



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSGRADO
PROGRAMAS DE GRADOS ACADEMICOS**

“Implementación de un sistema pseudoviral que permita determinar anticuerpos neutralizantes contra los coronavirus estacionales”

Maria Alejandra Ceballos Román

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Director de Tesis

Mónica Loreto Acevedo Acevedo

Co-Director de Tesis

Fernando Andrés Valiente - Echeverría

2022

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| HCoV | Coronavirus humano |
| SARS-CoV-2 | Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 |
| COVID-19 | Coronavirus 2019 |
| RBD | Sitio de unión al receptor |
| NAbs | Anticuerpos neutralizantes |
| S | Glicoproteína spike |
| M | Glicoproteína de membrana |
| E | Glicoproteína envoltura |
| N | Nucleocápside |
| ACE2 | Enzima convertidora de angiotensina 2 |
| ANP | Aminopeptidasa N |
| RII | Respuesta inmunidad innata |
| RIA | Respuesta inmunidad adaptativa |
| NAbs | Anticuerpos neutralizantes |
| BSL2 | Laboratorio de bioseguridad 2 |
| BSL3 | Laboratorio de bioseguridad 3 |
| HEK-293T | Células de riñón embrionario humano 293T |
| Huh-7 | Células de carcinoma hepatocelular humano |
| HEK293T-ACE2 | Células de riñón embrionario humano 293T que expresan de forma estable el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 |
| RLUs | Unidades relativas de luminiscencia |
| DMEM | Medio Dulbecco's Modified Eagle |
| P24 | proteína viral p24 del VIH-1 |
| PEI | Polietilenimina |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| ID50 | Dosis inhibitoria del 50% |
| VIH-1 | Virus inmunodeficiencia humana 1 |
| Ig | Inmunoglobulinas |

RESUMEN

Cuatro coronavirus de dos géneros distintos son endémicos en los humanos: dos alfacoronavirus (NL63 y 229E) y dos betacoronavirus (OC43 y HKU1), causan frecuentemente enfermedades leves del tracto respiratorio superior y han estado circulando en los humanos como virus estacionales. Las infecciones son comunes en todos los grupos de edad, sin embargo, son más altas en niños y adolescentes. Los *Coronaviridae* son una familia de virus con genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 27 a 32 kilobases. La glicoproteína spike (S) de los coronavirus humanos (HCoV) está expuesta en la superficie, y desempeña un papel clave para la entrada viral a la célula hospedera, convirtiéndose en el principal sitio de antigenicidad. Por ende, es uno de los objetivos de los anticuerpos neutralizantes (NAbs) tras la infección viral. Los NAbs contra los HCoV estacionales son comunes en los humanos debido a las infecciones repetidas en el tiempo. Los estudios epidemiológicos han descrito que la seroconversión se produce a menudo en la infancia y la seroprevalencia puede alcanzar más del 90% para los cuatro HCoV estacionales en los adultos.

El objetivo de esta tesis fue implementar un sistema pseudoviral que permitiera determinar anticuerpos neutralizantes contra el coronavirus estacional 229E. Para ello, se generó un pseudotipo viral basado en VIH-1 que contiene en su membrana la glicoproteína spike del HCoV estacional 229E, el que, para analizar su infectividad, fue transducido en células HEK293T-ACE2 y Huh-7, observando una mejor transducción en las células Huh-7 debido al nivel de expresión de los receptores celulares de aminopeptidasa N, siendo este el principal receptor celular necesario para la entrada viral. Posteriormente, el pseudotipo HCoV 229E y SARS-CoV-2, como control, fueron utilizados para medir la cantidad de anticuerpos neutralizantes en sueros de pacientes adultos extraído previo a la pandemia del COVID-19. En las que se observó 8 de 19 muestras con la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el HCoV 229E y ninguna contra SARS-CoV-2. El título de anticuerpos neutralizantes fue calculado detectando el 50% de la dosis inhibitoria (ID50) con valores desde 43,47 hasta 756,8, con un promedio de 258,4. Paralelamente, se analizaron muestras pediátricas de donantes diagnosticados con coronavirus estacional, observando que el 13% (2/15) de ellas se pudo detectar la neutralización para el pseudotipo viral HCoV 229E.

En conclusión, se caracterizó y optimizó la producción del pseudotipo viral basados en VIH-1 para la glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E la que representó una herramienta útil para estudiar las respuestas neutralizantes en individuos infectados naturalmente y los resultados de este proyecto permitieron comparar los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados contra el pseudotipo viral HCoV 229E. Este modelo puede permitir comparar la neutralización de anticuerpos de no solo los coronavirus, sino, además, de virus de preocupación pública; ayudando a responder preguntas críticas de investigación y a entender la inmunidad frente a estos patógenos.

ABSTRACT

Four coronaviruses of two distinct genera are endemic in humans: two alphacoronaviruses (NL63 and 229E) and two betacoronaviruses (OC43 and HKU1) frequently cause mild upper respiratory tract disease and have been circulating in humans as seasonal viruses. Infections are common in all age groups, however, they are highest in children and adolescents. The Coronaviridae are a family of viruses with a single-stranded positive-sense RNA genome of approximately 27 to 32 kilobases. The spike (S) glycoprotein of human coronaviruses (HCoV) is exposed on the surface, and plays a key role for viral entry into the host cell, becoming the main site of antigenicity. It is therefore one of the targets of neutralizing antibodies (NAbs) following viral infection. NAbs against seasonal HCoV are common in humans due to repeated infections over time. Epidemiological studies have described that seroconversion often occurs in childhood and seroprevalence can reach more than 90% for the four seasonal HCoVs in adults.

The aim of this thesis was to implement a pseudoviral system to determine neutralizing antibodies against seasonal coronavirus 229E. For this purpose, a viral pseudotype based on HIV-1 containing in its membrane the spike glycoprotein of seasonal HCoV 229E was generated, which, to analyze its infectivity, was transduced in HEK293T-ACE2 and Huh-7 cells, observing a better transduction in Huh-7 cells due to the level of expression of the cellular receptors of aminopeptidase N, being this the main cellular receptor necessary for viral entry. Subsequently, the pseudotype HCoV 229E and SARS-CoV-2, as a control, were used to measure the amount of neutralizing antibodies in sera of adult patients extracted prior

to the COVID-19 pandemic. In which 8 of 19 samples were observed with the presence of neutralizing antibodies against HCoV 229E and none against SARS-CoV-2. The neutralizing antibody titer was calculated by detecting 50% of the inhibitory dose (ID50) with values ranging from 43.47 to 756.8, with an average of 258.4. In parallel, pediatric samples from donors diagnosed with seasonal coronavirus were analyzed, observing that 13% (2/15) of them could detect neutralization for the HCoV 229E viral pseudotype.

In conclusion, we characterized and optimized the production of the HIV-1 based viral pseudotype for the spike glycoprotein of seasonal coronavirus 229E which represented a useful tool to study the neutralizing responses in naturally infected individuals and the results of this project allowed to compare the titers of neutralizing antibodies detected against the HCoV 229E viral pseudotype. This model may allow the comparison of neutralizing antibodies not only to coronaviruses, but also to viruses of public concern, helping to answer critical research questions and to understand immunity to these pathogens.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1. Generalidades de los Coronavirus..... | 8 |
| 1.2.Ciclo replicativo de los HCoV..... | 9 |
| - Figura 1. Ciclo replicativo del coronavirus y neutralización..... | 10 |
| 1.3.Inmunidad e Importancia de los anticuerpos neutralizantes..... | 11 |
| 1.4.Inmunidad previa a los coronavirus estacionales..... | 12 |
| 1.5.Pseudotipos virales | 13 |
| 2. Hipótesis | 15 |
| 3. Objetivo general..... | 15 |
| 4. Objetivos específicos..... | 15 |
| 5. Materiales y métodos..... | 16 |
| 5.1.Líneas celulares y plásmidos..... | 16 |
| 5.2.Producción del pseudotipo viral HCoV 229E..... | 16 |
| 5.3.Transducción de los pseudotipos virales | 17 |
| 5.4.Muestras de suero humano | 17 |
| 5.5.Ensayo de neutralización con el pseudotipo viral HCoV 229E basado en VIH- | |
| 1..... | 17 |
| - Figura 2. Esquema de carga del ensayo de neutralización en placas de 96 | |
| pocillos..... | 18 |
| 5.6.Análisis estadístico | 18 |
| 6. RESULTADOS | 20 |
| 6.1.Desarrollo y caracterización del pseudotipo viral basados en VIH-1 para la | |
| glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E..... | 20 |
| - Figura 3. Esquema que representa la producción del pseudotipo viral HCoV | |
| 229E y ensayo de neutralización..... | 20 |
| - Tabla 1. Unidades relativas de luminiscencia (RLUs) obtenidas de la post- | |
| transducción de los pseudotipos virales en las células HEK293T-ACE2 y | |
| Huh-7..... | 22 |
| - Figura 4. Caracterización del pseudotipo viral del HCoV 229E basado en el | |
| VIH-1..... | 22 |

| | |
|--|----|
| - Tabla 2. Unidades relativas de luminiscencia (RLUs) obtenidas de la post-transducción con lipofectamina del pseudotipo viral HCoV 229E en células Huh-7..... | 23 |
| - Figura 5. Rango dinámico del sistema post-transducción del pseudotipo viral HCoV 229E..... | 24 |
| 6.2. Neutralización del pseudotipo viral del coronavirus estacional HCoV 229E en sueros humanos prepandémicos..... | 24 |
| - Figura 6. Neutralización del pseudotipo viral del coronavirus estacional HCoV 229E en plasmas humanos prepandémicos..... | 25 |
| - Tabla 3. Actividad neutralizante contra el pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2 en muestras prepandémicas..... | 26 |
| - Tabla 4. Actividad neutralizante contra el pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2 en muestras pandémicas..... | 27 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 28 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 29 |
| 9. Referencias..... | 30 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los Coronavirus

Los coronavirus (CoV) pertenecen al orden *Nidovirales*, a la familia *Coronaviridae* y a la subfamilia *Orthocoronavirinae* [1]. Son clasificados en cuatro géneros: alfa, beta, gamma y deltacoronavirus [2]. Sin embargo, los que han sido de interés clínico por ser patógenos respiratorios humanos son: dos alfaCoV (HCoV-229E; HCoV-NL63), y cinco betaCoV (HCoV-OC43; HCoV-HKU1; coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV); coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), incluido el nuevo coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2)) [2]. El SARS-CoV, el MERS-CoV y el SARS-CoV-2, son altamente patógenos, y han causado brotes zoonóticos en los humanos en las últimas dos décadas [3]. El SARS-CoV, presentó un total de 8096 casos confirmados y 774 muertes [4], mientras que, el MERS-CoV ha infectado a 2585 personas con 89 muertes [5]. Sin embargo, la pandemia del coronavirus 2019 (COVID-19) ha dejado a 521 millones de personas infectadas con 6.26 millones de muertes al 15 de mayo del 2022, se extendió por todo el mundo, y aun, sigue aumentando el número de nuevos casos y de muertes [6].

