

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DEL ANTÍGENO RBD DEL
CORONAVIRUS SARS-CoV-2 MEDIANTE UN ACARREADOR BIOLÓGICO:
ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN MODELO MURINO.**

Por

Q.C.B. Ana Melisa Dávila Carrillo

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en
Microbiología Médica.

2025

**ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL DEL ANTÍGENO RBD DEL
CORONAVIRUS SARS-CoV-2 MEDIANTE UN ACARREADOR BIOLÓGICO:
ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN MODELO MURINO.**

Aprobación de tesis



Dr. C. Romel Hernández Bello
Director de Tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Co-Director de tesis



Dra. C. Mariana Elizondo Zertuche
Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al SECIHTI por su apoyo en mi formación como Maestra en Ciencias.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL por permitirme ser parte de él y poder continuar con mi formación académica, así como a mis profesores y compañeros pertenecientes.

A mi Director de tesis el Dr Romel Hernández, doc muchas gracias por su paciencia, por su apoyo, sus consejos y anécdotas, me ha hecho crecer mucho académica y personalmente, gracias por su capacidad de alentarme a crecer y a seguir creyendo en mí, ah y por entender mis stickers de changuitos.

A mi Co-director de tesis el Dr José Palma, dr agradezco mucho su paciencia, gracias por enseñarme y a la vez darme la libertad y confianza para poder llevar a cabo los experimentos yo solita jaja, además fue muy divertido pasar por el estresante periodo de estandarización, admiro mucho su forma de resolver, espero algún día poder desarrollar ese superpoder.

A la Dra Mariana Elizondo, que forma parte de mi comisión de tesis, dra muchas gracias por sus consejos y enseñanzas, por su apoyo como tutora pero también como amiga, y por compartir su amor por los hongos con nosotros.

A la médica Daniela López, colaboradora de esta tesis, Dani eres una gran amiga, inteligente y domadora de ratones, tienes la capacidad de convertir los días más difíciles en los más divertidos ok, siempre he pensado que nuestra amistad no fue a ''primera vista'', si no que nació de los momentos de adversidad jaja te quiero mucho y agradezco a Dios que nos hizo coincidir en este camino.

Al CRCEI por permitirme llevar a cabo mis experimentos en sus instalaciones, agradezco también a los químicos y compañeros pertenecientes a él, en especial a la Q.B.P. Karen Solis, colaboradora de esta tesis y mi amiga la más trabajadora, te quiero mucho Karen, gracias por siempre estar al pendiente y por tu actitud de servicio, por las risas y por hacer

más ameno el trabajo en el lab, nos has enseñado mucho ok, tienes un corazón muy bonito y valioso.

A Humberto (Tobe), por ser mi amigo desde el primer día, gracias por hacer más divertida la maestría, por ser mi compañero de monkey aventuras, por entender mi humor y apoyarme cuando todo esto de la investigación era nuevo para mí, y por hacer de la hora de comida un respiro del trabajo en el lab. Te quiero mucho chiwisp3.

A Edgar, por su disposición para resolver mis dudas sobre inmunología y por su sincera amistad :) tkm amistad.

A mis amigos QCBs: Uriel, Ayllen y en especial a Chio, por su apoyo.

A los amigos y compañeros que hice a lo largo de mi formación como maestra en ciencias (Viri, Emilio, Octavio, Bere, y Julio). En especial a mis amigos de Biología Molecular (Luis, Joce, JuanDi, Sergio, Itzel y Yare) por adoptarme en su grupito.



A Dios por darme fortaleza y guiarme.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional, paciencia y amor, y sobre todo por creer en mí cuando a veces yo olvidaba cómo hacerlo. Ustedes son mi proteína de anclaje que me mantiene adherida a la pared celular de esta levadura llamada vida. Quiero dar un agradecimiento especial a mi tío Oscar, tío muchas gracias por todo su apoyo, le mando un monkey abrazo. A Angela, mi panita, que le nació darme su cariño y comprensión, y por siempre estar ahí para mí, te quiero mucho ok ♥, gracias por ser mi rayito de luz. A David, muchas gracias por tu apoyo, tu cariño y tus palabras sabias, tkm.

Al QCB Eduardo (mi pani) y a la QCB Jeily, muchas gracias por su amistad y por su apoyo a la distancia, los quiero mucho, me siento muy afortunada de tenerlos como amigos.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis a mi mamá, Ana María, por ser mi ejemplo de fortaleza y resiliencia:

"Pueden destrozarse todo aquello que ven, porque ella de un soplo lo vuelve a crear como si nada", ma' fuiste mi primer acercamiento a la ciencia, admiro lo inteligente y divertida que eres, y este logro (que también es tuyo) no lo hubiera podido lograr sin ti, tu apoyo fue pieza clave, me diste la valentía para pararme en frente de un auditorio lleno de gente y la seguridad para seguir adelante cuando creía que era muy difícil seguir. Gracias por ayudarme a construir mis alas pero también por mantener mis pies en el suelo. Te amo mucho.

A Hugo y Sebastián, por ser mi primer equipo de trabajo, por recordarme que pase lo que pase siempre los tendré a ustedes, los amo mucho.

A mis abuelos y a Dany, en especial a mi abuela Alicia, porque valora la importancia del estudio, aunque las circunstancias sociales de su época no le permitieran continuar con sus estudios como ella hubiera querido. Weli este logro es para ti. Gracias por tu historia, sueños y fuerza, me has enseñado que el conocimiento también es un acto de resistencia y de amor.

A Enchilada y a Geppeto, mis perrios, por recibirme con gran entusiasmo y alegría después de estar todo el día en el laboratorio, y de quererme a pesar de oler a ratón después de estar en el bioterio.

Por último, con todo el respeto que merecen, le dedico esta tesis a los ratoncitos BALB/c que fueron parte de este proyecto, *"Trabajar con animales de laboratorio es un privilegio, no un derecho"*, muchas gracias.

*"Never be so kind, you forget to be clever
Never be so clever, you forget to be kind."
-Taylor Swift*



ÍNDICE

Capítulo	Página
I. RESUMEN.....	7
II. ABSTRACT.....	8
III. ABREVIATURAS.....	9
IV. FIGURAS.....	12
V. TABLAS.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Coronavirus.....	15
1.2 SARS-CoV-2.....	15
1.3 Replicación de SARS-CoV-2.....	16
1.4 Proteína Spike.....	18
1.5 ACE 2.....	19
1.6 Dominio de Unión al Receptor (RBD).....	20
1.7 Células susceptibles a la infección por SARS-CoV-2	21
1.8 La pandemia de COVID-19.....	22
1.9 Vacunas actuales contra COVID-19.....	26
1.10 Vacunas orales.....	29
1.11 Mecanismos inmunológicos de la mucosa intestinal.....	30
1.12 IgA secretora.....	31
1.13 Inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA.....	32
1.14 Subclases de IgG.....	34
1.15 Vacunas orales con base en acarreadores biológicos.....	36
1.16 <i>Yeast display</i>	37
1.17 <i>Pichia pastoris</i>	38
1.18 <i>Pichia pastoris</i> como acarreador biológico.....	39
1.19 Evaluación preclínica en modelo murino.....	39
2. ANTECEDENTES.....	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	46
4. HIPÓTESIS.....	47

5. OBJETIVOS.....	48
5.1 Objetivo general.....	48
5.2 Objetivos específicos.....	48
6. MATERIALES MÉTODOS.....	49
6.1 Animales de experimentación.....	49
6.2 Reactivación de las cepas GS115 y PpRBDCoV-2.....	49
6.3 Amplificación del fragmento RBD por PCR de colonias.....	50
6.4 Preparación y administración del inóculo.....	51
6.5 Cinética de expulsión fecal de <i>Pichia pastoris</i>	51
6.6 Esquema de inmunización.....	53
6.7 Obtención de muestras sanguíneas por punción submandibular.....	53
6.8 Obtención del suero.....	54
6.9 ELISA indirecto para detección de IgG-HRP.....	54
6.10 Detección de IgG, IgM e IgA por ELISA indirecto.....	55
6.11 Determinación de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3)	56
7. RESULTADOS.....	58
7.1 Reactivación de las cepas GS115 y PpRBDCoV-2.....	58
7.2 Amplificación del fragmento RBD en la levadura recombinante PpRBD-CoV2.....	59
7.3 Viabilidad del inóculo.....	61
7.4 Cinética de expulsión fecal de <i>Pichia pastoris</i> tras administración oral en ratones.....	62
7.5 Detección de IgG-HRP en suero de ratones inmunizados.....	64
7.6 Detección de IgG, IgM e IgA en suero de ratones inmunizados.....	65
7.7 Determinación de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3)	71
8. DISCUSIÓN.....	74
9. CONCLUSIONES.....	83
10. PERSPECTIVAS.....	84
REFERENCIAS.....	85
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	94

I. RESUMEN

Q.C.B. Ana Melisa Dávila Carrillo.
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Título de estudio: Administración por vía oral del antígeno RBD del coronavirus SARS-CoV-2 mediante un acarreador biológico: Análisis de la respuesta inmune humoral en modelo murino.

Número de páginas: 94

Candidata para la obtención del grado de Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica.

Área de estudio: Microbiología.

Propósito y diseño del estudio: El propósito de este estudio fue evaluar el potencial inmunogénico de una levadura recombinante *Pichia pastoris* (PpRBD-CoV2), diseñada para expresar en su superficie el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2, como vacuna administrada por vía oral. Para ello, se desarrolló un esquema de inmunización en ratones BALB/c, a los que se administró por vía oral la levadura recombinante viva o inactivada. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de inmunoglobulinas específicas (IgG, IgM e IgA) mediante ELISA indirecto, y se caracterizaron las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) con el fin de determinar el perfil de la respuesta inmune inducida. Además, se monitoreó la cinética de excreción fecal de la levadura para evaluar su eliminación del tracto gastrointestinal.

Contribuciones y conclusiones: El estudio demostró que la inmunización oral con la levadura recombinante PpRBD-CoV2 induce una respuesta humoral específica contra la proteína RBD del SARS-CoV-2, evidenciada por la presencia de anticuerpos IgG e IgA en suero. El aumento en los niveles de IgG2a sugiere una respuesta inmune de tipo Th1, lo cual es relevante en la protección frente a infecciones virales. La levadura fue excretada progresivamente sin persistencia prolongada en el tracto gastrointestinal, indicando un perfil de seguridad favorable. En conjunto, estos hallazgos posicionan a PpRBD-CoV2 como un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas orales contra COVID-19 y potencialmente otras infecciones respiratorias.

Dr. C. Romel Hernández Bello
Director de Tesis

II. ABSTRACT

Q.C.B Ana Melisa Dávila Carrillo
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Study Title: Oral Administration of the SARS-CoV-2 Coronavirus RBD Antigen using a biological carrier: Analysis of the humoral immune response in a murine model.

Page count: 94

Candidate for the degree of Master of Science with a Specialization in Medical Microbiology.

Field of Study: Microbiology.

Purpose and Study Design: The purpose of this study was to evaluate the immunogenic potential of a recombinant *Pichia pastoris* strain (PpRBD-CoV2), genetically engineered to display the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 Spike protein on its cell surface, as an orally administered vaccine. An immunization protocol was established using BALB/c mice, which were orally administered either live or inactivated recombinant yeast orally. Specific immunoglobulin levels (IgG, IgM, and IgA) were subsequently quantified by indirect ELISA, and IgG subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) were analyzed to determine the immune response profile. Additionally, fecal excretion kinetics of the yeast were monitored to assess gastrointestinal clearance.

Contributions and Conclusions: The study demonstrated that oral immunization with the recombinant yeast PpRBD-CoV2 elicited a specific humoral immune response against the RBD protein of SARS-CoV-2, as evidenced by the presence of IgG and IgA antibodies in serum. The observed elevation in IgG2a levels suggests a Th1-skewed immune response, which is relevant for antiviral protection. The yeast was progressively excreted without prolonged persistence in the gastrointestinal tract, indicating a favorable safety profile. Altogether, these findings position PpRBD-CoV2 as a promising candidate for the development of oral vaccines against COVID-19 and potentially other respiratory infections.

III. ABREVIATURAS

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2

ADNg: ADN genómico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BrEt: Bromuro de Etidio

BSA: Albúmina de suero bovino

CMV: Citomegalovirus

E: Proteína de Envoltura

ELISA: Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

ERGIC: compartimento intermedio ER-Golgi

GALT: Sistema inmunológico asociado a mucosas

GFP: Proteína verde fluorescente

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

g: Gramos

HRP: Peroxidasa de rábano picante

IFN- γ : Interferón gamma

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

IgA: Inmunoglobulina A

IL-4: Interleucina 4

LT: Toxina Lábil al calor de *E. coli*

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

M: Proteína de Membrana

MERS: Síndrome respiratorio por coronavirus de Oriente Medio

mL: Mililitros

N: Nucleocápside

NaCl: Cloruro de sodio

nm: Nanómetros

NV: No viable

OPV: Vacuna oral contra la poliomielitis

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato

PBS-T: Solución Salina Tamponada con Fosfato-Tween 20

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno

RBD: Dominio de Unión al Receptor

RPBI: Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos

rpm: Revoluciones por minuto

RTC: complejo de replicación-transcripción

S: Proteína *Spike*

SARS: Síndrome agudo respiratorio severo

sIgA: IgA secretora

TE: Buffer Tris-EDTA

Th: Linfocitos T colaboradores

Th1: Linfocitos T cooperadores 1

Th2: Linfocitos T cooperadores 2

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

TMPRSS2: serina proteasa

TLRs: receptores de tipo Toll

UFC: Unidades formadoras de colonias

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo

ug: Microgramos

uL: Microlitros

YPD: Extracto de levadura peptona dextrosa

IV. LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura del coronavirus SARS-CoV-2.....	16
Figura 2. Replicación de SARS-CoV-2.....	17
Figura 3. Representación estructural de la proteína <i>Spike</i> del SARS-CoV-2.....	19
Figura 4. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 en las células del epitelio digestivo a través del receptor ACE2.....	20
Figura 5. Curva epidémica de casos confirmados y positividad por COVID-19 por semana epidemiológica.....	23
Figura 6. Casos y tasa de incidencia de la COVID-19 según grupo de edad para 2025.....	24
Figuras 7. Infección de epitelios mucosos por SARS-CoV-2 y activación de la respuesta inmune mucosal.....	31
Figura 8. Pared celular de <i>Pichia pastoris</i> y el sistema de <i>yeast display</i> utilizado para la presentación antigénica.....	38
Figura 9. Expresión de GFP en la pared celular de <i>Pichia pastoris</i> mediante anclaje GPI.....	41
Figura 10. Esquema de la estrategia de clonación y visualización estructural del dominio RBD.....	43
Figura 11. Mapa plasmídico del vector recombinante pGAPZ α -RBD-GPI-cMyc.....	44
Figura 12. Detección por inmunofluorescencia indirecta de la expresión superficial del dominio RBD en la levadura <i>Pichia pastoris</i>	

recombinante (PpRBD-CoV2).....	45
Figura 13. Esquema de recolección de materia fecal en ratones inmunizados.....	52
Figura 14. Esquema de inmunización.....	53
Figura 15. Reactivación de las cepas en medio YPD.....	59
Figura 16. Amplificación del fragmento RBD en PpRBD-CoV2 por PCR de colonias.....	60
Figura 17. Viabilidad de los inóculos de <i>Pichia pastoris</i>	62
Figura 18. Cinética de expulsión de <i>Pichia pastoris</i> en ratones BALB/c después de administración oral.....	63
Figura 19. Detección de IgG-HRP en suero de ratones inmunizados con PpRBD-CoV2 mediante ELISA indirecto.....	65
Figura 20. Detección de IgM específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2, al día 14 post-inmunización..	67
Figura 21. Detección de IgM específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2 al día 42 post-inmunización...	68
Figura 22. Detección de IgG específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2.....	69
Figura 23. Detección de IgA específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2.....	71
Figura 24. Determinación de subclases de IgG específicas contra RBD en suero de ratones inmunizados con PpRBD-CoV2.....	73

V. LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Variantes de SARS-CoV-2 derivadas de Omicrón, a mayo de 2025.....	25
Tabla 2. Comparación de vacunas contra COVID-19.....	27
Tabla 3. Efectos adversos documentados después de la administración de vacunas inyectables contra COVID-19.....	28
Tabla 4. Vacunas orales que forman parte del esquema nacional de vacunación de México.....	30
Tabla 5. Características generales de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA.....	34
Tabla 6. Características de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3).....	36
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento RBD mediante PCR de colonias.....	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Coronavirus*

El SARS-CoV-1 y el SARS-CoV-2 son dos tipos de coronavirus que han causado brotes importantes de enfermedades respiratorias en humanos. Pueden causar infecciones respiratorias que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves como el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) (1). El SARS-CoV-1 tiene una transmisión relativamente baja en comparación con el SARS-CoV-2 y ambos se propagan fácilmente de persona a persona a través de gotitas respiratorias y aerosoles (2).

1.2 *SARS-CoV-2*

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto perteneciente a la familia *Coronaviridae*, una gran familia de virus que pueden causar enfermedades en animales y humanos. Además, es miembro del género *Betacoronavirus*, del subgénero *Sarbecovirus*, y de tipo ARN de cadena positiva (3). Dentro del virus se encuentra su genoma viral el cual está asociado a la Nucleocápside (N), además cuenta con tres proteínas estructurales: la de Membrana (M) que da soporte y la forma curvada a la membrana, la proteína de Envoltura (E), que se encarga principalmente del ensamblaje y de la liberación de viriones y la proteína *Spike* (S) que tiene la función de facilitar la unión del virus al receptor de la celular huésped (figura 1).

