidad células a los 6 meses que a 1 mes post-infección en un análisis realizado con 95 individuos. Asimismo, se demostró que dichas células maduraron la afinidad de sus anticuerpos expresando nAbs de mayor potencia, lo cual es consistente con un mantenimiento del centro germinal luego de la infección. De todas formas, el análisis de memoria celular a plazos mayores aún se ve limitada por el surgimiento reciente de este virus (Sette & Crotty, 2021).

5. Variantes de preocupación (VOCs)

A partir de septiembre de 2020, han emergido variantes divergentes de SARS-CoV-2. Algunas de estas variantes han sido clasificadas como variantes de preocupación (variants of concern, VOCs) debido a su elevada transmisibilidad y virulencia, y a la caída en la efectividad de vacunas y terapias con anticuerpos monoclonales. Una de las primeras variantes que emergió y que rápidamente se hizo global fue la llamada *pandémica*, la cual posee la mutación D614G en Spike. A partir de entonces tuvo lugar un surgimiento y selección continua de variantes con un fitness mejorado debido a la evolución natural del virus y la presión inmunogénica que recibe al propagarse en la población, lo cual provoca la acumulación de mutaciones. Debido a que la proteína S es suficiente para que ocurra la infección y es el blanco de los anticuerpos neutralizantes, se ha focalizado el estudio en las sustituciones aminoacídicas de la misma presentes en las distintas variantes (Fergie & Srivastava, 2021; Garcia-Beltran et al., 2021).

Las VOCs Alpha, Beta, Gamma, Delta y Omicron, ordenadas de acuerdo a su surgimiento temporal, han sido las responsables de un aumento masivo de infecciones con SARS-CoV-2 causando las distintas “*olas de COVID-19*” desde el 2020. Cada variante adquiere nuevas mutaciones o incorpora delecciones en la proteína S que mejoran su replicación en el hospedador humano y escapan a la respuesta inmune montada previamente por una infección o vacunación (Mistry et al., 2022). Al mismo tiempo, todas comparten la mutación D614G y diversas investigaciones han demostrado que dicha sustitución promueve el estado

conformacional abierto de Spike incrementando la capacidad infectiva del virus (Benton et al., 2021) (Fig. 8).

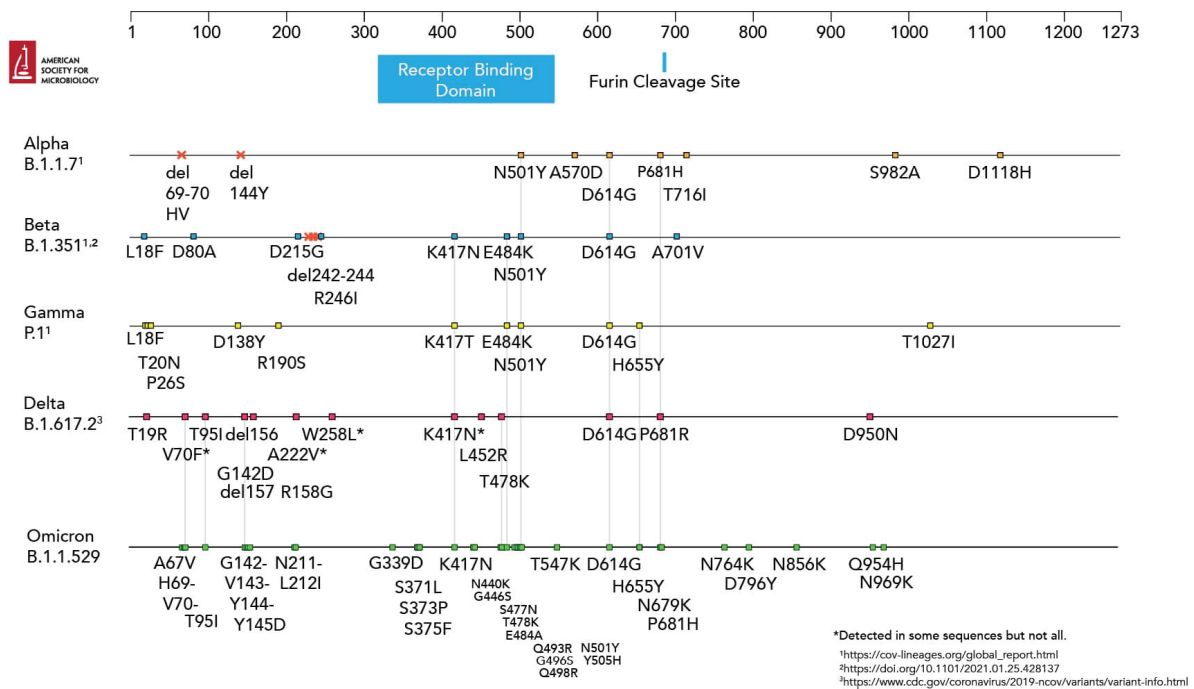


Figura 8. Esquema de la secuencia de la proteína S de las variantes Alpha, Beta, Gamma, Delta y Ómicron de SARS-CoV-2 con las sustituciones aminoacídicas y deleciones más relevantes que se han detectado a las cuales se las ha asociado con un aumento en el fitness viral o escape a la respuesta inmune. Recuperado de: American Society for Microbiology.

Las sustituciones que se encuentran en sitios claves de la proteína Spike implicados en el mecanismo de infección viral, como RBM, RBD o el sitio de corte por furinas, son aquellas que se han estudiado determinando cambios en parámetros como la infectividad, la afinidad de unión al receptor y la evasión de la respuesta inmune. Se han destacado las sustituciones puntuales E484K, N501Y, L452R, K417N/T, P681R/H así como también su interacción (Thye et al., 2021; Mistry et al., 2022) (Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones o sustituciones aminoacídicas presentes en la secuencia de Spike de las diferentes VOCs que han sido clasificadas de importancia. Se indica su ubicación en la proteína S, las variantes en las que se encuentran y el impacto que las mismas tienen sobre el fitness de las VOCs.

Mutación	Ubicación	Variantes	Impacto de la mutación	Referencias
E484K	RBD-RBM	Beta Gamma	-Resistencia a la neutralización por anticuerpos monoclonales e inducidos por la vacunación	(Thye et al., 2021)
N501Y	RBD-RBM	Alpha Beta Gamma Omicron	-La afinidad a ACE2 se ve incrementada ya que se trata de uno de los 6 aminoácidos claves involucrados en la unión al receptor	(Thye et al., 2021)

L452R	RBD-RBM	Delta	-Transmisibilidad incrementada -Escape a la respuesta inmune	(Chavda et al., 2022)
K417N/T	RBD	Beta Gamma Delta Omicron	-Combinada con la mutación N501Y elimina el efecto de los anticuerpos neutralizantes	(Thye et al., 2021)
P681R/H	Sitio de corte por furinas S1/S2	Alpha Delta Omicron	-El sitio de clivaje es más reconocible por furinas, facilitando la escisión de Spike lo cual aumenta la eficiencia de la infección	(Chavda et al., 2022; Mistry et al., 2022)

a. Epidemiología de las VOCs en Argentina

Las VOCs Gamma, Delta y Ómicron han sido de las más relevantes en nuestra región ya que fueron las causantes de las olas de mayor número de casos de COVID-19 diarios como así también de muertes reportadas, desde el surgimiento de la pandemia. Hasta el momento se han tenido tres picos de casos diarios de infección llegando a más de 100 mil casos por día en el último de ellos (Fig. 9) donde predominantemente se han colectado y secuenciado RNA virales de las VOCs Delta y Ómicron como parte del Proyecto Argentino Interinstitucional de Genómica (PAIS) (GISAID, s.f.) (Fig. 10). En cada ola ha prevalecido la infección causada por VOCs dominantes a nivel mundial en dicho lapso temporal que, a raíz de su escape a la respuesta inmune montada por la vacunación o infecciones previas, su alta capacidad de transmisión y su mejora en el fitness, desplazan de la población viral en circulación a variantes previas. Asimismo, el aumento exponencial de la cantidad de casos reportados en cada ola evidencia la mejora en la tasa de transmisión de las nuevas VOCs.

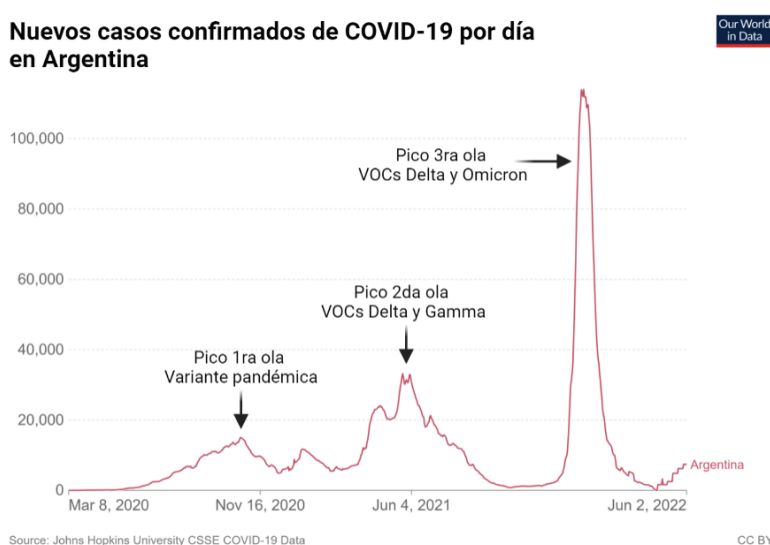


Figura 9. Nuevos casos confirmados de COVID-19 por día en Argentina desde marzo de 2020 hasta junio de 2022. Se observan los tres picos que han ocurrido a lo largo del tiempo correspondientes a las olas de infección con diferentes variantes de SARS-CoV-2. Modificado de Our World in Data

(*Coronavirus Pandemic (COVID-19) - Our World in Data, s.f.*) con datos proporcionados por la Sala de Situación Nacional COVID-19 -Nuevo Coronavirus 2019 y otros virus respiratorios del Ministerio de Salud de la Nación (*Dirección Nacional de Epidemiología e Información Estratégica Con Datos Extraídos Del SNVS 2.0, s.f.*).

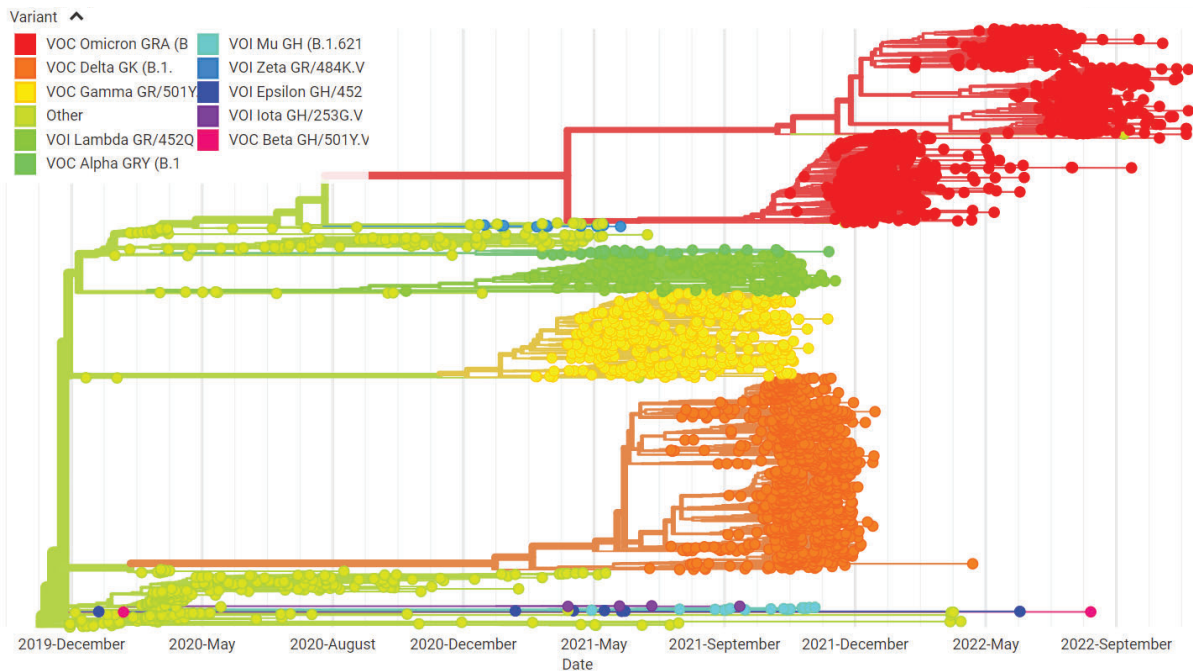


Figura 10. Filodinámica del coronavirus pandémico en Argentina actualizado por el Proyecto Argentino Interinstitucional de Genómica (PAIS) desde diciembre 2019 hasta septiembre 2022. El código de colores hace referencia a distintas variantes que se han secuenciado en el país en el tiempo. Se denota la predominancia temporal de distintas VOCs, lo cual coincide con las olas de infección reportadas en el país. Recuperado de: GISAID - Argentina (<https://gisaid.org>)

6. Desarrollo de vacunas

Para el desarrollo de vacunas y terapias antivirales contra COVID-19 se ha considerado a la proteína S como el blanco más atractivo. En particular, para el desarrollo de vacunas se utilizaron distintas estrategias que incluyen vacunas a subunidad, vacunas basadas en ácidos nucleicos (ADN y ARN) y vacunas de vectores virales que principalmente fueron diseñadas en base a esta proteína constituyendo plataformas vacunales novedosas. Las vacunas a virus inactivado utilizan la partícula viral completa por lo que pueden inducir respuestas inmunes más amplias que las otras plataformas mencionadas las cuales se basan en una única proteína o fragmentos de la misma (Dai & Gao, 2020). Por su parte, las plataformas basadas en ácidos nucleicos son fácilmente manipulables para incluir mutaciones en la secuencia de Spike ante la cual se montará una respuesta inmune, y pueden modificarse para brindar protección frente a las nuevas VOCs. Es así que, la compañía Moderna ya actualizó su plataforma ofreciendo una vacuna bivalente actualizada con la variante Omicron (Bhattacharya & Victora, 2022).

La cinética de respuesta inmune post-vacunación es similar a lo observado post-infección ya que los títulos de anticuerpos neutralizantes manifiestan un pico entre los 7 y 14 días. Por el contrario, los nAbs persisten por menor tiempo luego de la vacunación y por este motivo es

necesaria la aplicación de más de una o dos dosis, con plataformas homólogas o heterólogas, mientras la circulación comunitaria del virus continúe. En cuanto a la respuesta celular, se observó una respuesta robusta T CD4+ con un perfil Th1 y CD8+ en las vacunas de mRNA y basadas en adenovirus ya aprobadas para su aplicación (Fergie & Srivastava, 2021).

En Argentina, la vacunación comenzó a fines del año 2020 aplicando en las poblaciones de riesgo la vacuna basada en vectores adenovirales SPUTNIK V. Las vacunas aprobadas actualmente en el país y a nivel mundial son numerosas considerando el escaso tiempo desde que se identificó este nuevo virus y, a su vez, las estrategias aplicadas son diversas constituyendo un alto nivel de innovación (Tabla 3).

Tabla 3. Diferentes plataformas vacunales que han sido aplicadas o se encuentran en fases clínicas en Argentina. Se denota la estrategia y el antígeno utilizado en la formulación, así como también el estado actual en el país de las vacunas mencionadas.

Vacuna	Estrategia	Antígeno utilizado	Estado actual en Argentina	Referencias
Pfizer-BioNTech (BNT162b2)	mRNA	S estabilizada en su conformación prefusión	Aprobada	(S. Wang et al., 2021)
Moderna (mRNA-1273)				
SPUTNIK V (Ad26 y Ad5)	Adenovirus recombinante humano	S de longitud completa basada en la variante ancestral Wuhan		
AstraZeneca (ChAdOx1)	Adenovirus de chimpancé deficiente en la replicación			
ARVAC	Subunidad	Dímero de RBD de la variante Gamma	Fase II	(datos no publicados)

a. Correlatos de protección

Se define como correlato de protección a un marcador inmunológico asociado con protección contra la infección. Se ha reportado que el mejor correlato de protección contra la infección de SARS-CoV-2, hasta el momento, son los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación. Este parámetro permitiría predecir la eficacia de las vacunas, es decir, las vacunas que inducen mayores títulos de anticuerpos neutralizantes a nivel sistémico son las que mayor eficacia han demostrado (Earle et al., 2021; Khoury et al., 2021). En estudios de fases preclínicas se ha determinado una alta protección frente a la infección en primates no-humanos vacunados con plataformas en las que no se observó una buena respuesta celular pero sí una producción sustancial de nAbs (Dai & Gao, 2020). En investigaciones más

recientes con humanos se ha postulado que la inmunidad humoral constituye una parte integral de la protección contra SARS-CoV-2 ya que disminuye el riesgo asociado a la infección (Perry et al., 2022). La última guía para la industria emitida por la FDA (Emergency Use Authorization for Vaccines to Prevent COVID-19, March 31, 2022) recomienda obtener estos datos empleando ensayos de neutralización basados en pseudovirus o en el virus SARS-CoV-2 vivo, e incluyendo tanto el virus contra el cual está dirigido el prototipo de vacuna como las variantes de interés.

Con respecto a la respuesta celular, se ha determinado que el número de células T de memoria específicas residentes en los pulmones se correlacionan con la protección clínica. En este sentido, para elucidar la potencialidad de la respuesta celular como correlato de protección contra SARS-CoV-2 se requerirá del desarrollo de ensayos high-throughput y el estudio de la coordinación de ambos brazos de la respuesta adaptativa, tanto celular como humoral, a nivel poblacional (Moss, 2022).

7. Pseudovirus basados en lentivirus de SARS-CoV-2

Debido a que el trabajo con altos títulos de virus infectivo de SARS-CoV-2 supone un elevado riesgo individual y comunitario, éste debe ser manipulado bajo un nivel de bioseguridad de tipo 3 (BSL3). Como alternativa, se han desarrollado ensayos basados en pseudovirus tipificados con la proteína Spike de SARS-CoV-2, los cuales usan como plataforma virus que pueden ser manipulados en un nivel de bioseguridad de tipo 2 (BSL2). Los pseudovirus (Pv) son partículas virales recombinantes que tienen un core homólogo y pueden incorporar en su superficie proteínas de envoltura derivadas de distintos virus. Sus genes son alterados para atenuar su virulencia o generar partículas no replicativas, y, en general, llevan también un gen reportero que permite identificar y cuantificar niveles de infección. En los pseudovirus, las proteínas de envoltura de virus heterólogos mantienen su conformación y permiten la infección de células susceptibles al virus de interés. Asimismo, este sistema permite la manipulación genética para incorporar de forma rápida cambios en la secuencia de las proteínas de envoltura y producir variantes de pseudovirus, como pueden ser aquellos en la proteína S de las VOCs que emergieron a lo largo de la pandemia. Dada su practicidad y robustez, han sido utilizados para estudiar el tropismo celular, para el desarrollo de vacunas y para dilucidar mecanismos de entrada del virus, entre otros. Los sistemas más utilizados son aquellos basados en lentivirus o VSV (virus de la estomatitis vesicular) (Ou et al., 2020; Gillot et al., 2021; Tsai et al., 2021).

El uso de pseudovirus tipificados con la proteína Spike de SARS-CoV-2 resulta una estrategia adecuada y un método práctico y robusto para la evaluación de la respuesta inmune humoral contra el virus. En efecto, se ha reportado una buena correlación entre distintos ensayos de neutralización basados en pseudovirus y los ensayos de neutralización que usan al virus SARS-CoV-2 vivo considerados como el gold standard (Earle et al., 2021; Gillot et al., 2021; Larsen et al., 2021). Además, se han desarrollado distintas líneas celulares que sobreexpresan hACE2 y son usadas como células huésped susceptibles para dichos ensayos como las células renales embrionarias humanas (human embryonic kidney, HEK) (Ou et al., 2020; Septisetanyi et al., 2021). Los pseudovirus basados en lentivirus de SARS-CoV-2 se basan en

una partícula lentiviral derivada de HIV que permiten incorporar a Spike como proteína de superficie heteróloga al core de retrovirus mediante un sistema de empaquetamiento viral basado en la co-transfección de tres plásmidos: un plásmido de empaquetamiento, un plásmido de transferencia conteniendo el gen de GFP (*green fluorescent protein*) como reportero de la infección y un plásmido de expresión de Spike (Schmidt et al., 2020; Chen & Zhang, 2021).

