



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Búsqueda de péptidos potenciales para diagnóstico del virus
SARS-CoV-2 mediante estrategias de bioinformática con
enfoque a población mexicana**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

SHARON PEREZ BALBAS

ASESORA DRA EN C. ROCIO TIRADO MENDOZA

COASESORA DRA EN C. LILIAN HÉRNANDEZ MENDOZA

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VAQUERRIÁN BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y examen profesional**

Búsqueda de péptidos potenciales para el diagnóstico del virus SARS-CoV-2 mediante estrategias de bioinformática con enfoque a población mexicana

Que presenta la pasante: **Sharon Perez Balbas**
Con número de cuenta: **311192368** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Septiembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

MCVB/cga*

El camino del progreso no es ni rápido ni fácil

Marie Curie

Agradecimientos

Simple y sencillamente agradezco cada día por tenerte en mi vida, desde el día 1, me haz cuidado, protegido y amado como nadie en la vida lo va a hacer, no habrá persona que me ame más que tú, Te amo y te adoro mami, tu ejemplo de que a cualquier edad se puede estudiar, me fortalece. Ma por fin lo logramos, ahora ya tienes 3 carreras.

Pa tu ejemplo de templanza hacia las circunstancias me ha inspirado a que yo también puedo.

Agradezco a mi familia por los buenos deseos y las buenas vibras que siempre me han mandado, no tengo como pagarles todo lo que han hecho por mí.

Luisito me encanta tenerte como mi hermano, siempre aprendo algo de ti, de tu resiliencia, siempre te voy a cuidar, siempre estaremos juntos.

A mis abuelitos, ¡Por fin lo logre!, aunque no lo vieron yo sé que desde el cielo estan felices por mí.

A los malos momentos, de ellos aprendí que puedo ser fuerte, rendirte no es una opción, cuando se cierra una puerta, una ventana se abre.

Xime y Alex, Mimir ustedes son las personitas más divertidas e inteligentes, que nada los detenga, siempre van a ser los más inteligentes y los más capaces, son los niños más amorosos y alegres. Besitos en sus mulleras.

Gracias a todos por los que en el algún momento me apoyaron, a mis eternos amigos del alma, Sol, Roger, Milton, Eli, Dulce, Alexis y Verónica.

Javier, gracias por la oportunidad de aceptarme en tu grupo de trabajo, aprendí, mucho de ti, te extraño, el tiempo que te conocí fue corto, pero tu sabiduría fue muy grande, no voy a olvidar nunca tus frases, nunca olvidare cuando me decías “take easy” o “Brutal”.

Rocio eres lo mejor, tomaste este proyecto que Javier y yo diseñamos, lo tomaste en tus manos y me acobijaste.

Lilian, más que mi asesora, eres y serás mi amiga, porque no cualquiera te apoya en la forma en la que tú lo hiciste, eres muy importante en mi vida.

Mariana, Lupita y Laura, me encanto pasar el tiempo con ustedes, el tiempo que pasamos juntas fue el mejor que pase en el laboratorio.

Diana aprendí que con pasión puedes lograr lo que te propones.

A mi jurado por brindarme el tiempo y atención en cada revisión, aprendí que siempre se puede mejorar.

Agradezco la oportunidad de haber estudiado en la poderosísima FES Cuautitlán, a mis maestros.

Agradezco al laboratorio de Biología del Citoesqueleto y Virología por la oportunidad de desarrollarme en todo ámbito, tanto en el personal como en el académico.

Índice

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen.....	8
1.INTRODUCCIÓN.....	9
2.MARCO TEÓRICO	11
2.1 Características del virus SARS-CoV-2.....	11
2.2 Genoma viral	12
2.3 Proteínas virales	13
2.3.1 Proteína S.....	13
2.3.2 Proteína N.....	15
2.3.3 Proteína M.....	16
2.3.4 Proteína E.....	16
2.4 Proteínas no estructurales	17
2.5 Ciclo Replicativo	19
2.5.1 Fusión y entrada viral.....	19
2.5.2 Síntesis de RNA.....	22
2.5.3 Expresión de proteínas estructurales y accesorias.	23
2.5.4 Ensamblaje y liberación	24
3.RESPUESTA INMUNE ANTE EL VIRUS SARS-COV-2	24
3.1 Respuesta innata.....	24
3.1.1 Tormenta de citocinas.....	25
3.2 Respuesta inmune adaptativa.....	29
3.2 Respuesta inmune de las células T	30
3.2.2 Células T de memoria en covid-19.....	31
3.2.3 Células b.....	32
3. SISTEMA INMUNITARIO EN EL DESARROLLO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS...33	
3.1 Complejo mayor de histocompatibilidad y presentación antigénica.....	33
3.1.2 Procesamiento y presentación antigénica.....	33
4. PRESENTACIONES CLÍNICAS Y PATOGÉNESIS DE LA COVID-19.....	35
5. AGENTES ANTIVIRALES.....	42
6. PROFILAXIS Y MEDIDAS DE PREVENCIÓN.....	44
7. DIAGNÓSTICO.....	44
7.1 Prueba basada en PCR	45
7.2 Pruebas serológicas	47
8. EPIDEMIOLOGÍA	51
8.1 Casos de la Covid-19 en México.....	51
8.2 Casos activos	53
8.3 Distribución demográfica de casos totales de Covid-19	54
8.4 Características clínicas y antecedentes de riesgo.....	56
8.5 Defunciones.....	57
9. ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE PÉPTIDOS POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	60
9.1 IEDB	60
9.2 Datos que se incluyen en IEDB.....	61
9.3 Estructura de los datos	62
9.4 Herramienta de predicciones vinculantes con moléculas MHC clase I y II	64
9.4.1 HLA.....	64

9.4.2 PREDICCIONES VINCULANTES DEL MHC CLASE I.....	66
9.4.3 Predicciones vinculantes de HLA clase II.....	67
9.4.4 Incorporación de datos de elución en la predicción de epítomos.....	69
9.4.5 Predicciones de inmunogenicidad más allá de la unión y presentación del ligando MHC.....	70
10. GISAID	71
10.1 Nomenclaturas utilizadas en GISAD	71
10.1.1 Clado	72
10.1.2 Linaje	73
11. JUSTIFICACIÓN.....	75
12. HIPÓTESIS.....	75
13. OBJETIVOS.....	75
13.1 Objetivo general.....	75
13.2 Objetivo particular	75
14. METODOLOGÍA	77
14.1 Análisis de secuencia génicas de SARS-CoV-2.....	77
14.2 Identificación de alelos de HLA de mayor frecuencia en la población mexicana	77
14.3 Predicción de epítomos para células T	77
14.4 Inmunogenicidad.....	79
14.5 Antigenicidad	79
14.6 Cobertura de población.....	79
15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	80
16. CONCLUSIONES	94
17. PERSPECTIVAS	96
18. REFERENCIAS	97
19. Anexo 1.....	103

Índice de Figuras

Figura 1. Taxonomía de SARS-CoV-2.....	11
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes componentes de la partícula viral de SARS CoV-2.....	12
Figura 3. Genoma policistrónico del SARS-CoV-2.....	13
Figura 4. Diagrama de la Proteína S.....	15
Figura 5. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2 y posibles sitios diana terapéuticos.....	20
Figura 6. Vías de entrada del virus SARS-CoV-.....	21
Figura 7. Transcripción discontinua	22
Figura 8. Las respuestas inmunes innatas y adaptativas contra la infección por coronavirus (CoV).....	25
Figura 9. Tormenta de citocinas	27
Figura 10. Procesamiento antigénico vía MHC clase I y II)	35
Figura 11. Descripción de patología pulmonar en pacientes con enfermedad infecciosa por COVID-19.	37
Figura 12. Efectos a largo plazo de COVID-19.....	41
Figura 13. ELISA tipo sándwich para la detección de antígenos del SARS-CoV-2.....	49
Figura 14. ELISA de captura para la detección de anticuerpos humanos contra los antígenos del SARS-CoV-2.....	49
Figura 15. Inmunoensayo de flujo lateral para la detección de anticuerpos humanos IgM o IgG anti-SARS-CoV-2.....	50
Figura 16. Mapa de la distribución de la tasa de incidencia de casos acumulados de COVID-19 por entidad de residencia en México.....	52
Figura 17. Casos totales acumulados por entidad federativa de residencia.....	52
Figura 18. Casos confirmados, negativos y sospechosos con y sin muestra.....	53
Figura 19. Principales comorbilidades en casos positivos a COVID-19.....	57
Figura 20. Principales comorbilidades en defunciones positivas a COVID-19.....	57
Figura 21. Distribución de defunciones positivas y sospechosa COVID-19 por semana epidemiológica de defunción.	58
Figura 22. IEDB.....	61
Figura 23. El flujo de trabajo general del desarrollo de herramientas inmunoinformáticas.....	63
Figura 24. Nomenclatura actual del sistema HLA.....	66
Figura 25. Principales variantes de circulación.....	74
Figura 27. Árbol filogenético de SARS CoV-2.....	80
Gráfica 1. Linajes presentes en México hasta el 9 de mayo del 2021.....	80
Gráfica 2. Distribución de clados presentes en México hasta el 9 de mayo del 2021...82	82
Grafica 3. Mutaciones más frecuentes de SARS-CoV-2 en México.....	83
Grafica 4. Distribución de moléculas HLA de clase I locus A en la población mexicana...85	85
Gráfica 5. Distribución de moléculas HLA de clase I locus B en la población mexicana...86	86
Grafica 6. Distribución de HLA de clase II en la población mexicana.....	87
Gráfica 7. Cobertura de población de epítomos para HLA de clase I.....	92
Gráfica 8. Cobertura de población de epítomos de HLA de clase II.....	92
Gráfica 9. Cobertura de población de epítomos de HLA de clase I y clase II.....	93

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones de las proteínas no estructurales de SARS-CoV-2 en el ciclo de replicación del SARS-CoV-2, así como en la patogenia del hospedador.....	18
Tabla 2. Características de los marcos de lectura abiertos (ORF) de SARS-CoV-2....	23
Tabla 3. Citocinas presentes en COVID-19.....	27
Tabla 4. Principales efectores del sistema inmune innato ante SARS-CoV-2.....	28
Tabla 5. Manifestaciones clínicas de la infección por SARS-CoV-2.....	38
Tabla 6. Cambios inmunológicos en la COVID-19.....	39
Tabla 7. Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de la COVID-19.....	42
Tabla 8. Profilaxis y medidas de prevención.....	44
Tabla 9. Pruebas serológicas y moleculares.....	50
Tabla 10 Casos positivos activos a COVID-19 por entidad de residencia.....	54
Tabla 11. Distribución de casos positivos y asociados a COVID-19 por edad y sexo.....	55
Tabla 12. Distribución de defunciones por COVID-19 por edad y sexo.....	56
Tabla 13. Defunciones positivas y sospechosas a COVID-19 según entidad federativa de notificación.....	59
Tabla 14 Comparación de las herramientas de predicción de epítomos de clase I y clase II de MHC disponibles en IEDB.....	69
Tabla 15 Principales clados definidos por GISAID para SARS-CoV-2.....	73
Tabla 16. Distribución de Clados en México.....	81
Tabla 17. Epítomos de las proteínas S D614G, E, N, M NSP12_P323L para MHC I de la población mexicana.....	89
Tabla 18. Epítomos de las proteínas S D614G, E, N, M NSP12_P323L para MHC II de la población mexicana.....	90

ABREVIATURA

(Ac) ácido	(MTasa) Metiltransferasa
(ACE2) Enzima Convertidora de Angiotensina 2	(N) Nucleocápside
(ADNc) DNA complementario	(NAB) Unión a Ácido Nucleico
(ADRP) ADP-ribosa-1'-fosfato;	(NendoU) Endoribonucleasa viral
(CID) Coagulación Intravascular Diseminada	(Nps) Proteínas no Estructurales
(CL) Enlazador Central	(OBI) The Ontology of Biomedical Investigation
(CoV) Coronavirus	(ORF) Marcos de Lectura Abiertos
(CTL) Linfocito T Citotóxico CD8 ⁺	(pHLA) Péptido HLA
(D) Ácido aspártico	(PLPro) Proteasa de tipo papaína
(DPP4) Dipeptidil Peptidasa 4	(pMHC) Péptido MHC
(E) Envoltura	(RBD) Dominio de Unión
(ELISA) Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas	(RBM) Motivo de Unión al Receptor
(ERGIC) Compartimento intermedio del retículo Endoplásmico-Golgi	(RdRp) RNA polimerasa dependiente de RNA
(ExoN) Exoribonucleasa viral	(RER) Retículo Endoplasmático
(FP) Péptido de Fusión	(RNA) Ácido Ribonucleico
(G) Glicina	(RNAg) Ácido Ribonucleico genómico
(G-CSF) Factor estimulador de colonias de granulocitos	(RNP) Nucleocápside Helicoidal
(GM-CSF) Factor estimulador de colonias de mastocitos y granulocitos	(rRNA) Ácido Ribonucleico ribosomal
(HLA) Human Leukocyte Allele	(RT-PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
(HTL) Linfocito T Helper CD4 ⁺	(RT-qPCR) PCR de transcripción inversa cuantitativa
(IFN) Interferón	(S) Spike
(IgG) Inmunoglobulina G	(SARS) Síndrome Respiratorio Agudo Severo
(IgM) Inmunoglobulina M	(SDRA) Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda
(IL) Interleucina	(sgRNA) Ácido ribonucleico de guía sencilla
(InDRE) Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	(SISVER) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
(LB) Linfocitos B	(SUD) dominio exclusivo del SARS
(LT) Linfocitos T	(TAP) Transportador asociado con el procesamiento de antígenos
(M) Matriz	(TM) Dominio Transmembrana
(MALT) Tejidos linfoides asociados a la mucosa	(TMH1-TMH3) Ectodominio N-terminal seguido de tres hélices transmembrana
(mCEACAM1a) Relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario Murido 1	(TMPRSS2) Receptor por la Serina Proteasa Transmembrana 2 del Hospedera
(M-CSF) Factor estimulador de colonias de mastocitos	(TNF) Factor de Necrosis Tumoral
(MERS) Síndrome Respiratorio Del Medio Oriente	(TRS-L) Secuencias Líder Reguladoras de la Transcripción
(MHC) Complejo Principal de histocompatibilidad	(TSR) Secuencias Reguladoras de La Transcripción
(Mpro) Proteasa principal	(Ub) similar a ubiquitina
(mRNA) Ácido Ribonucleico mensajero	ICA (ensayo inmunocromatográfico)
(MRO) MHC Restriction Ontology	IEDB (Immune Epitope Database and Analysis Resource).