Los coronavirus humanos (HCoV): NL63, 229E, OC43 y HKU-1, suelen causar enfermedades del tracto respiratorio superior leves o moderadas, contribuyendo el 15 al 30% de los casos de resfriado común [7]. Se denominan estacionales o coronavirus humanos endémicos, porque circulan en determinada época del año; el HCoV-229E y el HCoV-OC43 tiende a ser epidémico durante el otoño o invierno [8]. Por otro lado, el HCoV-NL63 y el HCoV-HKU1 muestra un pico durante la primavera [9]. La reinfección oscila entre los 6 y 12 meses, lo que indica una inmunidad protectora de corta duración [10]. En los adultos sufren una media de dos a tres resfriados comunes al año, y los niños pueden padecer entre seis y ocho, de los cuales uno o dos están causados por algún HCoV estacional [11]. La transmisión, es principalmente por la inhalación de partículas virales que se encuentran en gotas y en aerosoles expulsados por un portador. El periodo medio de incubación es de aproximadamente 5 días [10].

1.2. Ciclo replicativo de los HCoV

Las partículas virales del HCoVs, están envueltas por una bicapa lipídica de origen celular donde se encuentra las glicoproteínas estructurales; spike (S), la de la membrana (M), la envoltura (E), además alberga la nucleocápside (N) cuya función es proteger el genoma viral [10]. El genoma de los HCoV es una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva que presenta un tamaño de aproximadamente 27 a 32 kilobases, contiene cinco marcos de lectura abierta (ORF), entre ellos podemos encontrar el ORF1a, ORF1ab, las cuatro proteínas estructurales (S, M, E y N), además de una serie de genes accesorios [12].

El ciclo replicativo comienza con la entrada de los HCoV a la célula hospedera mediante la glicoproteína S de transmembrana [13, 14]. Esta proteína comprende dos subunidades funcionales; la subunidad S1, es responsable de la unión al receptor de la célula y la subunidad S2 permite la fusión entre el virus y la membrana celular después de la unión al receptor [15]. El SARS-CoV-2 y el HCoV-NL63 se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2); el HCoV-229E se une a la aminopeptidasa N (APN) y al receptor CD13; los HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 emplean receptores basados en glicanos que llevan ácido siálico 9-O-acetilado (**Figura 1a**) [16]. El HCoV-NL63 además utiliza la proteína M para facilitar la fase inicial de adhesión, donde se une a la célula hospedera utilizando proteoglicanos de heparán sulfato como factor de unión [17]. Por otra parte, se requieren factores adicionales del hospedero para la entrada viral (la neuropilina-1, los proteoglicanos de sulfato de heparina, las lectinas de tipo C y/o la furina); El HCoV-229E puede utilizar dos vías distintas: una mediada por proteasas de superficie como la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), y otra por la catepsina endosomal L [18]. Asimismo, el HCoV-OC43 emplea las caveolina-1, mientras que el SARS-CoV-2 y el HCoV-NL63 pueden provocar el reclutamiento de clatrina [7]. Posteriormente, se produce un cambio conformacional en la proteína S de los HCoV, lo que permite la fusión con la membrana de la célula hospedera [19] y luego la liberación del ARN genómico al citoplasma, el que es traducido para dar origen a las poliproteínas virales (pp1a y pp1ab) [13, 19]. Estas poliproteínas son procesadas co y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares, generando 16 proteínas no estructurales (nsps), las cuales poseen funciones específicas (actividades enzimáticas de tipo proteasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), helicasa, exorribonucleasa, endorribonucleasa y metiltransferasa). Por otro lado, se forma una vesícula de doble

membrana (DMV) en el retículo endoplasmático (RE) (**Figura 1a**), las que crean un microambiente protector para la replicación del ARN genómico viral y la transcripción de ARNm subgenómicos [20]. Este último, se traduce para dar origen a las proteínas estructurales (N, E, M y S) quienes interactúan con el genoma viral dando lugar al ensamble de nuevas partículas virales. Estas partículas virales transitarán desde el RE hasta el aparato de Golgi siguiendo la vía exocítica para finalmente madurar y ser liberadas de la célula hospedera (**Figura 1a**) [13, 19, 20].

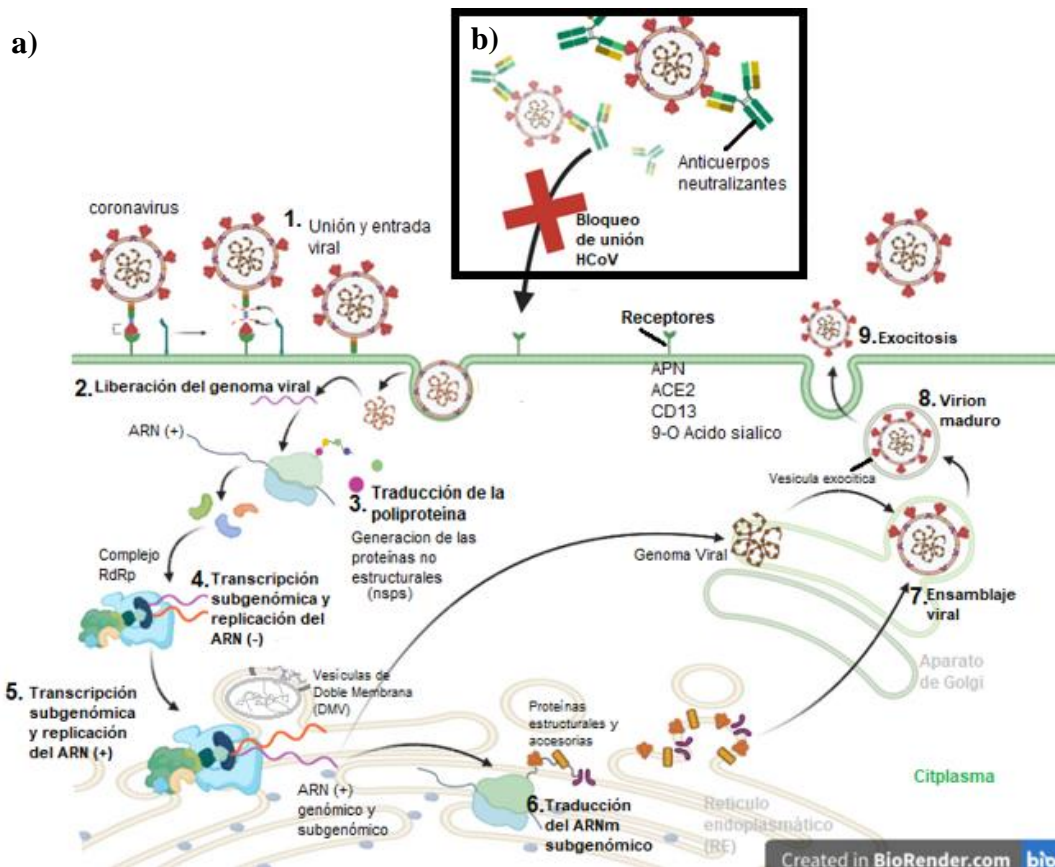


Figura 1. Ciclo replicativo del coronavirus y neutralización. (a) ciclo replicativo del coronavirus. El HCoV reconoce el receptor específico de la célula, uniéndose a este por medio de la proteína S. A continuación, entra por fusión de membranas o endocitosis. Tras la entrada, el ARN viral se libera y se traduce en las poliproteínas virales pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas son procesadas por proteasas codificadas por el virus para facilitar la replicación y producir ARN de cadena negativa de longitud completa y ARN subgenómico. El ARN subgenómico se traduce en proteínas estructurales y accesorias, incluidas las

proteínas S, M, E y N. Estas últimas se insertan en las membranas del RE y del Golgi, para luego interactuar con el genoma viral, ensamblándose y seguir una vía exocítica, para luego ser liberados. **(b) Neutralización del coronavirus por anticuerpos.** Los NAbs limitan la entrada viral, la traducción, la replicación y el ensamblaje viral.