- El vector de empaquetamiento está basado en el background de HIV ya que contiene los genes *gag* y *pol* que codifican para las proteínas estructurales y aquellas con actividad enzimática del virus, respectivamente. Entre las proteínas estructurales se encuentran la proteína de la cápside, la proteína de matriz y la nucleoproteína, mientras que la proteasa viral, la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN) son las principales proteínas con actividad enzimática de HIV (Seitz, 2016). Estas proteínas son sintetizadas y se incorporan dentro de la partícula viral como tales.
- El vector de transferencia que codifica para la proteína reportera GFP funciona como genoma de RNA del pseudovirus ya que un extremo 5' LTR truncado dirige la síntesis del mismo y, además, contiene la señal para el empaquetamiento de genomas de RNA recombinantes en las partículas virales. Asimismo, este vector contiene los elementos cis-regulatorios necesarios para la transcripción reversa y la integración en la célula blanco de transducción.
- El vector de envoltura codifica para la proteína de superficie Spike de SARS-CoV-2 bajo el promotor fuerte de CMV. La secuencia posee una delección de los últimos 19 aminoácidos de su extremo C-terminal donde se encuentra la señal de retención en el RE necesaria para la generación de viriones de SARS-CoV-2, como fue previamente detallado. Esta delección genera que la proteína Spike sintetizada continúe por la vía secretoria y termine anclada en la membrana celular, donde brotan las partículas lentivirales, lo cual eficientiza la incorporación de la misma en los viriones y su liberación desde las células transfectadas (Ou et al., 2020).

En las células susceptibles conteniendo el receptor ACE2, los pseudotipos de SARS-CoV-2 inician una ronda única de replicación de acuerdo al ciclo viral de HIV, por lo que, luego de la transcripción reversa de su material genético de +ssRNA, integran el mismo al genoma de las células (HIV Replication Cycle | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, s.f.). El transgén incorporado es aquel que codifica para GFP cuya expresión es dirigida desde un promotor fuerte del vector, CMV (Fig. 11).

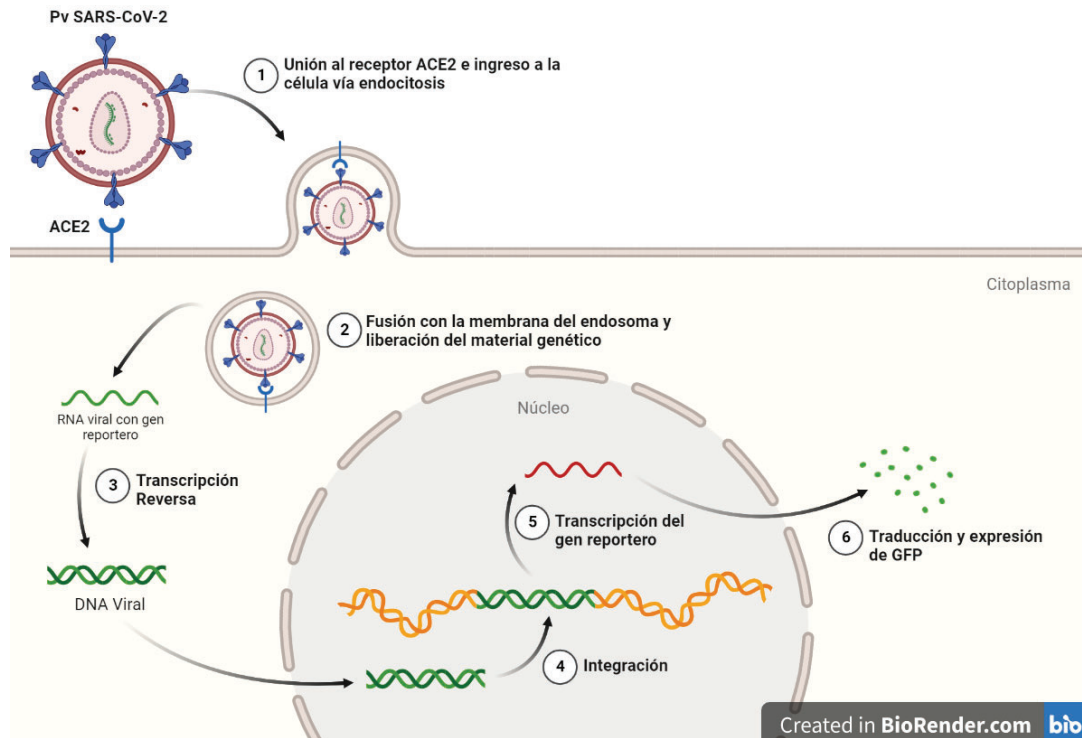


Figura 11. Ronda única de replicación de los pseudovirus basados en lentivirus de SARS-CoV-2. Ingresan a las células susceptibles mediante la interacción con ACE2 y continúan un ciclo de vida basado en el de HIV. La inserción del genoma viral al genoma de las células provoca la expresión de GFP, proteína reportera de la infección. No se generan nuevas partículas virales. Los pasos se enumeran de acuerdo al orden de los sucesos. Creado en: Biorender.

Hipótesis

La vacunación contra SARS-CoV-2 induce protección contra COVID-19 en humanos y modelos animales, y los anticuerpos neutralizantes son, hasta el momento, el mejor correlato de protección. Los ensayos de neutralización basados en pseudovirus tipificados con Spike permiten determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a distintas VOCs en individuos vacunados y el uso de modelos animales de infección permite evaluar la protección ante la infección luego de la vacunación.

Objetivo General

Evaluar la respuesta inducida por la vacunación frente a SARS-CoV-2 empleando ensayos in vitro con pseudovirus para medir la capacidad neutralizante de los anticuerpos y el modelo in vivo de hámster para determinar la protección frente a la infección.

Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por la vacunación con SPUTNIK V en humanos contra distintas variantes de preocupación de SARS-CoV-2, a distintos tiempos, utilizando el sistema de pseudovirus basados en lentivirus.
 - a. Diseñar y construir los vectores de expresión de la proteína Spike de SARS-CoV-2 de las variantes de preocupación Gamma, Delta y Ómicron.
 - b. Producir pseudovirus tipificados y caracterizar su infectividad.
 - c. Titular anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación contra distintas variantes de preocupación de SARS-CoV-2.
2. Evaluar la protección brindada por la formulación intramuscular de ARVAC frente al desafío con SARS-CoV-2 en modelo de hámster.
 - a. Determinar la variación de peso post-infección en animales vacunados y no vacunados como parámetro de severidad de la infección.
 - b. Cuantificar RNA viral en tejido pulmonar y titular SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superior e inferior como medida directa de protección.
 - c. Analizar la patología provocada por la infección en tejido pulmonar mediante tinciones de cortes histológicos.

Metodología

1. Diseño experimental 1: Ensayo longitudinal de seguimiento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en individuos vacunados con SPUTNIK V.

En el contexto del proyecto de Investigación “Evaluación de la respuesta inmune humoral al SARS-CoV-2 en la población vacunada de la Provincia de Santa Fe” dirigido por la Dra. Ana Laura Cavatorta (exp. 28474/2021) aprobado por la Comisión de Bioética de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad de Rosario se realizó un estudio de seroprevalencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en 1121 trabajadores de la salud vacunados con SPUTNIK V entre enero y marzo de 2021. La respuesta humoral fue monitoreada a las 2 y 24 semanas luego de completado el esquema de vacunación en 380 individuos, de los cuales 49 fueron también monitoreados en su respuesta de anticuerpos neutralizantes. En este trabajo se eligieron de manera aleatoria muestras pareadas extraídas a 2 y 24 semanas luego de completado el esquema de dos dosis de Sputnik V de 10 individuos sin diagnóstico de COVID-19 previo o durante el período de estudio. El análisis que se llevó a cabo tiene como objetivo evaluar los niveles de anticuerpos neutralizantes únicamente inducidos por la vacunación utilizando el sistema de pseudovirus.

Muestras de suero

Las muestras de suero de 10 individuos vacunados tomadas a las 2 y 24 semanas post vacunación fueron recibidas a través de un acuerdo de transferencia de material entre la Universidad Nacional de San Martín y la Universidad Nacional de Rosario.

Línea celular HEK293-hACE2

La línea de células susceptibles a SARS-CoV-2, HEK293-hACE2, sobre expresa el receptor hACE2 y ha sido desarrollada por nuestro grupo de trabajo mediante la transducción de células HEK293T con lentivirus expresando hACE2 y la selección clonal bajo tratamiento con higromicina (Coria et al., 2022). En esta línea celular, los lentivirus pseudotipados con la proteína Spike de SARS-CoV-2 interactúan específicamente con el receptor hACE2 y transducen dichas células produciendo GFP como gen reportero de la infección.

Obtención de los vectores de expresión de la proteína Spike de SARS-CoV-2

El sistema de lentivirus pseudotipados se basa en la incorporación de la proteína Spike de SARS-CoV-2 en la envoltura de virus recombinantes. Con este fin se empleó el plásmido pcDNA3.1 como vector para la expresión de versiones truncadas de Spike fusionadas en el extremo C-terminal a un tag de 3xFLAG descrito previamente por Ou et al. (2020). En particular, el servicio de síntesis de genes de Genscript permite el diseño y la construcción de plásmidos en vectores de expresión. Para este proyecto, se encargó la síntesis del plásmido pcDNA S-D614G-3xFlag con la secuencia codificante de Spike (Δ 19) optimizada para el uso de codones en humanos y de los plásmidos que incorporan las mutaciones correspondientes a

las VOCs Gamma, Delta y Ómicron. Los ADNs de los vectores de expresión fueron preparados en el laboratorio utilizando métodos estándar de obtención de ADN a partir de la lisis alcalina de bacterias competentes *E. coli* XL1blue transformadas con los plásmidos sintéticos, de acuerdo a lo establecido por el fabricante (QIAGEN Plasmid Purification, 2021). Utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Fisher) y mediante electroforesis en gel de agarosa 1% se determinó la concentración de DNA doble cadena y el nivel de pureza, respectivamente.

Para verificar la identidad de los vectores de expresión de Spike purificados, se llevó a cabo una digestión del DNA purificado con enzimas de restricción, particularmente con HindIII y XhoI en buffer G (Thermo Scientific). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en 10 μ l de volumen final con aproximadamente 100 ng de DNA y 1-2 U de cada enzima por 45 minutos a 37 °C. La compatibilidad de ambas enzimas junto con el buffer utilizado fue determinada mediante la plataforma NEBCloner provista por New England BioLabs.

Producción de pseudovirus tipificados

Este protocolo fue previamente puesto a punto y optimizado por el grupo de trabajo. Los pseudovirus (Pv) se obtuvieron a partir de la transfección de células HEK293T (2×10^6 células) cultivadas a 37°C y 5% CO₂ desde el día previo hasta aproximadamente un 90% de confluencia en placas para cultivo celular de 60 mm (p60) con 5 ml de medio completo DMEM 10%SFB, Pen-Strep 1% (cDMEM). Las células fueron transfectadas con el plásmido de expresión de Spike pcDNA S-D614G-3xFlag (o sus variantes), el plásmido de empaquetamiento psPAX2 (Addgene #12260) y el plásmido de transferencia pLB GFP (Addgene #11619). De este modo, la transducción/infección con los pseudovirus que se obtengan llevará a la expresión de GFP en las células infectadas. Para la producción de los pseudovirus, se preparó, para cada p60, una solución conteniendo 2,8 μ g de cada plásmido (relación 1:1:1) obteniendo una masa total de DNA cercana a 8,5 μ g, 17 μ l de PEI (relación 2:1 volumen:masa DNA) y DMEM hasta un volumen final de 500 μ l. La mezcla de transfección se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para luego ser adicionada al medio de cultivo de cada placa. Se procedió luego con una incubación de 1:30/2h en estufa a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, se removió la mezcla de transfección, se realizó un lavado con 3 ml de PBS y se adicionaron 5 ml de medio DMEM 5%SFB Pen-Strep 1%.

Las partículas virales se recuperaron del sobrenadante de cultivo luego de 72 h de incubación de acuerdo al protocolo ya descrito por Coria et al. (2022). Se realizaron alícuotas de 1 ml que fueron refrigeradas a -80°C. Posteriormente, los Pv fueron caracterizados en términos de título viral e incorporación de Spike con el fin de estandarizar los ensayos de neutralización.

Titulación de stocks virales

Se estimó el título de los stocks de pseudovirus mediante la infección de células HEK293-hACE2 susceptibles y el recuento de células GFP positivas en el equipo CTL ImmunoSpot S6 Universal Analyzer. Para la titulación se infectaron monocapas subconfluentes de células HEK293-hACE2 cultivadas desde el día previo en placa de 96

pocillos con cDMEM (10^4 células/pocillo). Se utilizó el stock viral sin diluir y se realizaron dos diluciones seriadas al tercio (1/3; 1/9) en medio de cultivo procediendo luego con una incubación de 30 minutos en estufa a 37°C , 5% CO_2 . Posteriormente, se descartó el medio de cultivo de la placa multipocillos y se llevaron a cabo las infecciones por triplicado, de cada dilución, utilizando un volumen de inóculo de 50 μl por pocillo. Además, se incluyeron controles de células sin infectar. Seguidamente, se centrifugó la placa durante 1h a 2500 rpm a temperatura ambiente para finalmente adicionar 50 μl de medio de cultivo completando el volumen final de 100 μl .

Las placas infectadas fueron reveladas luego de la incubación por 72 h en estufa a 37°C , 5% CO_2 . Se procedió con un paso de fijación de 30 minutos con PFA 4% (50 μl por pocillo). Luego, se lavaron las células con 100 μl de PBS y se colocaron 30 μl de PBS en cada pocillo para el posterior escaneo de la placa en el equipo CTL Immunospot. Para estimar el número de células infectadas con pseudovirus en cada pocillo se utilizó el software del equipo para realizar el recuento de células GFP positivas y el control de calidad de dichas mediciones. Por último, para obtener el título viral de cada stock expresado como unidades formadoras de focos por ml (UFF/ml) se tuvieron en cuenta los valores del recuento de focos en los pocillos (P_i) de las réplicas correspondientes a una dilución seleccionada adecuada, el factor de dilución correspondiente (FD_i) y el volumen de inóculo:

$$\text{Título de Pv} \left(\frac{\text{UFF}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Nro de focos en } P_i * FD_i}{\text{Volumen (ml)}}$$

Determinación de la incorporación y procesamiento de Spike mediante Western Blot

Se analizó la incorporación a la partícula viral y el procesamiento de corte por furinas de la proteína Spike en cada una de las variantes de pseudovirus. Para ello, se concentró un mismo volumen de cada stock viral mediante un ciclo de centrifugación overnight (ON) a 3000 g y 4°C . El 90% del medio fue descartado y el volumen restante se resuspendió en un mismo volumen de cracking buffer 2X. Además, se adicionó DTT (Dithiothreitol) 0,1M. Las muestras fueron incubadas a 95°C por 5 min para posteriormente ser corridas en condiciones desnaturalizantes mediante una electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizó un gel de poliacrilamida con un porcentaje de acrilamida/bisacrilamida escalonado, teniendo 12% en la zona inferior y 8% en la zona superior. Se analizó por Western blot el contenido de Spike con un anticuerpo primario anti-3xFLAG hecho en conejo (dilución 1:500), luego de la transferencia de bandas mediante un sistema semi-seco (45 min, 15V) a una membrana de nitrocelulosa y el bloqueo durante 1 h con TBS-Tween 0,05%, 1% leche descremada. El contenido de la proteína p24 de HIV presente como parte de la cápside de las partículas pseudovirales se empleó como patrón de carga y fue revelado utilizando un anticuerpo primario anti-p24 hecho en ratón (dilución 1:5000). Los anticuerpos secundarios anti-ratón IRDye 680 y anti-conejo IRDye 800 (dilución 1:20000) fueron utilizados para la detección con el software Odyssey Imaging System (LI-COR). Como control negativo de la detección de Spike se utilizaron pseudovirus basados en lentivirus tipificados con la proteína G de VSV (virus de estomatitis vesicular).

Incorporación de la mutación R683G a Spike

Para incorporar la mutación de arginina (R) por glicina (G) en la posición 683 (R683G) en los vectores de expresión de Spike de la variante pandémica (D614G) y de la variante Gamma, se optó por realizar mutagénesis sitio dirigida por PCR a partir de la generación de megaprimers conteniendo la mutación. Se realizaron dos ciclos de PCR en un termociclador (BioRad), el primero para la síntesis de los megaprimers y el segundo para efectuar la mutagénesis puntual dirigida. En ambos casos el DNA molde fue el vector de expresión de Spike de la variante D614G o Gamma. Se llevó a cabo un protocolo modificado de aquel descrito por Burke & Barik (2003) al optar por una estrategia que no emplea endonucleasas de restricción para incorporar la mutación.

Diseño de primers

Los primers para la mutagénesis del codón 683 se diseñaron utilizando el software SnapGene para visualizar la secuencia del vector de expresión pcDNA 3.1 S-3xFLAG. Se diseñaron también primers río abajo y río arriba del sitio de mutación que se utilizaron posteriormente para la secuenciación (Fig. 12A). Para incorporar el residuo de glicina en la posición 683, se diseñaron primers que incorporan una guanina (G) en la base nucleotídica 2056 de la secuencia codificante, y su respectiva base complementaria, para efectuar una mutación puntual modificando el codón AGA (Arg, R) por GGA (Gly, G) (Fig. 12B).



Figura 12. (A) Visualización en SnapGene del mapa lineal de la secuencia de la proteína Spike con los primers para introducir la mutación R683G (R683G Rv; R683G Fw) y los primers para secuenciar la región (Fw Seq; Rv Seq). (B) Visualización con aumento en la región del codón 683 de Spike mostrando tanto la secuencia nucleotídica como aminoacídica. Se denota la región de hibridación de los primers diseñados para realizar la mutagénesis dirigida.

Para el diseño de todos los primers fue tomada en cuenta la conservación aminoacídica de las regiones de la proteína Spike consideradas en la variante Gamma respecto a la variante pandémica (D614G). Las secuencias diseñadas fueron evaluadas con la herramienta OligoAnalyzer (IDT, Integrated DNA Technologies) para determinar la temperatura de melting, el % de GC y la energía libre de Gibbs (ΔG) asociada a la formación de dímeros.

Obtención de megaprimers

Se sintetizaron dos megaprimers (MP) conteniendo la mutación en su secuencia utilizando los pares de primers R683G_F con BGH_R (MP1) y R683G_R con CMV_F (MP2) (Tabla 4). En las mezclas de reacción se añadieron 1,25 U de la polimerasa DreamTaq junto con su buffer 10X (Thermo Fisher), 0,5 μ M de cada primer, 0,2 μ M de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂ y aprox. 0,5 μ g de vector molde en un volumen final de 25 μ l. Además, se incluyó un control negativo de reacción sin DNA molde. Luego de una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, se llevaron a cabo 34 ciclos de 1 min de desnaturalización a la misma temperatura, 30 seg de hibridación a 55°C y 2 min de extensión a 72°C (Actividad de DreamTaq polimerasa: 1'/kb). Terminados los ciclos, la extensión final tuvo una duración de 5 min a 72°C. Ambos megaprimers (MP) fueron purificados a partir de la extracción por gel de agarosa de acuerdo a lo establecido por el fabricante (QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN). Se cuantificó el contenido de DNA mediante el uso del equipo Nanodrop (Thermo Fisher).

Tabla 4. Primers utilizados para la síntesis de los megaprimers (MP) con la mutación puntual de interés. Se resaltan en negrita las bases nucleotídicas que insertarán la mutación en la secuencia. Se indican los primers forward (F) y reverse (R).

Nombre	Secuencia (5' - 3')
R683G_F	CTAACTC ACCCAGGGGAG CCCCGC
R683G_R	GCGGGCTCC CTGGGTGAG TTAG
CMV_F	CGCAAATGGG CGGTAGG CGTG
BGH_R	TAGAAGGCACAG TCGAGG

Mutagénesis dirigida mediante PCR

Se realizaron dos reacciones de mutagénesis por PCR, utilizando un MP en cada una de ellas, para cada variante viral. El volumen final de cada mezcla de reacción fue 25 μ l. Se utilizó 1 U de la polimerasa Phusion de alta fidelidad junto con su buffer HF 5X (Thermo Fisher), 0,2 μ M de dNTPs y una concentración 10X del MP respecto a la concentración de DNA molde. El ciclado llevado a cabo consistió en diferente número de ciclos en los cuáles se incorporó una modificación en la temperatura de la etapa de hibridación siendo escalonada para los primeros 4 ciclos y fija para los restantes 14 (Tabla 5). Terminados los ciclos, la extensión final tuvo una duración de 5 min a 72°C.

Tabla 5. Descripción de los ciclos de PCR efectuados para la mutagénesis dirigida con megaprimers. Se indica el tiempo y la temperatura de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión como así también el número de ciclos correspondientes a cada fase.

Etapa	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
Temperatura	98°C	65°C -2°C por ciclo	72°C

Tiempo (min)	1	1:30	4:30*
Nro de ciclos	4X		
Etapas	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
Temperatura	98°C	65°C	72°C
Tiempo (min)	1	1:30	4:30*
Nro de ciclos	14X		

*Actividad de Phusion DNA polimerasa: 30^{''}/kb

Los productos de reacción se incubaron con 0,5 µl de la enzima de restricción DpnI durante 3h a 37°C. La enzima DpnI es específica para la digestión de DNA metilado y, por lo tanto, se utiliza para remover el molde de PCR con la secuencia wild type al digerirse únicamente el DNA metilado purificado a partir de la lisis alcalina de bacterias transformadas. Seguidamente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* XL1blue con los productos de las reacciones de PCR.