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron a las proteínas que presentaban el mayor número mutaciones reportadas en GISAID las cuales son: en la proteína S (D614G), en la proteína N (G204R) y en la proteína no estructural Nsp12 (R203K). De acuerdo con GISAID en México, hasta el 13 de mayo de 2021, los clados más frecuentes corresponden a GR, G, GH y GRY. Por ello, se propuso el diseño de péptidos in silico para su uso en pruebas diagnósticas, de acuerdo con los clados que se han reportado con mayor frecuencia en México. Se tomaron en cuenta los alelos MHC que prevalecen en la población mexicana y se analizaron 7034 secuencias peptídicas de diferentes proteínas virales del SARS CoV-2. Las predicciones se realizaron con los recursos IEDB (Proteasomal cleavage/TAP transport/MHC class I combine predictor and T cell class I pMHC immunogenicity predictor y MHC-II Binding Predictions) para los diferentes péptidos, posteriormente se calculó la inmunogenicidad de cada uno (Vaxijen v2.0 online) y La cobertura de población para epítomos de células T se calculó mediante la herramienta proporcionada por IEDB.

Se predijeron más de 30,000 péptidos a partir de las proteínas obtenidas de GISAID, de los cuales se seleccionaron los péptidos que cumplieran con las características de ser inmunogénicos y con capacidad de interactuar con las moléculas del sistema HLA de clase I y II más frecuentes en la población mexicana identificándose los siguientes péptidos: Para HLA de clase I: LPFNDGVYF, WPWYIWLGF de la proteína S_ D614G, FLAFVVFL de la proteína E, SPRWYFYLL de la proteína N, LVIGAVILR de la proteína M y los péptidos TSFGPLVRK, VVSTGYHFR de la proteína NSP_12P323L. Para HLA de clase II, FIASFRLFARTRSMW; IASFRLFARTRSWS; ASFRLFARTRSMWSF de la proteína M.

1.INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoV) son virus respiratorios que pueden causar enfermedades que cursan desde el resfriado común hasta una enfermedad severa como: el Síndrome Respiratorio Del Medio Oriente (MERS) y el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). Estas enfermedades se consideran zoonosis, ya que los coronavirus responsables de estas entidades nosológicas dieron un salto interespecies de su hospedero intermediario al humano, estos virus zoonóticos tienen homología de secuencia con los coronavirus que infectan a su hospedero natural. En el caso de MERS y SARS los hospederos intermediarios descritos son el camello y la civeta respectivamente.

El nuevo CoV, designado como SARS 2 (SARS-CoV-2), fue identificado por primera vez en Wuhan por el Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades en diciembre del 2019 y es el agente causal de la nueva enfermedad por coronavirus (COVID-19) que se extendió rápidamente por toda China y a los 6 continentes en el primer trimestre del 2020 (Figura 1). La OMS declara la pandemia por COVID-19 el 11 de marzo de 2020. El número de casos de SARS-CoV-2 a mayo del 2021 es de 157, 290,219 en el mundo y ha generado más de 32,777,278 muertes a nivel global (mayo 2021). México está posicionado como el país número 15 con más casos (2, 366,496) y el quinto país con más defunciones (218,657) al 9 de mayo del 2021.

El cuadro clínico de la COVID-19 se divide en: período de incubación, asintomático, presintomático, período sintomático no grave con presencia de virus, etapa sintomática respiratoria que puede ir de leve a grave probablemente asociado a la carga viral, en todos los casos puede generar secuelas post-COVID-19 ⁶⁵. Tiene un periodo de incubación de 2-14 días, posteriormente, los pacientes pueden cursar con fiebre, mialgias, cefalea, tos, odinofagia, pérdida del gusto y olfato en los casos que se consideran leves, estos pacientes pueden recuperarse satisfactoriamente después de 15 días de evolución, o progresar a un

estadio grave. La COVID-19 grave se caracteriza por dificultad respiratoria que puede resolverse o bien generar un cuadro severo con Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA). Además, pueden presentarse manifestaciones extrapulmonares (complicaciones cardiovasculares, síntomas gastrointestinales, disfunción renal, manifestaciones neurológicas) que llevan a la muerte del paciente⁵⁷.

El diagnóstico de la COVID-19 se realiza por la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), este procedimiento se ha convertido en el método estándar para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, se han desarrollado otros basados en la detección de antígenos y anticuerpos, tal es el caso de las pruebas de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) e ICA (ensayo inmunocromatográfico)^{59.77}.

Los ensayos para detección de antígenos se basan en la identificación de las proteínas virales S (spike), N (nucleocápside), M (matriz) o E (envoltura), estas pruebas son de gran utilidad durante los primeros días de la infección, que se asocia al periodo de mayor carga viral, tanto en suero como en muestras de hisopado nasal. Otra prueba ampliamente aceptada es la prueba de detección de inmunoglobulinas G y M contra el virus, esta prueba suele ser positiva entre 7-10 días después de iniciada la sintomatología.¹³ Los niveles elevados de IgM corresponden al estadio agudo de la enfermedad y la presencia de IgG indica memoria inmunológica. La combinación de las pruebas de antígenos/anticuerpos y RT-PCR, resulta en una sensibilidad del 99,4%.⁷⁸

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS SARS-CoV-2

Los coronavirus (CoV) son patógenos importantes para los vertebrados, con la capacidad de causar enfermedades respiratorias, entéricas y sistémicas en humanos y animales. Son virus con envoltura que pertenecen a la subfamilia Orthocoronavirinae de la familia Coronaviridae, orden Nidovirales.⁴² La subfamilia se divide de acuerdo con sus características filogenéticas y genómica en cuatro géneros: coronavirus alfa (α), coronavirus beta (β), coronavirus gamma (γ) y coronavirus delta (δ)⁴⁹. Tienen un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo grande (27-32 kb), no segmentado, poliadenilado⁷⁵. En su envoltura presenta una proteína que semeja picos en forma de corona que se proyectan desde su superficie (80-160 nM de tamaño), de donde deriva su nombre.⁵⁸

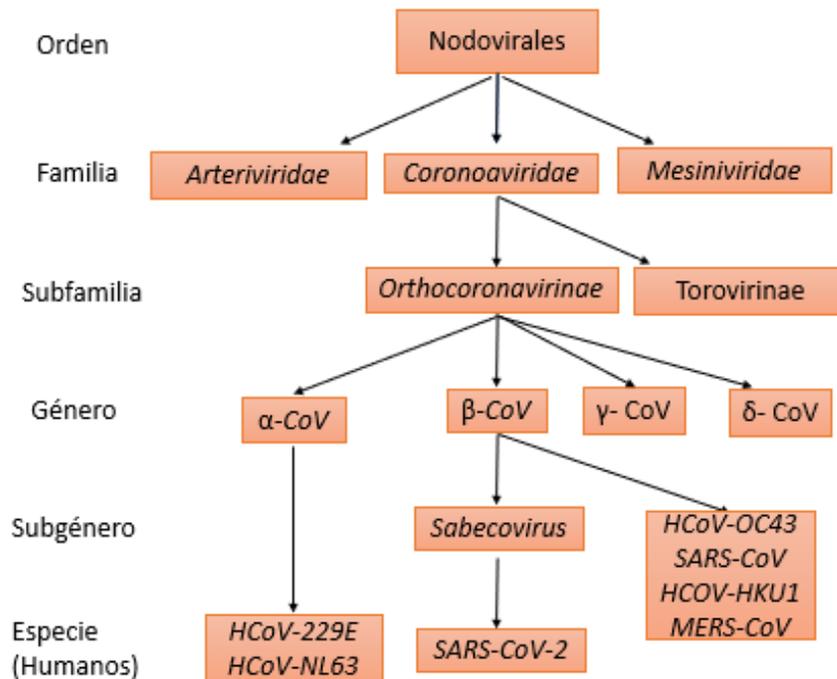


Figura 1. Taxonomía de SARS-CoV-2. Modificado de Malik, Y. A. (2020)³⁷

2.2 Genoma viral

El genoma del SARS-CoV-2 contiene al menos diez marcos de lectura abiertos (ORF). Los primeros ORF representan dos tercios del RNA viral. Se traducen en dos poliproteínas grandes, que se procesan en 16 proteínas no estructurales (nsp1 a nsp16) éstas forman el complejo viral replicasa-transcriptasa. Las nsps reorganizan el retículo endoplásmico en vesículas de doble membrana, donde tienen lugar la replicación viral y la transcripción. El otro tercio del genoma codifica cuatro proteínas estructurales principales (Figura 2); proteínas de Spike (S), Envoltura (E), Nucleocápside (N) y de Matriz (M), y varias proteínas accesorias.¹¹

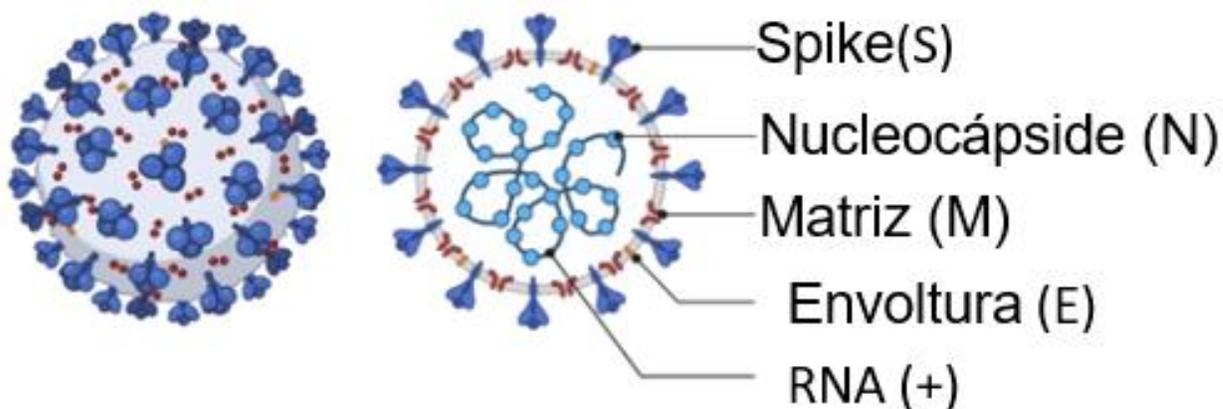


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes componentes de la partícula viral de SARS CoV-2. Los coronavirus son virus envueltos, de RNA monocatenario de sentido positivo, no segmentado, presenta cuatro proteínas estructurales: Spike (S), Envoltura (E), Matriz (M) y Nucleocápside (N), la proteína Spike media la entrada del SARS-CoV-2 a las células hospedera. Creado con BioRender.com

2.3 Proteínas virales

El genoma viral codifica para cuatro proteínas estructurales principales: Spike (S), de membrana (M), Envoltura (E) y Nucleocápside (N), codificadas en el extremo 3' del genoma, como se muestra en la Figura 3 constituyendo la fase tardía en la replicación de este virus.

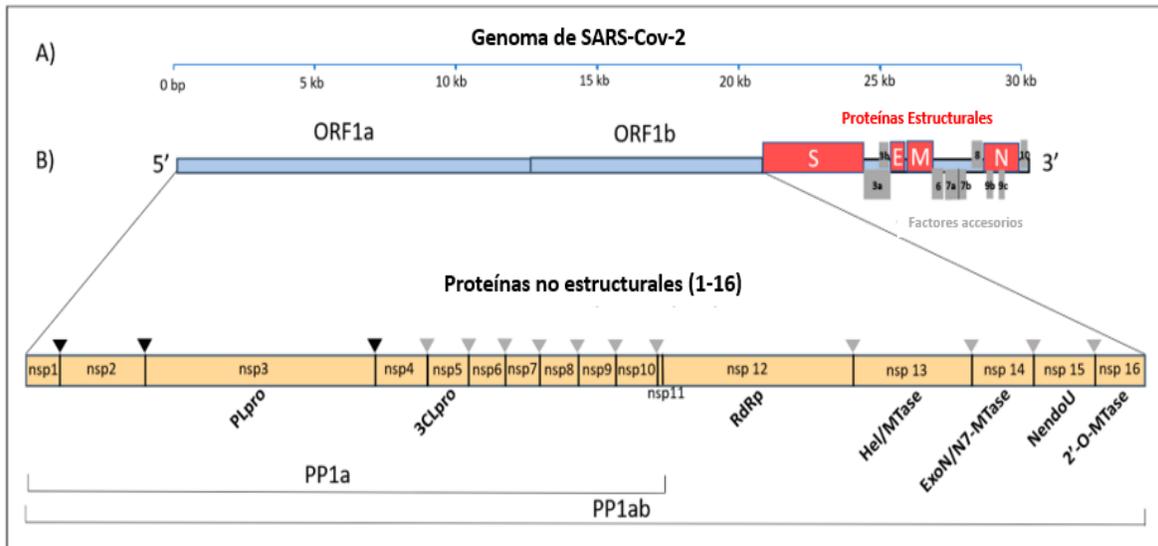


Figura 3. Genoma policistrónico del SARS-CoV-2. (A) Genoma de SARS-CoV-2 organizado en ORF individuales. (B) La poliproteína 1ab (PP1ab) incorpora 16 proteínas no estructurales (Nsps). Tomado de 51. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020)⁵⁰

2.3.1 Spike(S)

La proteína S es una glicoproteína que funciona como ligando para el receptor de la célula hospedera y permite que el virus se adhiera a la superficie de las células susceptibles. Su nombre se debe a que conforma estructuras en forma de picos, en la superficie exterior de la envoltura viral, constituidas por trímeros de la proteína S. Después del reconocimiento y la unión al receptor, el virus ingresa a la célula por endocitosis o por fusión directa de su envoltura con la membrana plasmática de la célula. El SARS-CoV y el SARS-CoV-2 utilizan como receptor a la Enzima Convertidora De Angiotensina 2 (ACE2), mientras que el MERS-CoV utiliza la Dipeptidil Peptidasa 4 (DPP4) y los coronavirus muridos utilizan la Molécula de Adhesión Relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario Murido 1 (mCEACAM1a).³⁴

La especificidad de receptor; determina el tropismo tisular y el rango de especies hospedadoras de los diferentes coronavirus. La especificidad de la proteína S por su receptor está determinada por su dominio de unión (RBD) (también llamado dominio C), responsable del reconocimiento por el receptor de la célula hospedera. La secuencia de la proteína S se divide comúnmente en dos secciones, denominadas S1 y S2, que corresponden a las dos subunidades en las que la proteína es escindida por proteasas de la hospedera después del reconocimiento del receptor. El RBD se encuentra en la subunidad S1 y contiene un motivo de unión al receptor (RBM) que interactúa directamente con el ligando. Aun cuando el SARS-CoV y el MERS-CoV tienen diferentes receptores celulares, sus RBD son estructuralmente similares, pero los RBM difieren en secuencia. Los RBM de SARS-CoV y SARS-CoV-2 están compuestos por ~ 70 aminoácidos, mientras que el MERS-CoV RBM está compuesto por ~ 83 aminoácidos.^{43,58}