1.3. Inmunidad e importancia de los anticuerpos neutralizantes

La primera línea de defensa contra una infección viral es la barrera física, como la piel. Cuando sobrepasa el virus esta barrera, se activa la respuesta inmune innata (RII), que está compuesta por elementos celulares (células dendríticas y células *natural killer*) y componentes séricos (citoquinas y proteínas del complemento). Su función es detectar el virus a través de receptores de reconocimiento de patrones y activar vías inflamatorias que promueven la eliminación de este. Además, permite identificar y eliminar las células infectadas, coordinando y acelerando el desarrollo de la inmunidad adaptativa (RIA) [20], [21]. El RIA está compuesta por linfocitos (B y T) y componentes séricos (citoquinas y anticuerpos), que van a reconocer antígenos pertenecientes a estructuras específicas del HCoV, generando una memoria inmunológica [22]. Por lo tanto, los anticuerpos son producidos y secretados por los linfocitos B, que requieren ser activados para proliferar rápidamente y diferenciarse en células plasmáticas, las que secretan anticuerpos específicos contra los antígenos virales [23]. Tras un primer encuentro con el antígeno, ya sea por vacunación o por infección natural, la memoria inmunológica permite una producción más rápida de anticuerpos neutralizantes tras la siguiente exposición viral. Hay tres clases de anticuerpos conocidos como inmunoglobulinas (Ig): A, M y G. Los estudios demuestran que cuando se encuentran las tres clases de inmunoglobulinas, es decir, IgG, IgM e IgA, se alcanza la máxima actividad de neutralización contra el SARS-CoV-2, evidenciándose la capacidad de los anticuerpos para trabajar juntos de forma sinérgica [24]. Tras la infección por SARS-CoV-2, los anticuerpos de tipo IgM anti-SARS-CoV-2 son producidos inicialmente y permanecen de 20 días a un mes antes de disminuir gradualmente. Asimismo, los anticuerpos de tipo IgG alcanzan su punto máximo alrededor del día 25 [25], y se mantienen altos durante semanas [26 – 28]. Los títulos sostenidos de anticuerpos IgG son producidos por células plasmáticas de larga vida en la médula ósea [29]. La función de los anticuerpos neutralizantes (NAbs) es unirse al antígeno viral e interferir con la unión del virus al receptor celular, induciendo así la agregación de las partículas virales y provocando una

reducción de la entrada del virus (**Figura 1b**). Además, atenúan la internalización a través de la endocitosis, lo que conduce a la degradación lisosomal y además pueden inhibir eventos metabólicos como la síntesis de las proteínas virales, bloqueando la replicación de los virus incluso después de la internalización [30, 31]. En SARS-CoV-2, los NABs van dirigidos contra la proteína S, específicamente a la subunidad S1 y a su sitio de unión al receptor (RBD) [32, 33], estos anticuerpos representan el 90% de la actividad neutralizante en sueros de pacientes convalecientes por SARS-CoV-2 [34].

La actual pandemia por el SARS-CoV-2 ha llevado a un rápido desarrollo y producción de vacunas. Recientemente un informe en la población chilena vacunada, notificaban una tasa de seroconversión del 95,7% para los anticuerpos neutralizantes en los grupos de 18 a 59 años de edad, después de 28 y 42 días post-inmunización [35], lo que reducía la hospitalización (87,5%), el ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (90,3%) y la muerte relacionada con el COVID-19 (86,3%) [36]. Esto indica un papel protector de los anticuerpos neutralizantes en las primeras fases de la infección. Es por ello, que existe un gran interés en detectarse anticuerpos neutralizantes, debido a que confieren protección frente a una infección.

1.4. Inmunidad previa a los coronavirus estacionales

Los estudios seroepidemiológicos transversales y longitudinales han descrito que grandes proporciones de niños y adultos sanos tienen anticuerpos séricos detectables contra las cuatro cepas de los HCoV estacionales. La seroconversión se produce en la infancia y la seroprevalencia aumenta con la edad [37], debido a que las tasas de infección de los HCoV estacionales son más altas en niños y adolescentes [38].

En un estudio de 74.519 pacientes realizado en Escocia, la prevalencia de los HCoV estacionales fue de un 4,0%, observándose un mayor número de casos en niños menores de 5 años de edad y en personas de edad avanzada. Siendo el HCoV-OC43 el más prevalente, mientras que el HCoV-HKU1 tuvo la prevalencia más baja (un 0,3%) [39]. Otro estudio realizado en México, se analizaron 1.404 muestras de suero de niños con neumonía adquirida en la comunidad, encontrándose un 2,2% de muestras positivas para algún HCoV estacional [40]. Por otro lado, un estudio en Hong Kong demostró que la prevalencia total de los HCoV estacionales en pacientes con insuficiencia respiratoria aguda era del 2,1%, encontrándose el

HCoV-NL63 con una tasa de positividad del 1,3%, que fue la más alta [41]. En Chile no existen datos acerca de la prevalencia de los HCoV estacionales.

Se ha descrito que infecciones por los HCoV estacionales en individuos menores de 10 años de edad pueden actuar como un factor de protección de las infecciones sintomáticas graves por el SARS-CoV-2 al limitar la infección viral, ya que se han encontrado anticuerpos de reacción cruzada entre los HCoV estacionales y el SARS-CoV-2 en este grupo etario [33], [42], [43]. En particular, los estudios demuestran que hay un elevado nivel de anticuerpos contra la subunidad S2 del SARS-CoV-2, que es aquella que presenta un mayor grado de homología mayor entre los diferentes HCoV en comparación a la subunidad S1, por lo que es el sitio más probable de reconocimiento de anticuerpos de reacción cruzada [42, 44].

1.5. Pseudotipos virales

Para estudiar la infección viral o la búsqueda de anticuerpos neutralizantes por coronavirus humanos se requiere hacer ensayos celulares *in vitro* con la partícula viral completa en los que se requiere un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) [45]. Por otra parte, se han descrito dificultades en el cultivo *in vitro* de los HCoV de tipo salvaje, y los retos intrínsecos de la manipulación segura de los HCoV de alta patogenicidad [46]. Aunque, si bien es cierto que los ensayos de ELISA pueden utilizarse para detectar la presencia de anticuerpos en respuesta a la infección viral, el sistema en sí detecta específicamente la unión de anticuerpos a la proteína viral, pero no mide si esta interacción resulta en neutralización [47]. Es por ello, que el uso de pseudotipos virales de replicación restringida con proteínas de cubierta viral, representa un método seguro y eficaz, que pueden ser utilizados en condiciones de bioseguridad 2 (BSL2) [48]. Además, los pseudotipos virales pueden utilizarse para cuantificar y comparar serológicamente las respuestas neutralizantes, dilucidar la dinámica de los anticuerpos contra los coronavirus estacionales y los efectos de la reactividad cruzada de los anticuerpos en el resultado clínico después de la infección natural [49]. Varias investigaciones han incorporado el uso de los pseudotipos para identificar factores del hospedero necesarios para: (1) la entrada de los coronavirus, (2) ensayos de neutralización (anticuerpos dirigidos contra los epítomos de la proteína S de los HCoV) y/o (3) detectar una inhibición antiviral [50]. Gracias al modelo pseudoviral se detectó un anticuerpo monoclonal

humano que neutralizaba tanto el SARS-CoV-1 como el SARS-CoV-2 [51]. Asimismo, el uso de pseudovirus evitan las mutaciones *in vitro* adquiridas en el cultivo celular cuando se usa la partícula viral completa y reduce el riesgo de seleccionar inadvertidamente variantes de la proteína S de los HCoV [52, 53].

Se necesita diferentes pseudotipos virales para cada HCoV, que sea producido en condiciones similares a altos títulos que permitan comparar las respuestas inmunitarias neutralizantes. Es por ello, que esta tesis planteo producir un sistema capaz de medir NAbs, a través de un pseudovirus para realizar una búsqueda de anticuerpos neutralizantes contra el coronavirus estacional 229E en sueros prepandémicos y muestras pediátricas de pacientes diagnosticados con coronavirus estacional.

2. HIPÓTESIS

La generación del pseudotipo viral portador de la proteína spike 229E permitirá determinar anticuerpos neutralizantes contra este coronavirus estacional en sueros pre pandémicos.

3. OBJETIVO GENERAL

Implementar un sistema pseudoviral que permita determinar anticuerpos neutralizantes contra el coronavirus estacional 229E.

4. OBJETIVO ESPECIFICO

1. Caracterizar la producción del pseudotipo viral basado en VIH-1 para la glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E.
2. Validar la neutralización del pseudotipo viral del coronavirus estacional HCoV 229E en sueros humanos pre pandémicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Líneas celulares y plásmidos

Se utilizaron las células de riñón embrionario humano 293T (HEK-293T), células de riñón embrionario humano que expresan de forma estable el receptor ACE2 (HEK293T-ACE2) y células de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7). Todas las células se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone), antibióticos: penicilina, estreptomina y anfotericina B (BioReagent), l-glutamina (Corning) y puromicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para las HEK293T-ACE2, todas las células fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

Los plásmidos utilizados en este estudio fueron pNL4.3- ΔEnv -Firefly, pCMV-VSV-G, pCMV14-3X-Flag-SARS-CoV-2 S Δ 19CT y pHDM-229E-Spike- Δ 19-2008. Este último fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/HindIII, para verificar la presencia del fragmento genético que codifica la proteína S del HCoV 229E.