Selección de clones

A partir del crecimiento de colonias bacterianas producto de la transformación previamente mencionada, se seleccionaron un total de 12 clones para cada variante D614G y Gamma: 6 obtenidas luego de la mutagénesis con el MP1 y 6 con el MP2. Se realizó un pre-cultivo bacteriano de aprox. 3 ml durante 24 hs en medio LB a 37°C con agitación. Posteriormente, se purificó el DNA mediante la lisis alcalina de bacterias de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (QIAGEN Plasmid Purification, 2021). Asimismo, mediante electroforesis en gel de agarosa 1% se verificó que el tamaño del vector, producto de la reacción de mutagénesis por PCR, sea el correcto y se corroboró su identidad mediante la digestión con HindIII y XhoI como fue previamente mencionado en *Obtención de los vectores de expresión de la proteína Spike de SARS-CoV-2*. De esta manera, se continuó trabajando con aquellos clones cuyo tamaño y patrón de corte eran iguales al del vector de expresión de Spike de la variante parental correspondiente. Por último, utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Fisher) se determinó la concentración de DNA de aquellos clones conservados.

Secuenciación y caracterización de mutantes

Se realizó una precipitación de 30 µl del DNA de los clones previamente seleccionados con 0,8 M NaCl y 40 µl 13% peso/volumen de PEG durante una noche en hielo. Luego, se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C durante 30 min. Al pellet conteniendo el ácido nucleico se le efectuó un lavado con etanol 70% seguido de una centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. Se resuspendió el DNA concentrado en 30 µl de agua estéril y, finalmente, mediante electroforesis en gel de agarosa 1% se verificó que la concentración y pureza del DNA sea adecuada para una posterior secuenciación. Se secuenció un fragmento de

aproximadamente 1500 pb por el método de Sanger utilizando los primers diseñados para dicho fin (Macrogen) (Tabla 6).

Tabla 6. Primers utilizados para la secuenciación de la región de interés conteniendo el codón 683 de la proteína Spike. Se indican los primers forward (F) y reverse (R).

Nombre	Secuencia (5'- 3')
Seq_F	TCACTGGTTGCGTTATCGCGTGG
Seq_R	TGGAGCACTCAGTGGAGTCTCC

El análisis de la secuenciación se realizó con el software SnapGene alineando las secuencias provistas por Macrogen con la secuencia del vector pcDNA S-3xFLAG para verificar la presencia de la mutación puntual. De todos los mutantes positivos por secuencia, se eligieron tres por variante para caracterizar su infectividad. Para ello se produjeron pseudovirus modificando el protocolo previamente descrito a un formato de placa de 6 pocillos con 1,5 µg de cada plásmido (4,5 µg de masa total de DNA), 9 µl de PEI (relación 2:1 volumen:masa DNA) y DMEM hasta un volumen final de 200 µl. Luego, se cosecharon las partículas virales pseudotipadas del sobrenadante de cultivo y se titularon los stocks virales de los clones mutantes, mediante el protocolo ya descrito, para comparar su infectividad en cultivo con respecto a los virus parentales. Finalmente, se seleccionó un mutante por variante para continuar con los ensayos de seroneutralización: D614G-R683G (D614G Mut) y Gamma-R683G (Gamma Mut). Asimismo, se caracterizó el procesamiento de Spike por furinas de ambas mutantes mediante Western Blot como fue previamente mencionado.

Titulación de anticuerpos neutralizantes

El ensayo de titulación de anticuerpos neutralizantes utilizando pseudovirus de SARS-CoV-2 fue previamente puesto a punto y validado por nuestro grupo de trabajo en términos de reproducibilidad intraensayo e interensayo, y comparado con el ensayo *gold standard* de neutralización de SARS-CoV-2 vivo.

La titulación se realizó en un formato de placa de 96 pocillos, enfrentando cada pseudotipo de SARS-CoV-2 con diluciones seriadas de muestras de suero previo a la infección de la línea de células susceptibles HEK293T-hACE2. Los Pv (500-800 UFF/pocillo) fueron pre-incubados con diluciones seriadas al medio de las muestras de suero por 1h a 37°C, 5% CO₂ en placas con fondo en U estériles en un volumen final de 50 µl. Se ensayaron diluciones de los sueros desde 1/16 hasta 1/512. Luego, la mezcla Pv-suero fue adicionada a las células crecidas en cDMEM desde el día previo al igual que fue descrito para la titulación del stock viral. Se centrifugó la placa de 96 pocillos a 2500 rpm por 1h a temperatura ambiente y finalmente se le adicionaron 50 µl de cDMEM. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado para cada dilución. Asimismo, se incluyeron controles de células sin infectar y controles de células infectadas con Pv no enfrentado con suero (CV).

La presencia de anticuerpos neutralizantes se evaluó luego de 72h de incubación a 37°C, 5% CO₂. Se procedió a la fijación con PFA y al análisis de las placas en el equipo CTL

Immunospot como ya fue descrito para la titulación de stock virales. A partir del recuento de células GFP positivas se obtuvo el porcentaje de neutralización (%Neutralización) para cada dilución de muestra de suero (M_i) respecto al CV de cada VOC analizada. Dicho porcentaje fue calculado de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\%Infectividad = \frac{Nro\ células\ GFP\ positivas\ M_i * 100\%}{Nro\ células\ GFP\ positivas\ CV}$$
$$\%Neutralización = 100\% - \%Infectividad$$

Se graficaron curvas dosis-respuesta de %Neutralización en función del factor de dilución de cada muestra de suero. El título neutralizante 50 (TN50), definido como el recíproco de la dilución que produce una disminución del 50% en el recuento de células GFP positivas con respecto al control de virus, se obtuvo por interpolación en dichas curvas ajustadas mediante una regresión no lineal.

2. Diseño experimental 2: Evaluación de la protección de ARVAC frente a la infección por SARS-CoV-2 en modelo de hámster.

Los experimentos fueron llevados a cabo acorde a las recomendaciones de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (USA)* en una instalación con nivel de bioseguridad 3 (BSL3) perteneciente al centro médico Langone de la Universidad de Nueva York (NYU) ubicado en Alexandria Center (New York, NY, USA).

Se adquirieron 15 hámsters sirios machos que fueron transferidos al BSL3 de a pares dentro de jaulas ventiladas con acceso a comida y agua. Los animales fueron inoculados vía intramuscular con 100 μ l de (i) la vacuna ARVAC formulada con RBD (receptor binding domain) de la variante Gamma (P.1) + Alum (n=9); o (ii) PBS como placebo (n=6). Tanto en la vacunación como en el control se aplicaron dos dosis espaciadas por 14 días. Luego de 28 días de la última inmunización, todos los hámsters fueron desafiados mediante la infección por ruta intranasal con 5×10^4 UFPs de SARS-CoV-2 (USA/WA1/2020) en 100 μ l. Tres días post-infección (3 dpi) a un subset de animales (PBS n=3, ARVAC n=5) se les realizó un lavado nasal previo a ser sacrificados. Se obtuvieron los pulmones, tráquea y nariz para el posterior análisis de título viral y evaluación de la respuesta inmune montada. Lo mismo se realizó al día cinco post-infección (5 dpi) con el subset de animales restantes (PBS n=3, ARVAC n=4). Para su manipulación, los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con 300 μ l de ketamina/xilazina (4:1). El peso de los animales se midió diariamente a partir del desafío (día 0) y hasta finalizar el experimento.

Homogeneización de tejidos y extracción de RNA

Los tejidos obtenidos fueron homogeneizados durante 40 segundos a 6.00 m/s durante dos ciclos en el equipo FastPrep-24 5G bead beating grinder and lysis system (MP Biomedicals). La homogeneización se realizó en tubos eppendorf conteniendo perlas de carburo de tungsteno (QIAGEN). Parte del tejido pulmonar junto con la tráquea y la nariz de los

hámsters fueron homogeneizados en 1 ml de PBS para posteriormente determinar el título viral mediante el ensayo de formación de placas. Otra parte del tejido pulmonar fue homogeneizada en 1 ml de Trizol para proceder con la extracción de RNA. Se centrifugaron las muestras a 15000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante fue congelado inmediatamente para el posterior análisis del título viral o transferido a otro tubo eppendorf conteniendo 200 ul de cloroformo para la extracción de RNA.

El RNA fue aislado y purificado del tejido pulmonar mediante un protocolo de trizol/cloroformo de acuerdo a lo establecido por el fabricante del reactivo TRIZOL (Invitrogen). Se determinó su pureza y se cuantificó en todas las muestras con el uso del Nanodrop (Thermo Fisher).

RT-qPCR

Se llevó a cabo una RT-qPCR de un sólo paso utilizando el kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR Master Mix 2X (NEB) para cuantificar la expresión relativa en tejido pulmonar de hámster de la nucleoproteína de SARS-CoV-2 (N2) utilizando actina como gen de referencia. Cada gen fue amplificado con sus primers forward y reverse correspondientes (Tabla 7). Todas las reacciones se realizaron por duplicado en un volumen final de 10 µl con 1 µg de molde de RNA y 0,5 µM de cada primer. Se añadió un control negativo en ausencia de RNA, por duplicado, para cada par de primers. El equipo utilizado para llevar a cabo la RT-qPCR fue QuantStudio 5 (Thermo Fisher).

Tabla 7. Primers utilizados para la retrotranscripción y amplificación en tiempo real de los genes de interés. Se indican los primers forwards (F) y reverse (R).

Nombre	Secuencia (5'- 3')
N2_F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
N2_R	GCGCGACATTCCGAAGAA
Hamster_ActinB_F	CCAAGGCCAACCGTGAAAAG
Hamster_ActinB_R	ATGGCTACGTACATGGCTGG

Se tomaron los datos de Ct (Cycle threshold, en inglés), el cual se define como el número de ciclos de PCR necesarios para que la señal de fluorescencia cruce el umbral. Los niveles relativos de RNA viral (N2) en ambos tratamientos fueron cuantificados a partir de una primera normalización con la expresión de actina como referencia y luego se relativizó el número de copias de N respecto a RNA pulmonar de hámsters control sin tratamiento ni infección. Se realizó un análisis de $\Delta\Delta Ct$ considerando una eficiencia (E) de 2 y se realizó una transformación logarítmica de los datos para su análisis.

$$\Delta Ct N2_{tratamiento^*} = Ct N2_{tratamiento^*} - Ct actina_{tratamiento^*}$$

$$\Delta Ct N2_{control^{**}} = Ct N2_{control^{**}} - Ct actina_{control^{**}}$$

$$\Delta\Delta Ct N2 = \Delta Ct N2_{tratamiento^*} - \Delta Ct N2_{control^{**}}$$

$$Expresión\ relativa\ en\ tratamiento\ respecto\ a\ control = 2^{-\Delta\Delta Ct N2}$$

*Tratamiento refiere a PBS IM o ARVAC IM; **Control refiere a hámsters sin tratamiento ni infección.

Ensayo de formación de placas de lisis

Para determinar el título de virus infeccioso en pulmón, tráquea, nariz y lavado nasal, en hámsters vacunados (ARVAC IM) y en hámsters control (IM PBS), se llevó a cabo un ensayo de formación de placas en un formato de placa de 24 pocillos utilizando células Vero E6 (células epiteliales de riñón de mono verde africano) crecidas en cDMEM desde el día previo ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo). Se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo en cDMEM de todas las muestras y se infectó con un volumen de inóculo de 200 μ l. Las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C y luego se continuó siguiendo el protocolo ya descrito por Hoagland et al. (2021).

Para obtener el título viral se tuvieron en cuenta aquellos pocillos donde fue posible contar entre 15-30 placas de lisis (P_i) y se consideró tanto el factor de dilución (FD_i) correspondiente al pocillo contabilizado como el volumen de inóculo. Se efectuó el mismo cálculo que aquel realizado para la titulación de pseudovirus, expresando los resultados en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml) en este caso.

Histología de tejido pulmonar

Un lóbulo del pulmón extraído de cada hámster fue fijado en 5 ml de formaldehído 10% durante 48hs, renovando la solución fijadora a las 24hs. Luego los tejidos se rehidrataron en 5 ml de PBS y las muestras fueron enviadas al servicio de histología animal provisto por NYU Langone Medical Center. Se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y se detectó la presencia de la nucleoproteína viral en pulmón con un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-N SARS-CoV-2 (1:50).

3. Gráficos y análisis estadísticos

Todos los gráficos y análisis estadísticos de ambos diseños experimentales fueron realizados con el software GraphPad 8.4.2. Se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos analizados a fin de aplicar test estadísticos con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. De no cumplirse los mismos, se llevaron a cabo análisis estadísticos con pruebas no paramétricas.

Resultados

1. Obtención y purificación de vectores de expresión de Spike

En este trabajo se propuso utilizar el sistema de Pv basados en lentivirus para la determinación de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra las distintas variantes de SARS-CoV-2 inducidos por la vacunación con SPUTNIK V. En este sistema, la producción de pseudotipos de SARS-CoV-2 se basa en la transfección de tres plásmidos: el vector de empaquetamiento psPAX-2, el vector de transferencia pLB que codifica para GFP como gen reportero, y un vector de expresión de Spike de SARS-CoV-2.

Para el vector de expresión de Spike se encargó la síntesis de una secuencia optimizada para el uso de codones de mamífero y el clonado en el vector pcDNA 3.1. En esta construcción, la versión truncada de la secuencia codificante de Spike ($\Delta 19$) se encuentra río abajo del promotor fuerte CMV y contiene en su extremo 3' el tag de 3xFLAG junto a una señal de poliadenilación para que la proteína pueda ser expresada en células HEK. Además, posee en sus extremos los sitios de corte de la endonucleasas de restricción (ER) HindIII y XhoI. Particularmente, producto del corte con estas enzimas se libera el fragmento de la secuencia codificante de Spike-3xFLAG del vector dando como resultado un fragmento de aproximadamente 3853 pb y otro de 5324 pb (Fig. 13A).

Se amplificaron y purificaron los vectores de expresión de Spike de todas las variantes a analizar. Luego, se determinó la eficiencia de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa y la identidad del vector mediante el análisis del patrón de restricción. De acuerdo con lo esperado, después de la digestión con las enzimas HindIII y XhoI, se observó la liberación del fragmento de aproximadamente 4000 pb correspondiente a la secuencia codificante de Spike. Asimismo, en la corrida electroforética del vector purificado sin digerir se observó una banda de 6000 pb que corresponde al DNA superenrollado ya que dada su estructura tiene una corrida electroforética de mayor velocidad que el plásmido nickado (banda superior), lo explica que su peso molecular aparente sea menor (Fig. 13B). El rendimiento de la purificación de estos vectores fue del orden de los 140 μg de DNA a una concentración aproximada de 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Además, se comprobó la pureza de los DNAs en la corrida electroforética y empleando como medida la relación de absorbancias a 260 y 280 nm.

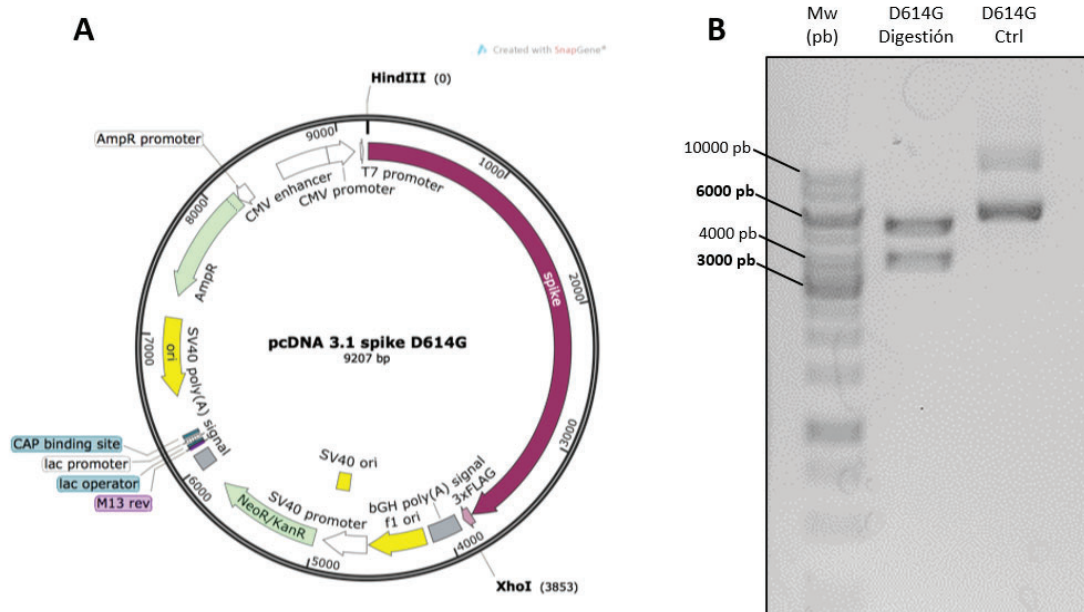


Figura 13. (A) Esquema generado con el software de edición de ADN Snapgene del vector de expresión de Spike de la variante pandémica (D614G) con todas sus características a nivel de secuencia. (B) Corrida electroforética en gel de agarosa 1% del producto de digestión del vector de expresión de Spike de la variante pandémica [D614G Digestión], el vector sin digerir [D614G Ctrl] y el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder [Mw (pb)].

2. Producción y titulación de stocks virales pseudotipados

Luego de la cosecha de los virus, posterior a la transfección de células HEK-293T, se procedió a la infección de células HEK293 que sobreexpresan el receptor ACE2 para la titulación de los stocks virales pseudotipados. La titulación se basa en el recuento de focos verdes fluorescentes producto de la expresión de la proteína reportera GFP como resultado de la transducción de células blanco luego de la infección con los pseudotipos. Cada foco representa una unidad infecciosa y el título se estima a partir de la imágenes adquiridas de una placa de 96 pocillos. El recuento de focos mostró una disminución en su número en las sucesivas diluciones del stock para todas las variantes (Fig. 14).

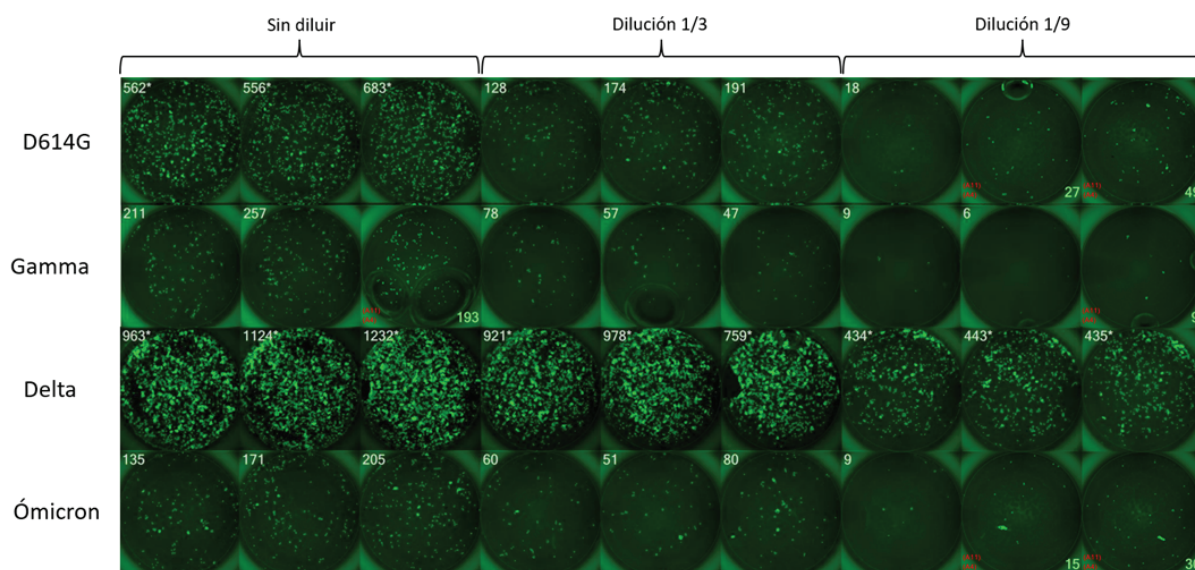


Figura 14. Imagen de escaneo en CTL Immunospot de placa de titulación de los pseudovirus de las variantes de SARS-CoV-2 D614G, Gamma, Delta y Ómicron. Formato de placa de 96 pocillos utilizando el stock sin diluir y dos diluciones seriadas al tercio, por triplicado. Se realizó el recuento de células GFP positivas y el control de calidad (QC) de dichas mediciones. Los números que se muestran en cada pocillo corresponden al número de células GFP positivas cuantificadas en los mismos.