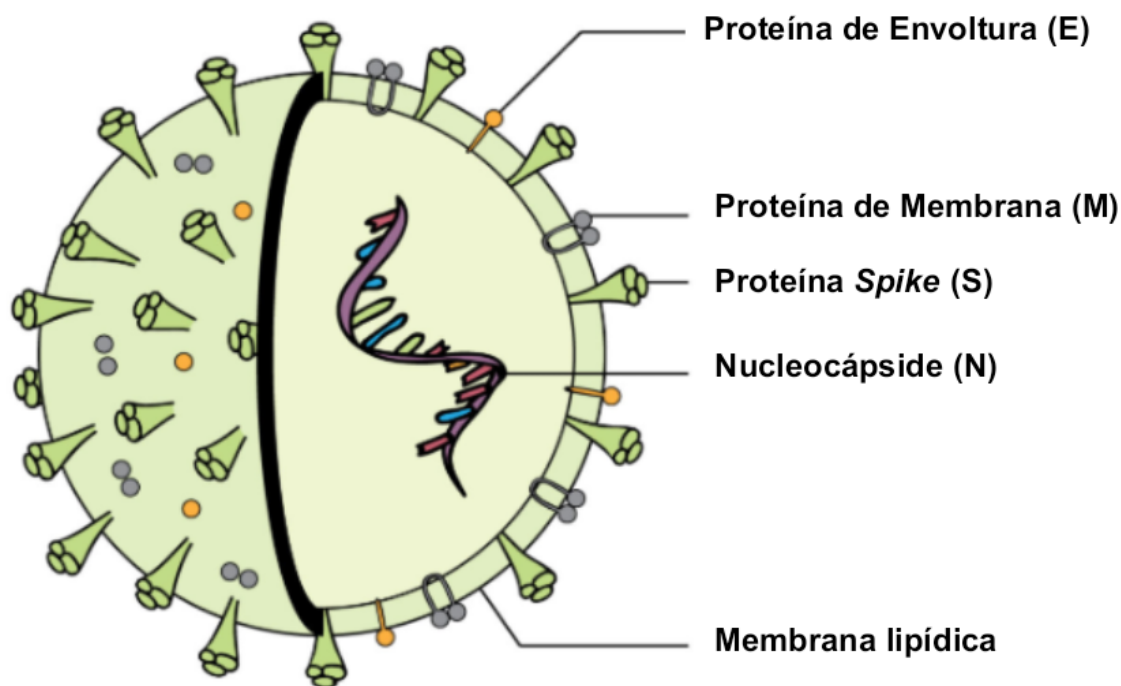


Figura 1. Estructura del coronavirus SARS-CoV-2. El virión está compuesto por una membrana lipídica que incorpora tres proteínas estructurales principales: la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína *Spike* (S), la cual es responsable de la unión al receptor celular. En su interior se encuentra el genoma viral constituido por ARN monocatenario positivo asociado a la nucleocápside (N).

Fuente: ADN Institut. ¿Qué es el coronavirus?. 2020.

1.3 Replicación de SARS-CoV-2

El ciclo de replicación inicia con la unión de la proteína *Spike* (S) al receptor ACE2, seguido por el *priming* proteolítico de la proteína (S) por la serina proteasa TMPRSS2, lo que permite la entrada del virus por fusión de membranas o endocitosis. Una vez en el citoplasma, el genoma viral es traducido por la maquinaria ribosomal de la célula huésped, generando dos grandes poliproteínas (pp1a y pp1ab), que luego son procesadas por proteasas virales (como Mpro y PLpro) para formar el complejo de replicación-transcripción (RTC). Este complejo sintetiza una cadena negativa de ARN que

sirve como molde para la síntesis de nuevos genomas virales y subgenomas que codifican proteínas estructurales (figura 2).

Las proteínas estructurales se traducen en el retículo endoplasmático y se ensamblan en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC), junto con el ARN genómico encapsidado. Finalmente, los viriones completos se liberan por exocitosis, infectando nuevas células y propagando la infección (4).

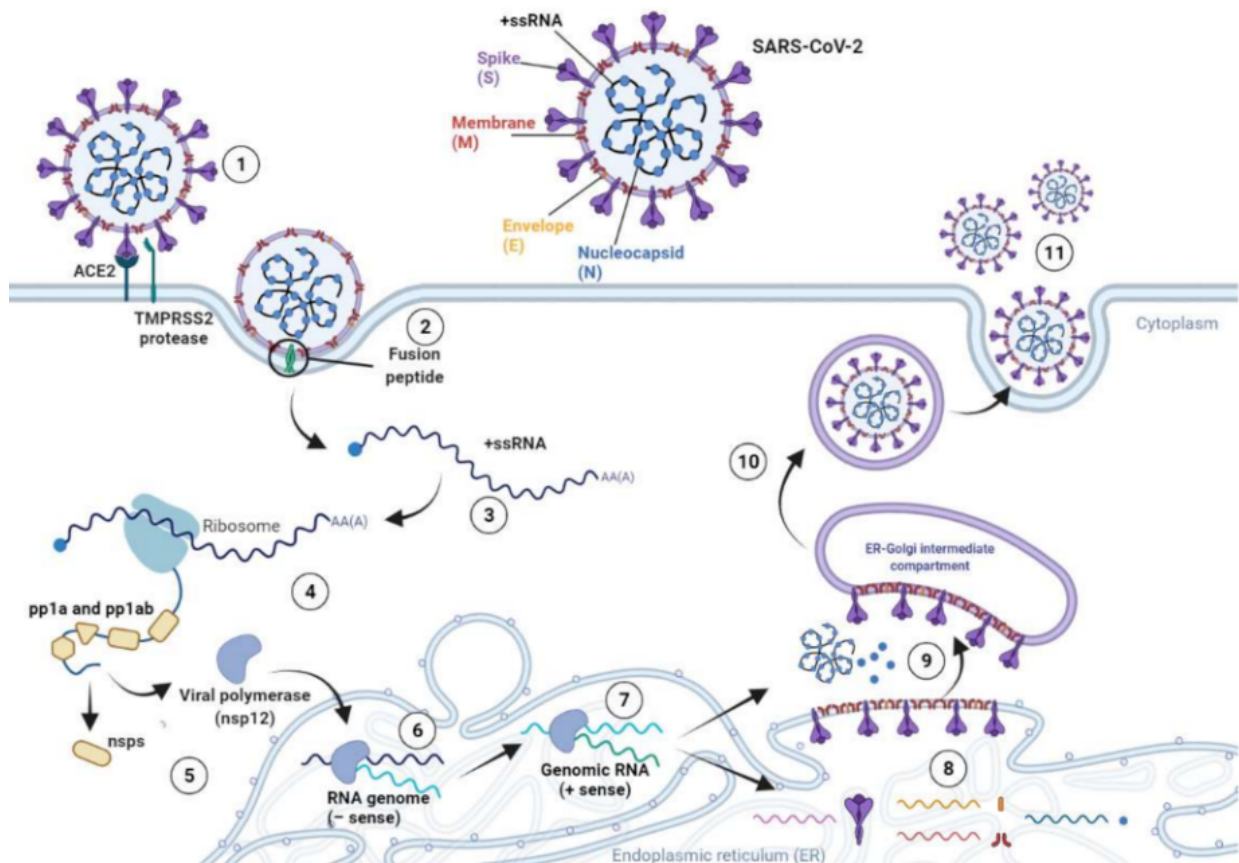


Figura 2. Replicación de SARS-CoV-2. (1) Unión entre la proteína *Spike* y el receptor ACE2 en la superficie de la célula huésped. (2) El péptido de fusión sufre cambios conformacionales que permiten la fusión del SARS-CoV-2 y su entrada al citoplasma celular. (3) Liberación del genoma de ARN positivo monocatenario del SARS-CoV-2. (4) El genoma viral es transcrito por los ribosomas de la célula huésped. (5) El ARN

traducido codifica poliproteínas (pp1a y pp1ab) y la ARN polimerasa dependiente del ARN viral NSP12. (6) NSP12 produce copias completas de sentido negativo del ARN del SARS-CoV-2. (7) El genoma del ARN de sentido negativo se emplea como plantilla para generar los nuevos genomas de sentido positivo. (8) La traducción del ARN viral ocurre en el retículo endoplasmático de las células huésped y conduce a la síntesis de proteínas estructurales. (9) Las proteínas estructurales se mueven al compartimento intermedio del aparato de Golgi donde ocurre el ensamblaje viral. (10) Los virus maduros se ensamblan en el compartimento intermedio del Golgi y se liberan en vesículas secretoras. (11) Los viriones del SARS-CoV-2 se secretan por exocitosis.

Fuente: Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Al Suwaidi H, Al-Marzouqi AHA, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses*. 2021;13(9):1687. doi:10.3390/v13091687

1.4 Proteína Spike

La proteína *Spike* del SARS-CoV-2 es una glicoproteína transmembranal de clase I, localizada en la superficie del virión, y es responsable de mediar la entrada del virus a las células del hospedero. Esta proteína consta de dos regiones S1 y S2 (figura 3). La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD), encargado del reconocimiento y unión al receptor celular ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) de la célula huésped, que al unirse da lugar al primer paso del mecanismo de infección del virus (4,5), mientras que la subunidad S2 participa en la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped.

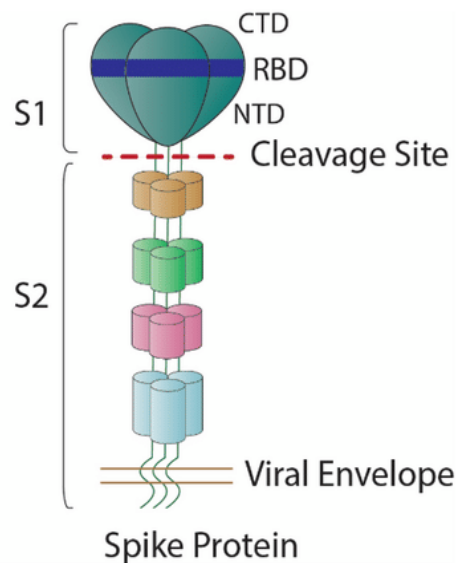


Figura 3. Representación estructural de la proteína *Spike* (S) del SARS-CoV-2. Esta glicoproteína trimérica se encuentra en la superficie viral y es responsable del reconocimiento y unión al receptor ACE2 en las células huésped, a través de su dominio de unión al receptor (RBD). La proteína S juega un papel clave en la entrada viral y es una de las principales dianas para el desarrollo de vacunas y terapias neutralizantes.

Fuente: Kumar S. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of *Spike* protein. J Med Virol. 2022 May;94(5):1641–9.

1.5 ACE2

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) es una metaloproteasa de tipo I que desempeña un papel crucial en el sistema renina-angiotensina, regulando la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico. Sin embargo, su relevancia se intensificó con la aparición del coronavirus SARS-CoV-2, agente etiológico del COVID-19, al identificarse como su principal receptor de entrada a las células humanas. El dominio de unión del virus (RBD) en la proteína Spike reconoce y se acopla específicamente a la ACE2, facilitando la fusión de la membrana viral con la célula huésped (Figura 3). Esta interacción no solo permite la infección, sino que también puede alterar la expresión y función de ACE2,

contribuyendo a la disfunción endotelial, inflamación y daño multiorgánico observado en casos graves de la enfermedad. Por tanto, la ACE2 no solo representa un punto clave en la patogénesis del COVID-19, sino también una diana potencial para estrategias terapéuticas y de prevención (5).

1.6 Dominio de Unión al Receptor (RBD)

El RBD, que abarca aproximadamente los residuos 319 a 541 de la proteína *Spike*, es un antígeno inmunodominante, altamente inmunogénico, y constituye el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes inducidos de forma natural o por vacunación. Además, a pesar de las múltiples mutaciones observadas en las variantes del SARS-CoV-2, el RBD ha demostrado conservar su función estructural y su capacidad de unión a ACE2 (figura 4), lo que lo convierte en un candidato ideal para el diseño de vacunas y terapias dirigidas contra COVID-19 (6).

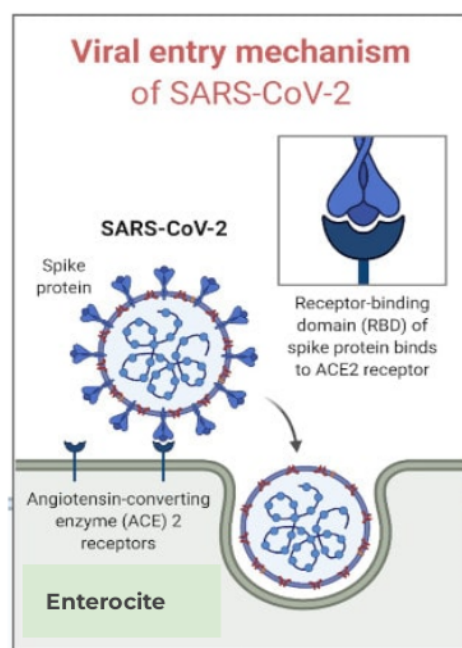


Figura 4. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 en las células del epitelio digestivo a través del receptor

ACE2. La proteína *Spike* del virus se une al receptor ACE2 de la membrana celular mediante interacciones polares, lo que permite la entrada del virus al interior celular por endocitosis. Fuente: Sánchez Gutiérrez M. SARS-CoV-2: una nueva amenaza. Rev Med Hered [Internet]. 2020;31(1):56–64.

1.7 Células susceptibles a la infección por SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 presenta un tropismo celular estrechamente relacionado con la expresión del receptor de entrada ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) y la serina proteasa TMPRSS2, que facilitan la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (7). Las principales células blanco del virus son las células epiteliales del tracto respiratorio, en particular las células ciliadas de la vía aérea superior y las células alveolares tipo II (AT2) en los pulmones. Estas últimas desempeñan funciones críticas en el mantenimiento del epitelio alveolar y la producción de surfactante, y su infección contribuye significativamente al daño pulmonar observado en COVID-19 (7).

Además del sistema respiratorio, el SARS-CoV-2 puede infectar múltiples tipos celulares extrapulmonares debido a la distribución sistémica de ACE2. Entre ellas se encuentran los enterocitos del intestino delgado, los cardiomiocitos, las células epiteliales renales (especialmente del túbulo proximal), las células endoteliales vasculares, y algunas células del sistema nervioso central, incluyendo astrocitos y neuronas (8,9). Esta amplia gama de células susceptibles está en consonancia con la diversidad de manifestaciones clínicas observadas, que abarcan desde síntomas respiratorios hasta complicaciones gastrointestinales, cardiovasculares y neurológicas (10).

1.8 La pandemia de COVID-19

Desde el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2 en diciembre de 2019, se han confirmado más de 775 millones de casos de COVID-19 y aproximadamente 7 millones de defunciones a nivel mundial hasta abril de 2025. A pesar de los avances en vacunación, con más de 13 mil millones de dosis administradas globalmente, el virus ha tenido un impacto sanitario y social sin precedentes (11).

Los signos y síntomas que presentaron los pacientes van desde aquellos leves como fiebre, tos y fatiga, hasta graves como dificultad para respirar y neumonía. Las personas mayores y aquellas con condiciones de salud subyacentes como enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones graves (12).

Además de los problemas de salud que ha generado a la población, la pandemia ha tenido un impacto significativo en la economía global, los sistemas de salud, la educación y la vida cotidiana de las personas (13). Las medidas para contener la propagación del virus, como el uso de cubrebocas, los confinamientos y las restricciones de viaje, llevaron a interrupciones en muchas actividades y servicios, provocando un desequilibrio en la sociedad (14).

En México, la pandemia también dejó una huella significativa, registrando cerca de 7.6 millones de casos confirmados y más de 334,000 muertes, lo que posicionó al país entre los más afectados a nivel regional. Hasta la fecha, se han aplicado más de 223 millones de dosis de vacunas en territorio nacional, lo que ha contribuido a la contención de brotes severos, aunque persiste la vigilancia epidemiológica ante la posible aparición de

nuevas variantes (15). Todos los estados de la república mexicana fueron afectados, pero aquellos con mayor número de casos de COVID-19 fueron la Ciudad de México, el Estado de México, Jalisco y Nuevo León (16).

Durante la semana epidemiológica 10 de 2025 (del 2 al 8 de marzo), México reportó un total de 42,872 casos sospechosos de COVID-19, de los cuales se confirmaron 630 casos, representando el 1.3% del total. Esta cifra muestra una disminución del 88% en comparación con los casos registrados en la misma semana del año anterior. Además, se reportaron 18 defunciones asociadas al virus en este periodo (figura 5).

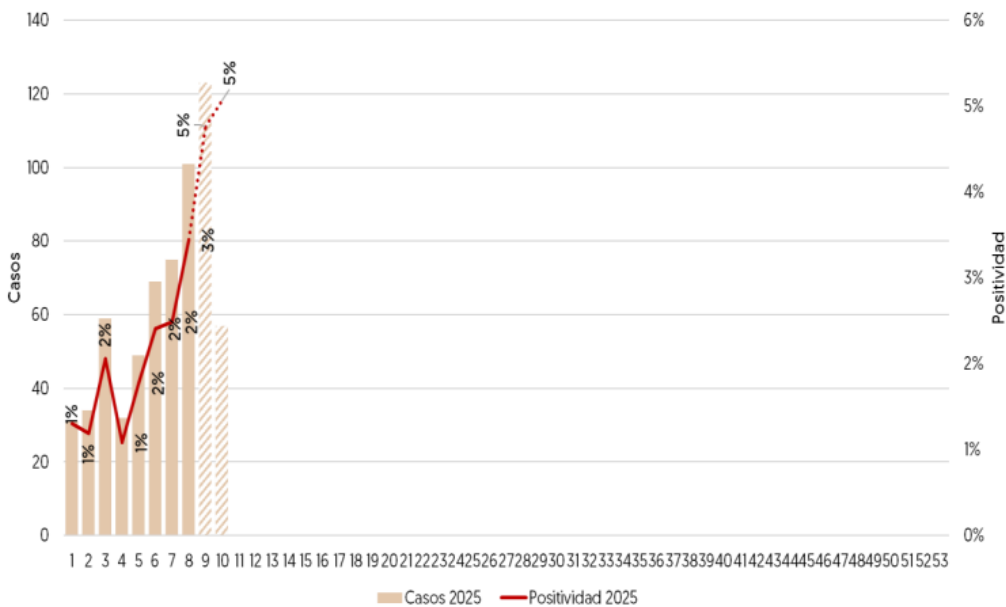


Figura 5. Curva epidémica de casos confirmados y positividad por COVID-19 por semana epidemiológica.
Fuente: SINAVE/DGE/Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad Respiratoria Viral.

El grupo de edad más afectado en lo que va del año corresponde a personas entre 85 y 89 años, con una incidencia del 3.2%, seguido por el grupo de 90 a 94 años, con el

1.64% de los contagios. La mediana de edad de los pacientes es de 39 años, y la distribución por sexo muestra un predominio en mujeres, con un 62.2% de los casos (figura 6).

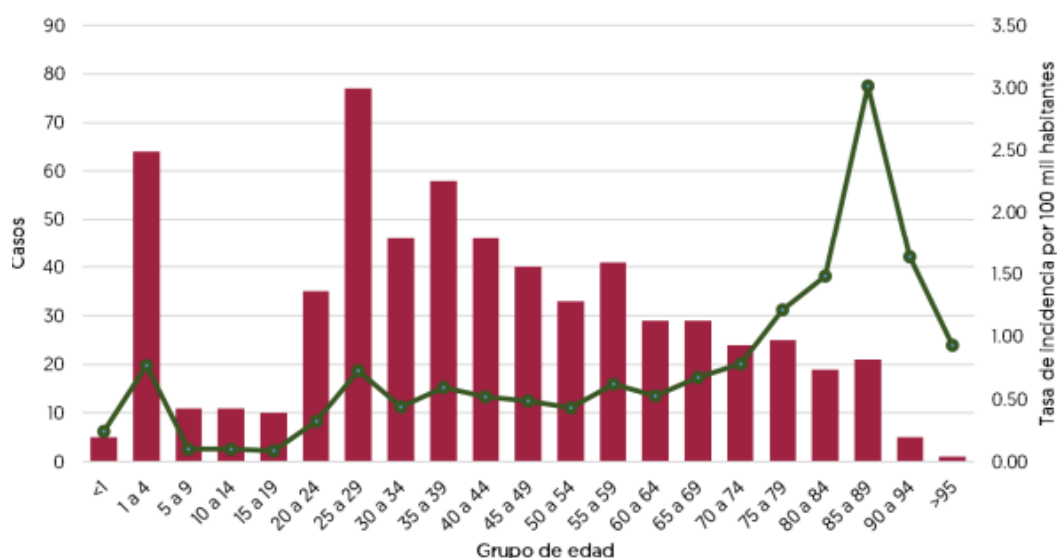


Figura 6. Casos y tasa de incidencia de la COVID-19 según grupo de edad para 2025. Fuente: SINAVE/DGE/Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad Respiratoria Viral.