En particular, el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 tienen una identidad de secuencia del 89,8% en la subunidad S2, que participa en el proceso de fusión de la envoltura viral, y las subunidades S1 contienen la región RBD que interacciona con la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE2) que es el receptor para infectar células en humanos (Figura 4).⁸³ Más importante aún, es la afinidad de unión a ACE2 del RBD en la subunidad S1 de la proteína S del SARS-CoV-2 ya que es de 10 a 20 veces mayor que la del SARS-CoV, lo que puede contribuir a una mayor infectividad y transmisibilidad del SARS-CoV-2 en comparación con el SARS-CoV. Se considera que la subunidad S2 actúa como una proteína de fusión viral de clase I, promoviendo la entrada del virus a la célula hospedera a través de la fusión de la membrana. Esta subunidad contiene un Péptido de Fusión (FP), que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. La subunidad S2 contiene dos dominios de hepta repetidos α -helicoidal adicionales, llamados HR1 y HR2, que interactúan entre sí para formar una conformación de espiral enrollada, lo que facilita la

fusión de la membrana al unir la envoltura viral y la membrana de la célula hospedera. La subunidad S2 también contiene un Dominio Transmembrana (TM) que ancla la proteína S a la envoltura viral, así como un endodominio rico en cisteína, también conocido como dominio CP (citoplasmático), orientado hacia el interior de la partícula viral.^{43,58}

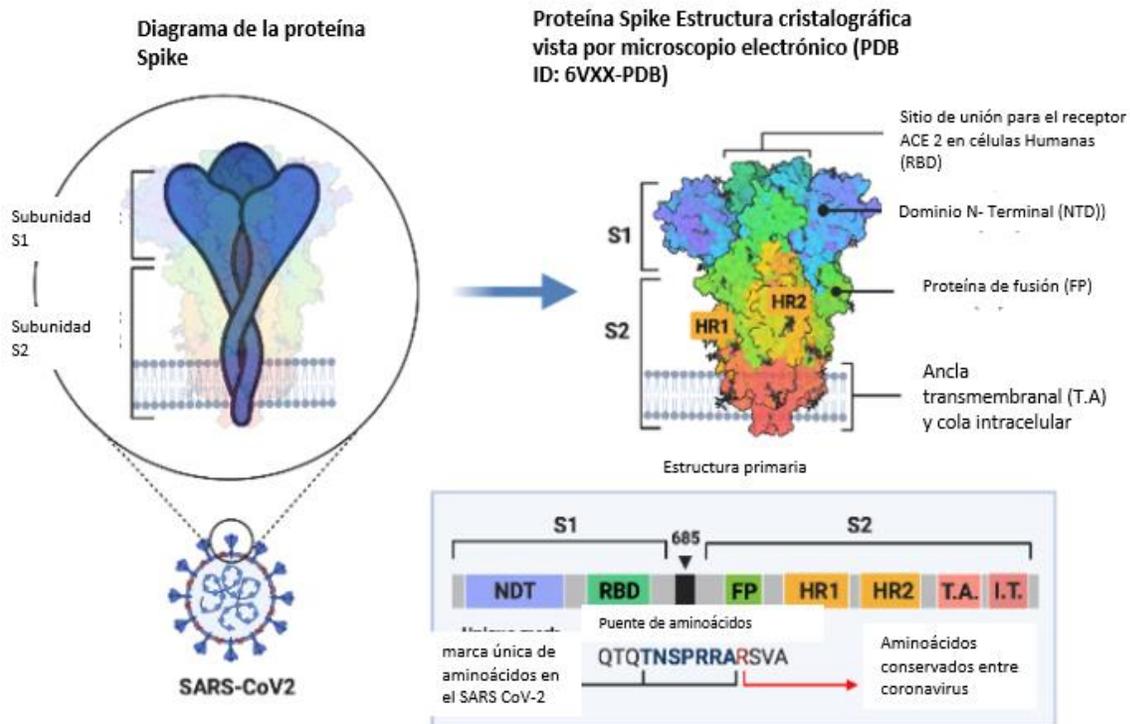


Figura 4. Diagrama de la Proteína S. Se compone de dos subunidades, S1 y S2, y se representa comúnmente como un pico en forma de espada. Sin embargo, la estructura real de esta proteína se puede observar mediante cristalografía. <https://app.biorender.com/biorender-templates>

2.3.2 Proteína N

La proteína de la nucleocápside (N) es una proteína estructural con tres dominios conservados, brazo N, enlazador central (CL) y cola (C) con un peso molecular de 43 a 50 kDa. Se asocia al RNA genómico (RNAg) para conformar la nucleocápside helicoidal (RNP) e interactúa con las otras proteínas estructurales durante el ensamblaje de los viriones, lo que lleva a la encapsidación del genoma. Esta proteína se produce en altas concentraciones durante la infección y es altamente inmunogénica, por lo que es un blanco para el desarrollo de vacunas.^{2,4}

2.3.3 Proteína M

La proteína M, es una glicoproteína transmembrana larga de tipo III y es la proteína estructural más abundante, está constituida por 222 aminoácidos. Tiene tres dominios principales: Ectodominio N-terminal seguido de tres hélices transmembrana (TMH1-TMH3) y el dominio endo C-terminal. Esta proteína tiene interacciones homotípicas, así como, heterotípicas con otras proteínas estructurales, S, E y N. Las interacciones homotípicas se presentan a lo largo de la proteína M, incluidas las regiones TM, su interacción con las proteínas E y N es a través del endodominio C-terminal. Estas interacciones son esenciales para el ensamblaje de nuevos viriones. La proteína M induce una fuerte respuesta humoral y los epítomos antigénicos se han identificado en las regiones TM1 y TM2 de la proteína M del SARS-CoV.^{34,35}

2.3.4 Proteína E

La proteína E es un polipéptido pequeño de 75 aminoácidos, su peso molecular varía de 8,4 a 12 kDa. Estructuralmente se divide en tres dominios: un ectodominio hidrofílico N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) seguido de un endodominio C-terminal hidrofílico largo. La estructura por Resonancia Magnética Nuclear del dominio TMD de la proteína E de SARS CoV-2, muestra un haz de hélice pentamérica que rodea un poro central hidrófilo catiónico estrecho, similar a las vioporinas. La actividad de las vioporinas de la proteína E, se propone como inductora de la tormenta de citocinas.²

La incorporación eficiente de estas proteínas y el complejo de ribonucleoproteína es esencial para la maduración y gemación de nuevas partículas virales. Las proteínas M y E son importantes en la regulación del ensamblaje del virión, ambas proteínas se conservan en β -coronavirus y comparten más del 90% de identidad de secuencia con sus homólogos de SARS-CoV.²

2.4 Proteínas no estructurales

La región 5' del RNAg codifica las proteínas moduladoras de la respuesta inmune de la hospedera nsp1 y nsp2. El nsp1 interactúa con la subunidad pequeña ribosomal de la hospedera para detener la síntesis de proteínas antivirales al apagar la síntesis de proteínas de la hospedera en las células infectadas. Las secuencias de aminoácidos de nsp1 de SARS-CoV y la de SARS-CoV-2 son 84% idénticas, lo que indica funciones comunes realizadas por nsp1 en ambos virus. La estructura cristalográfica de la proteína nsp1 de SARS-CoV-2, que interactúa con las subunidades ribosómicas 40S humanas, sugiere que su monómero está constituido por 180 residuos de aminoácidos que comprenden una α hélice corta, seguida de un bucle corto y una segunda α hélice más grande. La interacción hidrofóbica entre las dos α hélices estabiliza la estructura de la proteína. El dominio C-terminal de nsp1 hace interacciones estrechas con uS3, uS5 del rRNA y la hélice 18 en la subunidad pequeña ribosomal 40S y bloquea el túnel de entrada del mensajero (mRNA). La nsp2 interactúa con las señales involucradas en el ciclo de la célula hospedera, en el SARS-CoV, nsp2 interactúa específicamente con las proteínas humanas prohibitin 1 y prohibitin 2 que están involucradas en la función y morfología mitocondrial y la proliferación celular.^{28,51}

Tabla 1. Funciones de las proteínas no estructurales de SARS-CoV-2 en el ciclo de replicación del SARS-CoV-2, así como en la patogenicidad del hospedador.^{2,34}

Proteína	Participación en el ciclo viral	Patogénesis del hospedador
nsp1		Promueve la degradación de proteínas de la hospedera y mediante la interacción con la subunidad ribosómica 40S y el mRNA del hospedero, bloquea la traducción de proteínas del hospedero, lo que resulta en el bloqueo de la respuesta inmune innata
nsp2		No se conoce su función, se une a proteínas "PROHIBIDAS" Altera el ciclo celular al unirse a las proteínas prohibitin 1 y prohibitin 2
nsp3 (PL ^{pro})	Proteasa, unión ssRNA	Proteína transmembranal de múltiples dominios, sus actividades incluyen: dominios Ubl1 y Ac, interactúan con la actividad ADRP de la proteína N, promueve la expresión de citocinas dominio PLPro / dominio Deubiquitinasa, escinde la poliproteína viral y bloquea la respuesta inmune innata del hospedero Ubl2, Ubl2, NAB, G2M, SUD, Dominios Y. Interactúa con el RNA del hospedero G-quadruplex para inhibir la traducción del hospedero, suprime la respuesta inmunitaria innata del hospedera mediante deubiquitinación, desISGilación y unión a ADPr*
Nsp4	Ensamblaje de las vesículas virales de doble membrana	Proteína de andamio transmembrana, importante para el plegamiento estructural adecuado de DMVs* Mpro*, escinde la poliproteína viral
Nsp5 (M ^{pro} 3CL ^{pro})	Proteasa (parecida a la quimotripsina)	Mpro*, escinde la poliproteína viral, inhibición de señalización IFN
Nsp6	Inducción de autofagosoma	Potencial proteína de andamio transmembrana
Nsp7	Síntesis de cebadores y replicación del RNA Cofactor de Nsp12	Forma un complejo hexadecamerico con nsp8, puede actuar como abrazadera de procesividad para la RNA polimerasa
Nsp8	síntesis de cebadores y replicación del RNA Cofactor de Nsp12	Forma un complejo hexadecamérico con nsp7, puede actuar como abrazadera de procesividad primase para la RNA polimerasa; puede actuar como primasa
Nsp9	Papel putativo como unión a ssRNA	Proteína de unión al RNA, interactúa con la proteína celular DEAD - box RNA helicase 5 (DDX5) para facilitar la replicación del virus.
Nsp10	mRNA cap metilación del extremo 5' (metilación encapuchada/ protección mRNA)	Cofactor para nsp16 y nsp14, forma heterodímero con ambos y estimula la actividad ExoN y 2-O-MT

	Cofactor de Nsp16 y Nsp14	
Nsps12	Replicación de RNA, encapsamiento mRNA	RdRp*
Nsps13 (helicasa)	Actividad de helicasa durante la replicación, Actividad 5'-trifosfatasa para la protección de mRNA	RNA helicasa, 5 'trifosfatasa
Nsps14	Corrección de pruebas durante la síntesis de mRNA, N7-metiltransferasa durante la protección del mRNA	N7 MTasa) y exoribonucleasa 3'-5', ExoN; N7 MTase agrega un límite 5' a los RNA virales, la actividad de ExoN es importante para la corrección de pruebas del genoma viral
Nsps15	La endoribonucleasa escinde el RNA en los sitios de poliuridilato	Endoribonucleasa vira
Nsps16	2' - O - ribosa metiltransferasa durante la protección del mRNA	2'-O-MT; protege el RNA viral del reconocimiento de MDA5

NOTA: Ubl, similar a ubiquitina; Ac, ácido; ADRP, ADP-ribosa-1'-fosfato; PLPro, proteasa de tipo papaína; NAB, unión a ácido nucleico; SUD, dominio exclusivo del SARS; DMV, vesículas de doble membrana; Mpro, proteasa principal; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; MTasa, metiltransferasa; Exoribonucleasa viral, ExoN; Endoribonucleasa viral, NendoU; 2'-O-MT, 2'-O-Metiltransferasa; MDA5, proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7282679/> y Kadam, S. B., et al (2021).³⁴

2.5 Ciclo replicativo

2.5.1 FUSIÓN Y ENTRADA VIRAL

Las proteínas de entrada viral deben plegarse a un estado energéticamente estable y, sin embargo, deben experimentar una transición conformacional posterior que proporcione suficiente energía para superar la repulsión natural entre el virus y las membranas celulares. Después de la unión a la superficie de la célula hospedera, la entrada del virus en la célula ha sido descifrada por dos caminos diferentes basados en la disponibilidad de la proteasa de la célula hospedera para activar la proteína de punta unida al receptor (Figura 6). En el primer camino, los CoV invadieron la célula hospedera como una endosoma que está mediado por endocitosis dependiente e independiente de clatrina.^{26, 31,58}

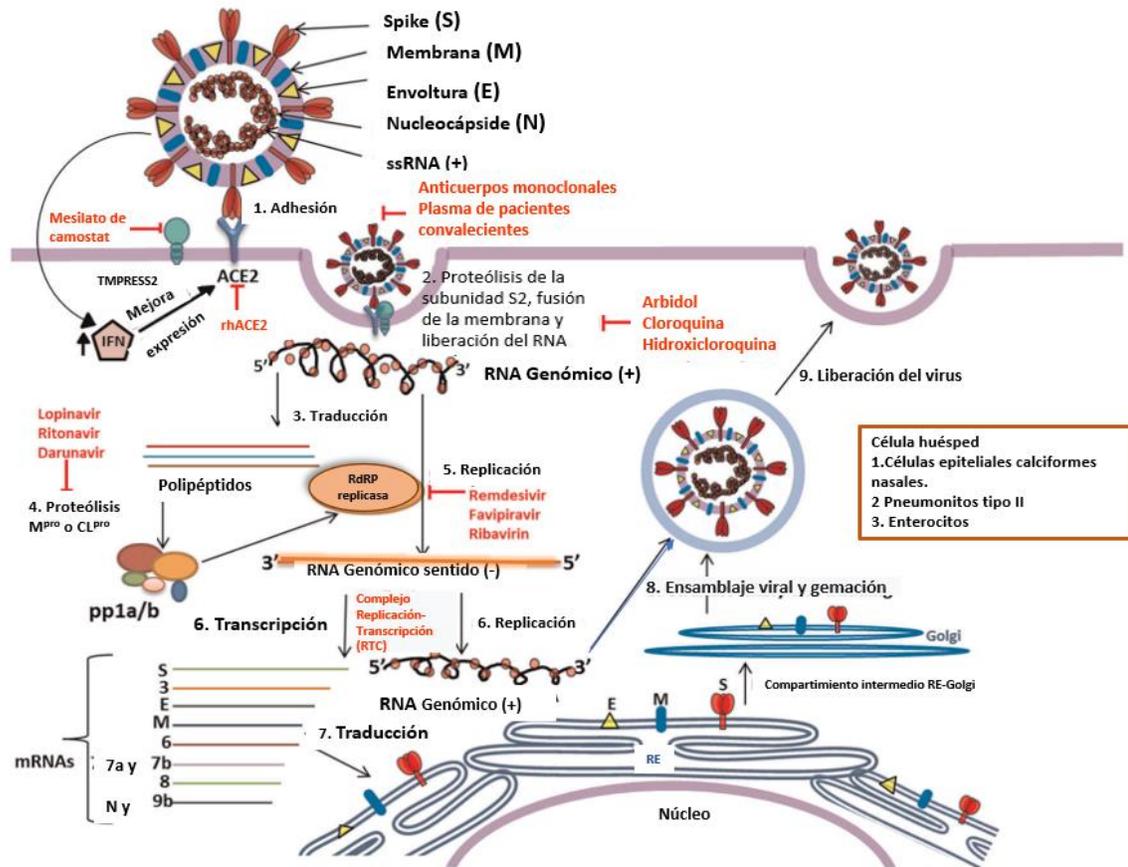


Figura 5. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2 y posibles sitios diana terapéuticos. El SARS-CoV-2 ingresa al organismo por las rutas nasal-oral. Modificado de SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights Kadam, S. B et al. (2021)²⁶