El título viral de las variantes que se produjeron se presenta en la Tabla 8. Asimismo, la reducción en la infectividad en cada stock viral a medida que el mismo fue diluido se representó mediante regresiones lineales simples. En todos los casos se observó una buena correlación ($r^2 > 0.7$) entre unidades formadoras de focos y dilución del stock viral y la pendiente ha sido significativamente distinta de cero ($P < 0.01$) (Fig. 15A).

Tabla 8. Título de pseudovirus en UFF/ml de los stocks generados para las variantes D614G, Gamma, Delta y Ómicron

Variante	Título pseudoviral (UFF/ml)
D614G	12007
Gamma	4407
Delta	53160
Ómicron	3407

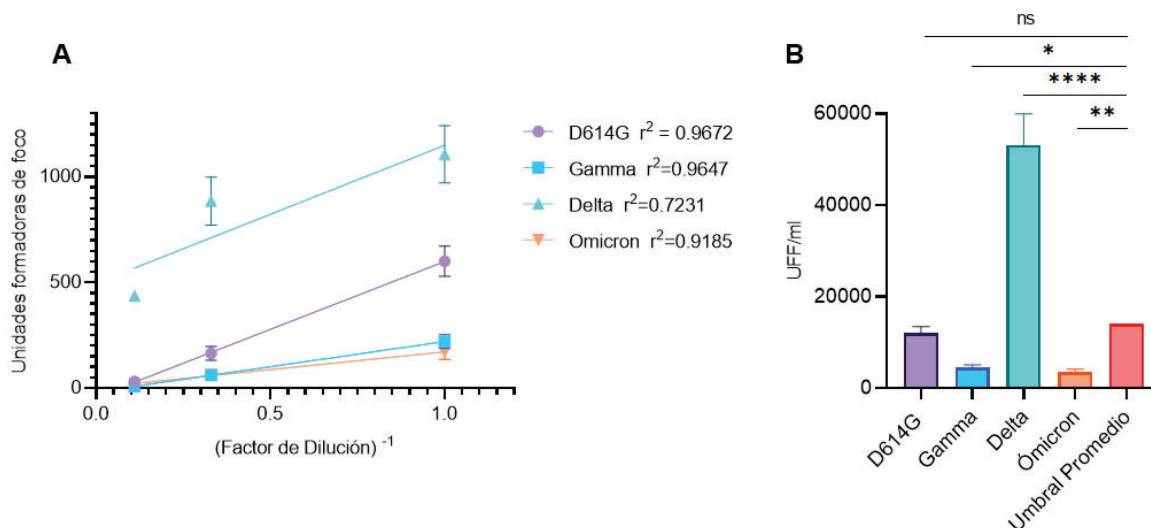


Figura 15. (A) Análisis de regresión lineal simple de la titulación de los stocks virales de los pseudovirus de las variantes de SARS-CoV-2. En todos los casos la pendiente ha sido significativamente distinta de cero ($P < 0.01$). (B) Valor promedio de título en UFF/ml de cada stock viral pseudotipado ($n=3$) y valor de umbral promedio de título viral requerido para el ensayo de seroneutralización. Se efectuaron comparaciones de los valores de título de cada variante con el umbral promedio mediante ANOVA de una vía. Las barras representan la media \pm DE. *, ** y **** indican diferencias significativas ($P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.0001$, respectivamente); ns: no significativo.

De acuerdo a la puesta a punto del ensayo de neutralización realizada previamente por nuestro grupo, para asegurar la linealidad del ensayo es necesario contar con un promedio de 14000 UFF/ml de los pseudotipos de SARS-CoV-2 para infectar las células susceptibles con un promedio de 650 unidades infecciosas enfrentadas con diluciones seriadas de los sueros analizados. Aquello fue lo observado en la titulación de la variante pandémica (D614G) ya que no se hallaron diferencias significativas en el título viral respecto al umbral promedio. Asimismo, el valor de dicho umbral fue superado por la variante Delta al sobrepasar significativamente su valor más de 3.5 veces ($P < 0.0001$). Por el contrario, para los pseudotipos de las variantes Gamma y Ómicron los títulos fueron significativamente inferiores al umbral ($P = 0.0127$ y $P = 0.0068$, respectivamente) e insuficientes para realizar los ensayos de neutralización (Fig. 15B).

3. Incorporación de la mutación R683G

Con el objetivo de mejorar los títulos de Pv infecciosos se utilizó como estrategia la mutación de arginina (R) por glicina (G) en la posición 683 (R683G) de la proteína S tanto en la variante pandémica (D614G) como en Gamma. De acuerdo con los antecedentes esta mutación altera el sitio de clivaje por furinas y resulta de la adaptación de virus quiméricos replicativos en células 293T/ACE2 (Schmidt et al., 2020). Para comprobar la incorporación de la mutación en los vectores de expresión de Spike, se secuenciaron distintos clones y se analizaron los cromatogramas teniendo en cuenta la calidad de los mismos y la correcta asignación de las bases nucleotídicas. Mediante la comparación de secuencias con los virus

parentales se obtuvieron 6/12 clones para Gamma y 3/12 clones para D614G que contenían la mutación puntual en la base nucleotídica 2056 de los vectores de expresión de S (Fig. 16).

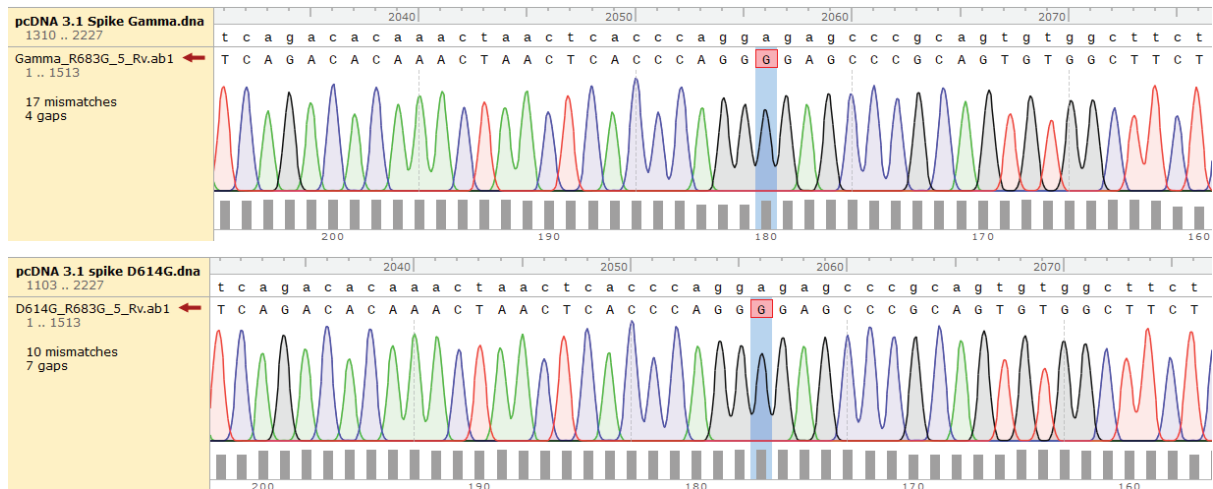
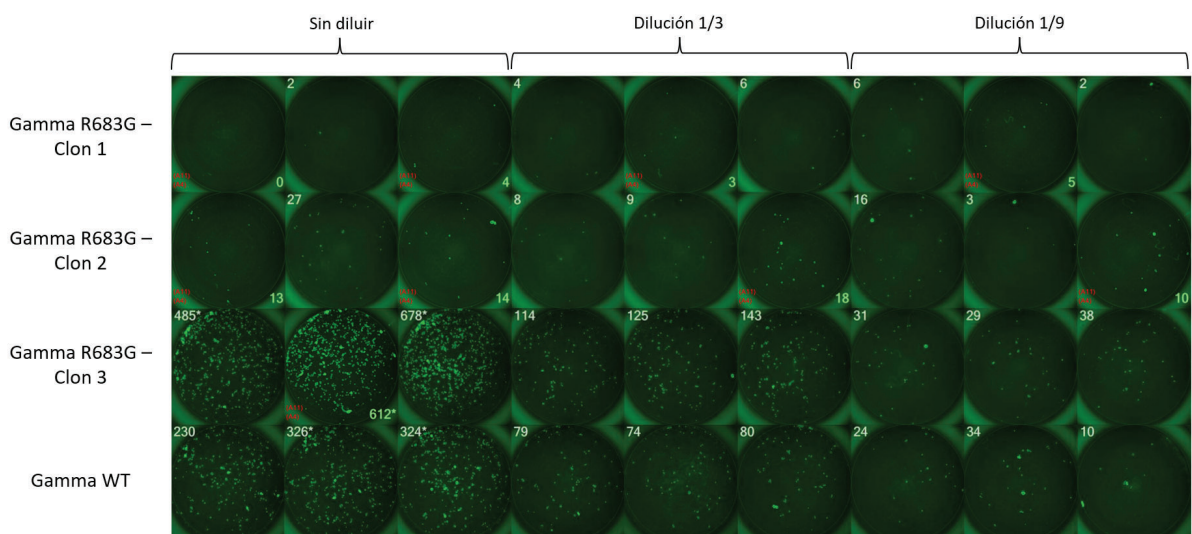


Figura 16. Imagen representativa de la comparación de secuencias de dos clones conteniendo la mutación puntual (A→G) en la posición 2056 del vector pcDNA 3.1 Spike de la variante Gamma en el panel superior y la variante D614G en el panel inferior. Se muestra el alineamiento de secuencias, la calidad de la secuenciación y el cromatograma con los picos diferenciando la asignación de bases nucleotídicas y la mutación seleccionada.

a. Producción y titulación de pseudovirus mutantes

Para continuar con la caracterización de los clones mutantes se escogieron la misma cantidad de clones positivos por secuencia de la variante pandémica y de Gamma para la producción de pseudovirus a baja escala y su titulación. El número total de virus presentes en los stocks de cada variante se cuantificó mediante el recuento de los focos fluorescentes, los cuales corresponden a células infectadas (Fig. 17).



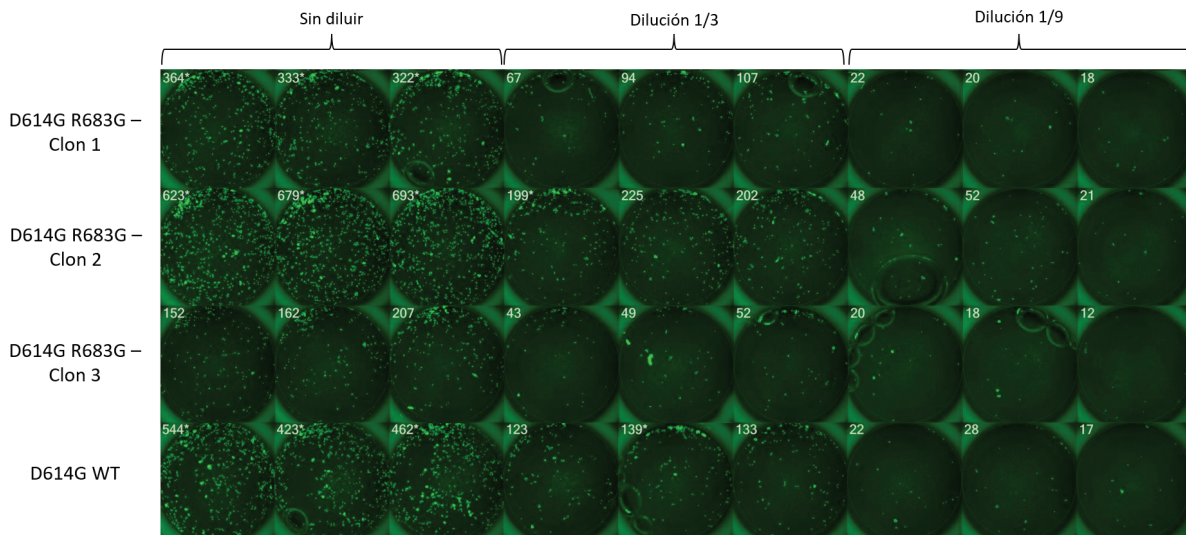


Figura 17. Imagen de escaneo en CTL Immunospot de placa de titulación de los pseudovirus de los clones R683G seleccionados por secuencia (n=3) y el virus parental para la variante Gamma en el panel superior y la variante D614G en el panel inferior. Formato de placa de 96 pocillos utilizando el stock sin diluir y dos diluciones seriadas al tercio, por triplicado. Se realizó el recuento de células GFP positivas y el control de calidad (QC) de dichas mediciones. Los números que se muestran en cada pocillo corresponden al número de células GFP positivas cuantificadas en los mismos.

Con respecto a la variante Gamma, se observó capacidad infectiva en un sólo clon. Su título viral fue significativamente mayor ($P=0.0005$) al de Gamma WT y no mostró diferencias significativas con respecto al umbral promedio necesario para efectuar los ensayos de seroneutralización (Fig. 18A). Por lo tanto, la nueva variante Gamma Mut fue seleccionada para continuar con dichos ensayos. En cuanto a la variante pandémica, se observó un nivel de infectividad variable en los tres clones analizados. De todas formas, el segundo evidenció un título significativamente mayor a su virus parental ($P=0.0012$; Ver Anexo Fig. S1) y dada la adaptación que esta mutación impone sobre la replicación en células en cultivo, fue seleccionado para el posterior análisis. D614G Mut no presentó diferencias significativas en su título respecto al umbral promedio, por lo que fue posible su aplicación para la titulación de anticuerpos neutralizantes (Fig. 18B).

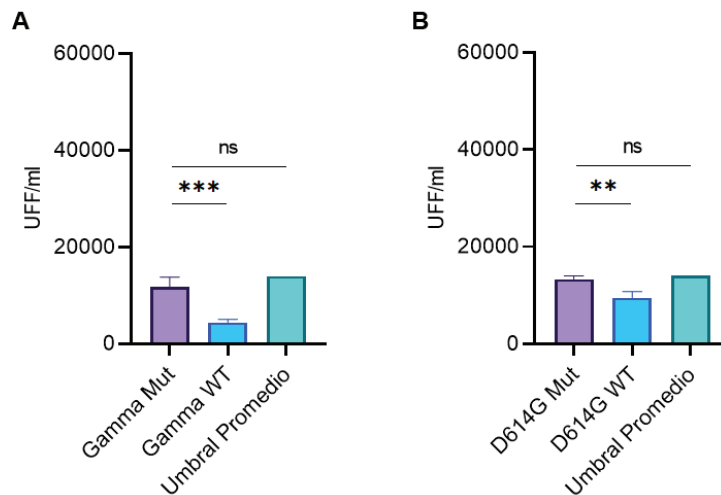


Figura 18. Valor promedio de título en UFF/ml de cada stock viral pseudotipado de los clones seleccionados Gamma Mut (A) y D614G Mut (B) junto con el valor de umbral promedio de título viral requerido para el ensayo de seroneutralización. Se efectuaron comparaciones de los valores de título de cada variante con el umbral promedio mediante ANOVA de una vía. Las barras representan la media \pm DE. **, *** indica diferencias significativas ($P < 0.01$ y $P < 0.001$ respectivamente); ns: no significativo.

Finalmente, luego de caracterizar y seleccionar una mutante R683G para cada variante, se produjeron y titularon nuevos stocks de los pseudovirus (Tabla 9 y Fig. 19).

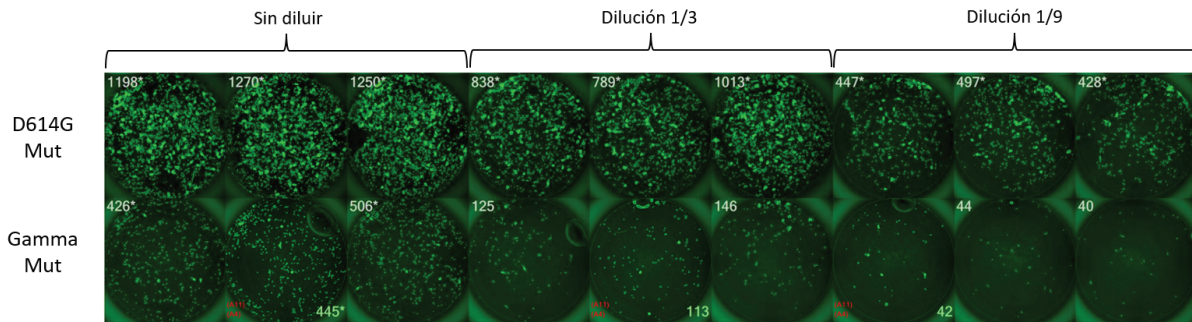


Figura 19. Imagen de escaneo en CTL Immunospot de placa de titulación de stocks de pseudovirus de los clones seleccionados con la mutación R683G incorporada, D614G Mut (D614G-R683G) y Gamma Mut (Gamma-R683G). Formato de placa de 96 pocillos utilizando el stock sin diluir y dos diluciones seriadas al tercio, por triplicado. Se realizó el recuento de células GFP positivas y el control de calidad (QC) de dichas mediciones. Los números que se muestran en cada pocillo corresponden al número de células GFP positivas cuantificadas en los mismos.

Tabla 9. Título de pseudovirus en UFF/ml de los stocks generados para las variantes D614G Mut y Gamma Mut

Variante	Título pseudoviral (UFF/ml)
D614G Mut	52800
Gamma Mut	9180

Posteriormente, repitiendo el análisis realizado previamente, a partir de regresiones lineales simples se determinó una buena correlación entre el número de focos y la dilución del stock viral al obtener un coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.8 y una pendiente significativamente distinta de cero ($P < 0.001$) en ambos los casos (Fig. 20A). Asimismo, con respecto al umbral promedio, para el título viral de Gamma Mut no se observaron diferencias significativas, mientras que para D614G Mut fue necesario diluir el stock viral al realizar los ensayos de neutralización ya que su título resultó significativamente mayor al umbral ($P < 0.0001$) (Fig. 20B).

El título viral de las variantes que se produjeron se presenta en la Tabla 8. Asimismo, la reducción en la infectividad en cada stock viral a medida que el mismo fue diluido se representó mediante regresiones lineales simples.

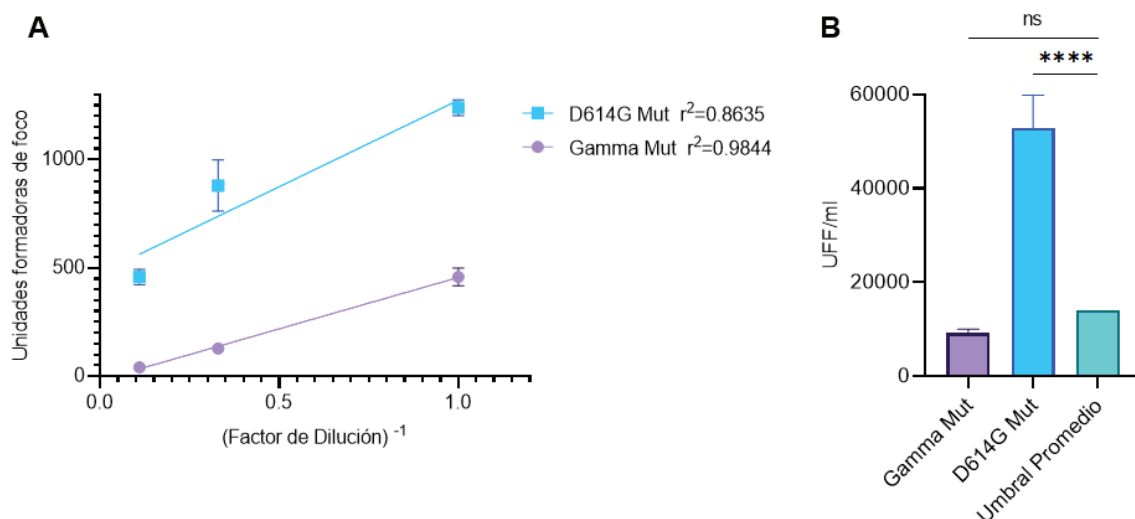


Figura 20. (A) Análisis de regresión lineal simple de la titulación de los stocks virales de los pseudovirus de D614G Mut y Gamma Mut. En ambos los casos la pendiente ha sido significativamente distinta de cero ($P < 0.001$). (B) Valor promedio de título en UFF/ml de cada stock viral pseudotipado con la mutación R683G y valor de umbral promedio de título viral requerido para el ensayo de seroneutralización. Se efectuaron comparaciones de los valores de título de cada variante con el umbral promedio mediante ANOVA de una vía. Las barras representan la media \pm DE. **** indica diferencias significativas ($P < 0.0001$); ns: no significativo.

4. Caracterización de la incorporación y procesamiento de Spike

La eficiencia de la incorporación de la proteína S en los pseudovirus y su procesamiento en cada variante fue evaluada mediante Western Blot. Como control se detectó la incorporación de la proteína p24. Dado que se trata de pseudotipos basados en una partícula lentiviral derivada de HIV, todas las partículas virales incorporan a p24 como proteína de cápside, independientemente de si las mismas incorporan la proteína de envoltura o no. A su vez, mediante este método se evaluó el impacto de la mutación R683G en el procesamiento de S en sus subunidades que ocurre mediante el clivaje en el sitio de corte de furinas. Para esto, se produjeron y titularon nuevos stocks de las variantes D614G, Gamma Mut y Ómicron, y se utilizaron los stocks de Delta y D614G Mut obtenidos anteriormente (Tabla 10). Además, se usó como control un pseudovirus tipificado con la proteína G de VSV.