La vigilancia continua sigue siendo esencial para detectar nuevas variantes de SARS-CoV-2 que puedan surgir y representar nuevos retos en salud pública, especialmente en lo referente a transmisibilidad, escape inmune y severidad clínica. Si bien durante las primeras etapas de la pandemia la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó como variantes de preocupación (VOC) a Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529), la mayoría de estas ya no circulan activamente a nivel mundial, siendo desplazadas por linajes descendientes de Ómicron (17).

Actualmente, todas las variantes relevantes (JN.1, XBB.1.5 y KP.2) son derivadas de

Ómicron, que continúa siendo la base evolutiva dominante del virus desde el año 2022. En cambio, las variantes Lambda (C.37) y Mu (B.1.621), inicialmente clasificadas como variantes de interés (VOI), han sido reclasificadas como variantes previamente monitorizadas debido a su limitada diseminación y pérdida de relevancia epidemiológica (18).

Tabla 1. Variantes de SARS-CoV-2 derivadas de Omicrón, a mayo de 2025.

Variante (linaje Pango)	Clasificación actual	Año de detección	Observaciones
JN.1	Variante de preocupación (VOC)	2023	Variante predominante a nivel mundial. Alta evasión inmune y transmisibilidad.
JN.1.5	Variante de interés (VOI)	2024	Circulación sostenida, evolución continua de JN.1.
XBB. 1.5	Variante de interés (VOI)	2022	Alta transmisibilidad. Prevalente en EE.UU. en 2023.
XBB. 1.16	Variante de interés (VOI)	2023	Aumento de casos pediátricos reportado.
EG. 5	Variante de interés (VOI)	2023	Circulación global moderada.
KP. 2	Variante bajo vigilancia	2024	Diseminación creciente, competidora emergente de JN.1.
BA. 2.86	Variante bajo vigilancia	2023	Alta divergencia, baja circulación actual.

Fuente: WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>

A pesar de la continua aparición de nuevas variantes, muchas de las mutaciones en la proteína *Spike*, aunque favorecen la evasión inmunológica, no han afectado de forma crítica la estructura del dominio de unión al receptor (RBD). Esto ha permitido que dicho dominio siga siendo una diana inmunogénica confiable para el diseño de vacunas y anticuerpos neutralizantes, manteniendo su valor como blanco terapéutico (19).

1.9 Vacunas actuales contra COVID-19

Actualmente están disponibles varias vacunas para las que numerosos países han concedido autorizaciones de uso de emergencia con el fin de lograr una vacunación masiva mundial (Tabla 2). Las vacunas fueron consideradas en su momento como innovadoras y fueron parte crucial para poder contener la pandemia, se desarrollaron diversos tipos de vacunas como las de tipo ARN, de tipo vector viral, con base en proteínas y de virus inactivado (20).

Tabla 2. Comparación de vacunas contra COVID-19.

Fabricante	Tipo	Dosis	Almacenaje
 Oxford Uni-AstraZeneca	Vector viral (virus genéticamente modificado)	2 	 Entre 2 y 8 grados (6 meses)
 Moderna	ARN (Parte del código genético del virus)	2 	 Entre -25 y -15 grados (7 meses)
 Pfizer-BioNTech	ARN	2 	 Entre -80 y -60 grados (6 meses)
 Gamaleya (Sputnik V)	Vector viral	2 	 -18,5 grados (en forma líquida) Entre 2 y 8 grados (Forma seca)
 Sinovac (CoronaVac)	Virus inactivo	2 	 Entre 2 y 8 grados
 Novavax	A base de proteína	x2 	 Entre 2 y 8 grados
 Janssen	Vector viral	x1 	 Entre 2 y 8 grados (3 meses)

Fuente: Gobierno de Reino Unido, Reuters

BBC

Fuente: BBC, Gobierno de Reino Unido, Reuters.

Sin embargo, estas vacunas no están exentas de efectos adversos, los cuales suelen ser poco frecuentes, pero los efectos adversos considerados graves suelen requerir atención médica. En los últimos años se han documentado diversos efectos neurológicos como el Síndrome de *Guillain Barré*, parálisis facial de Bell, mielitis transversa, así como

enfermedades cardiacas como miocarditis y pericarditis, y trombosis con trombocitopenia (21), todos ellos producidos después de la vacunación con vacunas de tipo ARN como *Pfizer* y *Moderna*, y de tipo vector viral, como *Astrazeneca*, la cual ya ha reconocido que sus vacunas producen estos efectos adversos; y como la vacuna de *Jonhson & Jonhson/Jansen*, la cual ya ha sido retirada del mercado por esta misma razón (Tabla 3) (22).

Tabla 3. Efectos adversos documentados después de la administración de vacunas inyectables contra COVID-19.

Efecto adverso	Vacuna	Núm.de casos/ Vacunados
Síndrome de Guillain-Barré	-J&J/Janssen	1 / 23,000
Parálisis facial de Bell	-Pfizer/BioNTech -Moderna	7 /37,000
	-J&J/Janssen	3 /37,000
Mielitis transversa	Oxford-AstraZeneca	1/ 11,636
Miocarditis y Pericarditis	-Pfizer/BioNTech -Moderna	224/ 6.9 millones
Trombosis con trombocitopenia	-J&J/Janssen	12/ 7 millones

Fuentes: Castillo E, *et al.* Manifestaciones neurológicas asociadas a la vacuna contra COVID-19. Neurología. 2022 Oct 12. Spanish.

See I, *et al.* US case reports of cerebral venous sinus thrombosis with thrombocytopenia after Ad26.COV2.S vaccination, March to April 2021. JAMA. 2021;325(24):2448–56.

Goddard K, Hanson KE, Lewis N, *et al.* Incidence of myocarditis/pericarditis following mRNA COVID-19 vaccination among children and younger adults in the United States. Ann Intern Med. 2022;175(7):1007–15.

1.10 Vacunas orales

En el desarrollo de éstas vacunas, solo se tomaron en cuenta a las vacunas inyectables, dejando de lado a las vacunas orales, las cuales son consideradas como un modo atractivo de inmunización, ya que suelen ser aceptadas por la población al no ser invasivas; además, son simples de administrar, ya que no se requiere de personal profesional para su administración, no generan Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), y son menos costosas, por lo que son adecuadas para la administración masiva (23). Por otro lado, se ha documentado que inducen una inmunidad protectora, por medio de la generación de anticuerpos neutralizantes producidos en las superficies mucosas y a nivel sistémico, en donde se observa la producción de IgG e IgA específicas, así como también la inducción de una respuesta inmune celular, como respuestas Th1 y Th17 (24).

Algunos ejemplos de vacunas orales que han tenido relevancia son la vacuna contra la Polio, con virus vivos atenuados que inducen inmunidad intestinal y sistémica y las vacunas Rotarix y RotaTeq (Tabla 4), que protegen contra el rotavirus induciendo una fuerte respuesta inmunitaria en el tracto gastrointestinal (25). Sin embargo, en la actualidad no hay vacunas orales contra COVID-19 en uso a nivel global.

Tabla 4. Vacunas orales que forman parte del esquema nacional de vacunación de México.

Vacuna	Nombre comercial	Tipo de Vacuna	Edad de Aplicación	Dosis oral
Polio (OPV)	Sabin	Virus vivo atenuado	6, 18 meses y durante campañas	0.1 mL (2 gotas)
Rotavirus (pentavalente)	RotaTeq®	Virus vivo atenuado recombinante	2, 4 y 6 meses	2 mL Tres dosis
Rotavirus (monovalente)	Rotarix®	Virus vivo atenuado	2 y 4 meses	1.5 mL Dos dosis

Fuente: Secretaría de Salud. (2023). Esquema de vacunación universal. Gobierno de México.

<https://www.gob.mx/salud/articulos/esquema-de-vacunacion>

Este tipo de vacunas, al ser administradas por vía oral, interactúan directamente con el sistema inmunológico asociado a mucosas (GALT), lo que permite la inducción de una respuesta inmune preferentemente en el intestino y facilita la activación de mecanismos inmunológicos clave para la protección frente a patógenos entéricos.

1.11 Mecanismos inmunológicos de la mucosa intestinal

El sistema inmunológico asociado a mucosas, conocido como GALT, desempeña un papel importante en la respuesta inmune inducida por inmunización oral. Las células M especializadas del epitelio intestinal transportan antígenos desde la luz intestinal hacia las placas de Peyer y otros tejidos linfoides asociados, donde son procesados por células dendríticas. Estas células se encargan de presentar los antígenos a los linfocitos T

cooperadores, que posteriormente activan a los linfocitos B, promoviendo su diferenciación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas tales como IgM, IgG y predominando IgA (Figura 7) (26).

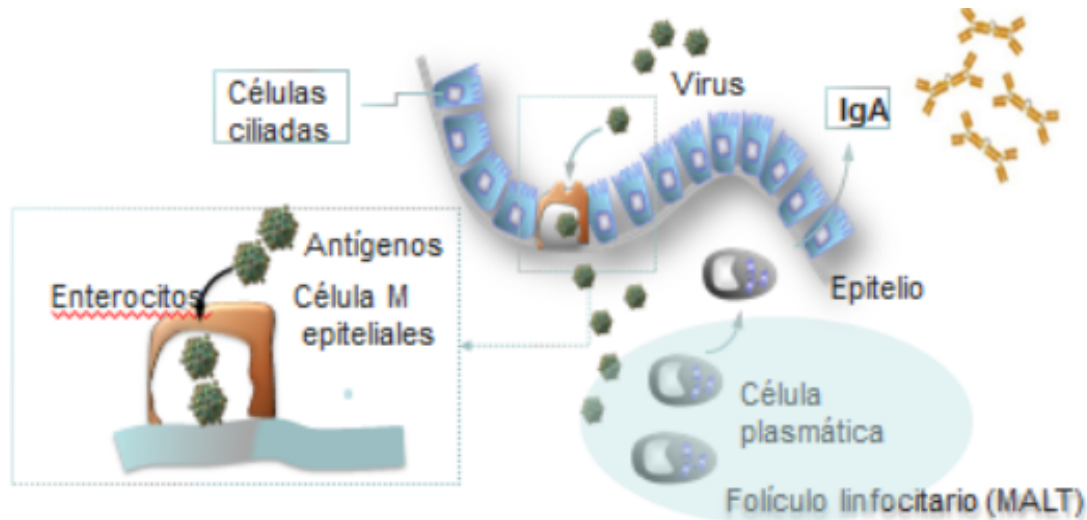


Figura 7. Infección de epitelios mucosales por SARS-CoV-2 y activación de la respuesta inmune mucosal. Representación de la infección por SARS-CoV-2 en células epiteliales de mucosas respiratorias e intestinales. El virus puede ingresar a través de células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio y enterocitos intestinales, facilitado por células M que transfieren antígenos al tejido linfático asociado a mucosas (MALT). Esta interacción induce la activación de células plasmáticas que secretan inmunoglobulina A (IgA), la cual se transporta al lumen para neutralizar partículas virales y limitar su propagación. Fuente: Inmunosalud. Asociación progreso inmunología. Inmunosalud.net

1.12 IgA secretora

Una de las principales inmunoglobulinas generadas en la mucosa intestinal es la IgA secretora (sIgA), la cual desempeña una función clave en la inmunidad. La sIgA se secreta hacia la luz intestinal, donde se encarga de neutralizar toxinas, virus y bacterias sin inducir inflamación. Esta inmunoglobulina impide la adherencia e invasión de patógenos en el

epitelio intestinal, bloqueando su replicación y facilitando su eliminación. La inducción eficaz de IgA mediante vacunas orales representa una ventaja importante, ya que proporciona inmunidad localizada en el sitio de entrada de muchos patógenos respiratorios y entéricos, como SARS-CoV-2 (26,27).

La IgA en humanos, también se encuentra en forma de IgA1 e IgA2, siendo la IgA1 más abundante en suero y secreciones, mientras que la IgA2 predomina en las mucosas. Ambas subclases tienen funciones complementarias en la neutralización de patógenos, siendo la IgA2 la más eficiente en el tracto gastrointestinal (28).

1.13 Inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA

La inmunización oral puede inducir respuestas inmunológicas tanto a nivel de las mucosas como a nivel sistémico. A nivel sistémico, una de las respuestas más relevantes es la producción de inmunoglobulinas en el suero, principalmente IgM, IgG e IgA (Tabla 5). Cada una de estas inmunoglobulinas cumple funciones cruciales en la defensa contra patógenos, y su distribución y afinidad por los antígenos varía dependiendo del tipo de respuesta inmune involucrada.

La IgM es la primera inmunoglobulina que se produce en una respuesta primaria, actúa como un marcador de la exposición inicial al antígeno. Se produce principalmente en la fase temprana de la respuesta inmune, donde su función principal es la activación del sistema del complemento, la neutralización de patógenos y la promoción de la fagocitosis mediante la activación del complemento (29).

La IgG es la inmunoglobulina predominante en la respuesta secundaria y es clave en la protección a largo plazo. La producción de IgG sigue a la IgM durante la respuesta inmune primaria y se produce en grandes cantidades durante la exposición repetida a un patógeno o antígeno. Esta inmunoglobulina tiene una alta afinidad por el antígeno, lo que le permite neutralizar patógenos más eficazmente, además de activar el sistema del complemento y facilitar la fagocitosis a través de receptores Fc (30). En términos de protección duradera, la IgG es un marcador importante de la memoria inmunológica, ya que sus niveles elevados indican que el sistema inmunológico ha "aprendido" a reconocer y combatir el patógeno de manera más eficiente con el tiempo.

En el suero, la IgA (aunque en menor cantidad que en las mucosas) contribuye a la respuesta inmune frente a patógenos en circulación, pero su principal función sigue siendo la protección en las superficies mucosas. En su forma sérica, la IgA se encuentra principalmente en forma monomérica, mientras que en las mucosas es predominantemente dimerizada, lo que facilita su transporte a través de las células epiteliales (31).

La IgA se encuentra en suero en niveles más bajos en comparación con IgG, pero su función sigue siendo relevante para la respuesta inmune sistémica. La IgA en suero es capaz de neutralizar ciertos patógenos y colaborar con las otras inmunoglobulinas en la defensa general del organismo (31).

Tabla 5. Características generales de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA.

	IgM	IgG	IgA
Forma principal	Pentámero	Monómero	Monómero (suero) / Dímero (mucosas)
Abundancia relativa	Primera en respuesta inmune (~10%)	Mayoritaria en suero (~70–75%)	Principal en secreciones (~15%)
Función principal	Activación del complemento, respuesta primaria	Opsonización, activación del complemento, neutralización de toxinas y virus	Inmunidad mucosa, neutralización
Tiempo de aparición	Respuesta primaria (temprana)	Respuesta secundaria (tardía)	Predomina en mucosas tras exposición repetida
Presente en mucosas	No	No principalmente	Si

1.14 Subclases de IgG

Por otro lado, la IgG en los mamíferos se divide en varias subclases, que desempeñan roles específicos en la respuesta inmune (Tabla 6), la IgG1 está asociada con una respuesta inmune de tipo Th2, favoreciendo una respuesta humoral mediada por células B la cual es importante en la defensa contra patógenos extracelulares, como bacterias y parásitos (32).

La subclase IgG2a en ratones está particularmente asociada con la respuesta inmune

de tipo Th1. La cual es crucial en la defensa contra infecciones virales e intracelulares, como las causadas por SARS-CoV-2, y se encuentra involucrada en la eliminación de patógenos intracelulares (32). En ratones BALB/c, la IgG2a juega un papel fundamental en la activación de la fagocitosis mediada por macrófagos y en la eliminación de patógenos virales. En estudios con ratones BALB/c, la respuesta inmune frente a ciertos antígenos depende en gran medida de la producción de IgG2a, lo que destaca su relevancia en la respuesta inmune en este modelo animal.

Aunque menos estudiada que las anteriores, la IgG2b se asocia con la defensa frente a patógenos extracelulares. En ratones BALB/c, esta subclase también contribuye a la neutralización de patógenos y a la activación del complemento, aunque en menor medida que IgG1 e IgG2a (33).

La subclase IgG3 es particularmente eficiente en la activación del sistema del complemento, lo que la hace esencial en la defensa frente a ciertos patógenos, especialmente en modelos murinos como el de los ratones BALB/c (32,33). La IgG3 tiene un papel importante en la protección contra infecciones virales y bacterianas a través de la facilitación de la lisis de los patógenos por el complemento. Aunque su contribución es menos destacada en ratones BALB/c en comparación con IgG2a, sigue siendo importante en la respuesta inmune general.

Tabla 6. Características de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) en ratones BALB/c.

Subclase de IgG	Función principal	Respuesta Th	Tipo de respuesta dirigida	Relación con respuesta celular
IgG1	Neutralización, contra proteínas solubles	Th2 (IL-4)	Respuesta humoral (alérgenos, helmintos)	Baja participación en respuesta celular, se asocia más a inmunidad humoral.
IgG2a	Opsonización, Citotoxicidad mediada por células, complemento	Th1 (IFN- γ)	Respuesta celular (virus, bacterias intracelulares)	Alta implicación en respuesta celular, activa células citotóxicas y fagocitos.
IgG2b	Complemento, citotoxicidad	Th1/Th2 mixto	Respuesta balanceada (infecciones mixtas)	Participa tanto en respuesta humoral como celular, modulación equilibrada.
IgG3	Aglutinación, fuerte activación del complemento	No definida	Respuesta contra polisacáridos bacterianos	Poca implicación directa en respuesta celular, más importante en neutralización extracelular.

1.15 Vacunas orales con base en acarreadores biológicos

Así mismo, existen las vacunas orales con base en acarreadores biológicos, las cuales son consideradas una innovación interesante en la vacunación, donde se emplean organismos vivos o componentes biológicos como vectores para llevar antígenos al sistema inmunológico del huésped (34). Estos acarreadores pueden ser bacterias, virus, levaduras, o incluso material biológico derivados de plantas. Actualmente la mayoría de vacunas de este tipo han sido estudiadas en modelos animales, algunos ejemplos de acarreadores biológicos en modelo animal son *Bacillus subtilis* que expresa una proteína multi-epítpe

del rotavirus en modelo murino (34), *B. subtilis* expresando el gen HA contra el virus de la influenza H5N1 (35), *Lactobacillus plantarum* que expresa la proteína *Spike* del virus SARS-CoV2 en modelo murino (36), así como aquellos con base en levaduras, siendo la más común *Saccharomyces cerevisiae*.