La proteína S pasa a un estado llamado metaestable, un estado de menor energía, antes de la fusión de la membrana. Al igual que en el SARS-CoV y otros coronavirus, esta transición de proteína S se habilita a través de dos pasos de escisión proteolítica después de la participación de ACE2. Después de la unión a la superficie de la célula hospedera, la entrada del virus en la célula ha sido descifrada por dos caminos diferentes basados en la disponibilidad de la proteasa de la célula hospedera para activar la proteína de punta unida al receptor (Figura 6). En el primer camino, los SARS-CoV-2 invade la célula hospedera como una endosoma que está mediado por endocitosis dependiente e independiente de clatrina. Alternativamente, en la segunda vía, la invasión directa de partículas de virus en la célula hospedera está mediada a través de la escisión proteolítica de la proteína Spike unida al receptor por la serina proteasa transmembrana 2 del hospedador (TMPRSS2),

seguida de la fusión de las membranas viral y celular. La escisión de la proteína S ocurre en dos sitios dentro de la porción S2 de la proteína, con la primera escisión se separa el RBD y los dominios de fusión de la proteína S y la segunda expone el péptido de fusión (escisión en S2'). La formación de este paquete da como resultado la fusión y la liberación final del genoma viral en el citoplasma.^{24,31,51}

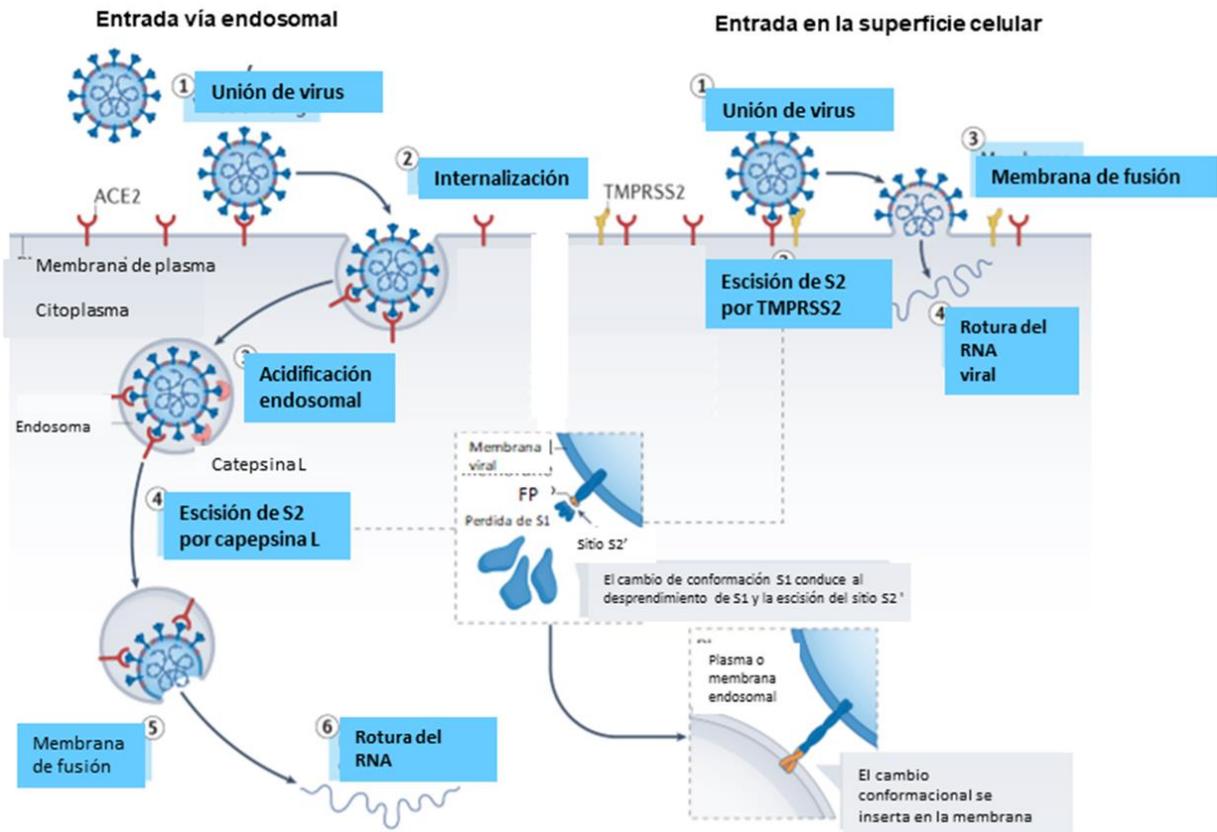


Figura 6. Vías de entrada del virus SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 puede entrar por la vía endosomal (izquierda), el complejo virus-ACE2 inducen cambios conformacionales en la subunidad S1 de la proteína S y expone el sitio de escisión S2' en la subunidad S2, se internaliza mediante endocitosis mediada por clatrina, la escisión de S2 se realiza por la catepsina en los endolisosomas, el sitio S2' es escindido por diferentes proteasas, que requieren un ambiente ácido para su actividad. La entrada del virus por medio de TMPRSS2 (derecha), la escisión de S2' se produce en la superficie celular, S2' expone el péptido de fusión (FP) y la disociación de S1 de S2 induce cambios conformacionales en la subunidad S2. Esto impulsa al péptido de fusión hacia la membrana de la célula hospedera, iniciando la fusión de membranas formando un poro de fusión a través del cual el RNA viral asociado a la nucleocápside se libera en el citoplasma de la célula hospedera para que se transcriba y se replique, Jackson, C. B., Farzan, M., & Chen, B²⁴

2.5.2 Síntesis de RNA.

Un sello distintivo de los coronavirus y de la mayoría de los miembros del orden Nidovirales es el proceso de transcripción viral discontinua (Fig. 8). La síntesis de RNA del coronavirus implica la interacción entre las TRS (Secuencias Reguladoras de La Transcripción) complementarias al RNA de cadena negativa naciente (cuerpo TRS de sentido negativo) y las Secuencias Líder Reguladoras de la Transcripción (TRS-L) complementarias al RNA genómico de cadena positiva. Tras el reinicio de la síntesis de RNA en la región TRS-L, se agrega una copia de la cadena negativa de la secuencia líder al RNA naciente para completar la síntesis de los RNAg de cadena negativa. Por lo que la síntesis de RNA de hebra negativa es un proceso discontinuo que da como resultado la producción de un conjunto de sg RNA de hebra negativa que luego se utilizan como plantillas para sintetizar en conjunto un anidado característico de mRNA de sg de sentido positivo que se traducen en proteínas estructurales y accesorias.^{23,70}

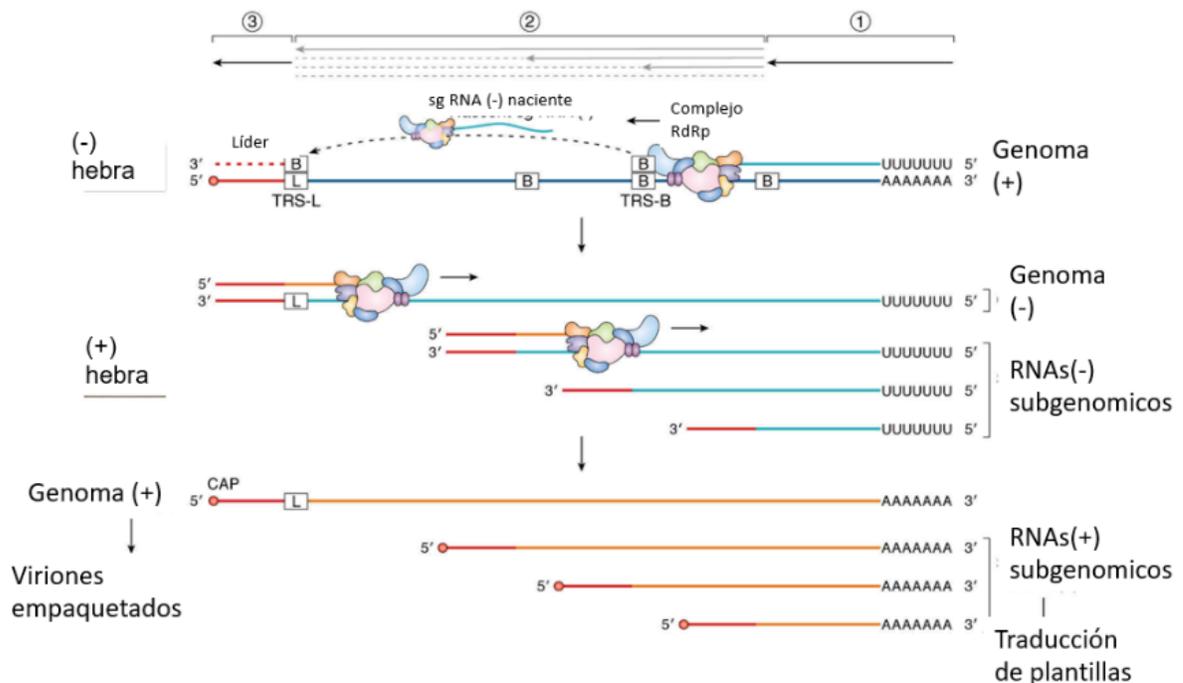


Figura 7. Transcripción discontinua. El complejo RdRp inicia la transcripción en el extremo 3' del genoma de sentido positivo Tomado de Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. (2020)¹⁸

2.5.3 Expresión de proteínas estructurales y accesorias.

Los ORF que codifican para las proteínas estructurales, la S, la proteína E, M N se encuentran en el último tercio 3' de los genomas del coronavirus. Su genoma consta de 15 marcos de lectura abiertos (ORFs). Intercalados entre estos ORF se encuentran los ORF que codifican a las proteínas accesorias. Las proteínas estructurales del coronavirus se ensamblan y participan en la morfología de nuevos viriones en el (RE) y el compartimento del trans-Golgi lo que se sugiere que salen de la célula infectada por exocitosis.^{34,62}

Tabla 2. Características de los marcos de lectura abiertos (ORF) de SARS-CoV-2

ORF	Proteína	Características
1a	nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8, nsp9, nsp10.	Estas poliproteínas serán procesadas proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps)
1b	Nsp12, nsp13, nsp14, nsp15, nsp16	
3 ^a	3a.	Homotetrámeros que forman canales de potasio. Modulan la liberación del virus, regula la expresión de subunidades de fibrinógeno FGA, FGB y FGG. Regula a la baja la expresión del receptor de interferón tipo 1. Inducción de apoptosis vía caspasa 8/9
3b	3b	Activación de AP-1 vía ERK y JNK. Inducción de apoptosis vía caspasa 3
6	6	Factor de virulencia. Inhibe la síntesis de IFN y la translocación de STAT1
7 ^a	7a	Proteína transmembranal tipo 1 involucrada en el ensamble viral, activa la liberación de citocinas proinflamatorias
7b	7b	Proteína integral de membrana
8	8	Proteína integral de membrana
14		No caracterizada, función desconocida
10		No caracterizada, función desconocida

2.5.4 Ensamblaje y liberación

Después de la replicación y la síntesis de RNA subgenómico, las proteínas S, E y M se traducen y se insertan en el RE. Estas proteínas se mueven a lo largo de la vía secretora hacia el compartimento intermedio del retículo Endoplásmico-Golgi (ERGIC).

En el compartimento, los genomas virales que están encapsidados por la proteína N, brotarán en la membrana dando como resultado la formación de la partícula viral. Después del ensamblaje los viriones se transportan a la superficie celular en vesículas y se liberan por exocitosis.⁶⁵

3. RESPUESTA INMUNE ANTE EL VIRUS SARS-CoV-2

3.1 RESPUESTA INNATA

La respuesta inmunitaria contra SARS-CoV-2 implica una fase de contención rápida mediada por componentes de inmunidad innata y si es necesario, esta fase es seguida de inmunidad adaptativa, que debería poder erradicar al patógeno y generar memoria inmunológica. Por lo que compete a los mecanismos de inmunidad innata, la primera línea de defensa son las superficies mucosas, estas protegen contra la entrada del virus mediante su integridad estructural y a través de tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT).⁴⁴

Con respecto a la COVID-19, se ha descrito que el SARS-CoV-2 ingresa al organismo a través del tracto respiratorio, la mucosa oral y el epitelio conjuntival y la IgA presente en las superficies mucosas colabora en la protección ante el virus, en relación con esto, se ha descrito un aumento en la concentración de IgA en casos severos de COVID-19. Dado que ACE2 es el receptor principal para el SARS-Cov-2 y permite la entrada del virus en la célula. Las células infectadas por el virus como las células epiteliales producen interferones, que están asociados con genes que responden al interferón y que permiten que se produzca

una sólida respuesta inmune innata. Las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos como primera línea de defensa inician la reacción inmune y afectan su tipo e intensidad.⁴¹ Posteriormente las primeras moléculas que se producen ante el virus de SARS-CoV-2 son las defensinas (péptidos antibióticos endógenos con actividad antimicrobiana de amplio espectro) que actúan contra el patógeno.^{4,41}