Tabla 10. Título de pseudovirus en UFF/ml de los stocks utilizados para realizar el Western Blot de las variantes D614G, D614G Mut, Gamma Mut, Delta y Ómicron.

Variante	Título pseudoviral (UFF/ml)
D614G	3347
D614G Mut	52800
Gamma Mut	3653
Delta	53160

Ómicron	1327
---------	------

A partir del análisis de las imágenes obtenidas de Western Blot se pudo observar que en los stocks de los pseudotipos de SARS-CoV-2 y de VSV la intensidad de la banda de detección de p24 es comparable, aunque para Delta, D614G Mut y Ómicron la intensidad es algo menor en comparación con las demás variantes. Por el contrario, se observó que la o las bandas correspondiente a la proteína S fue de mayor intensidad para Delta y D614G Mut. Estos resultados indican que la incorporación de la proteína S es más eficiente en los pseudotipos de dichas variantes para las cuales la relación de intensidades de las bandas de las proteínas S y p24 es mayor. Además, sugieren que la incorporación más eficiente de la proteína S resulta en un número más alto de partículas infectivas de acuerdo con el título estimado para estas dos variantes (Tabla 10). Asimismo, para la proteína S, se detectaron una o dos bandas mayoritarias de aproximadamente 180 kDa y 100 kDa que reflejan sus monómeros de longitud completa y procesados, respectivamente. En aquellas variantes que poseen el sitio de corte de furinas intacto se detectó únicamente la banda inferior, lo cual se corresponde con la incorporación de la proteína S procesada a las partículas virales. Por el contrario, en las variantes mutantes D614G Mut y Gamma Mut se observa la banda superior de 180 kDa que de acuerdo con lo esperado refleja el bloqueo en el procesamiento de S por la incorporación del cambio R683G en el sitio de corte de furina, validando la caracterización funcional de las mutantes (Fig. 21).

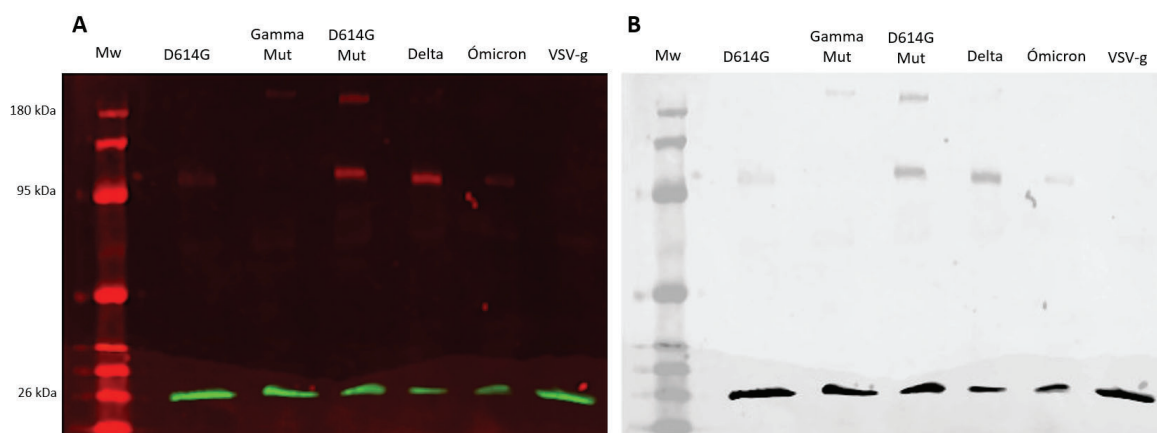


Figura 21. Análisis de Western Blot de pseudovirus concentrados de todas las variantes analizadas D614G, D614G Mut, Gamma Mut, Delta y Ómicron. El canal rojo (800 nm) muestra la detección del tag 3xFLAG de Spike y el canal verde (680 nm) muestra los niveles de la proteína p24 (24 kDa) como control de carga. Se incluyó el marcador de peso molecular (Mw) PageRuler y un control de detección de Spike con pseudovirus basados en lentivirus tipificados con la proteína G de VSV (VSV-g). (A) Imagen de alto contraste del canal de 800 nm; (B) Imagen con colores en negativo editada con el software ImageJ.

5. Capacidad neutralizante de anticuerpos inducidos por la vacunación con SPUTNIK V frente a las VOCs

Luego de la optimización de la infectividad en cultivo celular de la variante Gamma (Gamma Mut) a partir de mutagénesis dirigida en el sitio de corte por furinas se llevaron a cabo los

ensayos de seroneutralización de los sueros obtenidos a las 2 y 24 semanas post-vacunación (2 spv y 24 spv, respectivamente) de 10 individuos vacunados con dos dosis de SPUTNIK V (Fig. 22). Se titularon los anticuerpos neutralizantes en suero para la totalidad de las variantes estudiadas. Además, se incluyó en todos los análisis a la variante pandémica con la mutación R683G (D614G Mut) como control para la comparación con la variante Gamma Mut (Gamma R683G).

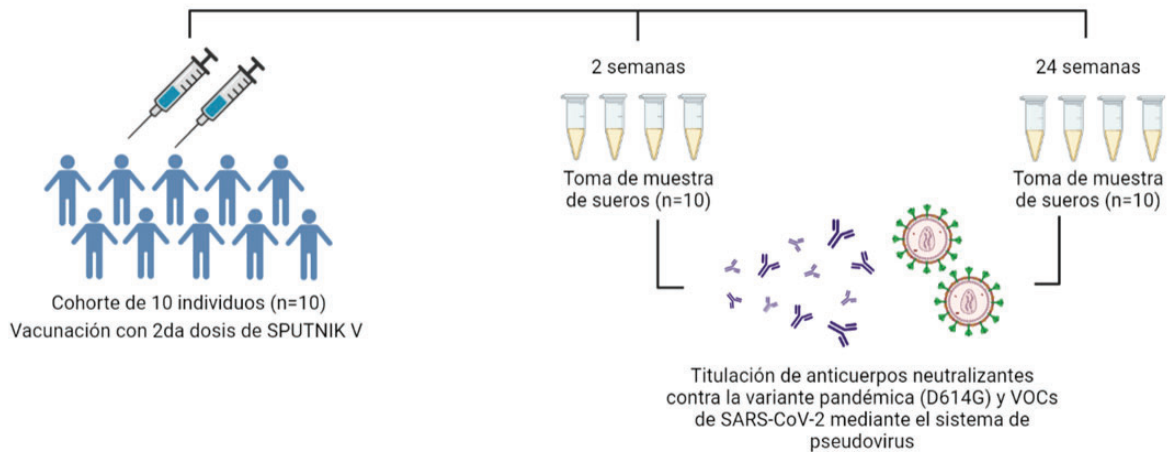


Figura 22. Esquema temporal del diseño experimental para la determinación de títulos neutralizantes contra SARS-CoV-2 (Variante pandémica y VOCs) inducidos por la vacunación en 10 individuos mediante el sistema de pseudovirus de SARS-CoV-2.

Para comparar la capacidad neutralizante de las muestras se estimó el título neutralizante 50. Se enfrentaron diluciones seriadas de las muestras con los pseudotipos de las distintas variantes y luego se infectaron células HEK293-hACE2. A partir del recuento de focos de infección, se construyeron curvas dosis-respuesta de % Neutralización en función del factor de dilución de la muestra. Como resultado de la presencia de nAbs capaces de bloquear la infección, se observó una disminución de la neutralización a mayor dilución de las muestras de suero, de acuerdo a lo esperado (Fig. 23). A partir de dichas curvas se interpolaron los valores de TN50 de todos los sueros para las variantes estudiadas en ambos tiempos.

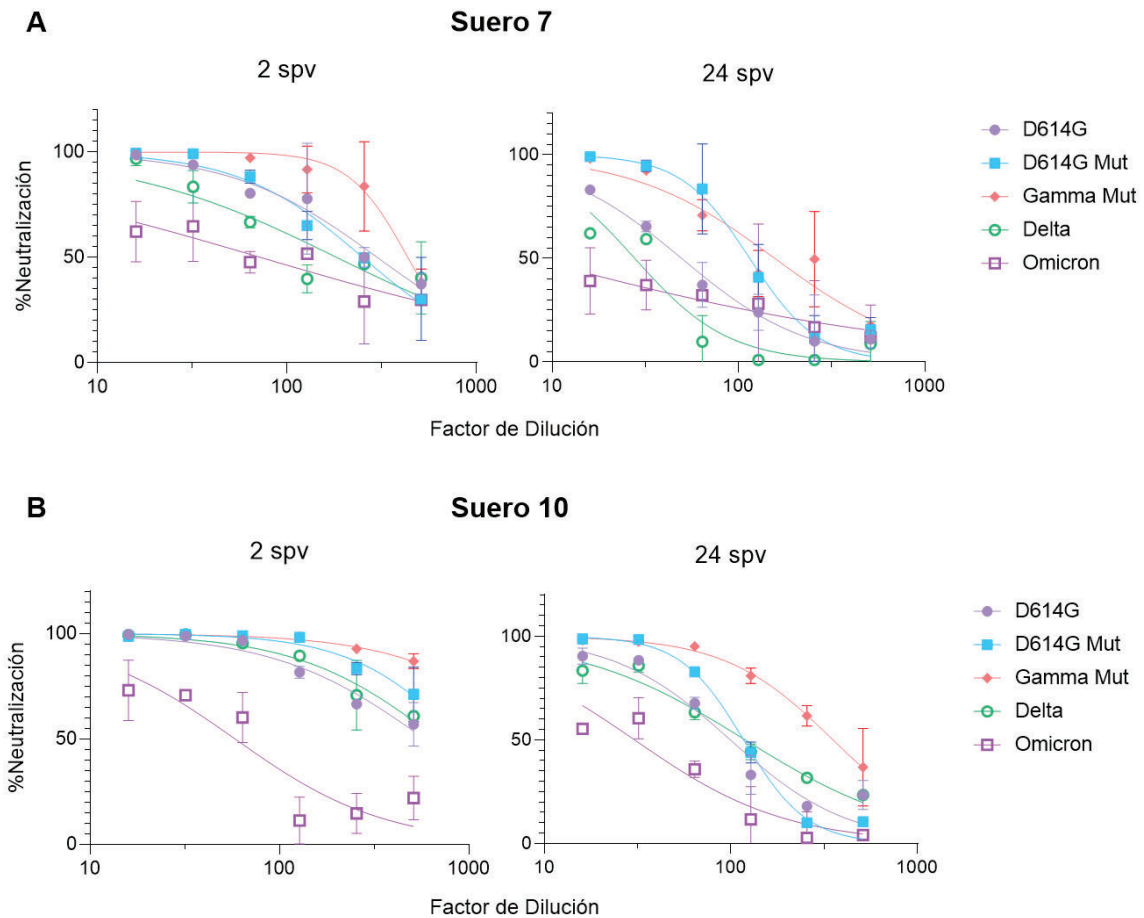


Figura 23. Ajuste no lineal efectuado para el porcentaje de neutralización (%Neutralización) en función del recíproco de la dilución de la muestra de suero (Factor de Dilución) mediante la función $\log(\text{agonist})$ vs. $\text{Normalized response}$. Se realizó la determinación del TN50 de cada muestra para cada variante a partir de las curvas. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos a 2 y 24 semanas post-vacunación para los sueros (A) 7 y (B) 10.

Algunas muestras mostraron un porcentaje de neutralización mayor al 50% en la última dilución ensayada (1/512) y otras no mostraron una reducción del 50% de unidades infecciosas a la menor dilución ensayada (1/16). Con el objetivo de incluir dichas muestras en las representaciones gráficas, en el primer caso se tomó como valor de TN50 el recíproco del siguiente valor de dilución seriada al medio (1/1024), mientras que para el segundo caso se asignó un valor de TN50 igual a 1 (Ver Tabla S1, Anexo). En ambos casos, el rango dinámico de %Neutralización no permitió estimar el TN50 mediante interpolación optando por asignar valores arbitrarios.

a. Seguimiento de la respuesta neutralizante

Al analizar el TN50 para cada variante a ambos tiempos, se observó una disminución significativa del título de anticuerpos neutralizantes en el tiempo, en todos los casos ($P < 0.01$). Esta caída fue de alrededor de 5 veces y con un valor comparable para las muestras enfrentadas a los pseudovirus de las variantes D614G y D614G Mut. Para el caso de Delta y Ómicron, la caída en la capacidad neutralizante fue más pronunciada, ya que la reducción del

TN50 a 24 spv respecto a 2 spv fue de 6 veces y 10.3 veces, respectivamente. Por su parte, para la variante Gamma Mut se observó la menor caída en la capacidad neutralizante a lo largo del tiempo (2.5 veces) (Fig. 24).

Debe notarse que para la variante Ómicron, debido a que sólo se obtuvo un stock con título viral bajo, las muestras se enfrentaron con un número de unidades infecciosas más bajo que para el resto de las variantes y por debajo del adecuado para asegurar el rango dinámico del ensayo de seroneutralización. A pesar de esto, se decidió continuar con el mismo a fin de analizar la presencia de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación con SPUTNIK V frente a la última VOC reportada. Si bien los TN50 obtenidos frente a Omicron no pueden ser comparados con el resto de las variantes, los resultados mostraron que los sueros de los individuos vacunados presentaron anticuerpos neutralizantes para esta VOC.

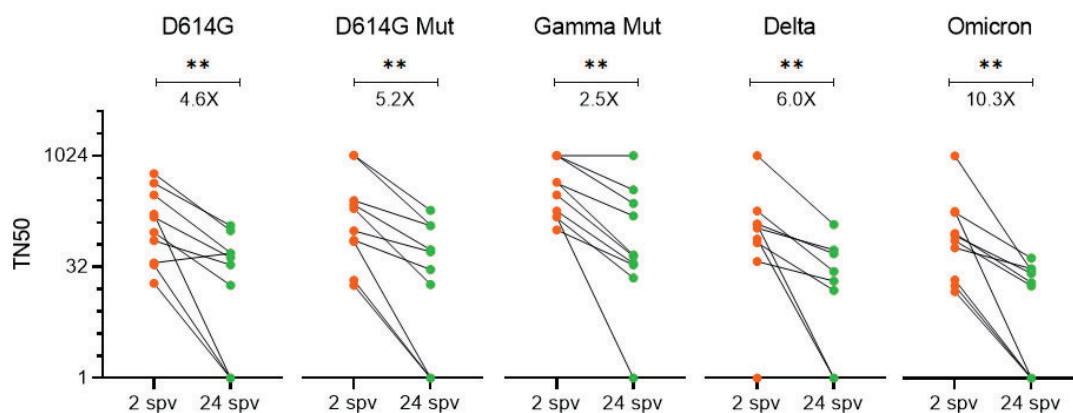


Figura 24. Ensayo longitudinal del título neutralizante 50 (TN50) de las muestras de suero tomadas de 10 individuos vacunados con dos dosis de SPUTNIK V y sin infección con SARS-CoV-2 registrada a la fecha de toma de muestras a las 2 y 24 semanas post-vacunación (2 spv; 24 spv). Los sueros fueron evaluados contra las variantes D614G, D614G-R683G (D614G Mut), Gamma-R683G (Gamma Mut), Delta y Ómicron. Se muestra el TN50 para cada muestra y las líneas conectan una misma muestra medida a ambos tiempos. Muestras con TN50 por debajo de 16 fueron seteadas en 1 y aquellas con TN50 por encima de 512 fueron seteadas en 1024 para su representación gráfica. El test de Wilcoxon para muestras pareadas fue realizado en cada caso para el análisis estadístico. ** indica diferencias significativas ($P < 0.01$).

b. Reactividad cruzada de la respuesta neutralizante

Para determinar si la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por SPUTNIK V frente a SARS-CoV-2 fue mantenida frente a las VOCs se compararon los TN50 obtenidos a ambos tiempos con la variante pandémica (D614G). En el caso de Gamma Mut, los títulos neutralizantes a ambos tiempos fueron comparados con aquellos obtenidos para la variante D614G Mut de manera tal de realizar la comparación entre variantes que llevan la proteína Spike con el sitio de corte de furinas interrumpido. La comparación de resultados de D614G Mut con la variante pandémica sin la mutación (D614G) se empleó para determinar si dicha mutación no afecta la neutralización ejercida por los sueros en estudio.

Los resultados demostraron que la capacidad neutralizante de los anticuerpos no se vio afectada por la incorporación de la mutación R683G en la variante pandémica. Por otro lado, las muestras de suero obtenidas a 2 y 24 semanas luego de completado el esquema de vacunación no mostraron diferencias significativas en su actividad neutralizante frente a las VOCs estudiadas en comparación con la variante pandémica ancestral (D614G) (Fig. 25). Por lo tanto, los anticuerpos inducidos por la vacunación fueron capaces de neutralizar a todas las VOCs denotando la presencia de reactividad cruzada.

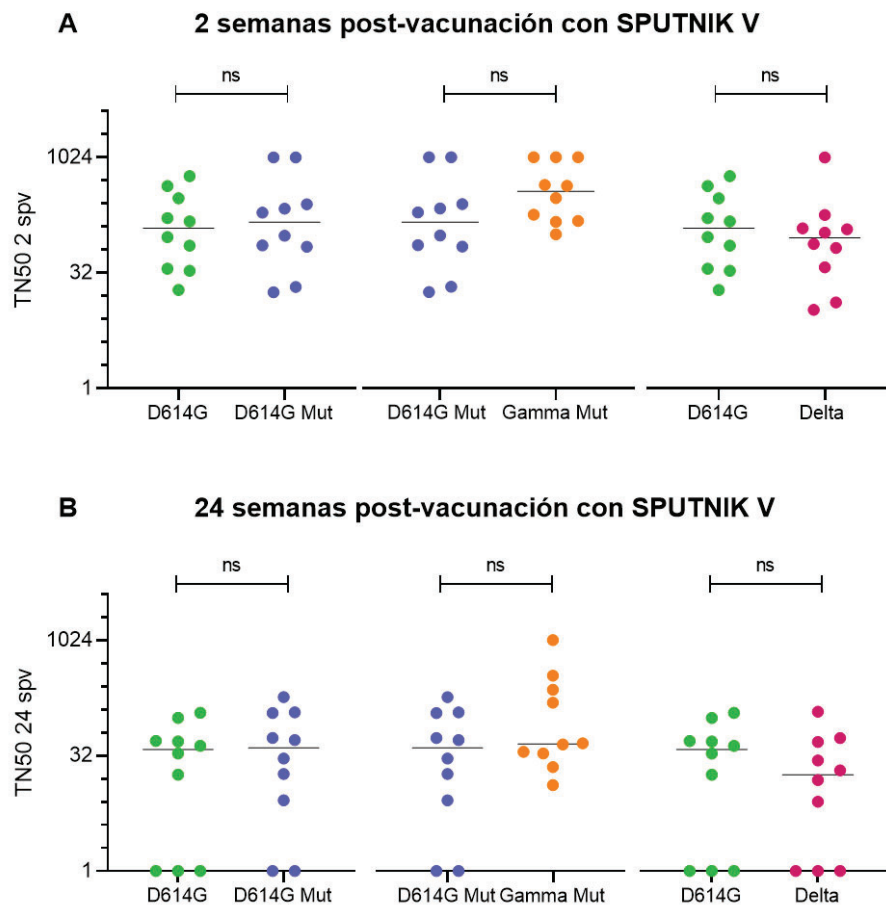


Figura 25. Ensayo longitudinal del título neutralizante 50 (TN50) de las muestras de suero tomadas de 10 individuos vacunados con dos dosis de SPUTNIK V y sin infección con SARS-CoV-2 registrada a la fecha de toma de muestras a las 2 y 24 semanas post-vacunación (2 spv; 24 spv). Comparación del título neutralizante 50 de las VOCs respecto a la variante pandémica o parental a 2 spv (A) y 24 spv (B). La variante Gamma Mut fue comparada con D614G Mut considerando un mismo background y se incluyó la comparación de D614G con su respectiva mutante (D614G Mut). Muestras con TN50 por debajo de 16 fueron seteadas en 1 y aquellas con TN50 por encima de 512 fueron seteadas en 1024 para su representación gráfica. El test de Mann-Whitney para muestras no pareadas fue realizado en cada caso para el análisis estadístico. Las barras representan la media. ns: no significativo.

c. Correlación TN Pseudovirus vs. SARS-CoV-2 vivo

A modo de determinar la correlación del ensayo de seroneutralización realizado con pseudovirus respecto al ensayo gold standard se realizó una comparación de los títulos neutralizantes obtenidos contra la variante pandémica (D614G) para las mismas muestras de suero a ambos tiempos. Se compararon los TN50 obtenidos con el sistema de pseudovirus con los TN90 (título neutralizante 90) obtenidos mediante el ensayo utilizando el virus SARS-CoV-2 vivo llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo. A partir de un análisis de regresión lineal simple se observó una correlación entre ambos parámetros ya que los datos se ajustaron a una recta con una pendiente significativamente distinta de cero ($P < 0.0001$) y se obtuvo un valor de coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.7 lo cual indica un buen ajuste del modelo a los datos (Fig. 26). Esto sugiere, de acuerdo a lo previamente reportado, que el modelo de Pv es de utilidad como alternativa para determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por SPUTNIK V en individuos vacunados frente a SARS-CoV-2.