5.2. Producción del pseudotipo viral HCoV 229E

Las partículas virales pseudotipadas fueron generadas por cotransfección del vector pNL4.3- ΔEnv -Firefly y el plásmido HDM-229E-Spike- Δ 19-2008 (con una proporción molar, 1:1) utilizando polietilenimina (PEI) lineal preparada como se ha descrito [54] y lipofectaminaTM 3000 siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de su adición al cultivo, se realizó un breve período de incubación (15 minutos) para permitir a los poliplejos alcanzar su tamaño óptimo para una máxima eficiencia de transfección. Las células HEK-293T se transfectaron en placas de 6 pocillos con una confluencia >70%, y 16 horas después de la transfección, se lavaron las células y se añadió medio fresco DMEM [54]. El sobrenadante conteniendo el pseudotipo viral se colectó a las 24 horas post-transfección, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los stocks virales se diluyeron en 50% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich), se guardaron en alícuotas y se almacenaron a -80°C para su uso posterior. El stock viral se cuantificó utilizando el kit del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) HIV-1 Gag p24 Quantikine (R&D Systems) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.3. Transducción de los pseudotipos virales

Se realizó la transducción por dilución en serie de células HEK293T-ACE2 y Huh-7 en microplacas de 96 pocillos (SPL Life Sciences). Para ello, se sembraron 15.000 células por pocillo en 100 µl de medio DMEM, y se agregaron por triplicado ocho diluciones seriadas 1:2 del pseudotipo viral en 100 µl. Cuarenta y ocho horas después de la transducción, se retiró el medio DMEM y se agregó 25 µl de tampón de lisis pasiva 1x (Promega) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 10 minutos en agitación a 400 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente utilizando el lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek). Se utilizó el Luminómetro de Microplacas GloMax 96 (Promega) que inyectó 25 µL del reactivo de luciferasa (Promega) a temperatura ambiente y la intensidad de luz fue medida en unidades relativas de luminiscencia (RLU). Todos los experimentos se realizaron en estas mismas condiciones.

5.4. Muestras de suero humano

Para este estudio se utilizó un total de 19 muestras de sueros pre pandémicos y 15 muestras de sueros de donantes pediátricos diagnosticados para coronavirus estacionales. La manipulación de las muestras humanas se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular y Celular, fue aprobada bajo el protocolo n°.096-2020 por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las muestras utilizadas en este estudio se anonimizaron.

5.5. Ensayo de neutralización con el pseudotipo viral HCoV 229E basado en VIH-1

Las muestras de suero se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas de 1:3 del suero inactivado en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal, con una dilución inicial de 1:40 y final de 1:87480, se incubaron con 3,2 ng de p24 del pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2, lo que corresponde al menos a 150.000 RLU de cada uno, en microplacas de 96 pocillos en duplicado. Tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron 15.000 células Huh-7 o HEK293T-ACE2 a cada pocillo, utilizando como control negativo células Huh-7 o HEK293T-ACE2 sin el pseudotipo viral (0% de infectividad) y como control positivo, se incubó 50 µL del pseudotipo viral HCoV 229E o SARS-CoV-2 sin suero (100% de infectividad) con 50 µl del

medio DMEM (**Figura 2**). La actividad de la luciferasa de luciérnaga fue medida 48 horas después y se calculó el porcentaje de neutralización para cada dilución y se estimaron los títulos de neutralización, definidos como dosis inhibitoria del 50% (ID50). Los ensayos de neutralización se validaron teniendo en cuenta los siguientes criterios de aprobación/desaprobación: (1) la RLU media de los pocillos del control positivo del pseudovirus es ≥ 10 veces la RLU media de los pocillos de control negativo. (2) el coeficiente de variación entre las RLUs de los pocillos de control positivo y negativo del pseudovirus fue $\leq 30\%$. (3) la diferencia porcentual para los pocillos por duplicado es $\leq 30\%$ para las diluciones de la muestra que producen al menos un 40% de neutralización y (4) la curva de neutralización del control positivo cruza el corte del 50% de neutralización [54].

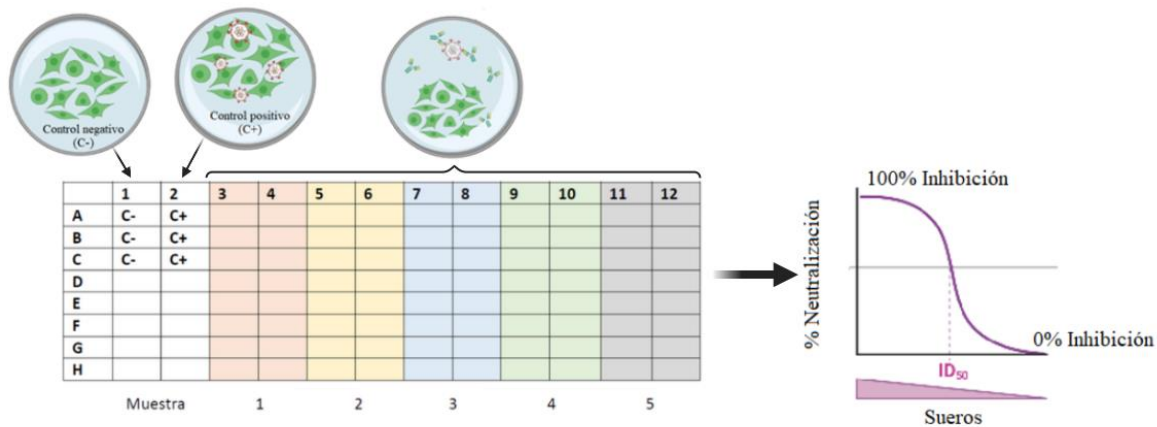


Figura 2. Esquema de carga del ensayo de neutralización en placas de 96 pocillos. Diluciones seriadas de la muestra de suero se incubaron con 3.2 ng de p24 de los pseudotipos virales (HCoV 229E y SARS-CoV-2) a 37°C por una hora, luego 15.000 células Huh-7 y HEK293T-ACE2 fueron agregadas a cada pocillo; la neutralización se evaluó como una reducción de la entrada viral a la célula hospedera mediante la producción de luciferasa después de 48 horas y se realizó el cálculo de ID50. Se realizó en formato de placa de 96 pocillos, cargando los controles negativos (C-); controles positivos (C+); Muestras de suero.

5.6. Análisis estadístico

Las curvas sigmoideas y la estimación del ID50 se obtuvieron usando un ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros medido como el porcentaje de neutralización determinado por la diferencia en RLUs entre las muestras y los controles del virus

pseudotipado. Para obtener los valores de ID50, la prueba de falta de ajuste deberá tener un valor de $P > 0,1$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 8.

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo y caracterización del pseudotipo viral basados en VIH-1 para la glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E.

Se optimizó la producción del pseudotipo viral del coronavirus estacional basado en VIH-1 y que contiene ensamblado en su membrana la glicoproteína spike del HCoV 229E, mediante un protocolo de transfección y transducción de líneas celulares que poseen los receptores específicos para la entrada del pseudotipo viral (**Figura 3**).

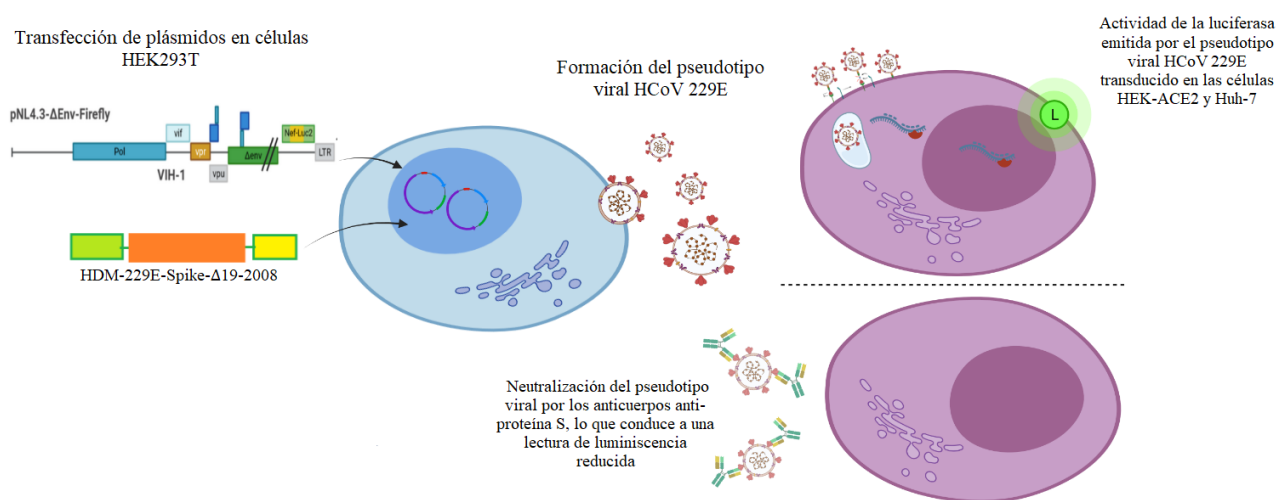


Figura 3. Esquema que representa la producción del pseudotipo viral HCoV 229E y el ensayo de neutralización. Las células HEK 293T fueron transfectadas con el plásmido que codifica el gen de la proteína spike de coronavirus HCoV 229E (carece de los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal) y el plásmido lentiviral pNL4.3-ΔEnv-Firefly que presenta una delección en el gen de la envoltura y una sustitución en la secuencia que codifica el gen Nef, por un gen reportero Firefly. Después de la entrada del pseudotipo viral en las células Huh-7, da lugar a una luminiscencia medible de las células transducidas con éxito. La neutralización del pseudovirus por los anticuerpos contra la proteína S del HCoV 229E tras la incubación con sueros humanos pre pandémicos puede medirse como una reducción de la producción de luminiscencia tras la transducción en las células Huh-7.