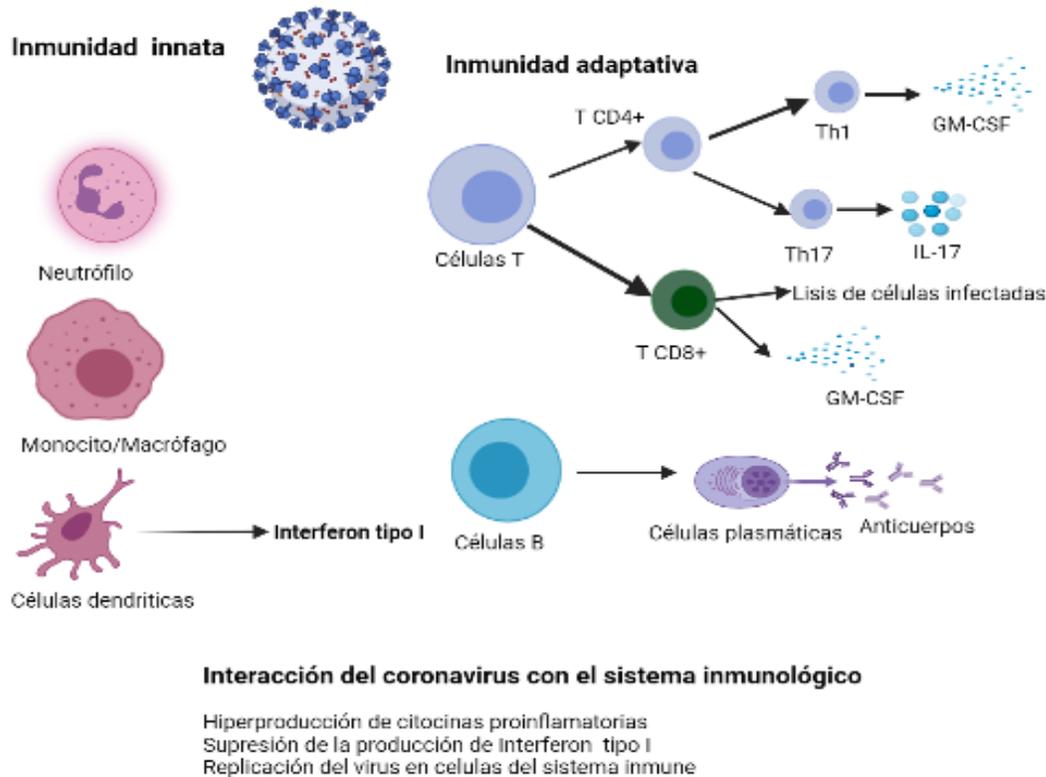


Figura 8. Las respuestas inmunes innatas y adaptativas contra la infección por coronavirus (CoV). La inducción de neutrófilos, monocitos / macrófagos y células dendríticas da como resultado la producción de diversas citocinas proinflamatorias que al producirse en grandes cantidades constituyen la llamada "tormenta de citocinas". Hosseini, A., (2020)¹⁹

3.1.1 Tormenta de citocinas

La mayoría de los pacientes con COVID-19 se recuperan de la enfermedad en el transcurso de los primeros 10 días después del contagio, ya que presentan cuadros leves y moderados, después de este periodo, sólo algunos desarrollan neumonía severa seguida de la llamada tormenta de citocinas, SDRA (Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda), coagulación intravascular diseminada (CID), falla multiorgánica y muerte. La tormenta de

citocinas es considerada una red compleja de eventos moleculares unificados por un fenotipo clínico de inflamación sistémica, falla multiorgánica e hiperferritinemia que se relaciona con la gravedad y el desenlace fatal de la enfermedad. Este estado es inducido por la activación de un gran número de leucocitos, incluidos linfocitos (B, T, NK), macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células residentes de tejido (las células epiteliales y endoteliales), que liberan grandes cantidades de citocinas proinflamatorias⁴. También se ha reportado un aumento considerable de eicosanoides proinflamatorios en pacientes con un cuadro grave de la enfermedad. Entre las numerosas moléculas que aumentan en el suero de estos pacientes se encuentran proteínas del complemento, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IP-10, MCP-1, TNF- α , proteína inflamatoria de macrófagos 1 α , y granulocitos-LCR ^{4, 28,71}

El SDRA es considerado la principal causa de muerte en pacientes infectados por SARS-CoV. En estos pacientes se ha reportado elevación de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8, IL-1 β , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y especies reactivas de oxígeno y quimiocinas (como CCL2, CCL5, proteína 10 inducida por IFN γ (IP-10) y CCL3) que a su vez contribuyen a la aparición de SDRA, asociado a títulos altos de partículas virales y desregulación en la producción de citocinas y quimiocinas.

En el caso de los pacientes con COVID-19, los niveles séricos de IL-2 e IL-6 se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (es decir, pacientes en estado crítico presentan elevación de estas citocinas tabla 3).^{4,28} Generando daños funcionales y estructurales ya que no se ejercen los mecanismos reguladores de la respuesta inflamatoria. Al respecto se ha descrito que la IL-10 parece controlar el daño tisular en modelos experimentales.^{16,28}

Tabla 3. Citocinas presentes en COVID-19^{16,28}.

	COVID- 19 Leve a moderada	COVID-19 Grave
Síntomas	Fiebre, mialgia, fatiga y disnea	Fiebre, mialgia, fatiga y disnea, SDRA y falla multiorgánica
Citocinas	↑IL-6, IL-10 y TNF-α	↑↑ IL-6, IL-10 y TNF-α
Linfopenia a expensas de LT	↓Linfocitos T (CD4 ⁺ y CD8 ⁺)	↓↓Linfocitos T (CD4 ⁺ T y CD8 ⁺)

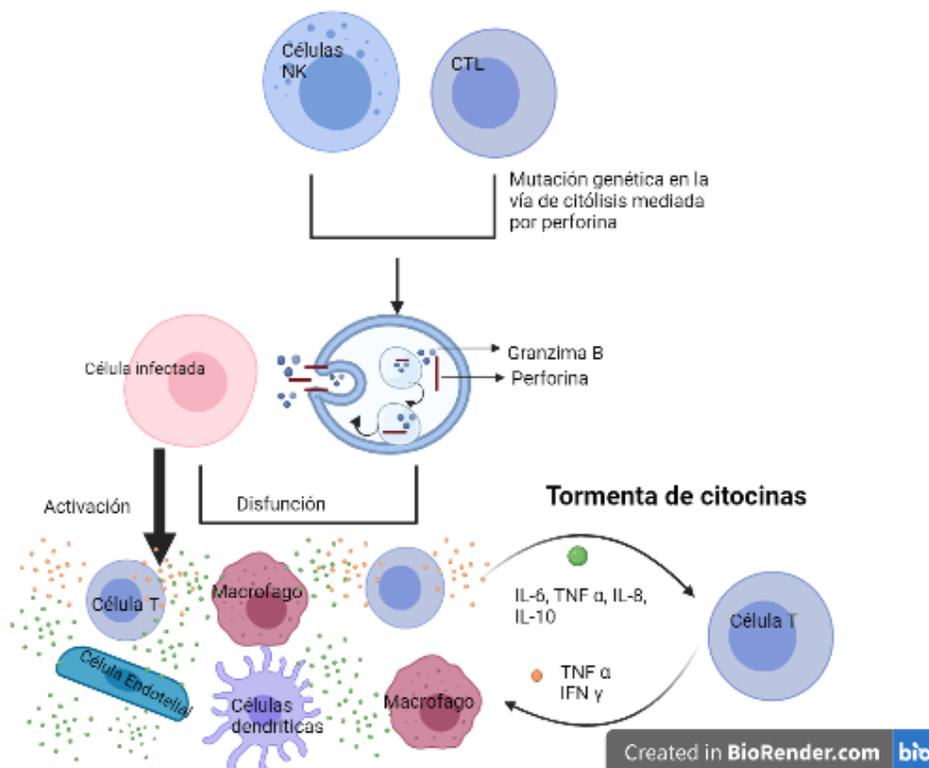


Figura 9. Tormenta de citocinas. Las citocinas proinflamatorias desencadenan una reacción en cascada mediante la activación de las células inmunitarias innatas, entre las que se encuentran macrófagos, células dendríticas y células endoteliales que a su vez generan la liberación de una mayor cantidad de citocinas, constituyendo la llamada tormenta de citocinas. *CTL (Linfocito T citotóxico). Modificado de Biorender tomado de Fara, A. (2020)¹³.

Tabla 4. Principales efectores del sistema inmune innato ante SARS-CoV-2^{4,8,16}

Componente de la inmunidad innata	Funciones/ Producción de moléculas	Características relevantes
Mecanismos de barrera.	<ul style="list-style-type: none"> • Integridad de la mucosa. • Tos. • Estornudo. • (eliminación por arrastre del agente agresor. • Atrapamiento de microorganismos y células dañadas. • Defensinas • Catelicidinas • Colectinas • Ficolinas 	Eliminación del patógeno por actividad mecánica o química (primera barrera de defensa).
Mecanismos de reflejo.		
Mucus		
Sustancias microbicidas		
Surfactante pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatorio • Antioxidante 	<p>Antagoniza las acciones de citocinas inflamatorias</p> <p>Disminuye la tensión superficial sobre el alveolo</p> <p>Disminuye la aparición de la membrana hialina y del edema pulmonar</p>
Receptores de Reconocimiento de Patógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Detección del RNA viral. 	<p>Inducen la activación de la vía NF-κB y promueven la expresión de citocinas proinflamatorias con un papel importante en el inicio de la inflamación inducida por virus.³</p> <p>NF-κB induce la expresión de interferón tipo I y factores inmuno inflamatorios.³</p>
Receptores tipo Toll <ul style="list-style-type: none"> • TLR 3, TLR7, TLR8 y TLR9. 		
Receptores citoplasmáticos tipo NOD	<ul style="list-style-type: none"> • NLRP3 	<p>Activación del inflamasoma en macrófagos, células epiteliales e incluso en células endoteliales lo que genera las formas activas de interleucina (IL)-1β e IL-18.</p>
Principales células de la inmunidad innata	<ul style="list-style-type: none"> • RIG-I/MDA-5 • Reguladores de la respuesta inmune e inflamatoria • Secretan citocinas proinflamatorias • Secretan citocinas proinflamatorias • Amplificación de la respuesta inmune • Presentadoras de antígenos profesionales a los 	Sensores de RNA en citoplasma celular
Macrófagos		
Neutrófilos		
Células dendríticas		

	linfocitos T moduladoras de respuesta inmune adaptativa	
Tormenta de citocinas	<ul style="list-style-type: none"> • IFN-γ, • IL-1β, • IL-6, • IL-12, • IL-17 • IL-18 • TNF-α 	<p>Los coronavirus poseen mecanismos de evasión que evitan la producción de IFN tipo I por las células epiteliales infectadas.</p> <p>TNF-α, IL-2, IL-6, IL-13 elevados en los sueros de los pacientes durante la fase aguda del SDRA.</p>
Proinflamatorias		
Antiinflamatorias	<ul style="list-style-type: none"> • IL-10 • (TGF-β) 	<p>IL-10 induce anergia o falta de respuesta de las células T durante la infección viral.</p> <p>IL-10 elevada en pacientes con SDRA.</p>
Quimiocinas	<ul style="list-style-type: none"> • IP-10 (inducible por interferón-γ). 	Elevado en pacientes fallecidos.
Hematopoyéticas	<ul style="list-style-type: none"> • Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) • Factor estimulador de colonias de mastocitos (M-CSF) • Factor estimulador de colonias de mastocitos y granulocitos (GM-CSF) 	

3.2 Respuesta inmune adaptativa

La transición entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa es fundamental para el progreso clínico de la infección por SARS-CoV-2. Es en este momento crucial cuando los eventos de regulación inmunológica, aún poco conocidos, conducirán al desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora o una respuesta inflamatoria exacerbada. La respuesta protectora depende de las células T, con LT CD4 ayudando a las células B, orientadas a la producción de anticuerpos neutralizantes específicos y células CD8 citotóxicas capaces de eliminar las células infectadas (el 80% de las células infiltrantes en COVID-19 son CD8). Por el contrario, una respuesta disfuncional, incapaz de inhibir la replicación viral y la eliminación de las células infectadas, puede deberse a una respuesta inflamatoria exacerbada que conduce en ciertos casos a una tormenta de citocinas, manifestada clínicamente por un síndrome de dificultad respiratoria aguda severa (SDRA) y consecuencias sistémicas, como diseminación viral y coagulación intravascular. Se ha

reportado en un modelo de infección de primates por SARS-CoV, que el virus se replica en los pulmones hasta el día 10 después de la infección; La inflamación pulmonar es más intensa después de la eliminación del virus, alcanzando su mayor nivel el día 14 y permaneciendo así hasta el día 28 post infección. Estos resultados sugieren que se produce una fase temprana dependiente de la replicación viral, mientras que, en la fase posterior independiente de la carga viral, fase inmunodependiente, se genera un componente inflamatorio exacerbado. La fase independiente de la carga viral se ha explicado por la reacción inflamatoria secundaria a la inhibición de la ECA2 o por un fenómeno autoinmune debido a la propagación del epítipo, provocada por la destrucción extensa de los tejidos.¹⁶

36, 67

3.2.1 Respuesta inmune de las células T

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ desempeñan un papel antivírico importante en infecciones por MERS-CoV y SARS-CoV, estos virus causan infecciones fatales del tracto respiratorio inferior y alteraciones extrapulmonares.