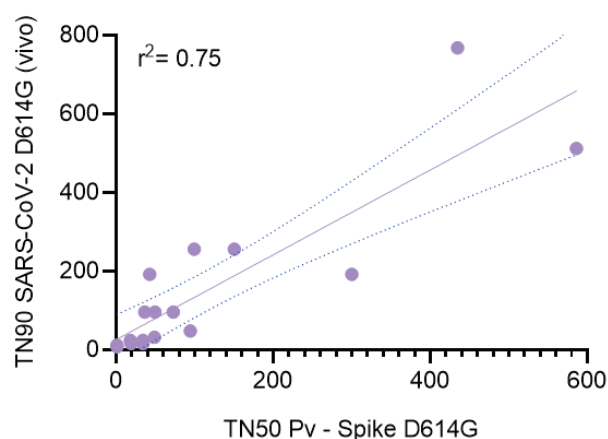


Figura 26. Análisis comparativo de regresión lineal simple para TN50 obtenido con los pseudovirus y TN90 obtenido a partir del ensayo de seroneutralización con virus vivo. Se compararon los títulos neutralizantes contra la variante pandémica (D614G) de las mismas muestras de suero a ambos tiempos. La pendiente de la recta resultó significativamente distinta de cero ($P < 0.0001$). Las líneas punteadas denotan IC (intervalo de confianza) 95%.

6. Protección brindada por ARVAC frente a SARS-CoV-2 en modelo de hámster

El segundo objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la vacuna ARVAC en un modelo animal. Este objetivo se concretó con la supervisión de la Dra. Lucía Carrau durante una estadía en New York University, Estados Unidos y se utilizó como modelo para el desafío la infección de hamsters con la variante ancestral USA/WA1/2020 de SARS-CoV-2. Se llevó a cabo un esquema de vacunación con dos dosis de la formulación de ARVAC compuesta por RBD de la variante Gamma y Alum como adyuvante, administradas vía intramuscular con 14 días de diferencia. Se administró PBS por vía intramuscular como placebo. Posteriormente, pasados 28 días de completado el esquema de vacunación se desafiaron los hámsters con 5×10^4 UFPs de SARS-CoV-2 y, en los 5 días posteriores, se midieron parámetros como la variación de peso de los animales y la carga viral en las vías respiratorias que permitieron concluir acerca de la protección ante la infección brindada por ARVAC (Fig. 27).

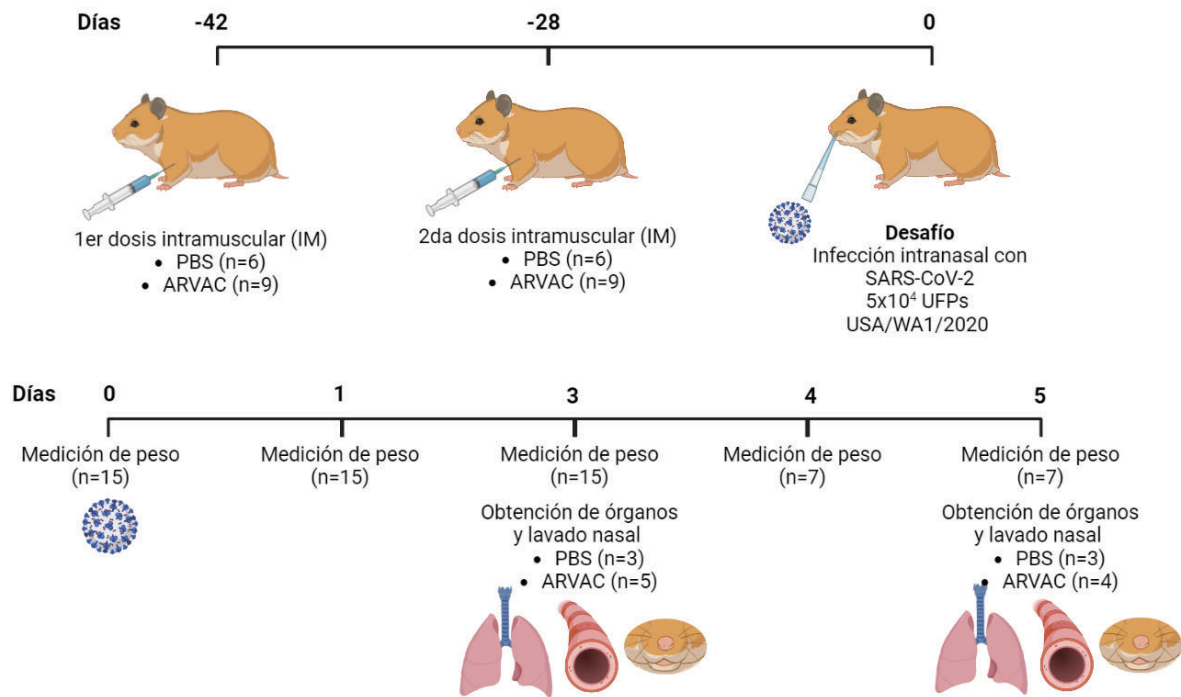


Figura 27. Esquema temporal del diseño experimental llevado a cabo para la evaluación de la protección frente a SARS-CoV-2 brindada por dos dosis de la formulación de ARVAC en modelo de hámster.

a. Variación de peso

Uno de los factores que caracteriza la severidad de la enfermedad en el modelo de hámster es la pérdida de peso observada posterior a la infección. Mediante el monitoreo del peso de los animales se observó una tendencia a la pérdida de peso que se vio atenuada en los animales inmunizados (IM ARVAC) que disminuyeron aproximadamente un 5% su peso inicial luego de 4 días post-infección, lo cual es significativamente menor ($P=0.0108$) a la pérdida de cerca de un 10% del peso inicial en los animales placebo (IM PBS) (Fig. 28A). Asimismo, este último grupo no recuperó su peso inicial incluso pasados 5 días posterior a la infección al detectarse aún una reducción significativa ($P=0.0229$) respecto al peso inicial. Por su parte, aquellos animales vacunados recuperaron el peso inicial luego de 5 días ya que no se observó una diferencia significativa respecto al día de la infección (Fig. 28B). Estos resultados indicarían que la vacunación disminuye la sintomatología de los animales producto de la infección con SARS-CoV-2.

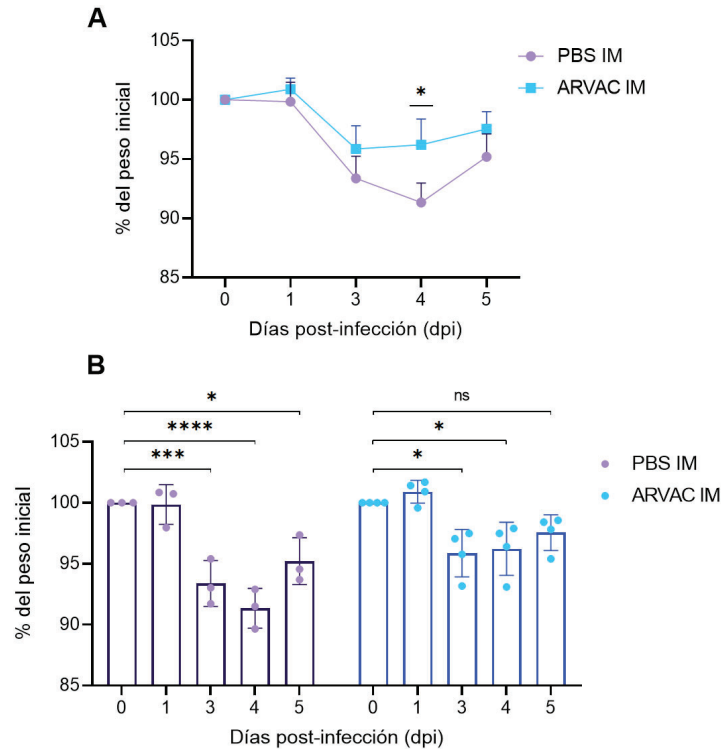


Figura 28. Variación del porcentaje (%) de peso corporal inicial durante los días 0, 1, 3, 4 y 5 post-infección (dpi) para hámsters placebo (PBS IM) ($n=6$, días 0, 1, 3; $n=3$, días 4, 5) y hámsters vacunados (ARVAC IM) ($n=9$, días 0, 1, 3; $n=4$, días 4, 5). Se realizaron comparaciones entre condiciones para cada día (A) y entre días para cada condición (B) mediante un ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples (Tukey) y un nivel de significación $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm DE. *, ***, **** indican diferencias significativas ($P<0.05$, $P<0.001$ y $P<0.0001$ respectivamente); ns: no significativo.

b. Carga viral en vías respiratorias

Se evaluó la protección frente al desafío de la vacuna ARVAC mediante la determinación de la carga viral total en tejido pulmonar dada por el número de copias del gen N de SARS-CoV-2 y el título de virus infeccioso en las vías respiratorias superior (nariz y lavado nasal) e inferior (pulmones y tráquea). En cuanto a la carga viral total, no se detectaron diferencias significativas entre vacunados y placebo a 3 y 5 dpi (Fig. 29A). En ambos, se cuantificó un promedio de 10^6 copias del gen N a 3 dpi, relativo a animales no infectados ni tratados, y un promedio de 10^4 copias a 5 dpi constituyendo una disminución significativa de 10^2 veces (PBS IM: $P=0.0047$; ARVAC IM: $P=0.0019$) (Fig. 29B). Por lo tanto, estos primeros resultados evidenciaron una disminución significativa de la carga viral total en el tiempo en todos los hámsters estudiados.

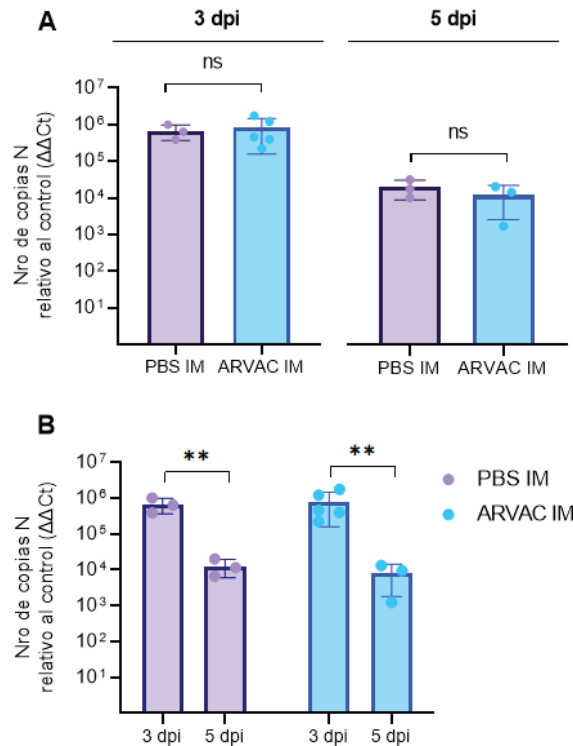


Figura 29. Carga viral total en tejido pulmonar medida como RNA de la nucleoproteína de SARS-CoV-2 (N) en hámsters vacunados (ARVAC IM) y hámsters placebo (PBS IM). Se muestra como número de copias relativo respecto a hámsters no tratados ni infectados (control). Actina fue utilizado como gen de referencia para el análisis de $\Delta\Delta Ct$. Se efectuaron comparaciones entre tratamientos a ambos dpi con un test-t para datos no pareados (A) y se aplicó un modelo estadístico de efectos mixtos para realizar comparaciones entre ambos dpi para cada tratamiento (B) ya que el diseño experimental fue desbalanceado. $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=5$ para el tratamiento ARVAC IM a 3 dpi; $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=4$ para el tratamiento ARVAC IM a 5 dpi. Nivel de significancia $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm DE. ** indica diferencias significativas ($P<0.01$); ns: no significativo.

Luego, se cuantificaron las partículas virales infectivas mediante ensayos de formación de placa de lisis en muestras de tejidos de las vías respiratorias y lavado nasal. Los hámsters vacunados no mostraron diferencias significativas en el título viral a 3 dpi con respecto a los hámsters placebo en ninguno de ellas (Fig. 30A). Por el contrario, a 5 días post-infección la vacunación redujo significativamente el título viral únicamente en tejido pulmonar ($P=0.0346$) (Fig. 30B). Al realizar comparaciones entre 3 y 5 dpi, los hámsters placebo no mostraron una reducción significativa de la carga viral infectiva en ningún tipo de muestra, mientras que, los hámsters vacunados, sí presentaron una reducción significativa tanto en tejido pulmonar como en tráquea ($P=0.0159$), componentes principales del tracto respiratorio inferior. Particularmente, se detectó una disminución promedio de más de 10^3 PFU/ml en pulmón, mientras que no se detectó presencia de virus infectivo en la tráquea a 5 dpi (Fig. 31). Estos resultados sugieren que la vacunación reduce la replicación viral en tejidos de las vías respiratorias inferiores y permite el rápido control y eliminación de la infección en estos tejidos.

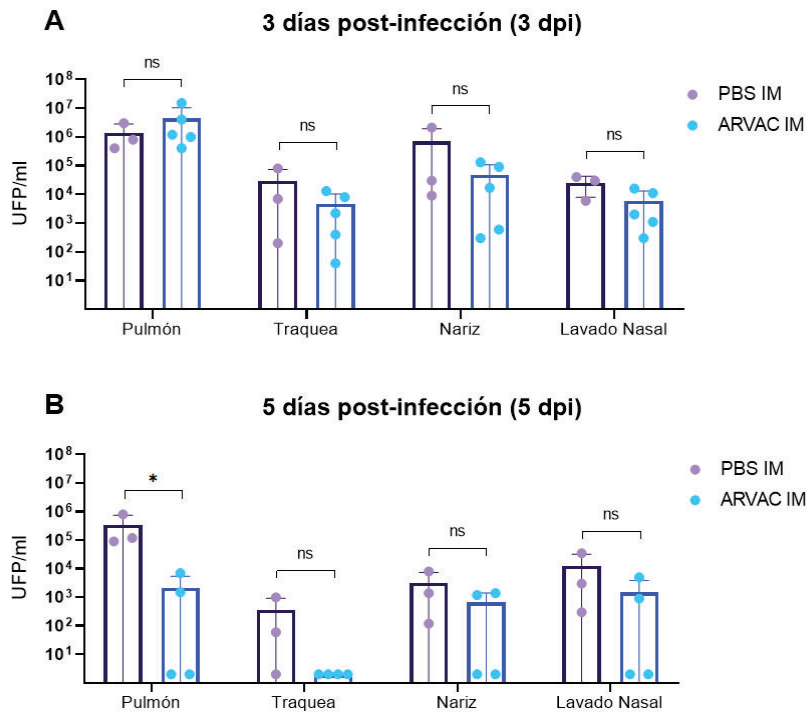


Figura 30. Título de virus SARS-CoV-2 infeccioso (UFP/ml) en pulmón, tráquea, nariz y lavado nasal, en hámsters vacunados (ARVAC IM) y en hámsters placebo (PBS IM). Se aplicó un modelo estadístico de efectos mixtos para efectuar comparaciones entre tratamientos a (A) 3 dpi y (B) 5 dpi. $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=5$ para el tratamiento ARVAC IM a 3 dpi; $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=4$ para el tratamiento ARVAC IM a 5 dpi. Nivel de significancia $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas ($P<0.05$); ns: no significativo.

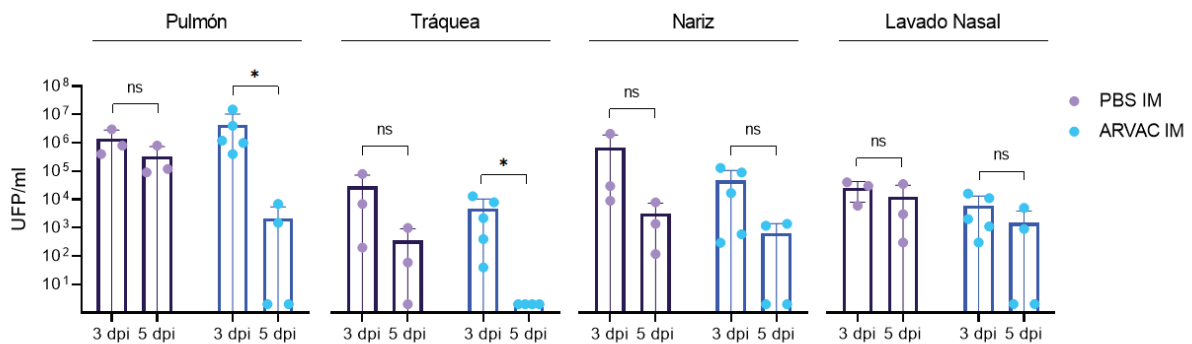


Figura 31. Título de virus infeccioso (UFP/ml) en hámsters inmunizados (ARVAC IM) y en hámsters placebo (PBS IM). Se efectuaron comparaciones entre el título a 3 y 5 dpi para cada tratamiento en pulmón, tráquea, nariz y lavado nasal. El test de Mann-Whitney para muestras no pareadas fue realizado en cada caso para el análisis estadístico. $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=5$ para el tratamiento ARVAC IM a 3 dpi; $n=3$ para el tratamiento PBS IM y $n=4$ para el tratamiento ARVAC IM a 5 dpi. Nivel de significancia $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas ($P<0.05$); ns: no significativo.

c. Histopatología del tejido pulmonar

En línea con los resultados anteriores, las tinciones histológicas del tejido pulmonar revelaron una mayor presencia de la nucleoproteína de SARS-CoV-2 en hámsters no inmunizados respecto a aquellos vacunados con la formulación a ARVAC. Por un lado, a 3 dpi se observó un aumento apreciable en la detección de N en el grupo PBS IM respecto al grupo ARVAC IM. Por otro lado, a 5 dpi disminuye considerablemente la detección de dicha proteína en ambos grupos siendo nula en aquellos animales vacunados. En cuanto a la tinción H&E, se observó hemorragia intraparenquimal, edema pulmonar e infiltración celular denotada por la acumulación de núcleos celulares, todos parámetros consistentes a un cuadro inflamatorio característico de neumonía producto de la infección. Asimismo, se detectó una infiltración celular más tardía en los animales placebo ya que fue más notoria a 5 dpi, mientras que en los animales vacunados puede observarse a 3 dpi. De todas formas, no se detectó una resolución completa de la inflamación en ningún caso (Fig. 32).

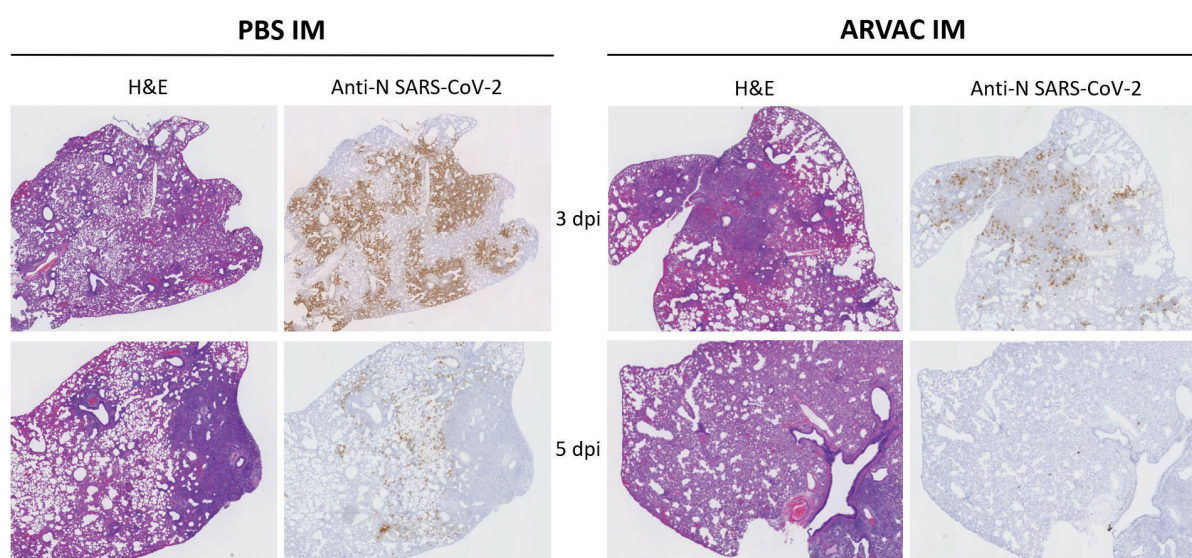


Figura 32. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y con un anticuerpo específico de la proteína N (Anti-N SARS-CoV-2) a 3 y 5 días post-infección (dpi) en tejido pulmonar de hámsters vacunados (ARVAC IM) y hámsters placebo (PBS IM), ambos grupos infectados con 5×10^4 PFUs de SARS-CoV-2. Cada par de imágenes representan un animal distinto.