En primer lugar, para la formación del pseudotipo viral, se purificó el plásmido HDM-229E-Spike-Δ19-2008 que contiene el gen de la proteína spike del HCoV 229E y se verificó la presencia del fragmento que codifica el gen con un ensayo de restricción utilizando los sitios

5' EcoRI y 3' HindIII, observándose un fragmento de aproximadamente 3.700 pares de bases (pb), correspondientes a la liberación del inserto que codifica el gen de la proteína S del HCoV 229E (**Figura 4a**). Posteriormente, células de riñón embrionario humano 293T (HEK-293T) fueron transfectadas con 1 µg del vector de expresión lentiviral pNL4.3-ΔEnv-Firefly, junto con 1 µg del plásmido 2862-HDM-229E-Spike-Δ19-2008; este último presenta una deleción de los últimos 19 aminoácidos del C-terminal de la proteína S (SΔ19), modificación que ha sido previamente descrita para mejorar la incorporación de la proteína S en el pseudotipo viral [54], evitando que esta última sea retenida en el retículo endoplasmático y garantizar que se generen títulos elevados del pseudotipo viral [50]. Además, como controles previamente verificados y estandarizados para formar los pseudotipos virales en la transfección, se usó un plásmido que contiene el gen de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y otro vector que contiene la proteína spike (SΔ19) del SARS-CoV-2 [54]. A fin de buscar el método más eficiente de transfección para producir mayor cantidad de pseudotipo viral, se utilizó polietilenimina (PEI) y lipofectamina por separado. El reactivo PEI lineal, es un polímero obtenido a partir de monómeros de etilenimina y permite la formación de complejos DNA/PEI. Este complejo tiene afinidad por la membrana celular, interactuando con proteoglicanos de heparán sulfato, permitiendo que ingrese el material genético a la célula hospedera [55]. No obstante, la lipofectamina son nanopartículas lipídicas, cuya función es formar complejos lipofectamina/material genético (plásmidos), y a través del transporte activo, mediado por vesículas, ingresa a la célula [56, 57]. Después de la transfección, se recolectó el sobrenadante a las 24 horas de incubación.

Posteriormente, el sobrenadante fue usado para transducir células HEK-293T que expresan de forma estable el receptor ACE2 (HEK293T-ACE2) y además, se utilizó la línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7), ya que contiene receptores de aminopeptidasa N necesarios para la entrada del HCoV 229E [49]. A las 48 horas post-transducción se midió la actividad de la luciferasa como un índice del nivel de entrada o infectividad (**Tabla 1**), observándose que todas las líneas celulares analizadas fueron susceptibles a la infección provocada por el VSV-G (**Figura 4b**). Mientras que el pseudotipo de SARS-CoV-2 presentaron mayores RLUs en células HEK293T-ACE2 que en las células Huh-7, tal como ha sido documentado, puesto que el ACE2 fue identificado como el principal receptor celular necesario para la entrada del SARS-CoV-2 a la célula hospedera [58]. Asimismo, el HCoV-

229E entró preferentemente en las células Huh-7, ya que es mayor la expresión de receptores celulares de aminopeptidasa N en estas células (**Figura 4b**).

Tabla 1. Unidades relativas de luminiscencia (RLUs) obtenidas de la post-transducción de los pseudotipos virales en las células HEK293T-ACE2 y Huh-7.

| Polietilenimina (PEI) | | | | | | Lipofectamina | | | | | |
|-----------------------|------------|-----------|---------|------------|-----------|---------------|------------|-----------|----------|------------|-----------|
| HEK-ACE2 | | | Huh-7 | | | HEK-ACE2 | | | Huh-7 | | |
| VSV-G | SARS-CoV-2 | HCoV 229E | VSV-G | SARS-CoV-2 | HCoV 229E | VSV-G | SARS-CoV-2 | HCoV 229E | VSV-G | SARS-CoV-2 | HCoV 229E |
| 15201 | 16398 | 14 | 9077 | 61 | 20369 | 759671 | 120972 | 30 | 385454 | 2676 | 72350 |
| 34729 | 26255 | 15 | 24144 | 274 | 83686 | 1519012 | 226138 | 1866 | 954694 | 6934 | 169287 |
| 48202 | 48024 | 65 | 68885 | 702 | 202709 | 3443750 | 381105 | 2113 | 1863251 | 16834 | 383197 |
| 129106 | 91529 | 334 | 118349 | 1547 | 354187 | 6198263 | 727928 | 7002 | 3386585 | 45496 | 677110 |
| 277980 | 196292 | 1175 | 242891 | 2209 | 387712 | 11256427 | 1325574 | 7288 | 6392143 | 98939 | 1386775 |
| 465899 | 416687 | 2198 | 408034 | 2898 | 628195 | 19154174 | 2262764 | 20898 | 13163709 | 179736 | 2711577 |
| 722554 | 636619 | 3068 | 843738 | 6839 | 1148208 | 26007334 | 3707397 | 21437 | 22504332 | 210108 | 4349248 |
| 1240925 | 1177322 | 3831 | 1395953 | 9678 | 1335676 | 33177081 | 5720405 | 24435 | 31081572 | 354879 | 5289767 |

* La transducción se realizó utilizando los sobrenadantes obtenidos de la transfección.

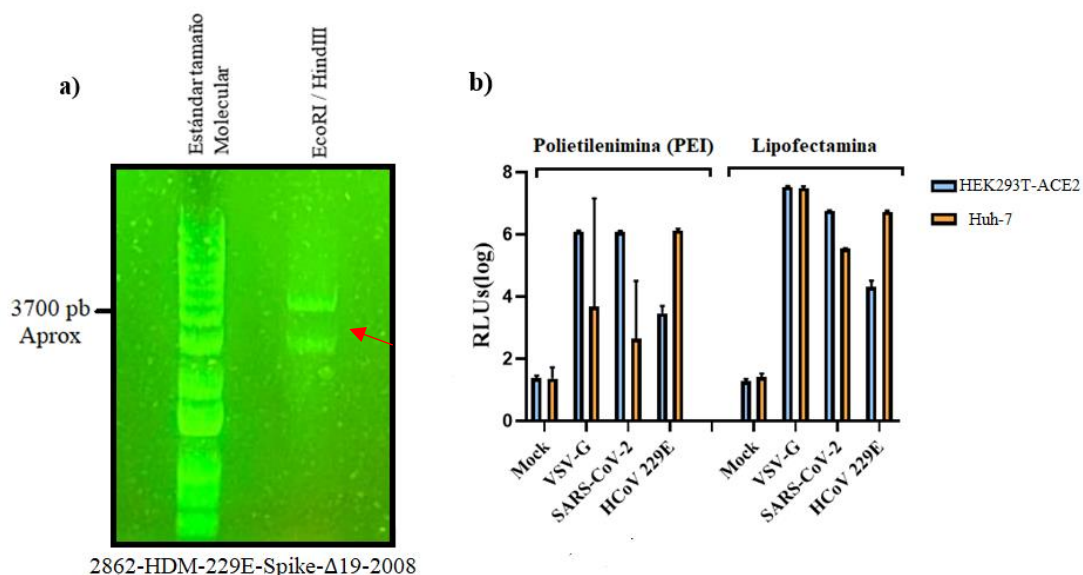


Figura 4. Caracterización del pseudotipo viral del HCoV 229E basado en el VIH-1. (a) Digestión enzimática con EcoRI/HindIII del plásmido 2862-HDM-229E-Spike-Δ19-2008. La fecha indica el fragmento de 3.700 pb liberado. **(b)** Comparación de la transducción con el reactivo de transfección polietilenimina y lipofectamina en células HEK293T-ACE2

y Huh-7. Se midió la actividad de la luciferasa a las 48 horas post-transducción, los resultados se expresan en logaritmo de las unidades relativas de luminiscencia (RLUs).

La transducción en las células HEK293T-ACE2 y Huh-7 con el sobrenadante recolectado por la transfección con lipofectamina, indicaba que los pseudovirus VSV-G, SARS-CoV-2 y HCoV-229E ingresaban a las células de forma más eficiente que al utilizarse el sobrenadante recolectado post-transfección con PEI, observándose sistemáticamente que la actividad de entrada viral era unas 100 veces mayor (**Figura 4b**). Utilizando las condiciones estandarizadas se procedió a producir el pseudotipo viral HCoV 229E a mayor escala para utilizarlos en los ensayos de neutralización. Para caracterizar el pseudotipo viral HCoV 229E cuantificamos los niveles de p24 presentes mediante ELISA (63.5 ng/mL) y utilizamos cantidades crecientes para determinar el rango dinámico, utilizando pseudotipo viral desprovisto de spike como control (**Figura 5, tabla 2**). Determinamos que el uso de 3,2 ng de p24 se asocia a valores de RLUs de 6×10^6 con suficientes ordenes de magnitud por sobre el control negativo. El rango lineal no se vio afectado al disminuir la cantidad de p24 utilizada.

Tabla 2. Unidades relativas de luminiscencia (RLUs) obtenidas de la post-transducción con lipofectamina del pseudotipo viral HCoV 229E en células Huh-7.

| RLUs post-transducción | ng de p24 |
|------------------------|-----------|
| 86.507 | 0,025 |
| 233.636 | 0,05 |
| 503.947 | 0,1 |
| 901.106 | 0,2 |
| 1.929.380 | 0,4 |
| 3.593.275 | 0,8 |
| 5.497.565 | 1,6 |
| 6.898.200 | 3,2 |

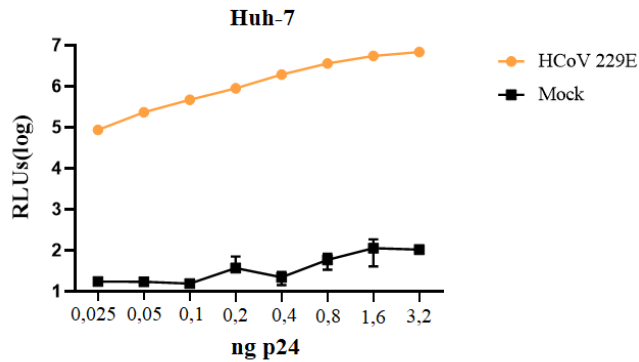


Figura 5. Rango dinámico del sistema post-transducción del pseudotipo viral HCoV 229E. Unidades relativas de luminiscencia emitida por la luciferasa del pseudotipo viral HCoV 229E transducido en las células Huh-7, producido a mayor escala para usarlo en los ensayos de neutralización.