1.16 Yeast display

Para lograr el desarrollo de las vacunas orales a base de levaduras, se pretende el uso de la técnica de ingeniería genética conocida como *yeast display*, que permite la expresión de proteínas recombinantes en la superficie celular de las levaduras. En el contexto de vacunas orales, esta tecnología permite presentar antígenos virales de interés, como el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2, directamente en la membrana de levaduras como *Pichia pastoris*, transformándolas en acarreadores biológicos inmunológicamente activos (37).

El sistema se basa en la fusión genética del antígeno con una proteína de anclaje que se incorpora de forma natural a la pared celular de la levadura. Una de las proteínas de anclaje más utilizadas es la región C-terminal de la α -aglutinina de *Saccharomyces cerevisiae*, que contiene dominios de anclaje tipo GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Figura 8), los cuales dirigen la proteína recombinante hacia la membrana plasmática, permitiendo su exposición en la superficie celular (38). Esto le da la capacidad a cada célula de levadura de poder presentar copias del antígeno en su superficie, manteniéndolo en su conformación nativa y aumentando su inmunogenicidad (39).

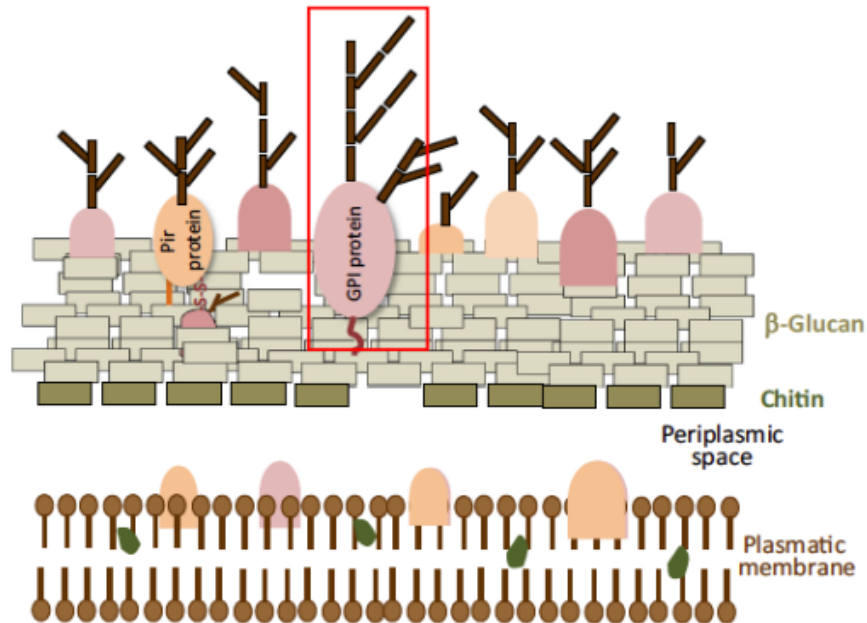


Figura 8. Pared celular de *Pichia pastoris* y el sistema de *yeast display* utilizado para la presentación antigénica. Las proteínas recombinantes pueden anclarse a la superficie celular mediante dominios de anclaje GPI, permitiendo su exposición sobre la matriz de β -glucanos y quitina. Este sistema permite mostrar antígenos en la superficie de la levadura, favoreciendo su reconocimiento por el sistema inmune tras la administración oral como plataforma vacunal.

1.17 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris (*Komagataella phaffii*) es una levadura metilotrófica ampliamente utilizada en biotecnología para la producción de proteínas recombinantes. Presenta diversas ventajas como un crecimiento rápido y se puede cultivar en medios simples y económicos (40,41). Además, puede crecer tanto en condiciones aeróbicas estrictas como en presencia de metanol como única fuente de carbono, lo que ha sido aprovechado mediante promotores fuertes como AOX1 para inducir de forma controlada la expresión de genes heterólogos (42). Su perfil de seguridad es positivo, ya que no produce endotoxinas y ha sido clasificada como un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la

FDA, lo que la hace adecuada para aplicaciones farmacológicas en salud humana y animal (43).

1.18 Pichia pastoris como acarreador biológico

Por lo anterior, nuestro equipo de trabajo propone como alternativa el desarrollo de una vacuna oral en *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), esta levadura es capaz de funcionar como una plataforma prometedora para el desarrollo de vacunas recombinantes, particularmente por vía oral. Gracias a su pared celular que está compuesta por β -glucanos, mananos y quitina, *P. pastoris* puede proteger antígenos recombinantes de la degradación gastrointestinal, permitiendo su liberación progresiva y exposición al sistema inmunitario en el intestino (44). Mediante tecnologías como el *yeast display*, *P. pastoris* puede anclar antígenos de interés en su superficie, favoreciendo el reconocimiento por células presentadoras de antígeno (45). En modelos aviares como pollos, y en mamíferos como ratones y cerdos, se ha demostrado que su administración oral puede inducir una respuesta inmune en mucosas (IgA) y sistémicas (IgG), sin causar efectos adversos (46–48). Por ello, *P. pastoris* se perfila como un acarreador biológico eficiente, seguro y versátil para vacunas orales dirigidas contra diversas enfermedades infecciosas, con potencial para aplicaciones tanto en medicina veterinaria como humana.

1.19 Evaluación preclínica en modelo murino

Los modelos murinos, como los ratones BALB/c, son ampliamente utilizados en la investigación preclínica por su característico sistema inmune, su bajo costo y disponibilidad. Estos modelos permiten estudiar la inmunogenicidad de vacunas experimentales, la producción de anticuerpos específicos (IgG, IgM, IgA) y la activación

de subtipos celulares. En el contexto de vacunas orales con acarreadores biológicos, permiten evaluar la respuesta inmune sistémica y a nivel de mucosas, así como el tránsito y eliminación del vector vacunal por vía digestiva (49). Se suelen utilizar ratones hembras debido a su comportamiento social más estable y menor agresividad comparado con los machos, lo cual facilita su manejo en estudios grupales, y se minimiza el estrés asociado al entorno experimental. Además, diversos estudios han demostrado que las hembras presentan respuestas inmunológicas robustas y consistentes, siendo adecuadas para evaluar la inmunogenicidad de vacunas en condiciones controladas (50).

2. ANTECEDENTES

Wang y colaboradores en el 2007 desarrollaron un vector para la presentación de proteínas heterólogas en la superficie celular de *P. pastoris* utilizando la mitad C-terminal de la alfa-aglutinina de *S. cerevisiae* como anclaje de membrana. Para comprobar la funcionalidad de este sistema de expresión, se utilizó como proteína modelo la proteína verde fluorescente (GFP), con el objetivo de observar si era correctamente dirigida y anclada a la superficie celular de la levadura recombinante. En la imagen de fluorescencia (Figura 9), se observa que las células de levadura transformadas con el vector GPI-GFP presentan fluorescencia localizada en la pared celular, lo que indica una expresión exitosa. Por el contrario, las células control (sin GFP) no presentan señal fluorescente. Este experimento demostró que el sistema basado en GPI (glicosilfosfatidilinositol) permite la exposición eficiente de proteínas en la pared celular de *P. pastoris*, lo cual representa una estrategia útil para aplicaciones en biotecnología, incluyendo vacunas orales y presentación antigénica superficial (51).

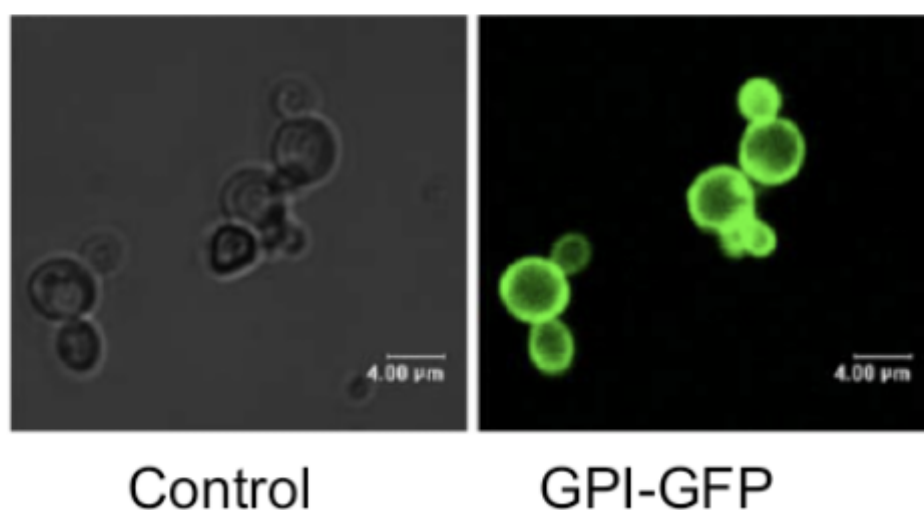


Figura 9. Expresión de GFP en la pared celular de *Pichia pastoris* mediante anclaje GPI. Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran a *P. pastoris* sin transformación (Control, izquierda) y a la

levadura transformada con el vector GPI-GFP (derecha). La fluorescencia en la pared celular de la levadura recombinante indica la correcta localización de GFP, así como la funcionalidad correcta de este sistema *yeast display*. Fuente: Wang et. al. (2007).

Actualmente existen algunas vacunas orales a base de levaduras empleando la técnica *yeast display*, aunque la mayoría de ellas son empleando *S. cerevisiae*, ya que es una levadura ampliamente estudiada (52-54), también existen vacunas a base de *P. pastoris* (55-57). Es importante mencionar que estas vacunas orales a base de levaduras son de uso veterinario y se han documentado buenos resultados.

Como antecedente de este proyecto nuestro equipo de trabajo desarrolló por medio de la técnica *yeast display*, una levadura recombinante de *P. pastoris* que expresa el dominio RBD del virus SARS-CoV2 en su membrana (*PpRBD-CoV2*) como parte del proyecto CONACyT #312185: *Generación de un vehículo de vacunación por despliegue en levaduras de la proteína S del coronavirus SARS-CoV2*, a partir de un plásmido comercial (pCMV3-ORF), el cual contiene la secuencia codificante del dominio RBD de la proteína *Spike* del coronavirus SARS-CoV-2, se obtuvo el gen para su expresión. Este gen fue posteriormente subclonado en el plásmido de expresión constitutiva pGAPZ α , generando una construcción de fusión con la secuencia de anclaje a membrana derivada de la alfa-aglutinina de *S. cerevisiae* (Figura 10).

La Figura 10 muestra por un lado el plásmido comercial pCMV3-ORF que contiene el gen sintético del RBD bajo el control del promotor citomegalovirus (CMV), y por otro lado una representación estructural tridimensional del dominio RBD de la proteína *Spike*. En esta estructura se identifican residuos clave involucrados en la unión al receptor

ACE2, principalmente en el segmento RBD del subdominio S1, destacándose mutaciones frecuentes como N501, E484 y K417, asociadas con mayor afinidad y evasión inmunológica.

**SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike RBD Gene
ORF cDNA clone expression plasmid (Codon
Optimized)**

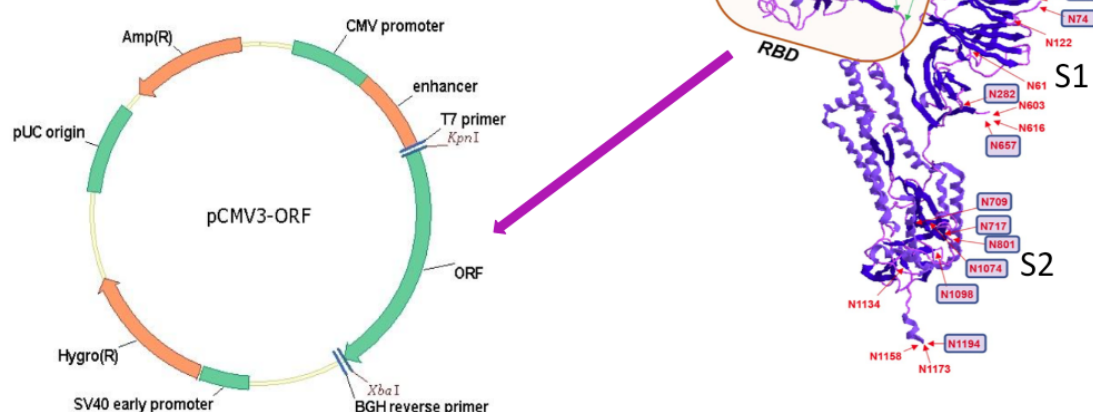


Figura 10. Esquema de la estrategia de clonación y visualización estructural del dominio RBD.

A la izquierda, se muestra el plásmido comercial pCMV3-ORF, que contiene el gen del dominio RBD del SARS-CoV-2. A la derecha, se observa una representación estructural tridimensional del dominio RBD de la proteína *Spike* (subunidad S1) donde se destacan residuos críticos para su interacción con el receptor ACE2 y su relevancia inmunológica.

Una vez subclonado el gen RBD en el plásmido pGAPZ α , se generó una construcción recombinante con el dominio RBD fusionado a la región de anclaje GPI de la alfa-aglutinina. Esta construcción permite la expresión de RBD en la pared celular de *P. pastoris*, bajo el control del promotor GAP constitutivo (Figura 11).

levadura recombinante expresa correctamente el dominio RBD en su membrana externa, haciéndola una potencial plataforma para estudios inmunológicos o desarrollo de vacunas orales.

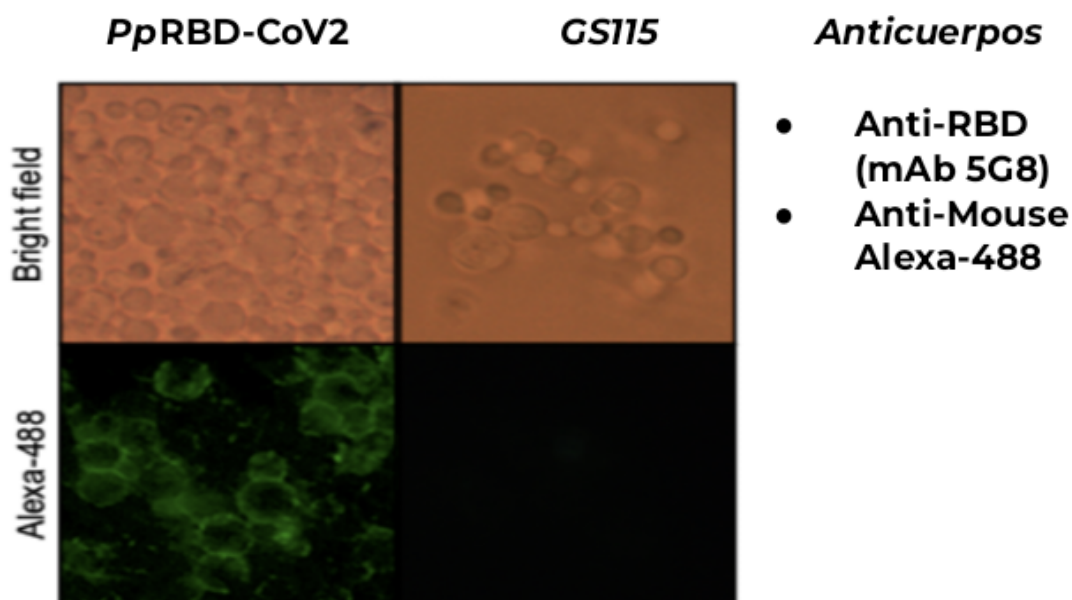


Figura 12. Detección por inmunofluorescencia indirecta de la expresión superficial del dominio RBD en la levadura *Pichia pastoris* recombinante (PpRBD-CoV2). La figura muestra campos de luz visible (bright field) y fluorescencia (Alexa-488) para la cepa recombinante PpRBD-CoV2 y la cepa control GS115. La fluorescencia observada únicamente en la levadura recombinante indica la unión del anticuerpo anti-RBD y su detección mediante un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488, lo que confirma la expresión del dominio RBD en la superficie celular.

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de vacunas orales contra COVID-19 es relevante para proporcionar una alternativa más accesible y manejable, en respuesta a las dificultades asociadas con las vacunas actuales. En este sentido este proyecto pretende evaluar si el candidato a vacuna *PpRBD-CoV2* administrado por vía oral en modelo murino puede inducir una respuesta de anticuerpos específicos contra la proteína RBD del virus SARS-CoV-2.

4. HIPÓTESIS

El uso de *Pichia pastoris* como acarreador biológico del antígeno RBD de SARS-CoV2 (*PpRBD-CoV2*) inducirá una respuesta inmune humoral específica que podrá ser detectable mediante ensayos de ELISA.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar el perfil de la respuesta inmune humoral anti-SARS-CoV-2 en modelo murino generado por la administración oral del antígeno RBD expresado mediante *yeast display* en la levadura *Pichia pastoris*.

5.2 Objetivos específicos:

1. Cuantificar la carga fúngica en heces de ratones BALB/c inmunizados por vía oral con la levadura *PpRBD-CoV2*.
2. Determinar el título del antisuero (IgG, IgM e IgA) de los ratones inmunizados empleando proteína RBD comercial en ensayos de ELISA.
3. Identificar la subclase de inmunoglobulinas de clase IgG en los ratones inmunizados empleando proteína RBD comercial en ensayos de ELISA.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

Ratones BALB/c hembras de 5 a 7 semanas de edad fueron divididos en 4 grupos experimentales de 7 ratones cada uno: grupo control (solución salina), grupo GS115 (levadura *wild type*), grupo PpRBD-CoV2 (levadura recombinante) y grupo PpRBD-CoV2 NV (levadura recombinante inactivada (No Viable)). Los grupos de ratones se mantuvieron en jaulas de microaislamiento con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y con alimento y agua esterilizados *ad libitum*. El cuidado, mantenimiento y manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 con las condiciones de la licencia del gobierno mexicano para la experimentación animal y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigación con Animales de Laboratorio (Comisión de Ciencias de la Vida, Consejo Nacional de Investigación) (Número de aprobación del comité de ética: MB24-00004).

6.2 Reactivación de las cepas GS115 y PpRBDCoV-2

Las cepas GS115 (*wild type*) y PpRBDCoV-2 (*Pichia pastoris* recombinante) almacenadas en viales a -70°C se descongelaron en hielo y se reactivaron en 2 mL de caldo YPD por 48 horas a 30°C en agitación constante a 200 rpm (*Labnet, Benchtop Shaking Incubator 222DS*). Posteriormente, con un asa metálica se sembró en placas petri con medio YPD (Extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 111 mM), se incubaron a 30°C hasta observar colonias.