Discusión

El desarrollo de vacunas efectivas contra el SARS-CoV-2 que brindan protección contra la enfermedad COVID-19 ha sido necesario para combatir la pandemia causada por este nuevo virus. Particularmente en Argentina, la vacunación comenzó a fines de 2020 con la aplicación de la vacuna SPUTNIK V a trabajadores del ámbito de la salud. Aún existen vacunas en desarrollo y, en nuestro país, ARVAC Cecilia Grierson es el prototipo vacunal más avanzado para el cual se están realizando actualmente los ensayos clínicos de fase II. En este trabajo nos propusimos evaluar la respuesta inducida por ambas vacunas, cada una con diferentes estrategias. Para esto, en primer lugar se desarrolló un sistema de pseudovirus de SARS-CoV-2 para determinar la capacidad neutralizante contra las VOCs de los anticuerpos inducidos por la vacunación con SPUTNIK V. En segundo lugar, se utilizaron hámsters como modelo in vivo de infección para evaluar la protección otorgada por la vacuna ARVAC frente a la infección.

1. Caracterización de la infectividad de los pseudovirus e incorporación de la mutación R683G

Los pseudovirus tipificados con la proteína S de la variante pandémica y VOCs de SARS-CoV-2 se diseñaron en base a las secuencias de aminoácidos de referencia de cada variante reportadas en GISAID. Durante la puesta a punto del sistema, se observó que las variantes Gamma y Ómicron presentaron bajo título de virus infectivo. Debido a que la infectividad de los pseudotipos está ligada a la incorporación y la funcionalidad de la proteína de envoltura, se caracterizó la incorporación relativa de S en los pseudovirus producidos mediante Western Blot. Este abordaje permite estimar la incorporación de S empleando como patrón de carga la proteína p24 del core de los pseudotipos. Los resultados obtenidos sugieren que la caída en la infectividad de estas dos variantes podría ser causado por una baja eficiencia en la incorporación de la proteína S. En efecto, para la variante Omicron el título de pseudovirus infectivo fue el más bajo y se detectó una menor cantidad relativa de S en las partículas virales pseudotipadas en comparación con el resto de las variantes. A su vez, las diferencias en la detección de p24 indican que una mayor producción de partículas virales no implicaría una mayor incorporación de Spike en ellas, y viceversa. En base a la intensidad de la banda de p24, la producción de viriones para la variante Delta habría sido menor que para la variante pandémica (D614G). Sin embargo, la VOC incorporó de manera más eficiente la proteína S a su envoltura, mientras que la incorporación fue deficiente en D614G, lo cual se relacionó directamente con el título viral (Tabla 10; Fig. 21). Por lo tanto, la funcionalidad de Spike en la superficie de los pseudotipos dependería de la eficiencia en su incorporación. La proteína S es, en última instancia, lo que les otorga infectividad a los viriones. Esto explica la generación de partículas de baja infectividad para los pseudotipos de D614G o de partículas virales no infectivas cuando la incorporación de S es nula. Si bien la intensidad de las bandas correspondientes a Spike se comparó de manera cualitativa, puede relacionarse con los títulos virales. Por otro lado, como metodología alternativa a la detección de p24 por Western Blot para estimar la producción total de viriones, se podría cuantificar el número de genomas

virales mediante RT-PCR cuantitativa para descartar posibles errores en la manipulación y/o carga de muestras previo a la corrida electroforética de proteínas.

Con el fin de aumentar la infectividad de las variantes pandémica (D614G) y Gamma, se exploró la posibilidad de alterar el sitio de corte de furinas a partir de la incorporación de la mutación R683G. Esto permitió aumentar su infectividad en células en cultivo 293T/hACE2 cómo había sido previamente reportado (Schmidt et al., 2020). Estas partículas virales utilizan preferentemente la vía de entrada endosomal dependiente de catepsinas que pueden clivar a la proteína S para activar su potencial fusogénico. En células que no expresan TMPRSS2 en su superficie, como las utilizadas en este trabajo, estos virus tienen ventajas replicativas ya que son más estables. Esto se debe a que el clivaje entre S1/S2 podría resultar en una liberación prematura de la subunidad S1 anulando su función de unión al receptor (Peacock et al., 2021). Se ha demostrado que la co-expresión de TMPRSS2 y ACE2 reduce la replicación y el fitness de mutantes que anulan el sitio de corte de furinas de SARS-CoV-2 (Johnson et al., 2021). Por otro lado, se ha reportado, mediante el uso de pseudovirus, que las mutaciones en aquel sitio afectan la expresión de S en la superficie celular, lo que sugiere que el procesamiento de S impacta en su localización subcelular (Lavie et al., 2022). En consecuencia, el aumento en la infectividad de las mutantes generadas en este trabajo podría ser explicado debido a la ausencia de la proteasa transmembrana en las células utilizadas o por un posible aumento de la expresión de la proteína S en la superficie celular, lo cual constituye un requisito indispensable para que los pseudovirus basados en lentivirus incorporen eficientemente mayor cantidad de proteína S en su envoltura aumentando su capacidad infectiva.

Finalmente, la caracterización del procesamiento de S permitió comprobar que en aquellas variantes con la secuencia del sitio intacta sólo se incorpora a las partículas la proteína procesada, mientras que en las mutantes R683G se pueden incorporar únicamente el monómero completo de S, como en el caso de Gamma Mut, o bien ambos, como en el caso de D614G Mut (Fig. 21). Este resultado es consistente con diversas caracterizaciones de mutantes con pérdida de función del sitio de corte de furinas previamente reportadas (Johnson et al., 2021; Peacock et al., 2021; Lavie et al., 2022). Si bien el motivo de clivaje por furinas en proteínas fue inicialmente descrito como la expresión regular $p_4\text{-R-X-[K/R]-R}_{p1}$, los residuos mínimos para la escisión por furinas se definen generalmente como $p_4\text{-R-X-X-R}_{p1}$ y el contexto de secuencia dado por los aminoácidos adyacentes puede modular el clivaje provocando que el sitio esté más o menos accesible al accionar de distintas proteasas (Lubinski et al., 2022) lo que podría explicar la diferencia observada en las mutantes R683G de distintas variantes. La mutación en la segunda posición del motivo (P2), no tiene una restricción estricta de aminoácidos para que ocurra el corte, el sitio entre S1 y S2 sigue siendo blanco de furinas y el clivaje se modula de acuerdo al contexto de secuencia de Spike.

A pesar de todo lo antedicho, los aislamientos de SARS-CoV-2 más recientes contienen mutaciones que aumentan la eficiencia del clivaje en el sitio de corte de furinas. Se determinó que estas nuevas variantes tienen una menor capacidad de ingresar a las células a través de la vía endosomal, por lo que infectan de manera muy ineficiente células que no expresan

proteasas de superficie. La maduración de la proteína S a partir de su escisión aumenta la entrada de los viriones en células que expresan TMPRSS2, las cuales son abundantes en el tejido respiratorio, primer blanco de infección del virus. Esa es una de las razones por la cual se atribuye la patogénesis característica de SARS-CoV-2 a la presencia del sitio de corte por furinas (Peacock et al., 2021; Frolova et al., 2022). Por lo tanto, si bien no es lo que ocurre en la naturaleza, la estrategia de alteración de dicho sitio mediante mutagénesis dirigida permitió obtener pseudovirus suficientemente infectivos para continuar con los ensayos de seroneutralización in vitro.

2. Capacidad neutralizante de anticuerpos inducidos por SPUTNIK V

Los resultados obtenidos a partir de la titulación de anticuerpos neutralizantes inducidos por SPUTNIK V en 10 pacientes a las 2 y 24 semanas de completado el esquema de vacunación, mostraron una reducción de la capacidad neutralizante en el tiempo para todas las variantes de SARS-CoV-2 estudiadas (Fig. 24). Consecuentemente, dado que hasta el momento el mejor correlato de protección son los niveles de nAbs, la protección brindada por dos dosis de esta plataforma vacunal a lo largo del tiempo estaría limitada. Por otro lado, las muestras evaluadas presentaron anticuerpos neutralizantes frente a las VOCs con títulos similares a los obtenidos para la variante pandémica, lo cual demuestra la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por esta plataforma vacunal basada en la proteína S de la variante ancestral (Wuhan) (Fig. 25). Estudios previos, en los cuales se realizó el seguimiento de individuos vacunados con SPUTNIK V (Gonzalez Lopez Ledesma et al., 2022), mostraron una caída media del título neutralizante frente a VSV replicativos pseudotipados con S de la variante ancestral de aproximadamente 2.5 veces a las 23 spv respecto a 3 spv. En el presente trabajo, si bien se utilizó un número limitado de muestras y un sistema de lentivirus pseudotipados con S de la variante pandémica no replicativos, se obtuvo una reducción en el mismo orden (cerca a 5 veces) en una ventana de tiempo similar (2 y 24 spv). Además, en el mismo estudio previo, se evidenció una caída en la neutralización de las variantes Gamma y Delta con respecto a Wuhan, mientras que nuestros resultados no mostraron diferencias con respecto a la variante pandémica. Sin embargo, la reactividad cruzada frente a las VOCs refleja una amplitud de la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación, la cual resulta en la expresión de nAbs de mayor potencia que evitan el escape de nuevas variantes que ya ha sido previamente observado en pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Sette & Crotty, 2021).

Existe evidencia que demuestra que los títulos de anticuerpos neutralizantes de individuos convalecientes son mayores frente a SARS-CoV-2 WT con respecto al virus con una delección en el sitio de corte de furinas. Esto podría estar ocasionado por la estabilidad de S en su conformación prefusión, lo cual alteraría la exposición de los sitios de unión de los anticuerpos neutralizantes (Johnson et al., 2021). Para determinar si efectivamente la mutación en el sitio de corte tiene consecuencias en el título neutralizante obtenido con nuestro sistema de pseudovirus se deberían comparar los títulos neutralizantes con respecto a su virus parental, lo cual no pudo ser llevado a cabo en este trabajo para la variante Gamma aunque sí fue realizado para la variante D614G Mut sin detectar diferencias significativas.

Según los resultados de este trabajo, los viriones de Gamma Mut incorporaron en su envoltura únicamente proteínas S completas, no escindidas, a raíz de la presencia de la mutación R683G. Este no fue el caso de D614G Mut donde se observó en mayor proporción, pero no únicamente, la proteína S completa. Estos resultados junto con la evidencia previamente mencionada sugieren que la incorporación en sus partículas de ambos tipos de proteína S tendría un menor impacto en la capacidad neutralizante observada respecto a aquella de D614G. Si bien no es el caso de SPUTNIK V, las vacunas Janssen Ad26 y Novavax están basadas en una proteína S que contienen mutaciones adicionales en el sitio S1/S2 para hacerla resistente a las proteasas de superficie ya que se ha demostrado que la proteína S estabilizada en su conformación prefusión provoca un incremento en la calidad y cantidad de los nAbs inducidos por la vacunación (Dai & Gao, 2020).

Para el caso de la variante Ómicron, los resultados obtenidos no reflejarían la cinética de respuesta neutralizante ni la reactividad cruzada de los nAbs que ocurre naturalmente luego de la vacunación con SPUTNIK V. De acuerdo a evidencia previa, no se ha determinado reactividad cruzada de la respuesta neutralizante inducida por dos dosis de SPUTNIK V contra esta variante respecto al linaje ancestral (Wuhan) y a la variante pandémica (D614G) (Lapa et al., 2022; Sanchez et al., 2022). El bajo título viral obtenido en la producción de pseudotipos de esta variante y el enfrentamiento de las muestras de suero con una cantidad de unidades infecciosas menor a la requerida provocaría la sobreestimación del título neutralizante ante esta variante y, por esa razón, no se pudieron comparar los TN con respecto a la variante pandémica. Sin embargo, pudimos evidenciar una disminución en el título neutralizante con el tiempo, al igual que otro grupo de investigación que ha detectado una disminución sustancial de la capacidad neutralizante en sueros de pacientes inmunizados con esta vacuna luego de 180 días y, más aún, luego de 1 año de completado el esquema de vacunación (Sanchez et al., 2022), lo que suma evidencia para validar la potencia de las mutaciones incorporadas en la proteína S de esta variante al escape de la respuesta neutralizante.

Sería de gran interés evaluar a tiempos mayores no sólo la respuesta neutralizante contra las VOCs para definir correlatos de protección, sino también la respuesta de memoria inducida por la vacunación para definir la importancia de la respuesta a largo plazo contra SARS-CoV-2. De todas maneras, se deberá tener en cuenta que luego de este estudio de seroprevalencia ha habido una constante actualización de los esquemas de vacunación ante la aparición de nuevas VOCs con incorporación de dosis de vacunas heterólogas (esquemas combinados) y un aumento de casos de COVID que limitan la posibilidad de estudiar una cohorte de individuos no infectados. Los esquemas de vacunación heterólogos, incluso desde la segunda dosis aplicada, muestran un buen perfil de reactogenicidad y su efectividad es mayor que los esquemas homólogos. Actualmente, el refuerzo heterólogo está siendo aplicado en Argentina en los esquemas de vacunación a partir de la tercera dosis (Pascuale et al., 2022).

El análisis de los efectos observados en este estudio está limitado por la poca cantidad de muestras de suero estudiadas, lo que, junto con las diferencias en los sistemas de virus/pseudovirus utilizados, hace difícil comparar los resultados obtenidos con resultados

obtenidos en otros laboratorios. Estas diferencias en los resultados interlaboratorios ha sido ampliamente estudiada en el contexto de un meta-análisis llevado a cabo para determinar a los títulos de nAbs como correlato de protección de distintas plataformas vacunales y ha detectado con mayor frecuencia variabilidad entre los títulos obtenidos entre diferentes laboratorios estudiando una misma vacuna que entre diferentes vacunas en el mismo laboratorio (Cromer et al., 2022). Aún así, hemos podido demostrar una correlación entre los TNs obtenidos con el sistema de pseudovirus desarrollado en esta tesina y los obtenidos por nuestro grupo de trabajo utilizando el virus vivo SARS-CoV-2 para las mismas muestras (Fig. 26), lo que permite concluir que los ensayos de neutralización basados en pseudovirus tipificados con Spike permiten determinar los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a distintas VOCs en individuos vacunados.

3. Protección brindada por ARVAC frente a SARS-CoV-2 en modelo de hámster

Los hámster sirios son naturalmente susceptibles a SARS-CoV-2 y la puesta a punto como modelo de infección reveló que la inoculación intranasal resulta en una enfermedad leve a moderada con signos similares a los observados en humanos, además de la pérdida de peso característica de los modelos animales frente a la infección. Al igual que en los humanos, el virus infecta principalmente el tracto respiratorio superior e inferior y es allí donde replica. El pico de replicación viral ocurre entre los 2 y 3 días post-infección y, particularmente, los hámsters son capaces de resolver la infección luego de dos semanas (Bricker et al., 2021). Muchos candidatos vacunales han sido testeados en hámsters para evaluar su eficacia como parte de los ensayos pre-clínicos necesarios en su desarrollo. Está reportado que usando hamsters como modelo para el desafío, los animales vacunados muestran una disminución en el título de virus infectivo en sus pulmones, pérdida de peso menor o nula y, en general, no presentan signos indicativos de neumonía a nivel histológico (S. Wang et al., 2021). En este trabajo se evaluó la protección brindada frente a la infección por un esquema de dos dosis de la vacuna ARVAC administrada por vía intramuscular.

En primer lugar, la inmunización atenuó la pérdida de peso posterior a la infección con SARS-CoV-2 y permitió a los animales vacunados recuperar el peso inicial (Fig. 28). Asimismo, la vacunación redujo sustancialmente los títulos de virus infectivo en tejidos de las vías respiratorias inferiores a los 5 dpi, pero no mostró cambios en la presencia del virus en nariz y lavado nasal (Fig. 31). Estos resultados son consistentes con los antecedentes de ensayos pre-clínicos de otras vacunas de aplicación intramuscular contra SARS-CoV-2 en modelo de hámster, aunque entre estos ensayos varían los tiempos post-infección analizados y los esquemas de vacunación aplicados. Particularmente, al inmunizar hámsters con 3 dosis de una formulación con virus inactivado e infectarlos vía intranasal con SARS-CoV-2 se determinó una cantidad notable de virus infectivo a 3 dpi tanto en pulmón como en nariz. A 7 dpi aunque se detectó una leve reducción del título viral en tejido nasal, en pulmón se encontró por debajo del límite de detección (Mohandas et al., 2021). Asimismo, para la formulación adenoviral desarrollada por la compañía farmacéutica Janssen (Ad26.COV2.S), no detectaron diferencias entre la carga viral de animales vacunados con una única dosis respecto a animales placebo en tejido pulmonar ni en lavado nasal a 3 dpi. De todas maneras,

no continuaron estudiando dicho parámetro a tiempos más largos (Bricker et al., 2021). En todos los casos, la vacunación fue protectora contra la pérdida de peso de los animales infectados.

Con respecto a la carga viral total en tejido pulmonar medida como la presencia de copias de RNA subgenómico de la proteína N del virus, no se encontraron diferencias significativas a los tiempos analizados en animales vacunados con ARVAC respecto a animales placebo y la reducción de la carga en el tiempo fue similar en ambos grupos (Fig. 29). Esta observación difiere con investigaciones previas que reportan una disminución del RNA viral a niveles no detectables en pulmones de animales vacunados contra SARS-CoV-2 (Kalnin et al., 2021; Mohandas et al., 2021). Debe notarse que la variación en la carga viral total entre 3 y 5 dpi observada en hámsters inmunizados mostró un perfil diferente al del título de virus infeccioso y al de la detección de proteína N en tejido pulmonar (Fig. 32), donde se encontró una diferencia significativa en la disminución del título y en la detección de N con respecto al grupo placebo. En consecuencia, la vacunación permitiría el control de la infección y la disminución del virus infeccioso en el tiempo posiblemente gobernado por una potente respuesta de nAbs capaces de bloquear la infección de células susceptibles. Por lo tanto, la diferencia observada para las determinaciones de carga viral total medida como número de copias de RNA de N y título medido como unidades formadoras de placa podrían explicarse teniendo en cuenta que la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación neutralizaría al virus en tejido pulmonar. Por esta razón, sería de gran interés evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por ARVAC en modelo de hámster.

Por último, se observaron signos claros de inflamación y neumonía en tejido pulmonar de hámsters placebo y vacunados a ambos tiempos post-infección. Al analizar comparativamente a ambos grupos a los 3 dpi, la mayor infiltración celular observada en los hámsters vacunados sugiere que la respuesta inmune ha sido montada con mayor eficiencia en dichos animales (Fig. 32). Este hecho indicaría que efectivamente la respuesta inmune montada por la inmunización con ARVAC permite inducir una respuesta más rápida ante la infección. No existen, hasta el momento, estudios previos que evalúen la respuesta de la vacunación a tiempos cortos luego de la infección (3-5 dpi) en este modelo animal. En ensayos pre-clínicos de otras vacunas usando este mismo modelo se observó una patología atenuada o nula en pulmones de animales vacunados recién a los 7 dpi, mientras que signos de neumonía han sido observados hasta 14 dpi en animales no vacunados (Bricker et al., 2021; Mohandas et al., 2021).

A partir de la revisión de los antecedentes, se puede observar que la respuesta frente al desafío varía con el régimen de vacunación y el prototipo vacunal contra SARS-CoV-2, que condicionan la respuesta inmune montada ante la vacunación y la resolución de la infección en distintos tejidos de las vías respiratorias. En conjunto, nuestros resultados demostraron que, si bien no provoca una inmunidad esterilizante, la vacunación con dos dosis de ARVAC induce protección contra SARS-CoV-2 en hámsters sirios permitiendo un rápido control del virus infeccioso en los tejidos de la vía respiratoria inferior. Dado el comportamiento temporal de la infección con SARS-CoV-2 en este modelo animal, sería relevante el análisis de los parámetros estudiados en este trabajo a tiempos mayores post-infección.

Al momento de escritura de esta tesina, se han finalizado los estudios clínicos de fase I de la vacuna ARVAC. Teniendo en cuenta los esquemas de vacunación utilizados en el país, dichos estudios se realizaron utilizando esta vacuna como refuerzo heterólogo en individuos vacunados con dos dosis de otras plataformas vacunales, si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo suman evidencia preclínica de protección de ARVAC utilizada como vacunación primaria.