Durante una infección viral, los linfocitos T (LT) CD4⁺ activan a los linfocitos B (LB) para la producción de anticuerpos específicos contra el virus, mientras las células T CD8⁺ ejercen mecanismos de citotoxicidad para la destrucción de las células infectadas. Se ha descrito que los linfocitos T CD8⁺, representan el 80% del total de células inflamatorias infiltrantes en el intersticio pulmonar en pacientes infectados con SARS-CoV y desempeñan un papel importante en la eliminación de células infectadas. Sin embargo, las células T CD4⁺ son más susceptibles a la infección por MERS-CoV, lo que probablemente lleve al agotamiento de estas células y a un menor reclutamiento de linfocitos a nivel pulmonar. Más aún, se ven afectadas la producción de anticuerpos y citocinas y por ende disminuye la neutralización viral mediada por anticuerpos, lo que puede generar neumonitis intersticial. Ahora bien, los linfocitos T cooperadores producen citocinas proinflamatorias a través de la vía de

señalización NF- κ B. La citocina IL-17 reclutan monocitos y neutrófilos al sitio de infección mediante el proceso inflamatorio y activa la producción de otras citocinas y quimiocinas, (IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- β y MCP-1).⁵⁹

Se han estudiado células T específicas de SARS-CoV en pacientes convalecientes y se observó que las células T de memoria detectada son específicas para las proteínas estructurales del SARS-CoV, a su vez las células T CD8⁺ tienen especificidad por las proteínas M y N del virus. La respuesta de las células T a la proteína S y otras proteínas estructurales (incluidas las proteínas M y N) es duradera y persistente. Esto establece evidencias para el diseño de la vacuna contra el virus SARS que pueden inducir respuestas dominantes, efectivas y de células de memoria a largo plazo contra el virus.⁵⁹

3.2.2 Células T de memoria en COVID-19

La respuesta inmune contra SARS-CoV-2 se encuentra en pleno estudio, sin embargo, existe mucha información sobre la inmunidad que se genera ante infecciones por otros coronavirus. Al respecto las células T de memoria residente en tejido activan células innatas, establecen respuestas adaptativas secundarias, reclutan células T de memoria adicional y mejoran la protección inmunológica contra patógenos a través de la secreción de citocinas y quimiocinas como IFN- γ y CXCL9-11. Las células T CD4⁺ específicas de SARS-CoV en casos moderados a graves presentan CD27⁺ / CD45RO⁺, son células que se caracterizan por la producción de grandes cantidades de IL-2, TNF- α e IFN- γ . De manera similar, las células T CD8⁺ en estos pacientes son predominantemente de memoria y se caracterizan por producir TNF- α , IFN- γ y expresan CD107a. La función de las células T CD8⁺ de memoria residente en el tejido, es bloquear la propagación de la enfermedad viral del tracto respiratorio superior al inferior en la infección por influenza A, previniendo el desarrollo de una enfermedad pulmonar grave. Si bien existen datos que sugieren la posibilidad de desarrollar células T de memoria de larga vida contra SARS-CoV-2, un

estudio reciente identificó niveles más bajos de células T de memoria en pacientes con SARS-CoV-2 comparados con los niveles producidos en pacientes con infección por SARS-CoV.^{5,59}

3.2.3 Células B

Las células B son críticas para la eliminación de la mayoría de las enfermedades virales ya que los anticuerpos son esenciales para la neutralización de partículas virales y para el desarrollo de mecanismos de citotoxicidad. Con respecto a SARS CoV-2 se ha descrito que la mayoría de los pacientes con COVID-19 establecen una respuesta humoral dentro de las dos semanas posteriores a la infección. Las respuestas humorales deficientes se asocian con un aclaramiento ineficaz del SARS-CoV-2, lo que destaca aún más la importancia de esta respuesta para el aclaramiento viral. Varios estudios han demostrado el uso sesgado de segmentos del gen VDJ para el desarrollo de anticuerpos específicos de ciertos virus. Se ha identificado un patrón similar de recombinación VDJ sesgada en algunos pacientes con SARS CoV-2, con el desarrollo de anticuerpos sesgado hacia la cadena pesada de inmunoglobulina G (IgG) IGHV3-23 e IGHV3-7, es posible generar productos terapéuticos utilizando esta estrategia contra el SARS-CoV-2.⁵⁹

3.3 SISTEMA INMUNITARIO EN EL DESARROLLO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS

3.1 Complejo mayor de histocompatibilidad y presentación antigénica

Los fenómenos de la respuesta inmune innata que inducen una respuesta inmune adaptativa se basan en los mecanismos de presentación antigénica que dependen del procesamiento antigénico y de la formación de complejos péptido-antigénico-moléculas de MHC clase I/II dependiendo si se trata de inmunógenos endógenos o exógenos respectivamente.⁴

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de genes responsables de la presentación de agentes y moléculas extrañas, tanto intracelulares como extracelulares, a las células efectoras del sistema inmunitario (LT vírgenes). Está conformado por genes que codifican moléculas del HLA (antígeno leucocitario humano) de clase I, II y III. Las moléculas de clase I participan en la presentación de inmunógenos endógenos, es decir de péptidos que provienen de agentes y moléculas que se generan de manera intracelular; las moléculas de clase II presentan inmunógenos exógenos los cuales ingresan a la célula vía endocítica para su procesamiento y posterior presentación a los linfocitos T efectores. Finalmente, los genes del MHC clase III codifican para moléculas del sistema del complemento algunas citocinas y moléculas involucradas en la presentación antigénica (TAP 1 y 2).^{48,59,61}

3.1.2 Procesamiento y presentación antigénica

Las vías de procesamiento antigénico son la endocítica o de degradación de antígenos citosólicos o endógenos y la exocítica que se refiere a la degradación de antígenos exógenos. Los péptidos que se generan a partir de proteínas intracelulares tanto propias como extrañas son degradadas por medio de un complejo macromolecular multienzimático

llamado proteasoma el cual degrada de forma selectiva proteínas marcadas con ubiquitina. Los péptidos resultantes de la actividad proteolítica en el proteasoma tienen un tamaño que van de 3 a 25 residuos de aa y son liberados a través del extremo terminal del proteasoma, los péptidos que tienen una longitud de 8 a 14 aa pasan al retículo endoplásmico a través del transportador TAP que es un heterodímero constituido por las subunidades TAP 1y TAP 2 que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplásmico, el proceso de transportación de estos péptidos es dependiente de ATP y la capacidad de transportación se ve incrementada por la acción de INF-gamma, una vez que los péptidos que se encuentran en la luz del retículo endoplásmico serán unidos a las HLA de clase I recién formadas.^{3,5,59}

Las moléculas de histocompatibilidad de clase I se sintetizan como proteínas de exportación, es decir asociadas a retículo endoplásmico, en el interior del retículo endoplásmico la cadena α de la molécula HLA clase I recién formada se asocia a dos moléculas chaperonas calnexina que posteriormente se sustituye por calreticulina, este intercambio de chaperonas permite la unión de la beta 2 microglobulina que se une a la cadena α y se une a la isoforma. ERP57 (aminopeptidasa que corta péptidos en residuos de 8 a 9 aa) y a la tapasina (puede actuar como editora de péptidos) lo que permite la unión de péptidos de mayor afinidad al surco de la molécula HLA de clase I, una vez formado el complejo maduro p-MHC sale del retículo endoplásmico y es transportado por la red trans-Golgi para finalmente ser exportado mediante vesículas exocíticas a la membrana celular (todas las células nucleadas).^{28,41,48,61}

La presentación inmunógenos de origen exógeno se lleva a cabo en las células presentadoras de antígeno (APC) y es a través de moléculas de histocompatibilidad clase II que se sintetizan también como moléculas de exportación, el surco de unión de estas moléculas con el antígeno se encuentra bloqueado por la cadena invariante lo que impide

que puedan unirse a péptidos dentro de la luz del retículo endoplásmico. Las moléculas de clase II al ser proteínas de exportación salen del retículo endoplásmico a la red de Golgi y son transportadas en vesículas exocíticas que más tarde se unirán a endosomas. Las células presentadoras de antígenos que incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, degradan antígenos exógenos mediante procesos fagocíticos que resultan en la fragmentación de péptidos.^{57,59}

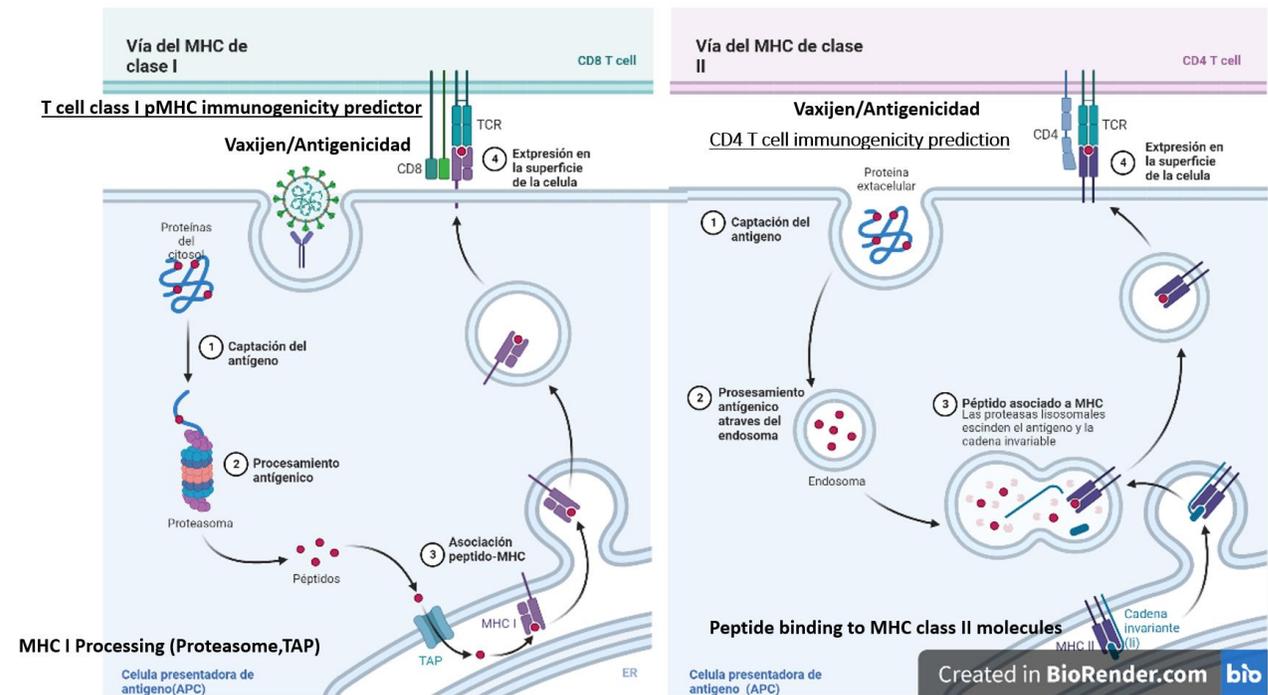


Figura 10. Procesamiento antigénico vía MHC clase I y II). Modificado de Biorender tomado de Murphy KP (2012)^{41,48}

4. PRESENTACIÓN CLÍNICA Y PATOGENESIS DE LA COVID-19

Uno de los principales problemas de la pandemia por la COVID-19 es que los síntomas de la enfermedad son diversos y pueden tener distintas manifestaciones entre los pacientes o dependen de la variante viral implicada. La enfermedad puede manifestarse por un cuadro asintomático, una presentación clínica leve o bien desarrollarse la enfermedad grave que puede evolucionar a la muerte del paciente. Los pacientes con enfermedad leve pueden mostrar signos de recuperación después de la primera semana, pero algunos pueden tener

síntomas persistentes o pueden evolucionar a la fase grave de la enfermedad deteriorándose rápidamente. Los síntomas más comunes de la COVID-19 aparecen aproximadamente entre 2 a 14 días después de la exposición al virus, los síntomas característicos incluyen fiebre, mialgias (dolor muscular), cefalea (dolor de cabeza), tos, odinofagia (dolor de garganta), hipogeusia o ageusia (pérdida del gusto) y anosmia (pérdida del olfato). En casos graves, el paciente desarrolla una infección pulmonar severa, surgen signos de alerta que incluyen dificultad para respirar debido al cuadro neumónico.⁸ El curso clínico más característico de los pacientes con la COVID-19 grave es el desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria severa (SDRA). Esta entidad clínica pulmonar es potencialmente mortal. El proceso inflamatorio a nivel alveolar lleva a la acumulación de líquido en los alvéolos lo que dificulta el paso de oxígeno suficiente hacia la sangre. Por lo que el paciente trata de compensar modificando la frecuencia y esfuerzo respiratorio, esto lo lleva al agotamiento por lo que los pacientes necesitan apoyo con ventiladores mecánicos lo que favorece el paso de oxígeno a los pulmones. A pesar de estos esfuerzos, aproximadamente el 40% de los pacientes con SDRA no sobreviven. Los pulmones se encuentran ante un proceso inflamatorio severo, producto de la desregulación de la respuesta inmune que lleva a la generación de la llamada “tormenta de citocinas” que incrementa el proceso inflamatorio, dañando el parénquima pulmonar esto provoca hipoxemia y falla multiorgánica que lleva al paciente a la muerte. Las manifestaciones clínicas de la infección por SARS-CoV-2 se resumen en la Tabla 5.^{13, 21}

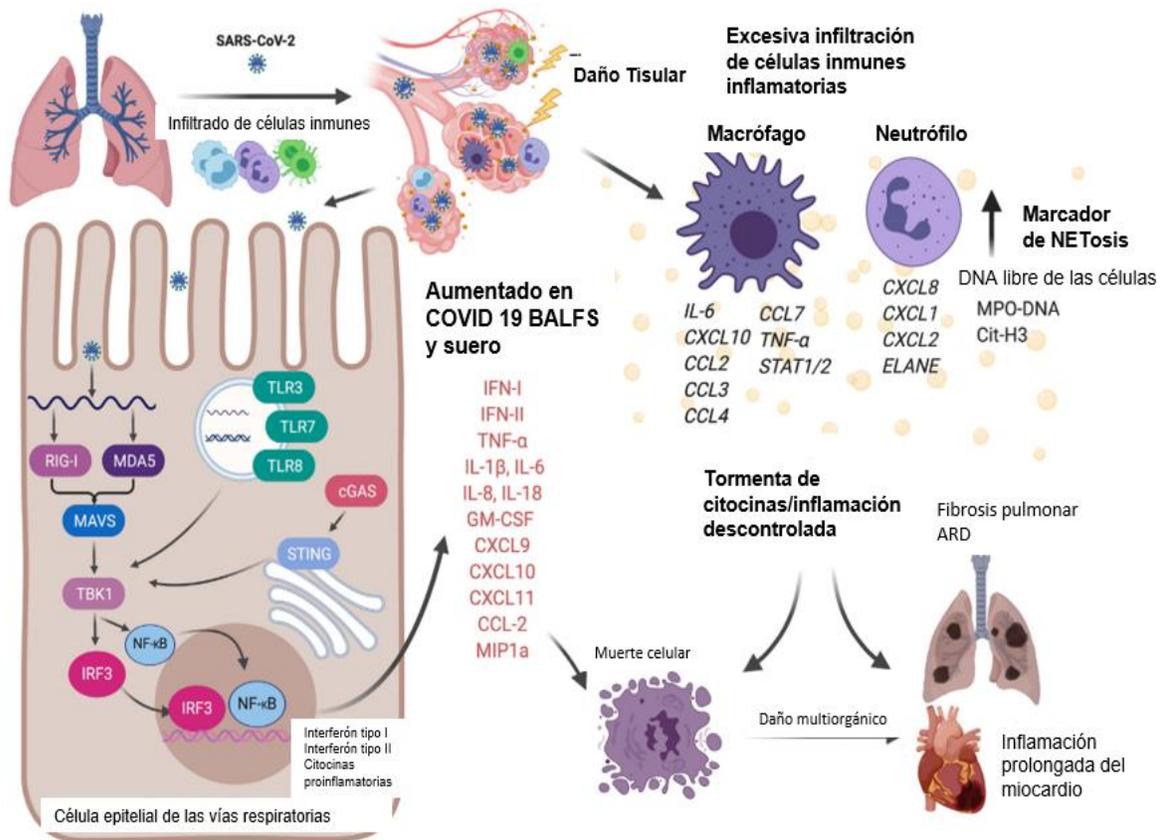


Figura 11. Descripción de patología pulmonar en pacientes con enfermedad infecciosa por COVID-19. El virus se establece en el tracto respiratorio inferior dañando la función pulmonar, ya que infecta a las células del epitelio alveolar, y las células endoteliales vasculares en pulmón. La disregulación de la respuesta inmune altera las funciones vitales hidroelectrolíticas que repercuten en la función cardíaca y renal, lo que aunado al daño que potencialmente ocasiona el virus en estos órganos, llevan al paciente a enfrentar una afectación multiorgánica que evoluciona a la muerte. Modificada de Harrison con BioRender⁸⁴