6.3 Amplificación del fragmento RBD en la levadura PpRBD-CoV2 por PCR de colonias

Para obtener el ADN de las levaduras recombinantes, se realizó un PCR de colonias, se tomó una colonia de levadura usando una punta de micropipeta estéril (cuidando no tomar demasiada biomasa, ni agar) y se colocó en 50 µl de agua destilada en un microtubo y se agitó suavemente para suspender las células en el agua. Se realizó el siguiente ciclo por triplicado: 98°C por 8 minutos en termociclador y posteriormente en hielo por 30 segundos. Para la mezcla de la reacción PCR se mezclaron los siguientes componentes (*Bioline*, *MyTaq*): buffer de reacción, 200 uM de cada nucleótido de dNTPs, 0.1-0.5 uM de cada primer (sentido y antisentido), 1-2.5 unidades por reacción de taq polimerasa (*Bioline*, *MyTaq*), 2-5 uL del sobrenadante de la muestra de células lisadas por calor y por último se agregó agua destilada hasta un volumen final de 20-50 µl. La amplificación del fragmento de 735 pb se llevó a cabo utilizando el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 65°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Para la extensión final 72°C por 5 minutos. La electroforesis del fragmento se llevó a cabo empleando 10 µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1% y el marcador de peso molecular de 1Kb (*Invitrogen*). Al finalizar la electroforesis el gel se visualizó bajo luz UV tras teñir con bromuro de etidio. Los oligonucleótidos empleados se muestran a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento RBD mediante PCR de colonias

Clave	Secuencia	Fragmento
Sc2-RBD-F	5'- tat ctc tcg aga aaa gag agg ctg aag cta tga ggg tcc aac caa cag aga gca-3'	54 bp
Sc2-RBD-R	5'- tgt tct aga aag ctg gcg aag ttc aca cac ttg ttc ttc ac-3'	41 bp

6.4 Administración del inóculo de *Pichia pastoris*

Se tomó una colonia de cada placa de agar de ambas cepas, se resuspendió en 2 mL de medio YPD líquido en y se incubó a 30° C en una incu-shaker (*Labnet, Benchtop Shaking Incubator 222DS*) por 48 horas para después vertir esos 2 mL de cultivo en 50 mL de medio YPD en matraces de 250 mL, se incubaron por 48 horas en agitación y se centrifugaron a 7,500 rpm por 8 minutos con el fin de recuperar el pellet y desechar el medio. El pellet se resuspendió en 25 mL de solución salina estéril y se calculó la cantidad de biomasa y solución salina que se agrega para ajustar el inóculo a la concentración deseada. El inóculo se ajustó a 1×10^8 para los grupos GS115, PpRBD-CoV2 y NV, utilizando la escala de 10 unidades de McFarland empleando un densitómetro (*Biosan, DEN 1-B*). La levadura PpRBD-CoV2 NV se inactivó con calor a 61°C por 1 hora empleando una placa de calentamiento.

6.5 Cinética de expulsión de *Pichia pastoris* GS115 y PpRBD-CoV2

Los ratones de los grupos GS115, PpRBD-CoV2 y NV fueron anestesiados con 50uL vía intraperitoneal con una solución de ketamina/xilacina (80/120 mg/g de peso

corporal, respectivamente). Una vez anestesiados, se administró vía oral 100 uL de bicarbonato de sodio al 10% empleando una cánula esteril (*Cadence Science*, 7910, medidas: 20G X 1.5). Pasados 30 minutos se administró vía oral el inóculo de 1×10^8 células viables de la levadura wild type al grupo GS115, 1×10^8 células viables de la levadura recombinante al grupo PpRBD-CoV2, 1×10^8 células no viables de la levadura recombinante al grupo PpRBD-CoV2 NV y al grupo control solo se le administró el vehículo (solución salina). A partir del día 2 se recolectaron cada 2 días muestras fecales de los ratones en tubos estériles (Figura 13), se pesaron y se resuspendieron en PBS 1X con ampicilina y estreptomicina (100ug/mL) a 4°C por 1 hora, para después realizar diluciones 1:10 y 1:100. Posteriormente se sembraron 100 uL en agar Sabouraud con ampicilina y estreptomicina (100ug/mL) a 30° C toda la noche. Después de 48 horas se cuantificaron las colonias en las placas, se determinaron las UFC multiplicando las colonias contadas por el factor de dilución, las UFC obtenidas se multiplican por 1 gramo y se dividen por la cantidad de gramos obtenidos de las heces y así obtener las UFC/g de heces.

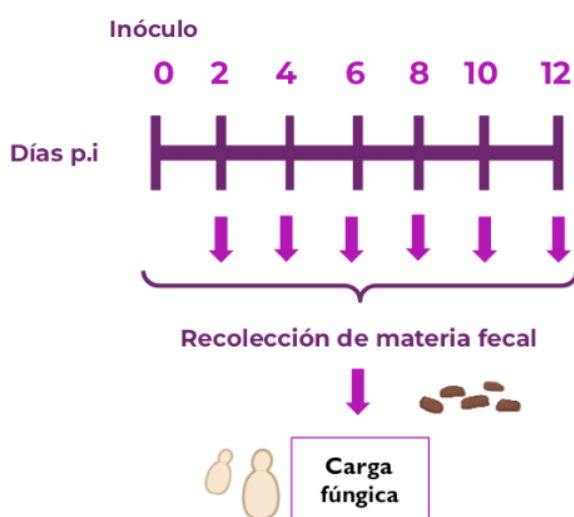


Figura 13. Esquema de recolección de materia fecal en ratones inmunizados.

6.6 Esquema de inmunización

Treinta minutos antes de cada inmunización a los animales se les administró vía oral con una cánula esofágica, una solución de NaHCO₃ al 10% con el fin de neutralizar el pH estomacal. Los inóculos de la levadura ajustados con solución salina a 1×10^8 se administraron vía oral con la cánula, y los días 8, 15, 22 y 36 se administraron los refuerzos de la inmunización.

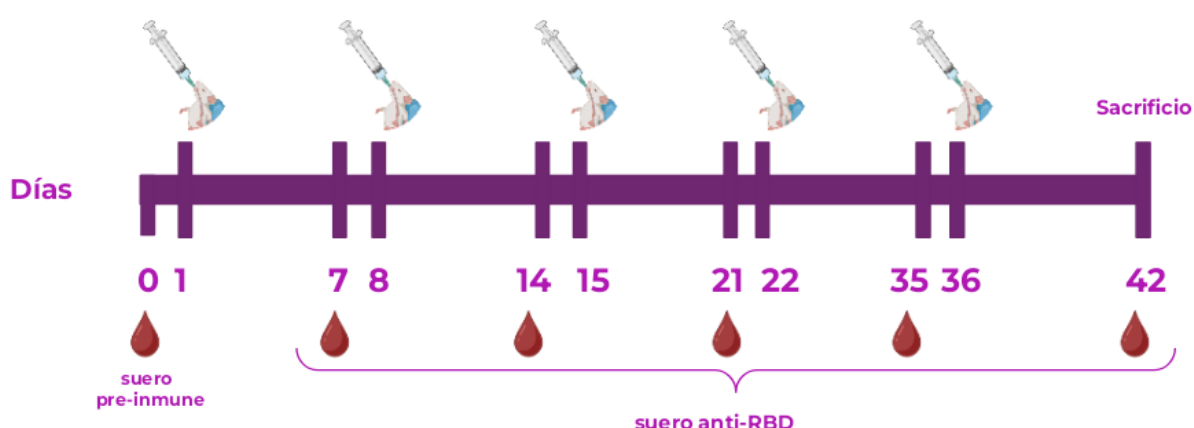


Figura 14. Esquema de inmunización

6.7 Obtención de muestras sanguíneas por punción submandibular

El suero pre-inmune se obtuvo tomando muestras sanguíneas de los animales de los 4 grupos antes de iniciar el esquema de inmunización. Las muestras sanguíneas de los diferentes grupos de animales se obtuvieron 24 hrs antes de cada inmunización, lo que corresponden a los días 7, 14, 21 y 35. Para ello, la vena maxilar que se encuentra en la región entre el ojo y la base de la oreja del ratón se limpió con alcohol al 70% empleando un cotonete estéril. Una vez que se evaporó el alcohol se procedió a aplicar vaselina esteril con un cotonete en la zona de interés y con una lanceta se realizó la punción junto al ángulo caudal mandibular y se colectó la sangre por capilaridad en un tubo eppendorf de

1.5 mL. Después de la recolección se untó nuevamente vaselina en el sitio de punción para detener el sangrado y se mantuvo en observación al ratón durante unos minutos para asegurar que el sangrado se detuvo y el animal se recuperara adecuadamente. Finalmente al día 42 post-inmunización se administró una anestesia profunda a los ratones con el fin de realizar un sangrado a blanco, el cual consiste en la punción cardiaca del ratón, con el fin de obtener la mayor cantidad de sangre posible y poder analizar a esa temporalidad el suero.

6.8 Obtención del suero

Las muestras de sangre obtenidas de los diferentes grupos de ratones se centrifugaron a 2,500 rpm, se separó el suero en microtubos estériles, y se almacenaron a corto plazo a 4°C y a largo plazo -20°C hasta su uso.

6.9 ELISA indirecto para detección de IgG-HRP

Para la cuantificación de los anticuerpos IgG anti-RBD específicos en suero de ratones inmunizados con la levadura recombinante PpRBD-CoV2, se realizó la técnica de ELISA indirecto como sigue: una placa de microtitulación de 96 pozos (*Nunc, Maxisorp*) se sensibilizó con 100 µL/pozo de la proteína RBD (*Sinobiological*) (1.0 µg/mL en un buffer de carbonatos 0.05 M, pH 9.6) y se incubó a 4°C durante 12-18 horas, protegido de la luz. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno con 200 uL de PBS-T (PBS 1% con 0.05% Tween-20) empleando un lavador automático de placas (*Biotek, 50 TS microplate washer*), y se bloqueó con 200 µL/pozo de BSA al 1% en PBS 1X durante 2 horas a 30° C. Se descartó la solución de bloqueo y se realizó otro ciclo de cuatro lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Posteriormente, se

utilizó el suero de cada uno de los ratones inmunizados diluido a una concentración de 1:10 en BSA 1% con PBS 1X, y se añadieron 100 µL/pozo por duplicado. La placa se incubó durante 12-18 horas a 4°C, protegida de la luz. Se descartó la solución de suero y se realizaron cinco lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Finalmente, se agregaron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario anti-IgG-HRP (*Thermo scientific*) de ratón diluido en BSA 1% - PBS 1X (1:2,000) y se incubó durante 2 horas a 30°C, protegida de la luz. Se descartó la solución y después de seis lavados con 200 uL/pozo de PBS-T se añadieron 100 µL/pozo de sustrato TMB previamente atemperado (*Life technologies*) y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y la absorbancia se midió cada 15 minutos hasta alcanzar los 60 minutos a 650 nm utilizando un lector de microplacas (*Thermo scientific, Multiskan Sky High*).

6.10 Detección de IgG, IgM e IgA por ELISA indirecto

Los anticuerpos IgG, IgM e IgA anti-RBD específicos de los ratones inmunizados se detectaron como sigue: Una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, Maxisorp) se sensibilizó con 100 µL/pozo de la proteína RBD (1.0 µg/mL en un buffer de carbonatos 0.05 M, pH 9.6) y se incubó a 4°C durante 12-18 horas, protegiendo de la luz. Se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno con 200 uL de PBS-T (PBS 1% con 0.05% Tween-20) empleando un lavador automático de placas (Biotek, *50 TS microplate washer*), y se bloqueó con 200 µL/pozo de BSA al 1% en PBS 1X durante 2 horas a 30°C. Se descartó la solución de bloqueo y se realizó otro ciclo de cuatro lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Se preparó un pool de suero correspondiente al día 42 post inmunización, utilizando muestras de los ratones inmunizados de cada grupo. De cada ratón se tomaron 12 µL de suero, los cuales se diluyeron hasta un volumen final de 600 µL

utilizando una solución de PBS 1X con BSA al 1%. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del suero en un rango de 1:10 a 1:10,000. De cada dilución se añadieron 100 µL por pozo, en duplicado, en la placa de ELISA. La placa se incubó durante 12-18 horas a 4°C, protegida de la luz. Se descartó la solución de suero y se realizaron cinco lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Posteriormente se añadieron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario anti-IgG, anti-IgM o anti-IgA de ratón biotinilado diluido en BSA 1% - PBS 1X (1:2,000) y se incubó durante 2 horas a 30°C, protegida de la luz. Se descartó la solución y después de seis lavados con 200 uL/pozo de PBS-T, se depositaron 100 uL/pozo del conjugado Streptavidina-HRP (10 ug/mL) diluido 1:400 en BSA 1% - PBS 1X, se incubó durante 30 minutos a 30° C. Se descartó la solución y se realizaron cinco lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Se añadieron 100 µL/pozo de sustrato TMB previamente atemperado (*Life technologies*) y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y la absorbancia se midió cada 15 minutos hasta alcanzar los 60 minutos a 650 nm utilizando un lector de microplacas (*Thermo scientific, Multiskan Sky High*).

6.11 Determinación de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3).

Las subclases de IgGs (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) del suero de ratones inmunizados se realizó mediante ELISAS como se describe a continuación. Una placa de microtitulación de 96 pozos (*Nunc, Maxisorp*) se sensibilizó con 100 µL/pozo de la proteína RBD (1.0 µg/mL en un buffer de carbonatos 0.05 M, pH 9.6) y se incubó a 4°C durante 12-18 horas, protegiendo de la luz. Se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno con 200 uL de PBS-T (PBS 1% con 0.05% Tween-20) empleando un lavador automático de placas (*Biotek, 50 TS microplate washer*), y se bloqueó con 200 µL/pozo de

BSA al 1% en PBS 1X durante 2 horas a 30° C. Se descartó la solución de bloqueo y se realizó otro ciclo de cuatro lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Se utilizaron muestras de suero del día 42 de cada uno de los ratones inmunizados, sin realizar un pool. Cada muestra se diluyó en una solución de PBS 1X con BSA al 1%, en una concentración final de 1:20. Se añadieron 100 µL por pozo, en duplicado. La placa se incubó durante 12 a 18 horas a 4 °C, protegida de la luz.

Se descartó la solución de suero y se realizaron cinco lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Se agregaron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario anti-IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón biotinilado diluido en BSA 1% - PBS 1X (1:500) y se incubó durante 2 horas a 30°C, protegida de la luz. Se descartó la solución y después de seis lavados con 200 uL/pozo de PBS-T, se depositaron 100 uL/pozo del conjugado Streptavidina-HRP (10 ug/mL) diluido 1:400 en BSA 1% - PBS 1X, se incubó durante 30 minutos a 30° C. Se descartó la solución y se realizaron cinco lavados con 200 uL/pozo de PBS-T de 3 minutos cada uno. Se añadieron 100 µL/pozo de sustrato TMB previamente atemperado (*Life technologies*) y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y la absorbancia se midió cada 15 minutos hasta alcanzar los 60 minutos a 650 nm utilizando un lector de microplacas (*Thermo Scientific, Multiskan Sky High*).

7. RESULTADOS

7.1 Reactivación de las cepas GS115 y PpRBDCoV-2

Las cepas *P. pastoris* GS115 (wild type) y PpRBD-CoV2 (recombinante), se reactivaron a partir de viales previamente almacenados a -80 °C. Para asegurar la viabilidad de las levaduras y preservar la esterilidad del procedimiento, la biomasa congelada fue extraída utilizando una espátula metálica esterilizada, manipulada bajo condiciones asépticas.

Posteriormente, se inoculó una pequeña cantidad de biomasa en 2 mL de medio líquido YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), el cual proporciona los nutrientes esenciales para el crecimiento inicial de las células. Las muestras inoculadas fueron incubadas a una temperatura constante de 30 °C durante un periodo de 5 días, bajo condiciones de agitación, permitiendo así la reactivación metabólica y la proliferación celular. Durante este tiempo, se monitoreó visualmente el cultivo hasta observar una turbidez evidente, indicativa de crecimiento.

Una vez obtenido un crecimiento visible en medio líquido, se procedió a realizar la siembra en placas de agar YPD. Esta segunda fase de cultivo permitió aislar colonias individuales y observar las características morfológicas de cada cepa de manera más clara.

Después de 48 horas de incubación de las placas, se observaron colonias bien desarrolladas en ambas cepas. Tal como se muestra en la Figura 15, las colonias correspondientes a la cepa GS115 (A) y la cepa recombinante PpRBD-CoV2 (B) presentaron una morfología similar, caracterizada por ser circulares, de superficie cremosa,

aperlada y de bordes bien definidos. No se detectaron diferencias morfológicas notables entre ambas cepas bajo las condiciones de cultivo empleadas, lo cual sugiere que la modificación genética en la cepa recombinante no alteró las características fenotípicas básicas observables a simple vista.

Esta reactivación exitosa de las cepas fue esencial para los experimentos posteriores, asegurando que ambas cepas de levaduras estuvieran en óptimas condiciones de viabilidad y crecimiento.

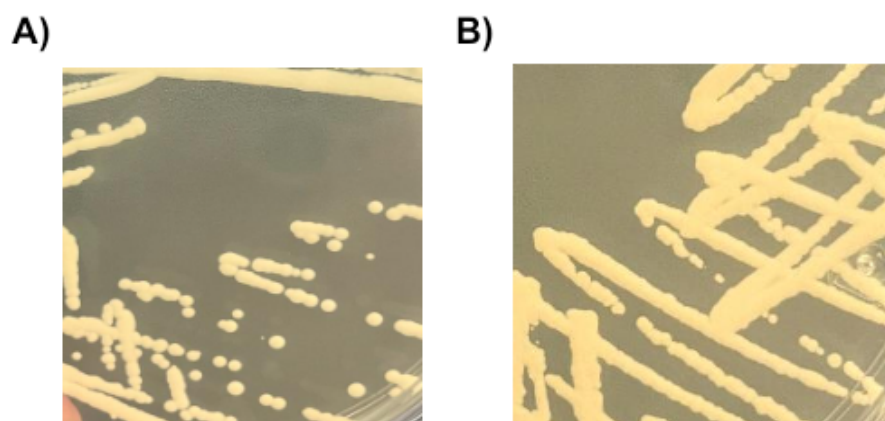


Figura 15. Reactivación de las cepas en medio YPD. A) Colonias correspondientes a la cepa GS115 y B) PpRBD-CoV2.

7.2 Amplificación del fragmento RBD en la levadura recombinante PpRBD-CoV2

Con la finalidad de confirmar que la cepa recombinante PpRBD-CoV2 de *P. pastoris* contenía el fragmento genético codificante para el dominio de unión al receptor (RBD) del virus SARS-CoV-2, se llevó a cabo una reacción de PCR de colonias. Para ello, se emplearon oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar exclusivamente la

región correspondiente al RBD, permitiendo así verificar la presencia e integridad del fragmento en el genoma de la levadura.