Conclusiones

- La infectividad de los pseudovirus tipificados con la proteína Spike de la variante pandémica y las VOCs se vio definida por la eficiencia en la incorporación de S en los viriones, lo cual determinó el título de virus infeccioso obtenido.
- La incorporación de la mutación R683G permitió aumentar la infectividad en cultivo tanto de la variante pandémica como de la variante Gamma, lo cual estaría explicado por una incorporación más eficiente de la proteína S a los viriones dada por un potencial aumento de su expresión en la superficie celular o por una mayor estabilidad de dicha proteína en la envoltura de los viriones permitiendo la infección de células 293T/hACE2 por vía endosomal.
- El seguimiento de la capacidad neutralizante de los nAbs inducidos por dos dosis de SPUTNIK V demostró una reducción a las 24 spv con respecto a las 2 spv para la variante pandémica (D614G), D614G Mut, Gamma Mut y Delta. Las muestras de suero analizadas presentaron nAbs contra Ómicron aunque no se aseguró el rango dinámico necesario para concluir acerca la respuesta neutralizante en el tiempo.
- Los nAbs inducidos por SPUTNIK V mostraron una eficiente reactividad cruzada contra las variantes Gamma y Delta lo cual reflejaría la amplitud de la respuesta neutralizante frente a las VOCs.
- La vacuna ARVAC indujo protección frente a SARS-CoV-2 en modelo de hámster caracterizada por un eficiente control del virus en las vías respiratorias inferiores dado por una potencial respuesta de nAbs que permite una rápida eliminación de la infección. Sin embargo, al igual que otras vacunas, esta vacuna no indujo inmunidad esterilizante, por lo que no evitaría la infección con SARS-CoV-2 pero reduciría la sintomatología.

Perspectivas a futuro

- Determinar la capacidad infectiva de los pseudovirus producidos para todas las VOCs en clones de células HEK293T que co-expresen en su superficie hACE2 y TMPRSS2. Este sistema permitirá determinar si efectivamente la expresión de la proteasa de membrana es clave en la infectividad de virus con el sitio de corte de furinas intacto. Además, sería especialmente relevante para poder llevar a cabo los ensayos de seroneutralización con los pseudovirus de la variante Omicron que mostraron baja capacidad infectiva en las células que expresan únicamente hACE2.
- Aumentar la cantidad de muestras de suero analizadas de modo tal de aumentar la significancia estadística en la determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por dos dosis de SPUTNIK V.
- Determinar la producción de nAbs en los hámsters vacunados con ARVAC para corroborar si efectivamente su presencia se correlaciona con la protección frente a la infección y con la rápida eliminación del virus infectivo en la vía respiratoria inferior.

Referencias bibliográficas

- 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* 2020, Vol. 9, Page 331, 9(5), 331. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050331>
- Banerjee, S., Wang, X., Du, S., Zhu, C., Jia, Y., Wang, Y., & Cai, Q. (2022). Comprehensive role of SARS-CoV-2 spike glycoprotein in regulating host signaling pathway. *Journal of Medical Virology*, 94(9), 4071–4087. <https://doi.org/10.1002/JMV.27820>
- Benton, D. J., Wrobel, A. G., Roustan, C., Borg, A., Xu, P., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2021). The effect of the D614G substitution on the structure of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(9), e2022586118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022586118>
- Bhattacharya, D., & Victora, G. D. (2022). Boosting with updated COVID-19 mRNA vaccines. *Nature Medicine* 2022 28:11, 28(11), 2257–2258. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02048-y>
- Bricker, T. L., Darling, T. L., Hassan, A. O., Harastani, H. H., Soung, A., Jiang, X., Dai, Y. N., Zhao, H., Adams, L. J., Holtzman, M. J., Bailey, A. L., Case, J. B., Fremont, D. H., Klein, R., Diamond, M. S., & Boon, A. C. M. (2021). A single intranasal or intramuscular immunization with chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine protects against pneumonia in hamsters. *Cell Reports*, 36(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109400>
- Burke, E., & Barik, S. (2003). Megaprimer PCR: application in mutagenesis and gene fusion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 226, 525–532. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:525>
- Chavda, V. P., Bezbaruah, R., Deka, K., Nongrang, L., & Kalita, T. (2022). The Delta and Omicron Variants of SARS-CoV-2: What We Know So Far. *Vaccines* 2022, Vol. 10, Page 1926, 10(11), 1926. <https://doi.org/10.3390/VACCINES10111926>
- Chen, M., & Zhang, X.-E. (2021). Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *International Journal of Biological Sciences*, 2021(6), 1574–1580. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59184>
- Coria, L. M., Saposnik, L. M., Pueblas Castro, C., Castro, E. F., Bruno, L. A., Stone, W. B., Pérez, P. S., Darriba, M. L., Chemes, L. B., Alcain, J., Mazzitelli, I., Varese, A., Salvatori, M., Auguste, A. J., Álvarez, D. E., Pasquevich, K. A., & Cassataro, J. (2022). A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD-Based COVID-19 Vaccine Formulations Containing Alum Increases Neutralizing Antibodies, Specific Germinal

- Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, 13, 604. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844837>
- Coronavirus Pandemic (COVID-19) - Our World in Data. (s/f). Recuperado el 4 de diciembre de 2022, a partir de <https://ourworldindata.org/coronavirus>
- Cromer, D., Steain, M., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Kent, S. J., Triccas, J. A., Khoury, D. S., & Davenport, M. P. (2022). Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 3(1), e52–e61. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00267-6)
- Dai, L., & Gao, G. F. (2020). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology* 2020 21:2, 21(2), 73–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
- Diamond, M. S., & Kanneganti, T. D. (2022). Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature Immunology* 2022 23:2, 23(2), 165–176. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0>
- Earle, K. A., Ambrosino, D. M., Fiore-Gartland, A., Goldblatt, D., Gilbert, P. B., Siber, G. R., Dull, P., & Plotkin, S. A. (2021). Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine*, 39(32), 4423–4428. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.063>
- Fergie, J., & Srivastava, A. (2021). Immunity to SARS-CoV-2: Lessons Learned. *Frontiers in Immunology*, 12, 716. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.654165>
- Frolova, E. I., Palchevska, O., Lukash, T., Dominguez, F., Britt, W., & Frolov, I. (2022). Acquisition of Furin Cleavage Site and Further SARS-CoV-2 Evolution Change the Mechanisms of Viral Entry, Infection Spread, and Cell Signaling. *Journal of Virology*, 96(15). <https://doi.org/10.1128/jvi.00753-22>
- Dirección Nacional de Epidemiología e Información Estratégica con datos extraídos del SNVS 2.0. (s/f) a partir de <https://www.argentina.gob.ar/>
- Ganesh, B., Rajakumar, T., Malathi, M., Manikandan, N., Nagaraj, J., Santhakumar, A., Elangovan, A., & Malik, Y. S. (2021). Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 10, 100694. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.100694>
- Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., St. Denis, K., Nitido, A. D., Garcia, Z. H., Hauser, B. M., Feldman, J., Pavlovic, M. N., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Sigal, A., Schmidt, A. G., Iafate, A. J., Naranbhai, V., & Balazs, A. B. (2021). Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, 184(9), 2372–2383. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.03.013>

- Gillot, C., Favresse, J., Maloteau, V., Dogné, J. M., & Douxfils, J. (2021). Dynamics of Neutralizing Antibody Responses Following Natural SARS-CoV-2 Infection and Correlation with Commercial Serologic Tests. A Reappraisal and Indirect Comparison with Vaccinated Subjects. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 2329, 13(11), 2329. <https://doi.org/10.3390/V13112329>
- GISAID - gisaid.org. (s/f). Recuperado el 4 de diciembre de 2022, a partir de <https://gisaid.org/>
- Gonzalez Lopez Ledesma, M. M., Sanchez, L., Ojeda, D. S., Rouco, S. O., Rossi, A. H., Varese, A., Mazzitelli, I., Pascuale, C. A., Miglietta, E. A., Rodríguez, P. E., Pallarés, H. M., Costa Navarro, G. S., Caramelo, J. J., Rothlauf, P. W., Liu, Z., Bloyet, L. M., Pontelli, M. C., Rasetto, N. B., Wenker, S. D., ... Gamarnik, A. v. (2022). Longitudinal Study after Sputnik V Vaccination Shows Durable SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies and Reduced Viral Variant Escape to Neutralization over Time. *MBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.03442-21>
- Gurevich, M., Zilkha-Falb, R., Sonis, P., Magalashvili, D., Menascu, S., Flechter, S., Dolev, M., Mandel, M., & Achiron, A. (2022). SARS-CoV-2 memory B and T cell profiles in mild COVID-19 convalescent patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 115, 208–214. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2021.12.309>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.004>
- HIV Replication Cycle | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. (s/f). Recuperado el 21 de noviembre de 2022, a partir de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
- Hoagland, D. A., Møller, R., Uhl, S. A., Oishi, K., Frere, J., Golyner, I., Horiuchi, S., Panis, M., Blanco-Melo, D., Sachs, D., Arkun, K., Lim, J. K., & tenOever, B. R. (2021). Leveraging the antiviral type I interferon system as a first line of defense against SARS-CoV-2 pathogenicity. *Immunity*, 54(3), 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.017>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:3, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2021). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1, 23(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Johansen, M. D., Irving, A., Montagutelli, X., Tate, M. D., Rudloff, I., Nold, M. F., Hansbro, N. G., Kim, R. Y., Donovan, C., Liu, G., Faiz, A., Short, K. R., Lyons, J. G.,

- McCaughan, G. W., Gorrell, M. D., Cole, A., Moreno, C., Couteur, D., Hesselton, D., ... Hansbro, P. M. (2020). Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunology* 2020 13:6, 13(6), 877–891. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00340-z>
- Johnson, B. A., Xie, X., Bailey, A. L., Kalveram, B., Lokugamage, K. G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J. K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Winkler, E. S., Swetnam, D., Plante, J. A., Aguilar, P., ... Menachery, V. D. (2021). Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature* 2021 591:7849, 591(7849), 293–299. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03237-4>
- Juraszek, J., Rutten, L., Blokland, S., Bouchier, P., Voorzaat, R., Ritschel, T., Bakkers, M. J. G., Renault, L. L. R., & Langedijk, J. P. M. (2021). Stabilizing the closed SARS-CoV-2 spike trimer. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20321-x>
- Kalnin, K. v., Plitnik, T., Kishko, M., Zhang, J., Zhang, D., Beauvais, A., Anosova, N. G., Tibbitts, T., DiNapoli, J., Ulinski, G., Piepenhagen, P., Cummings, S. M., Bangari, D. S., Ryan, S., Huang, P. W. D., Huleatt, J., Vincent, D., Fries, K., Karve, S., ... Casimiro, D. (2021). Immunogenicity and efficacy of mRNA COVID-19 vaccine MRT5500 in preclinical animal models. *Npj Vaccines* 2021 6:1, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00324-5>
- Keeton, R., Tincho, M. B., Ngomti, A., Baguma, R., Benede, N., Suzuki, A., Khan, K., Cele, S., Bernstein, M., Karim, F., Madzorera, S. v., Moyo-Gwete, T., Mennen, M., Skelem, S., Adriaanse, M., Mutithu, D., Aremu, O., Stek, C., du Bruyn, E., ... Riou, C. (2022). T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature* 2022 603:7901, 603(7901), 488–492. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04460-3>
- Khoury, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Subbarao, K., Kent, S. J., Triccas, J. A., & Davenport, M. P. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine* 2021 27:7, 27(7), 1205–1211. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>
- Lapa, D., Grousova, D. M., Matusali, G., Meschi, S., Colavita, F., Bettini, A., Gramigna, G., Francalancia, M., Garbuglia, A. R., Girardi, E., Puro, V., Antinori, A., Kovyrshina, A. v., Dolzhikova, I. v., Shcheblyakov, D. v., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. v., Gushchin, V. A., Logunov, D. Y., ... Gintsburg, A. L. (2022). Retention of Neutralizing Response against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Sputnik V-Vaccinated Individuals. *Vaccines*, 10(5), 817. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050817>
- Larsen, S. E., Berube, B. J., Pecor, T., Cross, E., Brown, B. P., Williams, B. D., Johnson, E., Qu, P., Carter, L., Wrenn, S., Kepl, E., Sydeman, C., King, N. P., Baldwin, S. L., & Coler, R. N. (2021). Qualification of ELISA and neutralization methodologies to

- measure SARS-CoV-2 humoral immunity using human clinical samples. *Journal of Immunological Methods*, 499, 113160. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.113160>
- Lavie, M., Dubuisson, J., & Belouzard, S. (2022). SARS-CoV-2 Spike Furin Cleavage Site and S2' Basic Residues Modulate the Entry Process in a Host Cell-Dependent Manner. *Journal of Virology*, 96(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.00474-22>
- Lubinski, B., Jaimes, J. A., & Whittaker, G. R. (2022). Intrinsic furin-mediated cleavability of the spike S1/S2 site from SARS-CoV-2 variant B.1.1.529 (Omicron). *BioRxiv*, 2022.04.20.488969. <https://doi.org/10.1101/2022.04.20.488969>
- Merad, M., Blish, C. A., Sallusto, F., & Iwasaki, A. (2022). The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, 375(6585), 1122–1127. <https://doi.org/10.1126/science.abm8108>
- Mistry, P., Barmania, F., Mellet, J., Peta, K., Strydom, A., Viljoen, I. M., James, W., Gordon, S., & Pepper, M. S. (2022). SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.809244>
- Mohandas, S., Yadav, P. D., Shete-Aich, A., Abraham, P., Vadrevu, K. M., Sapkal, G., Mote, C., Nyayanit, D., Gupta, N., Srinivas, V. K., Kadam, M., Kumar, A., Majumdar, T., Jain, R., Deshpande, G., Patil, S., Sarkale, P., Patil, D., Ella, R., ... Bhargava, B. (2021). Immunogenicity and protective efficacy of BBV152, whole virion inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates in the Syrian hamster model. *IScience*, 24(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102054>
- Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology* 2022 23:2, 23(2), 186–193. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
- Pascuale, C. A., Varese, A., Ojeda, D. S., Pasinovich, M. E., Lopez, L., Rossi, A. H., Rodriguez, P. E., Miglietta, E. A., Mazzitelli, I., di Diego Garcia, F., Sanchez, L., Rouco, S. O., Gonzalez Lopez Ledesma, M. M., Zurano, J. P., Mazzitelli, B., Scruzzi, G., Barbero, P., Cardozo, D., Gallego, S., ... Gamarnik, A. v. (2022). Immunogenicity and reactogenicity of heterologous immunization against SARS CoV-2 using Sputnik V, ChAdOx1-S, BBIBP-CorV, Ad5-nCoV, and mRNA-1273. *Cell Reports Medicine*, 3(8). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100706>
- Peacock, T. P., Goldhill, D. H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O. C., Kugathasan, R., Penn, R., Brown, J. C., Sanchez-David, R. Y., Braga, L., Williamson, M. K., Hassard, J. A., Staller, E., Hanley, B., Osborn, M., Giacca, M., Davidson, A. D., Matthews, D. A., &

- Barclay, W. S. (2021). The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology* 2021 6:7, 6(7), 899–909. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00908-w>
- Perry, J., Osman, S., Wright, J., Richard-Greenblatt, M., Buchan, S. A., Sadarangani, M., & Bolotin, S. (2022). Does a humoral correlate of protection exist for SARS-CoV-2? A systematic review. *PLOS ONE*, 17(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0266852>
- Qi, H., Liu, B., Wang, X., & Zhang, L. (2022). The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology* 2022 23:7, 23(7), 1008–1020. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01248-5>
- Sanchez, L., Oviedo Rouco, S., Pifano, M., Ojeda, D. S., Pascuale, C. A., Mazzitelli, B., di Diego Garcia, F., Gonzalez Lopez Ledesma, M. M., Rodriguez, P. E., Miglietta, E. A., Ceballos, A., Rossi, A. H., Kreplak, N., Geffner, J., & Gamarnik, A. v. (2022). Antibody durability at 1 year after Sputnik V vaccination. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(5), 589–590. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00176-1)
- Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H. H., Michailidis, E., Lorenzi, J. C. C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Caskey, M., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., Rice, C. M., ... Bieniasz, P. D. (2020). Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *Journal of Experimental Medicine*, 217(11). <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Septisetyani, E. P., Prasetyaningrum, P. W., Anam, K., & Santoso, A. (2021). SARS-CoV-2 Antibody Neutralization Assay Platforms Based on Epitopes Sources: Live Virus, Pseudovirus, and Recombinant S Glycoprotein RBD. *Immune Network*, 21(6). <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e39>
- Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
- Thakur, N., Das, S., Kumar, S., Maurya, V. K., Dhama, K., Paweska, J. T., Abdel-Moneim, A. S., Jain, A., Tripathi, A. K., Puri, B., & Saxena, S. K. (2022). Tracing the origin of Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): A systematic review

- and narrative synthesis. *Journal of Medical Virology*, 94(12), 5766–5779. <https://doi.org/10.1002/JMV.28060>
- Thye, A. Y. K., Law, J. W. F., Pusparajah, P., Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2021). Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs): An Impending Global Crisis. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 1303, 9(10), 1303. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9101303>
- Tsai, W. Y., Ching, L. L., Hsieh, S. C., Melish, M. E., Nerurkar, V. R., & Wang, W. K. (2021). A real-time and high-throughput neutralization test based on SARS-CoV-2 pseudovirus containing monomeric infrared fluorescent protein as reporter. *Emerging Microbes and Infections*, 10(1), 894–904. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1925163>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:3, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 724. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, S., Li, L., Yan, F., Gao, Y., Yang, S., & Xia, X. (2021). COVID-19 Animal Models and Vaccines: Current Landscape and Future Prospects. *Vaccines* 2021, Vol. 9, Page 1082, 9(10), 1082. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9101082>
- Wherry, E. J., & Barouch, D. H. (2022). T cell immunity to COVID-19 vaccines. *Science (New York, N.Y.)*, 377(6608), 821–822. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADD2897>
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data.* (s/f). Recuperado el 4 de diciembre de 2022, a partir de <https://covid19.who.int/>
- Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., Rosenthal, P. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2020). SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nature Structural & Molecular Biology* 2020 27:8, 27(8), 763–767. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0468-7>
- Zhao, J., Cui, W., & Tian, B. P. (2020). The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580137>

Anexo

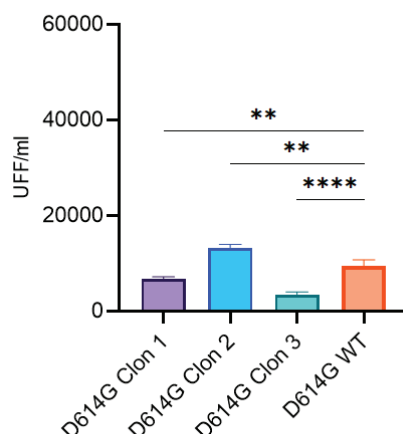


Figura S1. Comparación del título viral obtenido para los clones D614G-R683G seleccionados por secuencia con respecto a su virus parental. Se efectuaron comparaciones de los valores promedio de título en UFF/ml ($n=3$) de cada clon mutante con el virus parental (D614G WT) mediante ANOVA de una vía con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm DE. ** y **** indican diferencias significativas ($P<0.01$ y $P<0.0001$, respectivamente).

Tabla S1. Valores de TN50 obtenidos contra todas las variantes de SARS-CoV-2 estudiadas para las muestras de suero de 10 pacientes vacunados con SPUTNIK V tomadas a 2 y 24 semanas post-vacunación. Los ensayos de neutralización se llevaron a cabo utilizando un sistema de pseudovirus de SARS-CoV-2 basado en lentivirus.

TN50 2 semanas post-vacunación					
Paciente	D614G	D614G Mut	Gamma Mut	Delta	Ómicron
1	34,15	17,96	152,2	<16	21,45
2	19,16	20,97	183,3	<16	181,2
3	166	70,39	148	197,4	14,84
4	72,71	97,89	101,8	38,03	>512
5	94,34	195,6	446,8	76,63	85,21
6	36,34	73,36	300,8	118,7	17,83
7	300,3	251,7	435,3	183,3	72,7
8	150,4	220,3	>512	68,09	91,21
9	434,8	>512	>512	122,2	175,7
10	511,3	>512	>512	>512	58,36
TN50 24 semanas post-vacunación					
Paciente	D614G	D614G Mut	Gamma Mut	Delta	Ómicron

1	<16	<16	<16	<16	<16
2	<16	<16	35,88	<16	<16
3	<16	<16	22,75	54,22	<16
4	34,28	51,19	34,19	20,61	28,63
5	18,04	18,43	46,22	<16	26,23
6	48,88	29,41	44,76	<16	<16
7	49,63	115,1	156,9	27,75	17,78
8	42,85	54,47	231,5	15,41	19,58
9	115,8	185,1	>512	48,43	42,45
10	99,49	117,2	323,8	119,6	30,45

A stylized handwritten signature consisting of a vertical line with a horizontal bar across it, and a loop above the bar.

Malena Tejerina Cibello

A stylized handwritten signature with a large loop at the top and a horizontal line extending to the right.

Eliana F. Castro

Este documento corresponde a la última versión de la tesis e incluye sugerencias y correcciones de los jurados.