Tabla 5. Manifestaciones clínicas de la infección por SARS-CoV-2³⁶

Órganos/Sistema involucrados	Inicio de la enfermedad (enfermedad leve)	Enfermedad Moderada	Enfermedad severa	Signos de diagnóstico
Pulmón/Tracto Respiratorio	Dolor de garganta Rinorrea, estornudos	Pneumonia Disnea Hipoxemia moderada	Hipoxemia severa Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA)	Descenso de % pO ₂ Las radiografías de tórax muestran opacidades en vidrio esmerilado
Cerebro/Neurológico	Hiposmia/anosmia Hipogeusia/Disgeusia/Ageusia Alteración visual Fatiga Somnolencia	Cefalea, Náusea, Vómito Mareos Mialgia Ataxia Encefalopatía	Enfermedad cerebrovascular (accidentes cerebrovasculares de grandes vasos) Convulsiones Meningoencefalitis Neuropatía Síndrome de Guillain Barre SDRA Choque neurogénico Coma	Elevación de creatinina La resonancia magnética cerebral muestra hiperintensidades en regiones con infarto o encefalitis Detección de SARS-CoV-2 en líquido cefalorraquídeo o tejidos cerebrales en autopsias de algunos pacientes
Gastrointestinal	Náuseas, vómito Diarrea Acidez	Pérdida de apetito Dolor e hinchazón abdominal	Sangrado gastrointestinal Diseminación viral gastrointestinal	Elevación de enzimas hepáticas y bilirrubinas Detección de SARS-CoV-2 en muestras de heces
Corazón/Cardiaco	Dolor de pecho Arritmias, taquicardia sinusal	Inflamación cardíaca, infiltración de células inmunitarias	Miocardopatía Insuficiencia cardíaca aguda	Alteración electrocardiográfica del ritmo cardíaco, hipotensión. Enzimas cardíacas elevadas EKG anormal (intervalos QTc prolongados, ST elevado) Troponina cardíaca específica y péptido natriurético cerebral elevados
Riñón/ Renal	Proteinuria Hematuria	Lesión renal aguda	Insuficiencia renal	Alteración de los niveles de albúmina y creatinina
Vasos sanguíneos/vascular	Coagulación sanguínea de Tormenta citocinas	Tromboembolismo arterial o venoso	Embolia pulmonar Oclusión de vasos largos Coagulación intravascular diseminada	Elevación de Dímero D, interleucina-6, otras citocinas, ferritina y lactato deshidrogenasa
Mental/ psiquiátrico	Estado de ánimo depresivo Ansiedad Insomnio Ira Miedo	Depresión Desorden de estrés posttraumático	Exacerbación de desórdenes psiquiátricos o neurológicos	PT / PTT prolongado Calcio y fósforo plasmáticos elevados

Las manifestaciones clínicas son diversas y abarcan diferentes órganos y sistemas, actualmente la sintomatología descrita nos permite identificar los diferentes estadios de la enfermedad, sin embargo, aún falta mucho por ser descrito al respecto.

Con respecto a los cambios inmunológicos observados en pacientes con la COVID-19 se han descrito alteraciones linfocitarias, generación de anticuerpos que pueden tener actividad neutralizante o no para SARS-CoV-2 y quizás lo más significativo es lo que ha denominado “Tormenta de Citocinas” (Tabla 6).

Tabla 6. Cambios inmunológicos en la COVID-19^{4,19}

Cambios inmunológicos	Covid-19
Células T	Linfopenia en casos severos (<20%). Linfopenia inicial es predictivo de casos severos
Células T CD8⁺	Linfopenia severa (<5%) puede ser predictor de enfermedad severa
Th1-Th2	La inmunidad antiviral normal requiere de la respuesta CD4 y CD8 Th1. La enfermedad grave muestra una respuesta inflamatoria grave sistémica con tormenta de citocinas. La respuesta a la tormenta de citocinas es principalmente Th17 inflamatoria. Por lo que tiene un papel importante en la activación del inflammasoma.
Eosinófilos	Disminución del número de eosinófilos circulantes en 50% al 80% de los pacientes hospitalizados.
Niveles de anticuerpos específicos	En la fase aguda, aumenta la IgM específica del virus seguida de la IgG específica del virus durante la convalecencia.
Tormenta de citocinas	Las citocinas proinflamatorias de la respuesta inmune innatas y de la respuesta inmune adquirida se liberan en grandes cantidades relacionadas con la enfermedad grave.
Reactantes de fase aguda	En casos severos, son altos. Inicialmente los valores altos predicen la severidad de la enfermedad (Aumento severo de Proteína C reactiva).

Debido a el daño tisular inmunomediado en la COVID-19, la cual involucra respuestas celulares y humorales, por lo que las secuelas a largo plazo se podrían explicar en parte por los factores controlados por el hospedador que influyen en el resultado de la infección viral, incluida la susceptibilidad genética, la edad, cuando se infecta, la dosis y la vía de infección, la inducción de células y proteínas antiinflamatorias, la presencia de infecciones concurrentes, exposición anterior a agentes de reacción cruzada, etc. Si el SARS-CoV-2 puede causar un daño tisular sustancial que conduzca a una forma crónica de la

enfermedad, por lo que se necesita más información sobre estudios prospectivos para evaluar mejor el curso natural de la infección por COVID-19 y definir el síndrome de COVID-19 prolongado (figura 11). Desde el punto de vista clínico, los médicos deben conocer los síntomas, signos y biomarcadores presentes en pacientes previamente afectados por COVID-19 para evaluar, identificar y detener rápidamente la progresión prolongada de COVID-19, minimizar el riesgo de efectos crónicos.

Efectos a largo plazo de la COVID-19

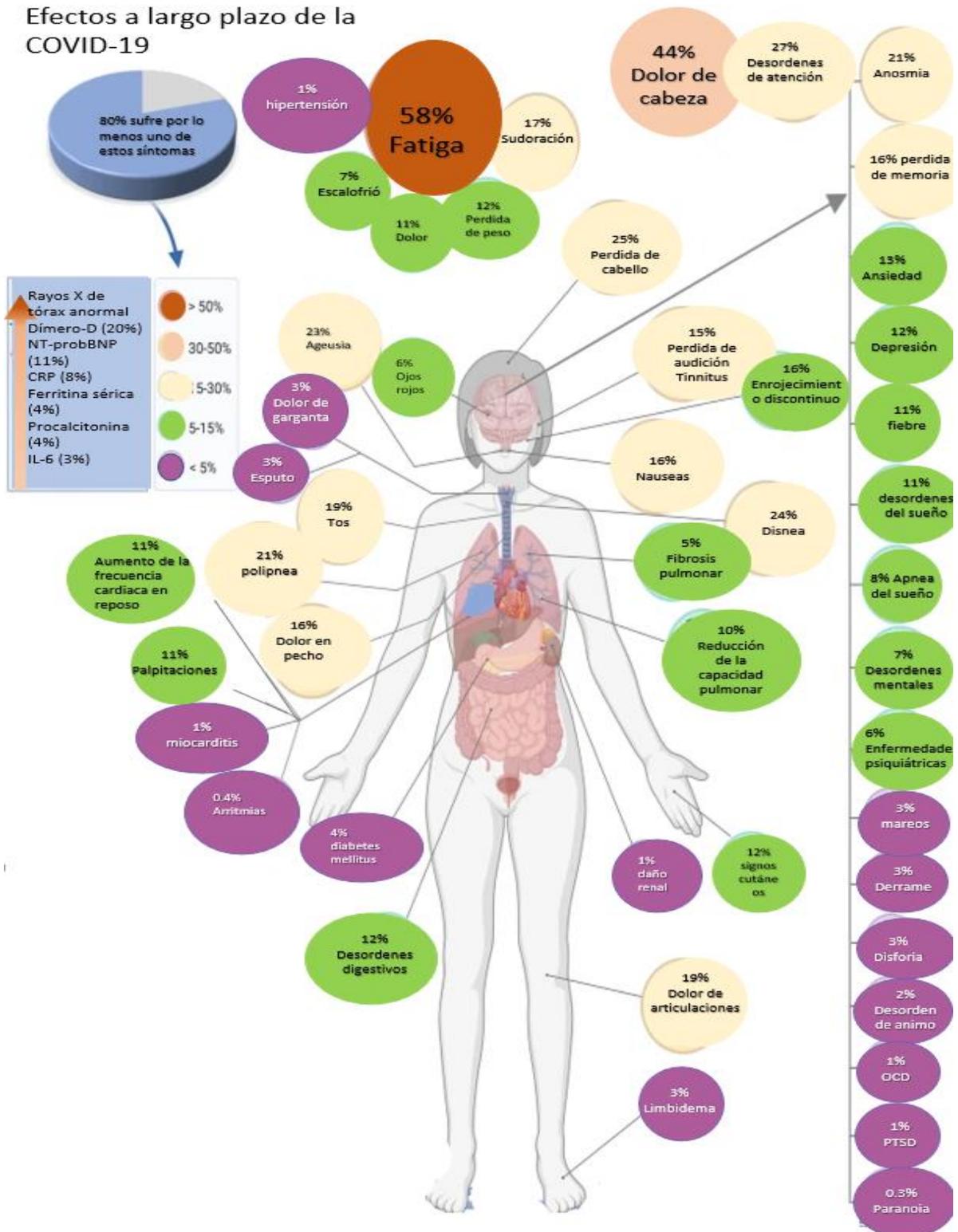


Figura 12. Efectos a largo plazo de COVID-19*PTSD Trastorno de estrés postraumático modificado de Lopez-Leon, S., Wegman-Ostrosky, T., Perelman, C. (2021)⁷⁸

5. AGENTES ANTIVIRALES

El tratamiento de los pacientes con la COVID-19 ha sido un reto, ya que es una enfermedad de reciente identificación, los esfuerzos científicos se encaminaron al reposicionamiento de fármacos ya existentes que pudieran tener efecto contra el virus, paralelamente algunos grupos desarrollaron proyectos de investigación con la finalidad de generar nuevos fármacos antivirales específicos. En general el tratamiento de los cuadros leves es sintomático y para los casos graves se basan en el tratamiento de las complicaciones de coagulabilidad, función respiratoria y metabólica en general. La terapia antiviral con la que se cuenta hasta este momento se describe en la Tabla 7.^{43,66}

Tabla 7. Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de la COVID-19^{43,66}

Fármaco	Blanco terapéutico	Descripción
Aurine tricarboxylic	Polimerasa de RNA viral	Se une a la polimerasa viral (ensayos in vitro)
Rupintrivir	Proteasa Viral	Inhibidor de la proteasa: Inactiva 3CL ^{pro} y PL ^{pro}
Benzopurpurin B	NPS15 Endoribonucleasa	Reduce la infectividad viral del virus SARS inhibiendo a NSP15 en cultivos celulares
C-21	Receptor de Angiotensina AT2	Agonista del receptor AT2 que puede mejorar el daño viral en pulmones.
β -D-N4-hydroxycytidine (NHC)	Polimerasa de RNA viral	Inhibición de la replicación de varios coronavirus
Baricitinib	Jack cinasa	Interfiere con la vía de señalización de la cinasa Janus.
Lopinavir	Proteasa viral	Utilizado en la generación partículas inmaduras no infecciosas del HIV, inhibe PL ^{pro} o 3CL ^{pro} en SARS-CoV-2
Ritonavir	CYP3a (blanco desconocido para coronavirus)	Inhibidor de la proteasa del HIV.
Remdesivir	Polimerasa de RNA viral	Análogo de la purina bloquea la síntesis del genoma viral

Remdesivir+Ribavirina +Galidesivir	Polimerasa de RNA viral	Análogo de adenosina, eficaz contra virus del ébola, zika y otros virus de RNA
Cloroquina/ hidroxicloroquina	Hemopolimerasa y ACE2	Aumenta el pH endosómico y la glicosilación terminal de ACE2, inhibiendo la entrada de SARS-CoV-2.
Nitaxozanida	Glutación-s-transferasa	Altera el pH e inhibe la maduración viral. Utilizado contra TB, helmintos y protozoos.
Umifenovir/arbido	Proteína S y el receptor ACE2	Interactúa con residuos aromáticos de glicoproteínas virales. Se está probando la acción profiláctica contra COVID-19 Hemo polimerasa y ACE2
Favipiravir	RdRp, RNA dependiente de RNA polimerasa, proteína S	Inhibidor del RNA viral dependiente de RNA polimerasa, derivado de pirazinacarboxamida Inhibidor de la ARN polimerasa viral. Proteína S y el receptor ACE2.
Interferón	PKR, Mx protein	Inhibe la replicación viral por la inhibición de PKR
Anticuepos monoclonales (Tociizumab)	Receptor IL-6	Inhibe IL-6, Reducir el sistema inmunológico en pacientes críticos
Corticoides	Cascada de inflamación	Para pacientes en choque y síndrome de distrés respiratorio agudo
Talidomina	Inmunosupresor	Inhibidor de la producción de TNF α , actividad anticariogénica
Pirfenidona	NA	Reduce la proliferación de fibroblastos, la producción de proteínas y citocinas asociadas a la fibrosis
Vitamina C	Antioxidante	Módulo de señalización redox

*Farmacos antivirales que se encuentran en ensayos *in vitro* *Los fármacos aquí descritos han demostrado ser eficaces en pacientes con la COVID-19, sin embargo, su indicación de uso en estos pacientes puede cambiar.