6.2. Neutralización del pseudotipo viral del coronavirus estacional HCoV 229E por sueros humanos preandémicos.

Para validar el uso de nuestro sistema en ensayos de screening y cuantificación de anticuerpos neutralizantes contra el HCoV 229E, se realizó en un formato de placa de 96 pocillos utilizando un set de 34 muestras clínicas separadas en donantes sanos preandémicos (n=19) y donantes pediátricos diagnosticados con coronavirus estacionales (n=15). Realizamos un screening utilizando diluciones de suero de 1/40, definiendo que los sueros con actividad neutralizante fueron aquellos que inhiban la infectividad en un 50% (**Figura 6**). La especificidad de la neutralización de las muestras positivas fue evaluada utilizando un pseudotipo similar, pero reemplazando la proteína spike de HCoV 229E por la proteína spike de SARS-CoV-2, demostrando que las muestras preandémicas neutralizan de manera específica.

Las curvas de neutralización de las muestras contra el pseudotipo viral HCoV 229E que presentaron actividad neutralizante, revelaron una amplia gama de títulos de anticuerpos neutralizantes con valores de ID50 que oscilaban entre 43,47 y 756,8 (**Tabla 3**) demostrando la presencia de NAbs son específicos contra la proteína S del HCoV 229E en las 19 muestras preandémicas, un 42% presentaron anticuerpos neutralizantes contra el HCoV 229E sugiriendo que estuvieron expuestos a este agente viral.

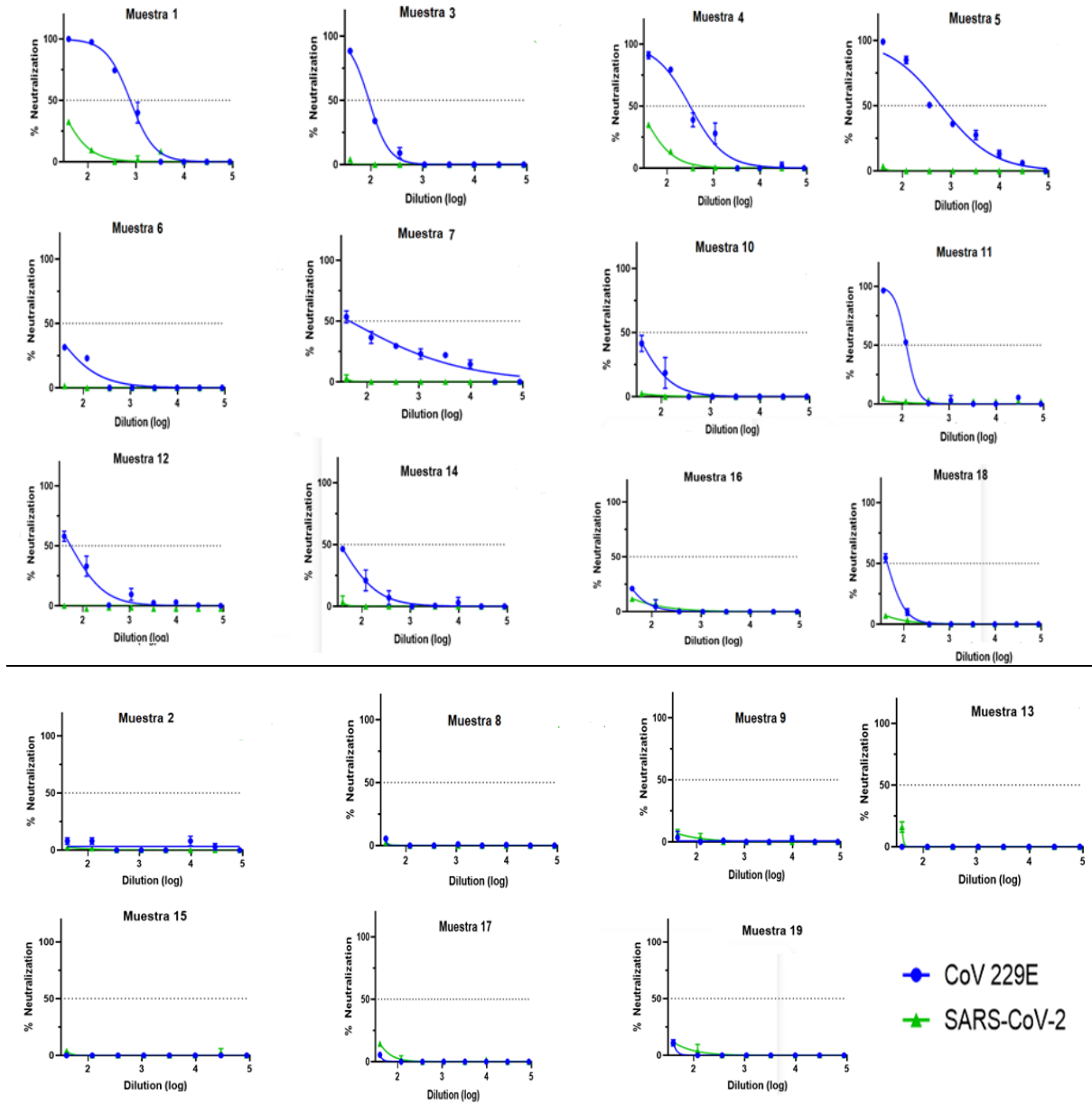


Figura 6. Neutralización del pseudotipo viral del coronavirus estacional HCoV 229E en plasma humanos preandémicos. Actividad neutralizante contra el pseudotipo viral del HCoV229E y SARS-CoV-2 en muestras de suero preandémico. Se realizaron curvas de neutralización para calcular los títulos de ID50. Los resultados se expresan como porcentaje de neutralización \pm % CV y corresponden a un ensayo representativo realizado por triplicado. Las curvas fueron ajustadas por regresión no lineal utilizando GraphPad Prism 8.

Para descartar alguna inhibición inespecífica y confirmar la presencia de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la proteína S del HCoV 229E y no a otro pseudotipo viral, observamos entonces que ninguna muestra neutralizó el pseudotipo viral del SARS-CoV-2, indicando que la actividad neutralizadora detectada contra el pseudotipo viral HCoV229E fue específica contra su proteína S. Como se muestra en la Figura 6 (en verde), no se observaron muestras prepandémicas capaces de neutralizar el pseudotipo viral del SARS-CoV-2, confirmando la especificidad de nuestro sistema pseudoviral.

Tabla 3. Actividad neutralizante contra el pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2 en muestras prepandémicas.

| Neutralización contra el pseudotipo viral 229E | | | | Neutralización contra el pseudotipo viral SARS-CoV-2 | | | |
|--|-------|---------------|----------------|--|------|--------|----------------|
| Muestras | ID50 | 95% IC | R ² | Muestras | ID50 | 95% IC | R ² |
| 1 | 756,8 | 661,7 - 863,7 | 0,9907 | 1 | <40 | - | - |
| 2 | <40 | - | - | 2 | <40 | - | - |
| 3 | 92,37 | 87,03 - 97,94 | 0,9947 | 3 | <40 | - | - |
| 4 | 312,8 | 252,0 - 388,7 | 0,9744 | 4 | <40 | - | - |
| 5 | 621,1 | 465,5 - 833,2 | 0,9671 | 5 | <40 | - | - |
| 6 | <40 | - | - | 6 | <40 | - | - |
| 7 | 55,74 | 32,92 - 83,13 | 0,9224 | 7 | <40 | - | - |
| 8 | <40 | - | - | 8 | <40 | - | - |
| 9 | <40 | - | - | 9 | <40 | - | - |
| 10 | <40 | - | - | 10 | <40 | - | - |
| 11 | 123,1 | 117,1 - 129,6 | 0,9937 | 11 | <40 | - | - |
| 12 | 55,19 | 41,99 - 68,86 | 0,9303 | 12 | <40 | - | - |
| 13 | <40 | - | - | 13 | <40 | - | - |
| 14 | <40 | - | - | 14 | <40 | - | - |
| 15 | <40 | - | - | 15 | <40 | - | - |
| 16 | <40 | - | - | 16 | <40 | - | - |
| 17 | <40 | - | - | 17 | <40 | - | - |
| 18 | 43,47 | 42,02 - 44,95 | 0,9956 | 18 | <40 | - | - |
| 19 | <40 | - | - | 19 | <40 | - | - |

IC, intervalo de confianza; -, no determinado; R², ajuste del R cuadrado de la regresión no lineal; ID, dilución inhibitoria.

Seguidamente, se realizaron ensayos de neutralización para el pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2 con muestras de donantes pediátricas diagnosticados con coronavirus estacionales, observando que el 13% (2/15) de ellas se pudo detectar la neutralización para el pseudotipo viral HCoV 229E, con valores de ID50 de 74.97 y 264.9. Sin embargo, estas

dos muestras, los pacientes tenían un diagnóstico por RT-PCR para el HCoV OC43; mientras que los donantes positivos para el HCoV 229E no mostraron capacidad neutralizante contra este pseudotipo (**Tabla 4**). En el primer caso los donantes pueden haberse infectado previamente con el HCoV 229E y en el segundo caso las muestras fueron tomadas en las primeras 48 horas de iniciado los síntomas lo que no es suficiente para generar una respuesta neutralizante [25].

Paralelamente, el 15% (3/15) de las muestras fue capaz de neutralizar el pseudotipo viral SARS-CoV-2, indicando que estos donantes pudieron cursar una infección previa con SARS-CoV-2 (**Tabla 4**). Sin embargo, no se encontró una misma muestra con capacidad neutralizante para ambos pseudotipos virales descartando al menos en este grupo analizado, una reacción cruzada como lo demuestran algunas evidencias [44, 58].