El análisis de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, procedimiento que permitió visualizar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos. En la Figura 16 se puede apreciar el resultado de este análisis. En el carril 1 se depositó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), el cual sirvió como referencia para la estimación del tamaño de los fragmentos amplificados en los demás carriles. En el carril 2, correspondiente a la cepa *wild type* (GS115), que no contiene ningún plásmido recombinante, no se observó ninguna banda amplificada, lo cual era el resultado esperado. En contraste, en el carril 3, correspondiente a la cepa PpRBD-CoV2, se detectó una banda intensa de aproximadamente 735 pb, tamaño que coincide con el fragmento esperado para el dominio RBD. Estos hallazgos confirman no sólo la presencia, sino también la integridad del fragmento RBD en la cepa recombinante PpRBD-CoV2, por lo que una vez confirmado esto se procedió a llevar a cabo los experimentos posteriores.

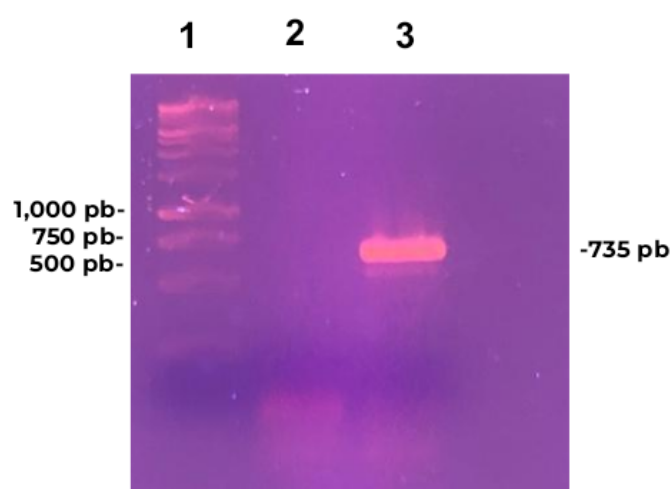


Figura 16. Amplificación del fragmento RBD en PpRBD-CoV2 por PCR de colonias. 1) Marcador Peso Molecular (100 pb, *Invitrogen*, 3uL), 2) GS115 y 3) PpRBD-CoV2. Gel de agarosa al 1% con BrEt.

7.3 Viabilidad del inóculo

Una vez que se reactivaron las cepas de GS115 y PpRBD-CoV2 de *P. pastoris* y se comprobó la integridad del fragmento RBD presente en la cepa recombinante, se procedió a la preparación de los inóculos experimentales, ajustando la concentración celular a 1×10^8 células viables tanto para la cepa GS115 como para la recombinante PpRBD-CoV2.

Posteriormente, se preparó un inóculo de la levadura recombinante con la finalidad de inactivar térmicamente, con el objetivo de obtener el grupo denominado PpRBD-CoV2 No Viable. Para corroborar que el tratamiento de inactivación había sido efectivo, se sembraron alícuotas de cada uno de los inóculos en agar Sabouraud. Tras la incubación, se observó que únicamente las muestras correspondientes a la cepa GS115 y a PpRBD-CoV2 sin tratamiento térmico presentaron crecimiento de colonias, mientras que en el inóculo tratado con calor (PpRBD-CoV2 NV) no se detectó desarrollo alguno.

Tal como se ilustra en la Figura 17, esta ausencia de crecimiento confirmó la inactivación de la levadura recombinante mediante calor, asegurando que el grupo experimental NV contenía células no viables para los experimentos posteriores.

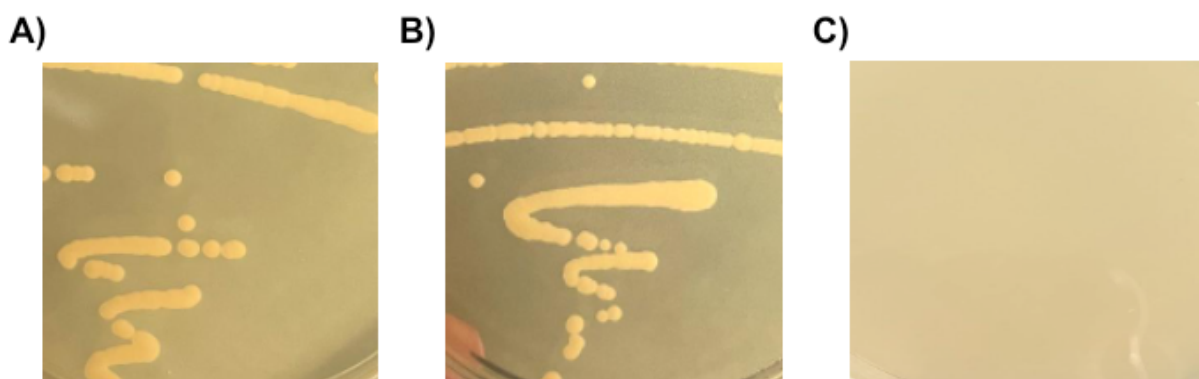


Figura 17. Viabilidad de los inóculos de *Pichia pastoris*. A) Colonias de GS115, B) Colonias de PpRBD-CoV y C) Sin crecimiento de colonias PpRBD-CoV2 NV inactivadas con calor.

7.4 Cinética de expulsión fecal de Pichia pastoris tras administración oral en ratones

Con el propósito de analizar la persistencia y eliminación de las levaduras administradas por vía oral, se realizó un seguimiento de la cinética de expulsión fecal en ratones BALB/c durante un periodo de 12 días posteriores a la inoculación.

Para ello, se administraron dosis de 1×10^8 de levaduras GS115 y PpRBD-CoV2 a su respectivo grupo de ratones, y posteriormente se recolectaron muestras de heces frescas cada dos días. La cuantificación se efectuó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 18, indican que tras la administración oral (día 0), a partir del día 2 comenzó a observarse una disminución progresiva en la carga de UFC/g en ambos grupos experimentales. Para el día 6, la cantidad de levaduras expulsadas había descendido a niveles por debajo de 10^5 UFC/g, y a partir del día 10, ya no se detectaron colonias viables en las muestras recolectadas.

Estos datos sugieren que las levaduras fueron eliminadas progresivamente a medida que transitaban a través del tracto gastrointestinal de los ratones.

Adicionalmente, no se observaron diferencias entre la cinética de eliminación de la cepa *wild type* GS115 y la cepa recombinante PpRBD-CoV2, lo cual sugiere que la modificación genética no afectó la tránsito intestinal de la levadura recombinante en el modelo murino empleado.

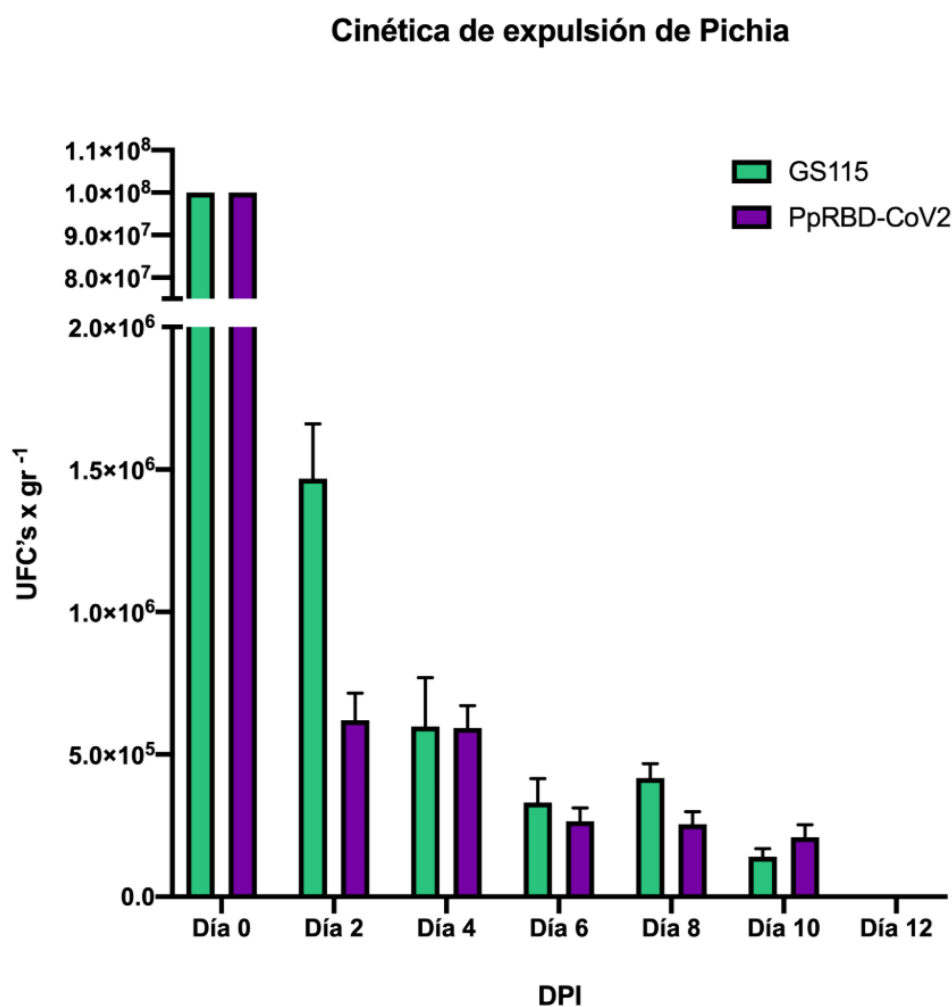


Figura 18. Cinética de expulsión de *Pichia pastoris* en ratones BALB/c después administración oral. Se muestra la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC/g de heces) recuperadas a distintos días

post-inoculación (DPI) para las cepas GS115 (verde) y PpRBD-CoV2 (morado). Ambas cepas fueron administradas por vía oral en una única dosis. Se observa una disminución progresiva de la carga fecal de levaduras en el tiempo, con eliminación casi completa hasta el día 10. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (n = 7 por grupo).

7.5 Detección de IgG-HRP en suero de ratones inmunizados

Con el propósito de confirmar si la inmunización oral con la levadura recombinante PpRBD-CoV2 fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral en el modelo murino, se llevó a cabo la cuantificación de anticuerpos IgG específicos en suero de los ratones BALB/c. Para ello, se utilizó un ensayo de ELISA indirecto, empleando un anticuerpo secundario conjugado a HRP (peroxidasa de rábano picante), que permite la detección colorimétrica de la unión antígeno-anticuerpo.

Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales: uno inmunizado con PpRBD-CoV2 y otro que recibió únicamente el vehículo (solución salina), utilizado como control negativo. Como se muestra en la Figura 19, los ratones inmunizados con la levadura recombinante presentaron un aumento significativo en los niveles de absorbancia a 650 nm, en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Este incremento indica una mayor producción de IgG específica contra el dominio RBD del SARS-CoV-2, lo que nos sugiere que la estrategia de vacunación basada en *P. pastoris* recombinante fue efectiva en la inducción de una respuesta inmune de IgG tras su administración oral.

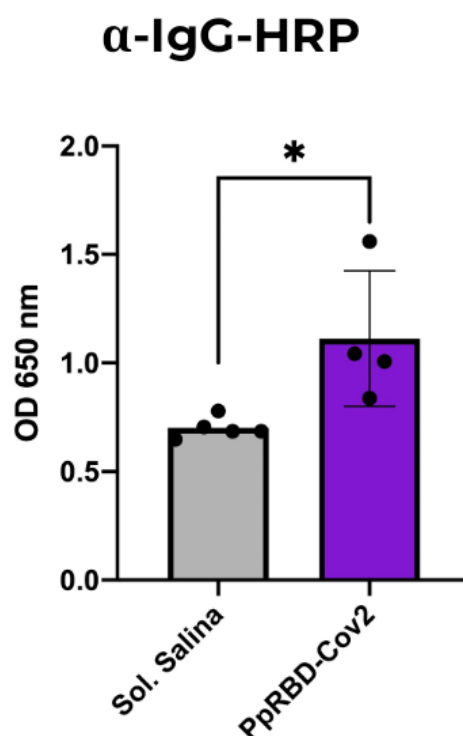


Figura 19. Detección de IgG-HRP en suero de ratones inmunizados con PpRBD-CoV2 mediante ELISA indirecto. Se muestran los niveles de IgG específica contra RBD en suero de ratones BALB/c inmunizados oralmente con PpRBD-CoV2 (morado) o tratados con solución salina (gris), correspondientes al día 42 del esquema de inmunización. Las mediciones de absorbancia (OD 650 nm) reflejan una diferencia significativa entre ambos grupos (* $p < 0.05$). Los datos se presentan como media $\pm$ DE ($n = 5$ por grupo).

7.6 Detección de IgG, IgM e IgA en suero de ratones inmunizados

Una vez que se confirmó la producción de una respuesta inmune humoral en los ratones inmunizados con la levadura recombinante, se evaluaron los niveles de IgG, IgM e IgA contra el dominio RBD en suero de los diferentes grupos de ratones de una manera más específica, por lo que para este análisis, se realizaron ensayos ELISA indirectos utilizando anticuerpos secundarios biotinilados específicos para cada isotipo, y se

analizaron pools de suero obtenidos de los grupos GS115 (*wild type*), PpRBD-CoV2 (recombinante viable) y PpRBD-CoV2 NV (recombinante inactivado por calor).

Se optó por el uso de anticuerpos secundarios biotinilados en lugar de anticuerpos directamente conjugados a HRP debido a las ventajas técnicas que ofrece esta estrategia. La utilización de anticuerpos biotinilados, seguida de la adición de un conjugado estreptavidina-HRP, permite una amplificación de la señal durante la detección, ya que varias moléculas de HRP pueden unirse a una única molécula de anticuerpo biotinilado, aumentando así la sensibilidad del ensayo.

Además, este sistema mejora la especificidad y reduce el ruido de fondo, debido a la alta afinidad entre la biotina y la estreptavidina. Esta elección metodológica fue particularmente importante para detectar respuestas de bajo nivel, como las esperadas en etapas tempranas de inmunización oral o en el análisis de isotipos como IgM, que podrían presentar títulos séricos más bajos.

La evaluación de los niveles de IgM específica contra el dominio RBD se realizó en dos momentos del esquema de inmunización: al día 14 y al día 42 post-inmunización. La figura 20 muestra los resultados correspondientes al día 14, donde se observa una ligera tendencia al incremento de los niveles de IgM en los grupos inmunizados con PpRBD-CoV2 y PpRBD-CoV2 NV en comparación con el grupo GS115, particularmente en las diluciones más bajas (1:10 y 1:100).

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, este comportamiento sugiere la activación de una respuesta inmune primaria temprana, mediada por IgM, tras la administración oral de las levaduras recombinantes.

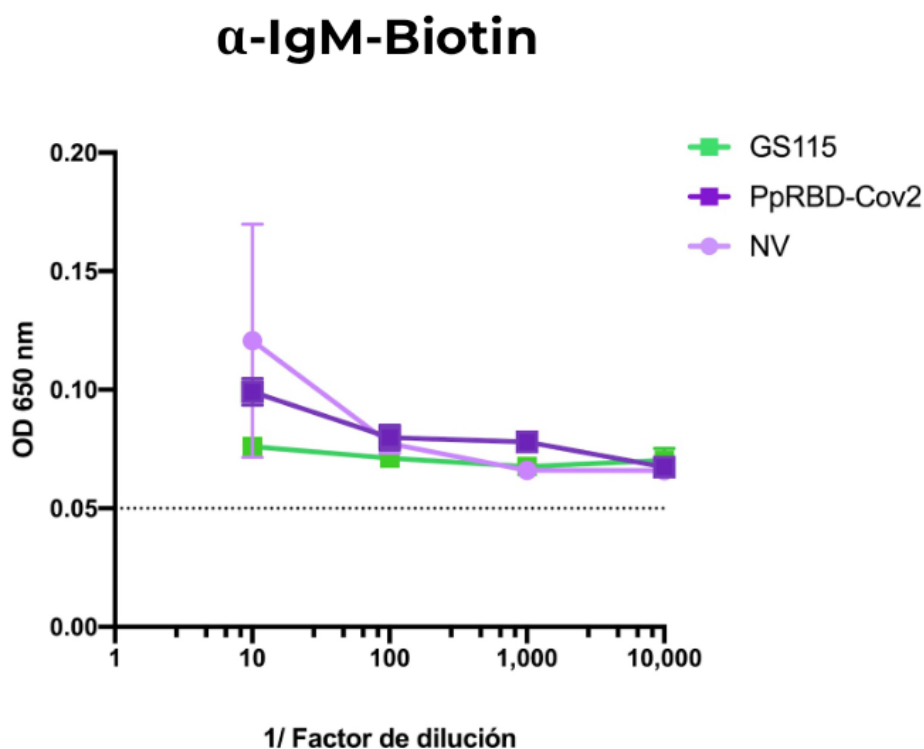


Figura 20. Detección de IgM específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2, al día 14 post-inmunización. Se evaluaron pools de suero mediante ELISA con anti-IgM-biotin a diferentes factores de dilución. GS115 (verde), PpRBD-CoV2 (morado) y NV (lila). Los valores representan la media $\pm$ DE de duplicados técnicos. La línea discontinua indica el umbral de detección.

Posteriormente, al analizar los niveles de IgM al día 42 (Figura 21), se observó que los niveles de absorbancia habían disminuido considerablemente en todos los grupos, acercándose al umbral de detección. No se encontraron diferencias relevantes entre los grupos inmunizados y el control, lo cual es algo esperado, ya que la IgM es el primer

isotipo en producirse en una respuesta primaria, pero tiende a decrecer conforme progresa la maduración de la respuesta adaptativa, dando paso a la generación de isotipos de alta afinidad como IgG e IgA. Estos resultados reflejan de manera adecuada la transición inmunológica inducida por la inmunización, donde la fase inicial está caracterizada por IgM y, conforme avanza el esquema de refuerzos, predomina la producción de anticuerpos de otros isotipos.

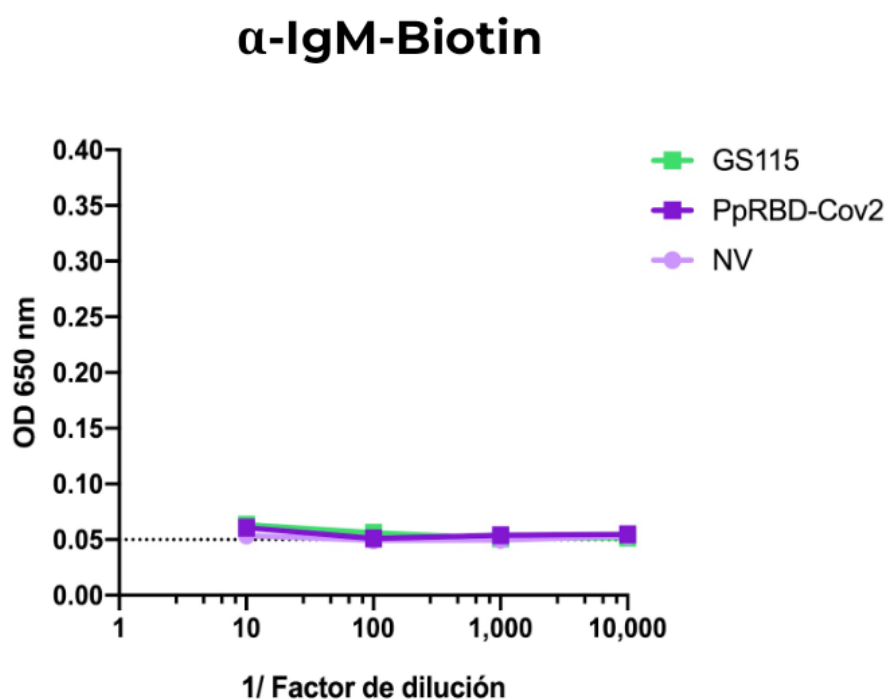


Figura 21. Detección de IgM específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2, al día 42 post-inmunización. Se evaluaron pools de suero mediante ELISA con anti-IgM-biotin a diferentes factores de dilución. GS115 (verde), PpRBD-CoV2 (morado) y NV (lila). Los valores representan la media $\pm$ DE de duplicados técnicos. La línea discontinua indica el umbral de detección.