Tabla 4. Actividad neutralizante contra el pseudotipo viral HCoV 229E y SARS-CoV-2 en muestras pediátricas.

| Neutralización contra el pseudotipo viral 229E | | | | Neutralización contra el pseudotipo viral SARS-CoV-2 | | | |
|--|-------|----------------|----------------|--|-------|----------------|----------------|
| Muestras | ID50 | 95% IC | R ² | Muestras | ID50 | 95% IC | R ² |
| 6 E1 | <40 | - | - | 6 E1 | <40 | - | - |
| 65 C | <40 | - | - | 65 C | <40 | - | - |
| 65 B | <40 | - | - | 65 B | <40 | - | - |
| 3 E1 | 264,9 | 252,6 to 277,8 | 0,9984 | 3 E1 | <40 | - | - |
| 6 E3 | <40 | - | - | 6 E3 | <40 | - | - |
| 60 E1 | <40 | - | - | 60 E1 | <40 | - | - |
| 23 E1 | <40 | - | - | 23 E1 | <40 | - | - |
| 36 C | <40 | - | - | 36 C | <40 | - | - |
| 16 E1 | <40 | - | - | 16 E1 | <40 | - | - |
| 84 E1 | <40 | - | - | 84 E1 | <40 | - | - |
| 107 B | <40 | - | - | 107 B | 3366 | 2524 to 4504 | 0,9698 |
| 102 A | <40 | - | - | 102 A | 1251 | 805,8 to 1939 | 0,9354 |
| 100 A | <40 | - | - | 100 A | <40 | - | - |
| 94 A | <40 | - | - | 94 A | 377,4 | 198,8 to 651,8 | 0,8947 |
| 6 E2 | 74,97 | 56,85 to 95,32 | 0,9661 | 6 E2 | <40 | - | - |

IC, intervalo de confianza; -, no determinado; R², ajuste del R cuadrado de la regresión no lineal; ID, dilución inhibitoria.

7. DISCUSIÓN

Este proyecto de tesis describe la generación de un pseudotipo viral basado en VIH-1 que contiene en su membrana la glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E y su validación con muestras de suero de donantes sanos prepandémicos y muestras de donantes pediátricos diagnosticados con coronavirus estacionales mediante RT-PCR. El uso de este tipo de investigaciones puede emplearse como una herramienta para estudiar los cambios en la capacidad de neutralización a lo largo del tiempo, ya sea con otro coronavirus u otros virus.

Optimizamos la producción del pseudotipo viral del coronavirus estacional 229E permitiéndonos obtener rangos dinámicos de transducción de al menos 6×10^6 RLUs/pocillo en las células Huh-7; las recomendaciones para realizar ensayos de neutralización con pseudotipos virales, son con rangos dinámicos de transducción mayores a 1×10^6 RLUs/pocillo en una placa de 96 pocillos, por lo cual nuestros resultados de transducción fueron suficientes para comparar la cohorte de sueros utilizados con la misma cantidad de pseudovirus. Por otra, como la susceptibilidad de las diferentes líneas celulares para la transducción de los pseudovirus depende de los receptores celulares presentes en cada una de ellas, así como de la capacidad intrínseca para soportar la infección lentiviral y la expresión del gen reportero, observamos un rango dinámico de transducción para el pseudotipo viral HCoV 229E fue mayor en células Huh-7 que en las HEK293T-ACE2, dado los altos niveles de expresión de aminopeptidasa N que contienen las células Huh-7 que en las HEK293T-ACE2.

El 42% (8/19) de las muestras prepandémicas utilizadas tuvieron la capacidad de neutralizar el pseudotipo HCoV 229E, pero no SARS-CoV-2, con valores de ID50 variables. Los estudios destinados a medir los NAbs por ejemplo en individuos expuestos al SARS-CoV-2 han demostrado resultados diferentes de ID50 según el estado inmunológico, comorbilidades, etc. Tales como, un estudio realizado en Shangai analizó 175 muestras de sueros e informó de altas variaciones en los títulos de NAbs con valores de ID50 que iban desde por debajo del límite de detección ($ID_{50} < 40$) e ID50 de 21.567. En este estudio, el 17% de los pacientes presentaban títulos medios-bajos de NAbs ($ID_{50} = 500$ a 999), el 39% presentaban títulos medios-altos ($ID_{50} = 1000$ a 2500), y el 14% presentaban títulos altos ($ID_{50} > 2500$), con sólo dos pacientes que presentaban títulos muy altos de NAbs (15.989 y 21.567) [60].

Destacamos que no se ha descrito un número definido de NAbs que indique protección contra el HCoV 229E, así como tampoco en otros HCoV y se requieren estudios adicionales que permitan determinarlo.

Paralelamente al análisis de las muestras preandémicas, se analizaron muestras de suero proveniente de pacientes pediátricos extraídas durante la pandemia donde sorpresivamente, a pesar de que las donantes fueron diagnosticadas con algún coronavirus estacional por RT-PCR, para el HCoV 229E de nuestro interés, no logramos obtener anticuerpos neutralizantes en los sueros. En este sentido no se ha establecido si los anticuerpos de tipo IgM tienen la misma capacidad de neutralizar en comparación del tipo IgG, y además tras el inicio de la infección, los anticuerpos IgM neutralizantes son indetectables entre los días 0 y 3 del inicio de la enfermedad, y se vuelven detectables a partir del día 4 [25]. Por lo tanto, como las muestras fueron tomadas al inicio de la enfermedad, no se logró establecer una respuesta inmune neutralizante detectable.

Los resultados de este proyecto de investigación permitieron comparar los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados contra el pseudotipo viral HCoV229E. Es por ello, que destacamos el uso de pseudotipos viral como una herramienta para poder detectar anticuerpos neutralizantes que puedan ser usada contra otros HCoV así como también otros virus de importancia epidemiológica. Además, mediante estrategias de mutagénesis sitio dirigida, se puede incluir mutaciones asociadas a variantes que pueden tener importancia en el escape o evasión de la respuesta inmune [52, 53]. Por otra parte, el uso de pseudotipos virales no solo te permite hacer ensayos de neutralización, sino que además, permite ser utilizado para identificar factores celulares adicionales necesarios para la entrada viral o para estudiar antivirales que inhiban la interacción ligando-receptor.

8. CONCLUSIONES

- Se logró producir un pseudotipo viral basado en VIH-1 portador de la glicoproteína spike del coronavirus estacional 229E.
- La proteína S del HCoV 229E por sí sola fue suficiente para impulsar completamente la entrada del pseudotipo viral a la célula hospedera (Huh-7).

- El pseudotipo viral obtuvo rangos dinámicos de transducción elevados que permitieron usarlos en los ensayos de neutralización.
- Evaluamos la capacidad de neutralización de muestras de suero de un set de 34 muestras clínicas separadas en donantes sanos prepandémicos y muestras clínicas de donantes pediátricos diagnosticados por coronavirus estacional, observando valores de ID50 variables.
- Estudios serológicos a nivel de población serán indispensables para establecer la verdadera carga de la infección por el HCoV 229E o determinar un valor específico de NAb que indique protección, y/o la respectiva distribución por ejemplo en edades, así como para identificar alguna inmunidad cruzada contra otro coronavirus.

9. Referencias

- [1] J. Cui, F. Li, and Z. L. Shi, “Origin and evolution of pathogenic coronaviruses,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 181–192, Mar. 01, 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- [2] Y. Chen, Q. Liu, and D. Guo, “Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis,” *J Med Virol*, p. 92, 2020, doi: 10.1002/jmv.25681.
- [3] E. De Wit, N. Van Doremalen, D. Falzarano, and V. J. Munster, “SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 523–534, Aug. 01, 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
- [4] “Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.” <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003> (accessed May 11, 2022).
- [5] “Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – Saudi Arabia.” <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON363> (accessed May 11, 2022).
- [6] E. Dong, H. Du, and L. Gardner, “An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 20, no. 5. Lancet Publishing Group, pp. 533–534, May 01, 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1.
- [7] M. M. Kesheh, P. Hosseini, S. Soltani, and M. Zandi, “An overview on the seven

- pathogenic human coronaviruses,” *Rev. Med. Virol.*, vol. 32, no. 2, p. e2282, Mar. 2022, doi: 10.1002/RMV.2282.
- [8] J. O. Hendley, H. B. Fishburne, and J. M. Gwaltney, “Coronavirus infections in working adults. Eight-year study with 229 E and OC 43,” *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 105, no. 5, pp. 805–811, May 1972, doi: 10.1164/ARRD.1972.105.5.805.
- [9] Y. Li, X. Wang, and H. Nair, “Global Seasonality of Human Seasonal Coronaviruses: A Clue for Postpandemic Circulating Season of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2?,” *J. Infect. Dis.*, vol. 222, no. 7, pp. 1090–1097, Oct. 2020, doi: 10.1093/INFDIS/JIAA436.
- [10] D. X. Liu, J. Q. Liang, and T. S. Fung, “Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1,” in *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, 2020, p. 428.
- [11] M. N. Capoor, F. S. Ahmed, A. McDowell, and O. Slaby, “Is the ‘Common Cold’ Our Greatest Ally in the Battle Against SARS-CoV-2?,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, Dec. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.605334.
- [12] M. Y. Wang, R. Zhao, L. J. Gao, X. F. Gao, D. P. Wang, and J. M. Cao, “SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10. Frontiers Media S.A., Nov. 25, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- [13] P. V’kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, and V. Thiel, “Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2,” *Nat. Rev. Microbiol.* 2020 193, vol. 19, no. 3, pp. 155–170, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
- [14] J. Lan *et al.*, “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to

- the ACE2 receptor,” *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 215–220, May 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- [15] A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, and D. Veessler, “Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 281-292.e6, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [16] R. J. G. Hulswit *et al.*, “Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 7, pp. 2681–2690, Feb. 2019, doi: 10.1073/PNAS.1809667116/SUPPL_FILE/PNAS.1809667116.SAPP.PDF.
- [17] H. Hofmann, K. Pyrc, L. Van Der Hoek, M. Geier, B. Berkhout, and S. Pöhlmann, “Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 22, p. 7988, May 2005, doi: 10.1073/PNAS.0409465102.
- [18] A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth, “Coronavirus humains (HCoV),” *Pathol. Biol.*, vol. 57, no. 2, pp. 149–160, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.PATBIO.2008.02.018.
- [19] J. Machhi *et al.*, “The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections,” *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 15, no. 3. Springer, pp. 359–386, Sep. 01, 2020, doi: 10.1007/s11481-020-09944-5.
- [20] M. S. Diamond and T. D. Kanneganti, “Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2,” *Nat. Immunol.* 2022 232, vol. 23, no. 2, pp. 165–176, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41590-021-01091-0.

- [21] T. D. Kanneganti, “Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell,” *Immunol. Rev.*, vol. 297, no. 1, pp. 5–12, Sep. 2020, doi: 10.1111/IMR.12912.
- [22] M. A. Chowdhury, N. Hossain, M. A. Kashem, M. A. Shahid, and A. Alam, “Immune response in COVID-19: A review,” *J. Infect. Public Health*, vol. 13, no. 11, pp. 1619–1629, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.JIPH.2020.07.001.
- [23] N. Y. L. Pang, A. S. R. Pang, V. T. Chow, and D. Y. Wang, “Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice,” *Mil. Med. Res. 2021 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–17, Aug. 2021, doi: 10.1186/S40779-021-00342-3.
- [24] C. D. Murin, I. A. Wilson, and A. B. Ward, “Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses,” *Nat. Microbiol. 2019 45*, vol. 4, no. 5, pp. 734–747, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41564-019-0392-y.
- [25] X. Liu, J. Wang, X. Xu, G. Liao, Y. Chen, and C. H. Hu, “Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients,” <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773324>, vol. 9, no. 1, pp. 1269–1274, Jan. 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1773324.
- [26] C. Zhou *et al.*, “Evaluation of serum IgM and IgG antibodies in COVID-19 patients by enzyme linked immunosorbent assay,” *J. Med. Virol.*, vol. 93, no. 5, pp. 2857–2866, May 2021, doi: 10.1002/JMV.26741.
- [27] W. Zhang *et al.*, “Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 9, no. 1, pp. 386–389, Jan. 2020, doi:

10.1080/22221751.2020.1729071/SUPPL_FILE/TEMI_A_1729071_SM6070.XLS
X.

- [28] A. S. Iyer *et al.*, “Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients,” *Sci. Immunol.*, vol. 5, no. 52, Oct. 2020, doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABE0367/SUPPL_FILE/ABE0367_TABLE_S4.XLSX.
- [29] A. Wajnberg *et al.*, “Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months,” *Science (80-.)*, vol. 370, no. 6521, pp. 1227–1230, Dec. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.ABD7728.
- [30] P. B. V. Tong, L. Y. Lin, and T. H. Tran, “Coronaviruses pandemics: Can neutralizing antibodies help?,” *Life Sci.*, vol. 255, p. 117836, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117836.
- [31] D. Sumbria, E. Berber, M. Mathayan, and B. T. Rouse, “Virus Infections and Host Metabolism—Can We Manage the Interactions?,” *Front. Immunol.*, vol. 11, Feb. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.594963.
- [32] N. A. Valdez-Cruz *et al.*, “Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 20, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12934-021-01576-5.
- [33] H. T. Zedan and G. K. Nasrallah, “Is preexisting immunity to seasonal coronaviruses limited to cross-reactivity with SARS-CoV-2? A seroprevalence cross-sectional study in north-eastern France,” *eBioMedicine*, vol. 71, p. 103580, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.EBIOM.2021.103580.

- [34] K. Röltgen *et al.*, “Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome,” *Sci. Immunol.*, vol. 5, no. 54, p. 240, Dec. 2020, doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABE0240.
- [35] S. M. Bueno *et al.*, “Interim report: Safety and immunogenicity of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 in healthy chilean adults in a phase 3 clinical trial,” *medRxiv*, p. 2021.03.31.21254494, Apr. 2021, doi: 10.1101/2021.03.31.21254494.
- [36] A. Jara *et al.*, “Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 385, no. 10, pp. 875–884, Sep. 2021, doi: 10.1056/NEJMOA2107715/SUPPL_FILE/NEJMOA2107715_DISCLOSURES.PDF
- [37] G. J. Gorse, G. B. Patel, J. N. Vitale, and T. Z. O’Connor, “Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum,” *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1875–1880, Dec. 2010, doi: 10.1128/CVI.00278-10.
- [38] A. S. Monto *et al.*, “Coronavirus Occurrence and Transmission Over 8 Years in the HIVE Cohort of Households in Michigan,” *J. Infect. Dis.*, vol. 222, no. 1, pp. 9–16, Jun. 2020, doi: 10.1093/INFDIS/JIAA161.
- [39] S. Nickbakhsh *et al.*, “Epidemiology of Seasonal Coronaviruses: Establishing the Context for the Emergence of Coronavirus Disease 2019,” *J. Infect. Dis.*, vol. 222, no. 1, pp. 17–25, Jun. 2020, doi: 10.1093/INFDIS/JIAA185.
- [40] R. M. Wong-Chew *et al.*, “Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 62, pp. 32–38, Sep. 2017, doi:

10.1016/J.IJID.2017.06.020/ATTACHMENT/A163A4F8-3308-47AC-981A-BD9CA8A80132/MMC1.DOCX.

- [41] S. K. P. Lau *et al.*, “Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 6, pp. 2063–2071, Jun. 2006, doi: 10.1128/JCM.02614-05/ASSET/D04386FA-6D30-4A46-AB1A-AA970E366795/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0060664630002.JPEG.
- [42] K. W. Ng *et al.*, “Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans,” *Science (80-.)*, vol. 370, no. 6522, pp. 1339–1343, Dec. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.ABE1107/SUPPL_FILE/ABE1107-NG-SM.PDF.
- [43] P. Nguyen-Contant *et al.*, “S protein-reactive IGG and memory B cell production after human SARS-CoV-2 infection includes broad reactivity to the S2 subunit,” *MBio*, vol. 11, no. 5, pp. 1–11, Sep. 2020, doi: 10.1128/MBIO.01991-20.
- [44] P. Nguyen-Contant *et al.*, “S Protein-Reactive IgG and Memory B Cell Production after Human SARS-CoV-2 Infection Includes Broad Reactivity to the S2 Subunit,” *MBio*, vol. 11, no. 5, pp. 1–11, Sep. 2020, doi: 10.1128/MBIO.01991-20.
- [45] D. L. Heymann, R. B. Aylward, and C. Wolff, “Dangerous pathogens in the laboratory: From smallpox to today’s SARS setbacks and tomorrow’s polio-free world,” *Lancet*, vol. 363, no. 9421. Elsevier B.V., pp. 1566–1568, May 15, 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16234-X.
- [46] S. Khan *et al.*, “Analysis of Serologic Cross-Reactivity Between Common Human Coronaviruses and SARS-CoV-2 Using Coronavirus Antigen Microarray,” *bioRxiv*, p. 2020.03.24.006544, Mar. 2020, doi: 10.1101/2020.03.24.006544.

- [47] D. Cantoni, M. Mayora-Neto, and N. Temperton, “The role of pseudotype neutralization assays in understanding SARS CoV-2,” *Oxford Open Immunol.*, vol. 2, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1093/OXFIMM/IQAB005.
- [48] J. V. and SandovalSalemiz, “Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises,” <https://home.liebertpub.com/hgtb>, vol. 28, no. 6, pp. 291–301, Dec. 2017, doi: 10.1089/HGTB.2017.084.
- [49] A. T. Sampson *et al.*, “Coronavirus Pseudotypes for All Circulating Human Coronaviruses for Quantification of Cross-Neutralizing Antibody Responses,” *Viruses 2021, Vol. 13, Page 1579*, vol. 13, no. 8, p. 1579, Aug. 2021, doi: 10.3390/V13081579.
- [50] H. X. Lin *et al.*, “Characterization of the spike protein of human coronavirus NL63 in receptor binding and pseudotype virus entry,” *Virus Res.*, vol. 160, no. 1–2, pp. 283–293, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2011.06.029.
- [51] C. Wang *et al.*, “A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection,” *Nat. Commun. 2020 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–6, May 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
- [52] L. SF *et al.*, “Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 384, no. 6, pp. 533–540, Feb. 2021, doi: 10.1056/NEJMOA2034545.
- [53] N. Le Bert *et al.*, “SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls,” *Nature*, vol. 584, no. 7821, pp. 457–462, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2550-z.

- [54] C. Beltrán-Pavez *et al.*, “Insights into neutralizing antibody responses in individuals exposed to SARS-CoV-2 in Chile,” *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 7, pp. 6855–6867, Feb. 2021, doi: 10.1126/sciadv.abe6855.
- [55] C. Raymond *et al.*, “A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications,” *Methods*, vol. 55, no. 1, pp. 44–51, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.YMETH.2011.04.002.
- [56] B. Dalby *et al.*, “Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications,” *Methods*, vol. 33, no. 2, pp. 95–103, Jun. 2004, doi: 10.1016/J.YMETH.2003.11.023.
- [57] F. Cardarelli *et al.*, “The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, May 2016, doi: 10.1038/srep25879.
- [58] J. Shang *et al.*, “Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2,” *Nat. 2020 5817807*, vol. 581, no. 7807, pp. 221–224, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
- [59] K. W. Ng *et al.*, “Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans,” *Science*, vol. 370, no. 6522, pp. 1339–1343, Dec. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.ABE1107.
- [60] F. Wu *et al.*, “Evaluating the Association of Clinical Characteristics With Neutralizing Antibody Levels in Patients Who Have Recovered From Mild COVID-19 in Shanghai, China,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 180, no. 10, pp. 1356–1362, Oct. 2020, doi: 10.1001/JAMAINTERNMED.2020.4616.