En cuanto a la determinación de IgG (Figura 22), los grupos inmunizados con levaduras recombinantes (PpRBD-CoV2 y NV) mostraron una mayor producción de IgG

específica en comparación con el grupo GS115. Esta diferencia fue especialmente evidente en las diluciones más bajas (1:10 y 1:100), lo cual sugiere que la expresión superficial del antígeno RBD en *P. pastoris* favoreció la generación de una respuesta humoral específica.

Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre el grupo de levaduras viables y el de levaduras inactivadas, indicando que la inactivación térmica no afectó de manera crítica la capacidad inmunogénica de las células recombinantes. A mayores diluciones, la absorbancia disminuyó progresivamente en todos los grupos, alcanzando valores cercanos al umbral de detección, como se esperaba.

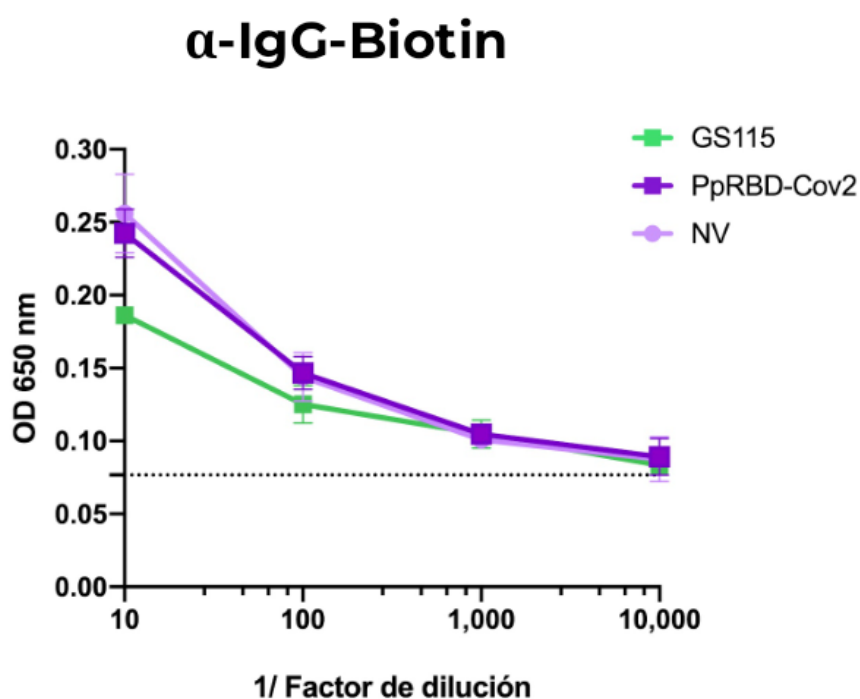


Figura 22. Detección de IgG específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2. Se evaluaron pools de suero correspondientes al día 42 del esquema de inmunización mediante ELISA con anti-IgG-biotin a diferentes factores de dilución. GS115 (verde): cepa *wild type*, PpRBD-CoV2 (morado): levadura recombinante con el fragmento RBD y NV (lila): levadura recombinante

no viable inactivada por calor. Los valores representan la media $\pm$ DE de duplicados técnicos. La línea discontinua indica el umbral de detección.

Finalmente, se determinaron los niveles de IgA, esta evaluación de IgA (Figura 23) reveló una tendencia similar. Los grupos PpRBD-CoV2 y NV presentaron niveles de absorbancia considerablemente más altos que el grupo GS115, siendo más marcada la respuesta en las primeras diluciones (1:10 y 1:100).

Particularmente, el grupo inmunizado con levadura viva (PpRBD-CoV2) presentó las absorbancias más elevadas, lo cual sugiere que la viabilidad de la levadura podría potenciar la inducción de IgA sérica. No obstante, el grupo NV también logró una respuesta detectable, aunque ligeramente menor.

Estos resultados podrían sugerir que la expresión de RBD en la superficie de las levaduras es capaz de inducir una respuesta inmune en mucosas (IgA) incluso cuando las levaduras han sido inactivadas.

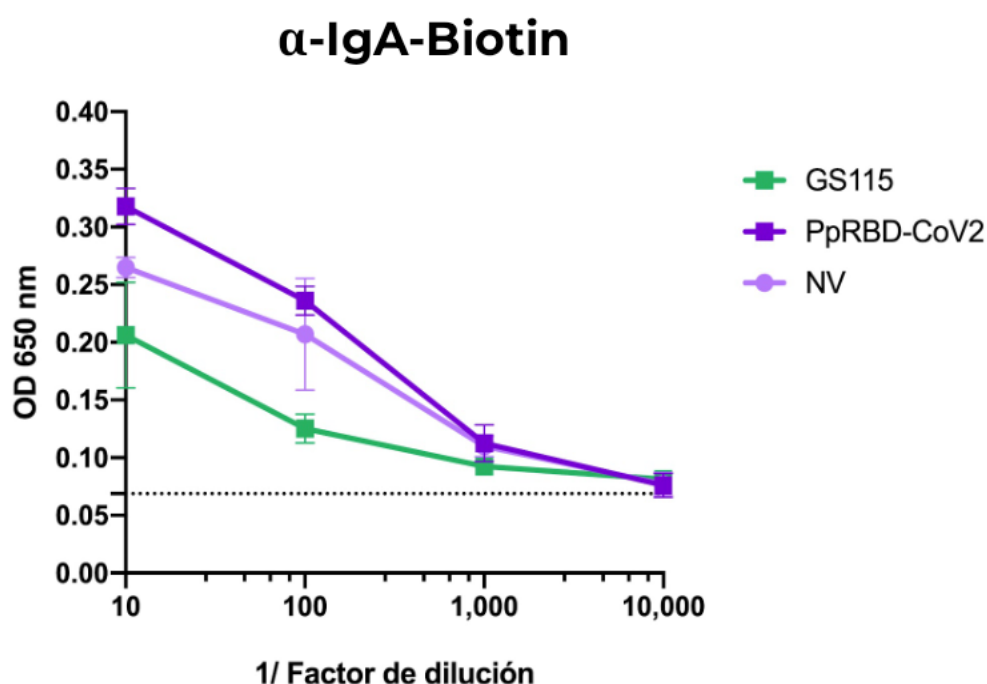


Figura 23. Detección de IgA específica contra RBD en suero de ratones inmunizados vía oral con PpRBD-CoV2. Se evaluaron pools de suero correspondientes al día 42 del esquema de inmunización mediante ELISA indirecto con anti-IgA-biotin a diferentes factores de dilución. GS115 (verde), PpRBD-CoV2 (morado) y NV (lila) inactivada. Los valores representan la media $\pm$ DE de duplicados técnicos. La línea discontinua indica el umbral de detección.

7.7 Determinación de las subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3)

Para profundizar en la caracterización del perfil de la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación oral, se analizaron las subclases de IgG generadas en suero de los ratones al día 42 post inmunización. La determinación de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 se llevó a cabo mediante ELISA indirecto utilizando anticuerpos biotinilados específicos para cada subclase. En el análisis de la IgG1 (Figura 24 A), no se detectaron diferencias significativas entre los grupos GS115, PpRBD-CoV2 y NV, sugiriendo que la vacunación no favoreció una respuesta predominantemente de tipo Th2. Sin embargo, en la

cuantificación de IgG2a (Figura 24 B), se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los grupos inmunizados con PpRBD-CoV2 y NV presentaron niveles significativamente más altos de IgG2a específica en comparación con el grupo GS115 ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). Este hallazgo sugiere la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1, la cual es fundamental en la protección contra infecciones virales, como SARS-CoV-2. Respecto a las subclases IgG2b (Figura 24 C) e IgG3 (Figura 24 D), no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que indica que estas subclases no fueron predominantemente inducidas en el modelo de inmunización empleado. En conjunto, estos resultados sugieren que la levadura recombinante PpRBD-CoV2, tanto viable como inactivada, fue capaz de estimular una respuesta inmune humoral caracterizada principalmente por la producción de IgG2a, asociada a un perfil Th1.

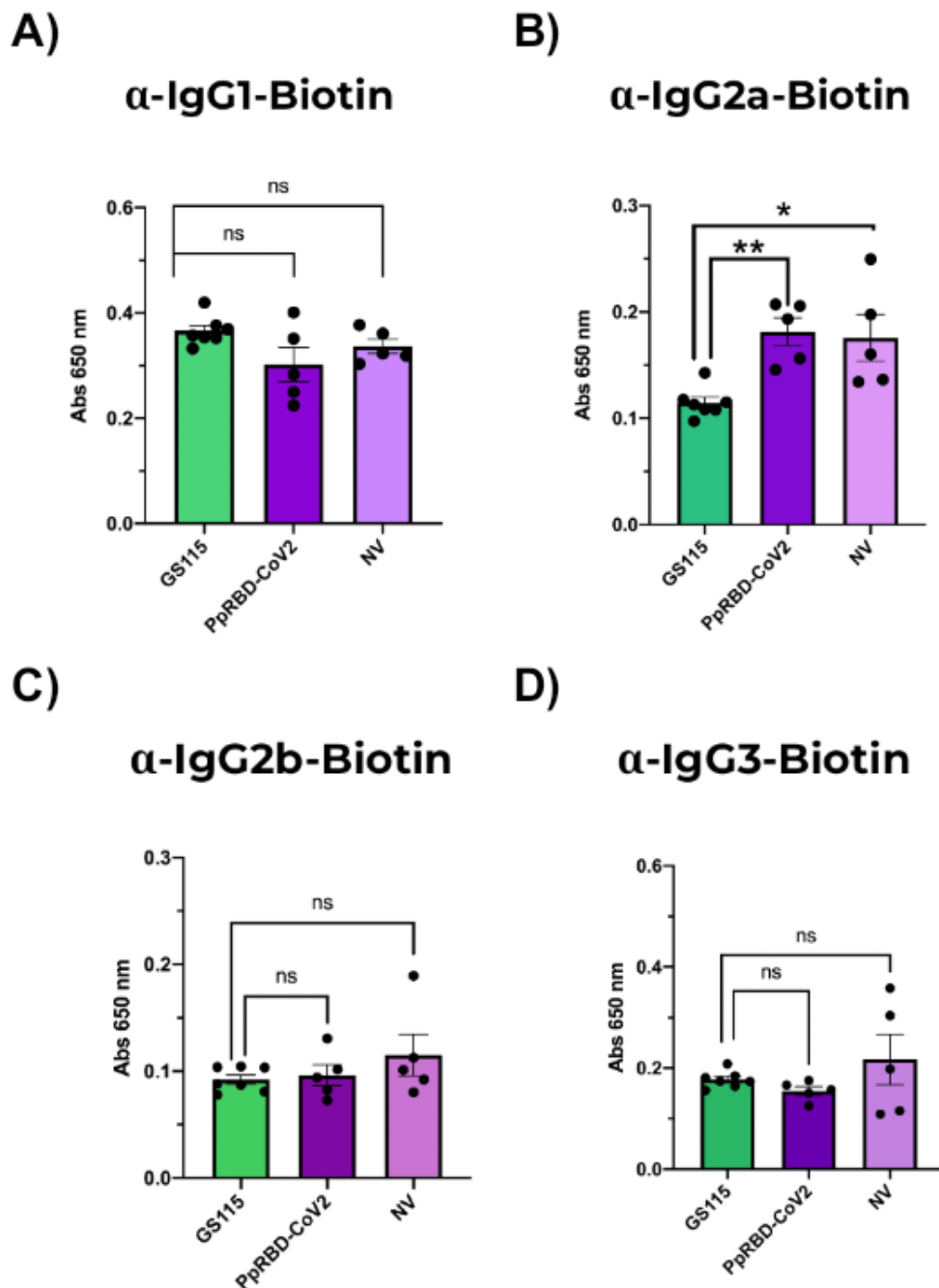


Figura 24. Determinación de subclases de IgG específicas contra RBD en suero de ratones inmunizados con PpRBD-CoV2. Se evaluaron las subclases IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C) e IgG3 (D) en suero del día 42 de cada ratón inmunizado vía oral. Se observaron incrementos significativos en IgG2a en el grupo PpRBD-CoV2 comparado con GS115 ($p < 0.01$) y con el grupo NV ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgG1, IgG2b ni IgG3 entre los grupos (ns: no significativo). Cada punto representa un animal ($n=5$ por grupo); los datos se presentan como media $\pm$ DE.

8. DISCUSIÓN

La pandemia por COVID-19 marcó un acontecimiento en la historia de la vacunación, impulsando el desarrollo acelerado de diferentes plataformas vacunales con el objetivo de contener la propagación del SARS-CoV-2. Entre las tecnologías más utilizadas destacan las vacunas de ARN mensajero, como las desarrolladas por Pfizer-BioNTech y Moderna; las vacunas de vectores virales, como la de AstraZeneca; y las vacunas basadas en subunidades proteicas como Novavax. Estas vacunas demostraron alta eficacia en la prevención de formas graves de la enfermedad y desempeñaron un papel crucial para reducir la mortalidad y la saturación hospitalaria en el corto plazo (58).

Sin embargo, a pesar de sus beneficios, también se reportaron efectos secundarios importantes. Algunas vacunas se asociaron con efectos adversos poco frecuentes pero graves, como miocarditis, trombosis o reacciones anafilácticas (59).

En ese sentido, la vacunación oral surge como una alternativa, especialmente en contextos donde el acceso a servicios médicos es limitado. Esta vía de administración tiene la capacidad de inducir inmunidad tanto sistémica como mucosal. Esto es particularmente relevante en el caso de SARS-CoV-2, un virus que inicialmente infecta epitelios respiratorios y, en algunos casos, gastrointestinales. La respuesta inmunitaria local, mediada principalmente por IgA secretora, cumple un papel esencial en la neutralización del virus en su sitio de entrada (60).

Es por esto, que en el presente trabajo se evaluó un prototipo de vacuna oral utilizando *P. pastoris*, como acarreador biológico expresando el antígeno recombinante RBD en su superficie mediante la técnica de *yeast display*.

El primer punto a determinar en cualquier vacuna oral de este tipo, es su permanencia en el intestino, ya que entre más tiempo permanezca a este nivel, mayor será la probabilidad de que se genere una respuesta inmune a nivel mucosal. Por ello, realizamos una cinética de expulsión de la levadura recombinante PpRBD-CoV2 en ratones BALB/c empleando 1×10^8 UFC, para determinar su tiempo de permanencia. Nuestros resultados mostraron que la levadura viable es capaz de permanecer hasta por 10 días a nivel intestinal. En trabajos realizados en otros modelos como en el de Zhou *et al.*, en donde *P. pastoris* recombinante expresa la proteína de fusión compuesta por la hemaglutinina del virus de la influenza H5N1 se observó que la levadura permanecía en heces hasta por 10 días, generando una respuesta inmune de tipo humoral, observada por el incremento de anticuerpos IgG específicos contra la hemaglutinina (HA) del virus (61).

Un segundo aspecto importante de las vacunas orales es que, al permanecer el tiempo suficiente en las mucosas, puedan activar el tejido linfoide asociado a mucosas (GALT), el cual genere una respuesta inmune coordinada mediante células M, placas de Peyer y células dendríticas intestinales; favoreciendo la producción de anticuerpos específicos (62). Sin embargo, dicha vacuna además de generar una respuesta inmune protectora, dicha respuesta no debe generar un efecto secundario de tipo inflamatorio que cause daño en tejido, en nuestro caso, a nivel intestinal. Cuando se analizaron los intestinos de los ratones BALB/c a los que se les administró tanto la levadura *wild type* como las

recombinantes (viable y no viable), no se observaron signos de inflamación visibles tales como infiltrado celular, engrosamiento de la mucosa, hiperplasia linfoide ni daño estructural epitelial (63). Lo anterior implica que la cepa GS115 no genera ningún tipo de respuesta inmune mucosal inflamatoria, probablemente debido a su naturaleza no patógena y a su perfil probiótico, como se ha reportado previamente para *P. pastoris* en estudios donde no se observaron alteraciones histológicas tras su administración oral (64). Este hallazgo es relevante, ya que demuestra que la exposición mucosal al antígeno no compromete la integridad del epitelio intestinal y tampoco induce efectos adversos locales, lo cual refuerza el perfil de seguridad de este tipo de vacuna. Con base en el resultado anterior, se diseñó un esquema de inmunización en el cual, las levaduras estuvieran siempre presentes en el intestino con la finalidad de inducir una respuesta inmune a nivel de mucosas y nivel sistémico.

La falta de signos inflamatorios en los ratones inoculados nos llevó a considerar la posibilidad de que, debido a la ausencia de indicios visibles de inflamación, la inducción de la respuesta inmune no se hubiese llevado a cabo. Esta duda surge porque, en muchos modelos experimentales, una respuesta inmune robusta suele ir acompañada de cierto grado de inflamación local. Se ha reportado que, por ejemplo, la utilización de un adyuvante o de superantígenos como la toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae*, fusionada con proteínas de interés y administrada por vía oral, genera en los ratones una respuesta inmune inflamatoria a nivel intestinal, caracterizada por infiltrado linfocitario, edema en la mucosa, aumento de la permeabilidad epitelial y, en algunos casos, diarrea (65). Sin embargo, se ha observado que este mismo sistema es capaz de inducir la producción de anticuerpos del tipo IgA en mucosas e IgG en suero, lo que demuestra su eficacia

inmunológica. A pesar de ello, la CT de *V. cholerae* no se emplea ampliamente en humanos debido a sus efectos secundarios, ya que el componente tóxico puede desencadenar una respuesta inflamatoria excesiva que compromete la integridad del epitelio intestinal (66). Por ello, la identificación de plataformas vacunales capaces de generar inmunidad efectiva sin inducir inflamación, como lo observamos en nuestro modelo basado en *P. pastoris*, representa una alternativa más segura y con mayor potencial para su aplicación en humanos. Interesantemente en nuestro caso, cuando analizamos las inmunoglobulinas IgG totales mediante ELISA indirecto, se observó un incremento en suero de los ratones inmunizados, y se corroboró este resultado empleando un método más sensible de detección a través de biotina-estreptavidina. En este sentido, tanto el prototipo de vacuna PpRBD-CoV2 como el método de inmunización resultaron efectivos a la hora de inducir la producción de IgG anti-RBD en suero de los ratones inmunizados, tal como se observa en la figura 22. Este hallazgo demuestra que, a pesar de tratarse de una plataforma oral basada en levaduras no patógenas, se logró inducir una respuesta humoral sistémica comparable a la observada con vacunas inyectables ya aprobadas, como BNT162b2 (*Pfizer-BioNTech*) y mRNA-1273 (*Moderna*). Estas vacunas, basadas en ARN mensajero, han demostrado ser altamente eficaces en inducir altos títulos de IgG anti-RBD en personas vacunadas o previamente infectadas por SARS-CoV-2, lo cual contribuye significativamente a prevenir el desarrollo de la enfermedad grave (67). Sin embargo, es importante destacar que la IgG, es importante para prevenir la progresión de la enfermedad, pero no impide completamente la infección viral, ya que no actúa directamente sobre las superficies mucosas, donde se da el primer contacto con el virus. Es por esta razón que muchas personas vacunadas aún pueden infectarse y transmitir el virus, aunque no presenten síntomas graves (68). La inmunoglobulina que realmente impediría la

entrada del virus por las mucosas respiratorias y gastrointestinales es la IgA secretora, tal como se ha demostrado en modelos de vacunas orales como las desarrolladas con adenovirus recombinantes orales (como *Vaxart-VXA-CoV2-1*) y aquellas formuladas con subunidades proteicas administradas por vía mucosal, como las investigadas por Van Doremalen *et al.* (69). A pesar de su potencial inmunológico, estas vacunas orales también presentan limitaciones importantes, ejemplo de ello son las vacunas con adenovirus, ya que pueden verse afectadas por una inmunidad preexistente al vector, inducir respuestas inflamatorias no deseadas y que requieren procesos de producción más complejos y costosos. En cuanto a las vacunas de subunidades, estas requieren adyuvantes potentes que suelen ser proinflamatorios, como la toxina colérica o la LT (Toxina lábil al calor) de *E. coli*, además de que su producción exige purificación de proteínas recombinantes bajo estrictas condiciones (27). Por el contrario, *P. pastoris* como prototipo de vacuna oral ofrece varias ventajas: no induce inflamación y no requiere purificación de proteínas ni uso de adyuvantes, ya que el antígeno se presenta en la superficie celular mediante *yeast display*. Estas características logran que esta levadura sea una opción atractiva y segura (64).

Como se ha mencionado, anteriormente, las vacunas orales actuales, han mostrado inducir una fuerte respuesta IgA en secreciones respiratorias y en mucosa intestinal, confiriendo así una primera línea de defensa más eficiente frente a la infección. Por tanto, si nuestra vacuna basada en *P. pastoris* recombinante además de inducir IgG específica, logra inducir IgA secretora anti-RBD, estaríamos ante una plataforma vacunal con potencial de protección tanto sistémica como en el sitio de entrada del virus, es decir, mucosal.

Cuando analizamos si nuestro prototipo de vacuna PpRBD-CoV2 era capaz de inducir la producción de IgA observamos que tanto la levadura recombinante viable como la no viable indujeron niveles detectables de IgA, siendo más elevados en el grupo que recibió células viables. Aunque la IgA sérica no refleja completamente la secreción mucosal, su presencia tras la inmunización oral puede ser un indicador de que la vía oral fue capaz de inducir una respuesta de tipo mucosal. Además, este resultado sugiere que la interacción activa de la levadura viable con células inmunitarias del intestino como las células dendríticas o las células M en las placas de Peyer podrían potenciar la estimulación inmunológica. Esto ha sido respaldado por estudios previos como el de Bastos *et al.* (2007) (70), quienes también reportaron niveles aumentados de IgA tras inmunización oral con *P. pastoris*. También se ha documentado que levaduras recombinantes pueden ser reconocidas por receptores de tipo Toll (TLRs), desencadenando señales proinflamatorias que promueven la activación de linfocitos T colaboradores (Th) y B.

Como ya se había mencionado, la estrategia metodológica empleada en esta investigación basada en el uso de anticuerpos secundarios biotinilados y detección con estreptavidina-HRP fue esencial para poder amplificar la señal en ELISA indirecto, pues nos permitió una mayor sensibilidad y especificidad, especialmente en la detección de IgA e IgM. Tal como se esperaba en una respuesta inmune primaria, los niveles de IgM en suero mostraron un incremento modesto hacia el día 14 post inmunización en los grupos que recibieron levadura recombinante. Este patrón fue observado de forma similar por Li *et al.* (2014) en un modelo murino de vacunación oral con *S. cerevisiae* que expresa la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (71), donde se registró una elevación inicial de

IgM seguida de un aumento de IgG, esto evidenciaría la maduración de la respuesta humoral.

En conjunto, los resultados que nosotros obtuvimos demuestran que la inmunización oral con PpRBD-CoV2 puede inducir una respuesta humoral específica, incluyendo la activación temprana de IgM, la producción de IgG y la detección de IgA en suero, lo que sugiere la activación tanto de la respuesta sistémica como de la mucosal. Estos hallazgos refuerzan el uso de este prototipo de vacuna como una alternativa biotecnológica eficaz, segura y adaptable para el desarrollo de vacunas orales contra SARS-CoV-2 y otros patógenos de interés.

Una vez que comprobamos que nuestro modelo de inmunización oral era capaz de producir una respuesta humoral procedimos a estudiar más a fondo el tipo de respuesta inmune inducida después de la vacunación, es decir si la respuesta era de tipo Th1 o Th2, ya que una respuesta inmune protectora efectiva contra virus sería de tipo Th1 (72,73). Una manera indirecta de determinar este tipo de respuesta es evaluar las subclases de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 generados durante la inmunización (29, 74). En ese sentido, el análisis de las subclases de IgG presentes en el suero de los ratones, empleando ELISA indirecto, nos arrojó que no había una producción de IgG1 en el grupo de los ratones inmunizados. Esta ausencia de los niveles de IgG1 sugiere que la inmunización oral con *P. pastoris* no favoreció una respuesta de tipo Th2, lo cual es deseable en el contexto de vacunas antivirales, ya que Th2 va dirigida a principalmente hacia patógenos extracelulares como parásitos protozoarios y helmintos, y puede ser menos eficaz para eliminar infecciones virales o patógenos intracelulares (75). Cuando

analizamos la presencia de IgG2a en el suero de los ratones inmunizados con nuestra vacuna prototipo, encontramos una elevada producción de esta inmunoglobulina. En nuestro modelo, esto podría indicar un predominio hacia una respuesta Th1, que es más efectiva en infecciones virales, ya que este perfil se asocia con la activación de macrófagos, producción de IFN- γ y diferenciación de linfocitos T citotóxicos (76,77) y en este sentido esta orientación hacia una inmunidad de tipo celular es fundamental para lograr una protección más completa y duradera frente a un virus como SARS-CoV-2, que requieren tanto la neutralización del virus como la eliminación de células infectadas (73,76).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Li *et al.* (2014), quienes documentaron que después de la inmunización oral con *P. pastoris* recombinante que expresa el antígeno E2 del virus de la peste porcina clásica en ratones en donde observaron una orientación hacia un perfil Th1, con producción elevada de IgG2a, lo cual coincidió con la inducción de IFN- γ y proliferación de linfocitos T, sugiriendo una respuesta inmune robusta tras la administración oral (77).

Respecto a las subclases IgG2b e IgG3, no detectamos diferencias significativas entre los grupos experimentales. Aunque estas subclases pueden participar en la activación del complemento y la opsonización, su papel en la inmunidad protectora contra virus es menos prominente en comparación con IgG2a.

Finalmente, los resultados obtenidos en este proyecto mostraron que la inmunización con el prototipo de vacuna oral PpRBD-CoV2 logró inducir una producción

de IgA secretora necesaria para la protección mucosal, y una producción de IgG2a en suero, sugiriendo una respuesta predominantemente de tipo Th1, sin generar respuestas inmune inflamatorias a nivel intestinal en los ratones inmunizados y/o efectos secundarios evidentes. Estas características en conjunto nos sugieren que nuestro prototipo de vacuna ofrece todas varias ventajas de una vacuna oral; es decir: no induce inflamación, es altamente estable, fácil de producir a gran escala, no requiere purificación de proteínas ni uso de adyuvantes, ya que el antígeno se presenta en la superficie celular mediante *yeast display*, lo que la convierte en una vacuna oral atractiva, segura y accesible para el desarrollo de vacunas orales especialmente en contextos con recursos limitados.

9. CONCLUSIONES

- La levadura *Pichia pastoris* GS115, administrada por vía oral, no mostró persistencia intestinal más allá del día 10, lo que refuerza su perfil de seguridad como vector vacunal transitorio.
- La expresión superficial del antígeno recombinante RBD en *P. pastoris* no modificó la cinética de su eliminación gastrointestinal, manteniéndose comparable a la cepa *wild type*.
- La inmunización oral con la levadura recombinante PpRBD-CoV2 fue capaz de inducir una respuesta humoral específica, evidenciada por la producción de anticuerpos de clase IgM, IgA e IgG.
- Entre las subclases de IgG analizadas, IgG2a fue la predominante en los ratones inmunizados, lo que sugiere una respuesta inmune de tipo Th1, favorable en el contexto antiviral.
- La levadura recombinante inactivada mantuvo su capacidad inmunogénica, ya que generó un perfil de respuesta humoral comparable al inducido por la levadura viable.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si los anticuerpos anti-RBD inducidos por la inmunización oral con *P. pastoris* son neutralizantes.
- Evaluar la producción de IgA específica en mucosas intestinales y respiratorias para confirmar la activación de la inmunidad mucosa local.
- Probar dosis más altas de levadura recombinante (1×10^{10} y 1×10^{12} células) para analizar su efecto sobre la magnitud y duración de la respuesta inmune.
- Caracterizar la respuesta inmune celular, particularmente la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, mediante citometría de flujo y análisis de citocinas.

REFERENCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727–33.
2. Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199–207.
3. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565–74.
4. Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Al Suwaidi H, Al-Marzouqi AHA, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses*. 2021;13(9):1687. doi:10.3390/v13091687
5. Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215–20.
6. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol*. 2020;5(48):eabc8413.
7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271–280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
8. Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Al Suwaidi H, Al-Marzouqi AHA, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses*. 2021;13(9):1687. doi:10.3390/v13091687

9. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020;383(6):590–592. doi:10.1056/NEJMc2011400
10. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):355–362. doi:10.1038/s41577-020-0331-4
11. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int> [Acceso: marzo 2025].
12. Guan WJ, Liang WH, Zhao Y, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J*. 2020;55(5):2000547.
13. Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg*. 2020;78:185–93.
14. Hale T, Angrist N, Goldszmidt R, et al. A global panel database of pandemic policies (Oxford COVID-19 Government Response Tracker). *Nat Hum Behav*. 2021;5(4):529–38.
15. Secretaría de Salud (México). COVID-19 México: Datos abiertos. <https://datos.gob.mx> [Acceso: marzo 2025].
16. Dirección General de Epidemiología. Informe técnico COVID-19 México. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud> [Acceso: marzo 2025].
17. World Health Organization (WHO). Tracking SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> [Accessed 25 May 2025].

18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> [Accessed 25 May 2025].
19. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409–424. doi:10.1038/s41579-021-00573-0
20. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.* 2020;586(7830):516–27.
21. Patone M, Handunnetthi L, Saatci D, et al. Neurological complications after first dose of COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021;27(12):2144–53.
22. Wise J. Covid-19: UK withdraws AstraZeneca vaccine as pandemic winds down. *BMJ.* 2024;385:q1257.
23. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):592–605.
24. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):148–58.
25. Secretaría de Salud. (2023). Esquema de vacunación universal. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/articulos/esquema-de-vacunacion>.
26. Brandtzaeg P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. *Immunol Invest.* 2010;39(4-5):303–55.
27. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 2005;11(4 Suppl):S45–53.

28. Lycke N. The mucosal immune system of the human gut. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(3):101-109.
29. Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor 1 regulate immunoglobulin isotype switching. *J Exp Med.* 1987;166(4):1183-1193.
30. Kaveri SV, Spertini F, Bayry J. Memory B cells and immunoglobulin isotype switching. *Immunol Today.* 1999;20(10):478-482.
31. Mantis NJ, Rolando D, McDonald RA, et al. Secretory IgA: Bridging innate and acquired immunity. *Vaccine.* 2011;29(18):3803-3811.
32. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:303-33.
33. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 1988;334(6179):255-8.
34. Zhou Y, Wang S, Cai Y, Li J, Liu L. Oral immunization with a probiotic-based vaccine expressing a multi-epitope protein induces protective immunity against rotavirus in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(7):2771-2782.
35. Lee JS, Poo H, Han DP, Hong SP, Kim K, Cho MW, et al. Mucosal immunization with surface-displayed hemagglutinin (HA) of H5N1 virus on *Bacillus subtilis* spores. *Vaccine.* 2010;28(27):4114-4120.
36. Yang Y, Xie Y, Qiao J, Liu Z, Yang J, Qian Z, et al. A recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing SARS-CoV-2 spike protein induces immune responses in mice. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):181.

37. Wang X, Ma Q, Wang Y, Wen D, Zhao Y, Liu F, et al. Yeast surface display of SARS-CoV-2 receptor-binding domain induces robust immune responses in mice. *Front Microbiol.* 2021;12:640330.
38. Kuroda K, Ueda M. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. *Biotechnol Lett.* 2011;33(1):1–9.
39. Shibasaki S, Ueda M, Mukai N, Kashiwamura N, Masuda T, Tanaka A. Cell surface display of thermostable lipase on *Saccharomyces cerevisiae* cells by using Sed1p as an anchor protein. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):4679–4684.
40. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(12):5301–17.
41. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45–66.
42. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22(4):249–70.
43. Gasser B, Mattanovich D. A yeast for all seasons—*Pichia pastoris* biotechnology. In: Benz JP, editor. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Springer; 2020. p. 93–116.
44. Lei H, Wang E, Ma Y, Li Z. *Pichia pastoris*: a promising alternative expression system for oral vaccine production. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(5):920–6.
45. Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(3):577–91.

46. Yang S, Sun S, Yan Q, Wang Y, Wang Y. Oral immunization with *Pichia pastoris*-expressed avian influenza virus H5 hemagglutinin induces protective immune responses in chickens. *Vaccine*. 2012;30(27):4081–6.
47. Viridi V, Coddens A, De Buck S, et al. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *E. coli* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(29):11809–14.
48. Pérez-Martínez I, Gómez-Chávez F, Estrada-Mondaca S, et al. Oral immunization with *Pichia pastoris* expressing HPV16 E7 induces mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*. 2012;30(41):5882–91.
49. Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, et al. Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PLoS One*. 2008;3(8):e2954.
50. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*. 2016;532(7600):512–516.
51. Wang CY, Chang CY, Chang MF. Development of a yeast cell surface display system using the C-terminal half of α -agglutinin for antigen presentation in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 2007;29(3):401–6.
52. Ueda M, Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol Adv*. 2000;18(2):121–40.
53. Kuroda K, Ueda M. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. *Biotechnol Lett*. 2011;33(1):1–9.

54. Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(3):577–91.
55. Lin Y, Zhang M, Liu J, et al. Display of VP2 protein of porcine parvovirus on the surface of *Pichia pastoris* and its immunogenicity in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(17):7483–92.
56. Wang F, Liu X, Chen J, et al. Surface display of CSFV E2 protein on *Pichia pastoris* and its immunogenicity in pigs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(12):5219–28.
57. Li Z, Wang Y, Chen W, et al. A recombinant *Pichia pastoris* oral vaccine displaying PEDV spike protein induces mucosal and systemic immune responses in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(5):2229–40.
58. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-2615.
59. Oster ME, Shay DK, Su JR, et al. Myocarditis Cases Reported After mRNA-Based COVID-19 Vaccination in the US From December 2020 to August 2021. *JAMA.* 2022;327(4):331-340.
60. Russell MW, Moldoveanu Z, Ogra PL, Mestecky J. Mucosal immunity in COVID-19: A neglected but critical aspect of SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2020;11:611337.
61. Zhou JY, Sun W, Zhang W, et al. Oral administration of recombinant *Pichia pastoris* expressing HA induces protective immune responses against H5N1 virus in mice. *Vaccine.* 2014;32(18):1955-62.

62. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):148-58.
63. Martirosyan A, Donnelly RF. Mucosal vaccination: a paradigm of mucosal adjuvants. *Curr Pharm Des.* 2015;21(27):4118-27.
64. Araya M, Cisternas M, Pino A, et al. Safety and probiotic properties of *Pichia pastoris*: A promising yeast for therapeutic applications. *Benef Microbes.* 2019;10(3):327-339.
65. Taguchi T. Experimental colitis induced by cholera toxin B subunit in mice. *Gastroenterology.* 1995;108(3):1016-24.
66. Walker RI. New vaccines for enteric diseases: development of live oral vaccines. *J Infect Dis.* 1990;161(6):1085-91.
67. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(23):2259-2261.
68. Levine-Tiefenbrun M, Yelin I, Katz R, et al. Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. *Nat Med.* 2021;27(5):790–792.
69. Van Doremalen N, Purushotham JN, Schulz JE, et al. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models. *Sci Transl Med.* 2021;13(607).
70. Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, et al. Construction and immunological evaluation of a recombinant *Pichia pastoris* vaccine expressing a *Mycobacterium bovis* antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(8):888–890.

71. Li Y, Wang Y, Liu Y, Ma J, Jia R, Fan Q, et al. Oral immunization with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing VP1 protein of foot-and-mouth disease virus induces protective immunity in mice. *Microb Cell Fact*. 2014;13:113. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0113-6>
72. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
73. Klasse PJ, Nixon DF, Moore JP. Immunoglobulin G (IgG) subclass profiles of anti-spike antibodies in COVID-19 patients: implications for vaccine design. *Front Immunol*. 2021;12:791985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.791985> (PMC8677488)
74. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003;4(9):835–842.
75. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):285–294.
76. Wang H, Yuan M, Li W, et al. SARS-CoV-2 vaccines induce differential subclass switching of IgG antibodies: implications for antibody function. *J Infect*. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.05.003>
77. Li Y, Lu Z, Wu W, Wang Y, Yu Y, Hu Y, et al. Oral immunization with recombinant *Pichia pastoris* expressing the E2 protein of classical swine fever virus induces protective immunity in mice. *Vaccine*. 2014;32(30):3617–3623. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.072>

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ana Melisa Dávila Carrillo

Título de tesis: Administración por vía oral del antígeno RBD del coronavirus SARS-CoV-2 mediante un acarreador biológico: Análisis de la respuesta inmune humoral en modelo murino.

Área de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nació en Monterrey, Nuevo León, México. El 22 de Noviembre de 1998.

Educación: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Licenciatura en Químico Clínico Biólogo en el año 2023.