6. PROFILAXIS Y MEDIDAS DE PREVENCIÓN

Tabla 8. Profilaxis y medidas de prevención⁷⁵

Medida de prevención	Acción
Mascarilla	<ul style="list-style-type: none">• En lugares públicos con poca o nula ventilación.• Es indispensable que sigas con esta medida de prevención que te ayuda a protegerte y proteger a los demás, recuerda que aun estando vacunado puedes adquirir y transmitir la enfermedad
Lavado de manos	Para reducir el riesgo de transmitir o adquirir la infección COVID-19, tanto la OMS, como el ECDC y el CDC recomiendan lavarse frecuentemente las manos con agua corriente y jabón y si esto no es posible, higienizarlas con un preparado de contenido alcohólico formulado para ser aplicado en las manos con el objetivo de inactivar los microorganismos
Sana distancia	Mantente al menos a 1.5 metros de otras personas, evita aglomeraciones y si es posible quédate en casa durante los periodos de alta transmisión.
Evitar compartir comida	El virus de SARS-CoV-2 se trasmite a partir de aerosoles, si estos aerosoles contienen el virus es muy probable que haya una infección viral por SARS-CoV-2 entre las personas que compartan alimentos y bebidas.
Vacunación	Las vacunas contra COVID-19 son seguras y eficaces y ayudan a disminuir el riesgo de enfermedad grave o muerte
Espacios ventilados	Evita espacios cerrados o mal ventilados, con poca o nula circulación de aire exterior. Las partículas virales se propagan entre las personas más fácilmente en el interior que en el exterior.
Monitorea tu salud	Si presentas síntomas de la enfermedad solicita atención médica, usa cubreboca y evita el contacto con otras personas, incluso dentro de tu casa

7. DIAGNÓSTICO.

Las pruebas de diagnóstico son esenciales para poder definir las pautas para el aislamiento oportuno de las personas positivas a SARS-CoV-2, lo que evita en gran medida la propagación de la enfermedad, y en relación con el paciente hace posible la instauración del tratamiento indicado para tratar de evitar la progresión del cuadro clínico.⁵

Desde el reporte del primer caso de la COVID-19 en diciembre de 2019, y de la identificación del SARS-CoV-2 como el agente causal, se han desarrollado varios kits de análisis y pruebas para su diagnóstico. Las pruebas actualmente disponibles en el mercado

se basan en los ensayos genéticos moleculares para la detección de RNA viral a partir de una muestra clínica de secreción orofaríngea o nasofaríngea que se procesa mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Sin embargo, existen otras técnicas como los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos isotérmicos, los ensayos serológicos y pruebas inmunológicas de antígeno, que permiten el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2^{42,47} (Tabla 9).

7.1 Prueba basada en PCR

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) desarrollada explícitamente para la detección de RNA (genómico), es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de la COVID-19, es una versión del método de PCR. Para la realización de la prueba se utilizan principalmente muestras de exudado nasal y de secreciones oculares, algunas se basan en la recolección de muestras de saliva que no solo es fácil y rápida de realizar, sino que también tiene menos riesgo para el personal de salud. Existen ensayos de microarreglos basados en la hibridación del RNA viral (permite monitorear en cada momento la expresión génica del virus), la tomografía computarizada de tórax se realiza para determinar y definir el grado de alteración pulmonar en los pacientes que padecen la COVID-19. ^{22,30,68}

La PCR de transcripción inversa cuantitativa (Tabla 9) (RT-qPCR) se usa cuando el material de partida es RNA. En este método, el RNA se transcribe primero en DNA complementario (ADNc) mediante transcriptasa inversa a partir de RNA total o RNA mensajero (mRNA). Luego, el ADNc se usa como molde para la reacción de qPCR. RT-qPCR se utiliza en una variedad de aplicaciones que incluyen análisis de expresión génica, validación de iRNA, validación de micromatrices, detección de patógenos, pruebas genéticas e investigación de enfermedades como lo es la actual pandemia por SARS-CoV-2.

Si bien las pruebas diagnósticas han permitido conocer la propagación de la enfermedad (llevando a la declaración de la Pandemia por la COVID-19) y las muertes asociadas a la enfermedad, existe un punto muy importante por cubrir, la identificación de los casos asintomáticos, estrategia clave para evitar la propagación de la infección por SARS-CoV-2. Por lo tanto, se requiere del desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y precisos dirigidos a identificar a los portadores asintomáticos de la infección por SARS-CoV-2 y que tengan una alta sensibilidad y especificidad para detectarlos de manera oportuna y sin falsos (-).²²

La limitación de la rRT-PCR para detectar infecciones pasadas por COVID-19 y el progreso de la enfermedad aumenta la importancia de los ensayos serológicos. Las pruebas serológicas pueden detectar infecciones activas y pasadas, si las pruebas se realizan dentro del marco de tiempo correcto después del inicio de la enfermedad. En el caso del ensayo de detección de anticuerpos, tanto los anticuerpos IgG como los IgM contra el COVID-19 son los analitos objetivo cuando IgM aparece en la sangre dentro de una semana y la expresión de IgG demorará más de 10 días. Además de la detección de anticuerpos, también se ha desarrollado la detección de antígenos contra la proteína S y la proteína N, lo que ofrece una detección temprana de la infección por COVID-19. En el caso de la RT-PCR, una de las razones importantes de los resultados falsos negativos es el muestreo (frotis de garganta) y el transporte inadecuado, mientras que la muestra de elección para la prueba serológica es suero/plasma/sangre completa, que son fáciles de manipular y transportar. Las pruebas serológicas como LFIA para la detección de antígenos/anticuerpos se pueden utilizar como una prueba rápida o como una prueba en el punto de atención que ofrece una detección rápida de los pacientes.²²

7.2 Pruebas serológicas

La pandemia mundial de COVID-19 se ha convertido en una crisis mundial de salud pública. Se han desarrollado varios métodos de diagnóstico clínico para distinguir a los pacientes infectados con COVID-19 de las personas sanas. La prueba de ácido nucleico es el estándar de oro para la detección de virus, ya que es adecuada para el diagnóstico precoz. Sin embargo, debido a la baja cantidad de ácido nucleico viral en el tracto respiratorio, la sensibilidad de la detección de ácido nucleico es insatisfactoria. Como resultado, la detección serológica comenzó a ser ampliamente utilizada con los méritos de procedimientos simples, menor costo y tiempo de detección. Las pruebas serológicas actualmente incluyen el ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), el inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) y el inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA).^{1,33,22}

Cuando un virus invade el cuerpo humano y libera antígenos virales en el torrente sanguíneo, el sistema inmunitario humano se activa para producir continuamente una gran cantidad de anticuerpos específicos (IgM/IgA/IgG) que están más concentrados que la proteína antigénica y duran un mucho tiempo, en comparación con los antígenos virales, se prefiere usar anticuerpos serológicos como objetivos de diagnóstico para desarrollar pruebas serológicas más rápidas, sencillas y sensibles. La detección de anticuerpos específicos de virus mostró resultados más precisos que la detección de inmunoglobulina total (Ig). Por lo tanto, varios estudios han seleccionado anticuerpos específicos de proteína S o N (IgM/IgA/IgG) como objetivos de diagnóstico de SARS-CoV-2, en este trabajo se propone seleccionar anticuerpos específicos no solo para las proteínas S o N, sino también para las proteínas E, M, y Nsp_12, la efectividad de la prueba serológica COVID-19 en una etapa temprana de la infección viral no está satisfecha, se ha demostrado que solo el 50% de los pacientes con por SARS-CoV-2 tenían IgM e IgG positivos en su suero en una semana después del inicio de los síntomas.⁷⁷

La figura 11, es una representación esquemática de las pruebas serológicas para diagnóstico de la COVID-19, las diferencias entre las distintas pruebas diagnósticas se resumen en la tabla 9. La detección de antígenos de la COVID-19 y de los anticuerpos contra antígenos virales se basan en ensayos similares y difieren en el recubrimiento de la placa de micropocillos. Cuando la placa está recubierta de antígenos, se utiliza para la detección de anticuerpos generados contra el virus y que están presentes en el suero del paciente y viceversa, el recubrimiento con anticuerpos antiviral permite la detección de los antígenos virales presentes en el suero de estudio.^{22,33,49,60,68,73}

El método ELISA se basa en la reacción entre antígenos específicos y anticuerpos, y el resultado se vuelve visible y posible para el análisis cuantitativo debido a la reacción enzimática. CLIA es una prueba de laboratorio, en esta se reemplazó el yodo radiactivo utilizado en inmunoensayos con un éster de acridinia que emite su propia luz. CLIA combina la quimioluminiscencia (radiación electromagnética provocada por una reacción química para producir luz) con un complejo inmunitario antígeno-anticuerpo. Tanto ELISA como CLIA se llevan a cabo en pocillos de microplaca, pero si la reacción en ELISA se confirma con mayor frecuencia por el cambio de color incluso a simple vista (se necesita un lector de microplaca para el análisis cuantitativo del contenido de los pocillos), CLIA se verifica mediante la producción de luz en el analizador de quimioluminiscencia. Las pruebas de ELISA y CLIA están utilizando ampliamente técnicas serológicas para la detección cuantitativa de antígenos o anticuerpos específicos en las muestras.^{33,60,73}

En el caso de detección de anticuerpos, la placa de ELISA estará recubierta con el epítipo de las proteínas S, N, M, E y NSP12 SARS-CoV-2, para detectar la presencia de IgG humana contra SARS-CoV-2 en la muestra, la prueba de ELISA tiene una alta sensibilidad y especificidad para detectar la infección por SARS-CoV-2. Además de los ensayos de ELISA en la actualidad solamente se basan en las proteínas S y N.^{2,16,20,73}

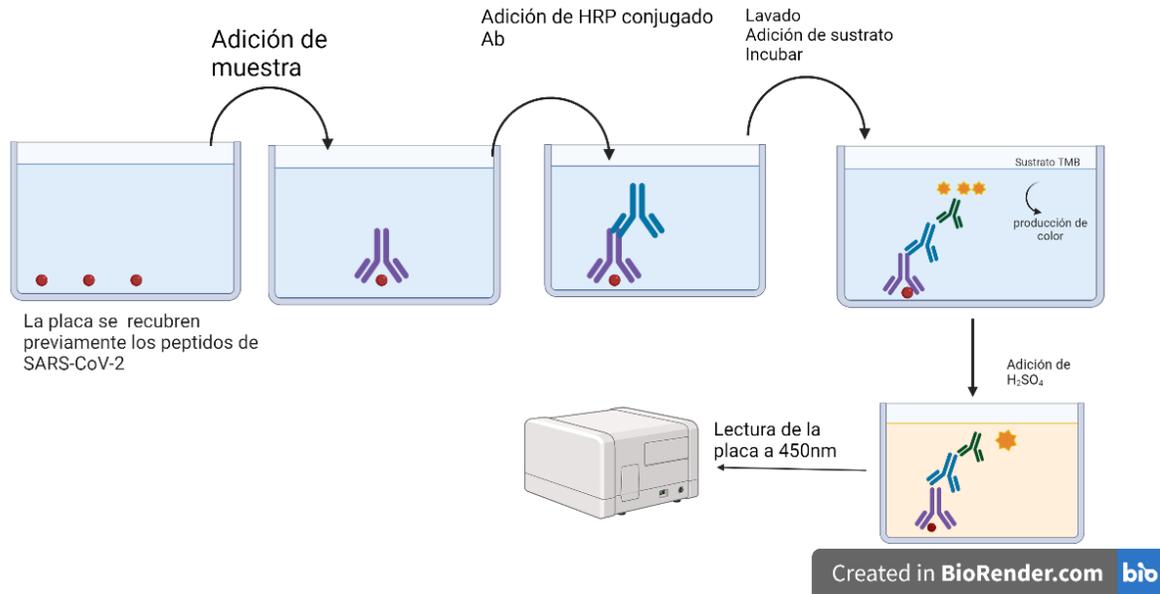


Figura 13. ELISA tipo sándwich para la detección de antígenos del SARS-CoV-2⁷³

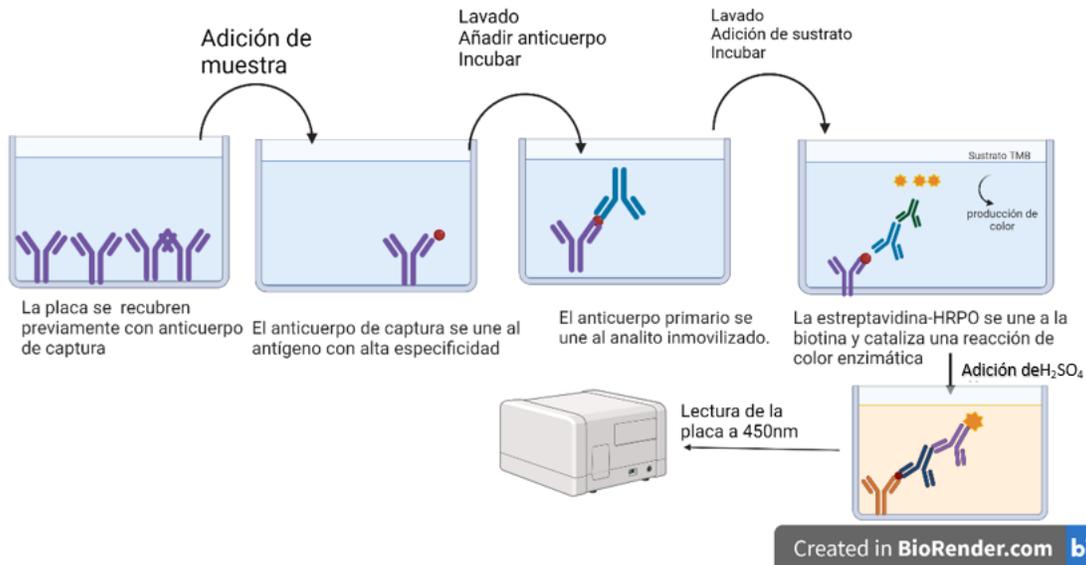


Figura 14. ELISA de captura para la detección de anticuerpos humanos contra los antígenos del SARS-CoV-2⁷³

LFIA (inmunoensayo de flujo lateral) es un método de análisis inmunoquímico basado en el principio de la cromatografía en capa fina, que se lleva a cabo utilizando tiras reactivas, paneles o casetes de prueba especiales. El principio de funcionamiento es que cuando la tira reactiva se sumerge en un fluido biológico (u otras muestras líquidas), comienza a migrar a lo largo de la tira según el principio de la cromatografía en capa fina. Junto con él,

se mueven los anticuerpos específicos etiquetados aplicados a la parte inferior de la tira reactiva.^{2,42,60}

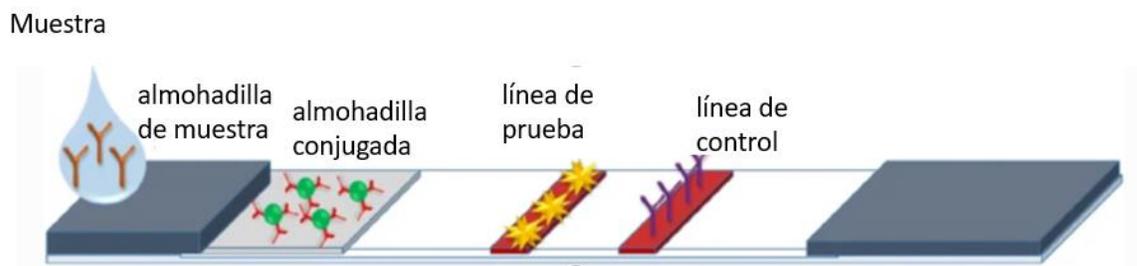


Figura 15. Inmunoensayo de flujo lateral para la detección de anticuerpos humanos IgM o IgG anti-SARS-CoV-2 ⁷³

Tabla 9. Pruebas serológicas y moleculares^{33,49,73}

Técnica	RT-qPCR	ELISA/CLIA	TEST rápidos
Muestra	Hisopado Nasofaríngeos/ orofaríngeo	Suero/Plasma	Suero/Plasma/Sangre total
Detección	RNA viral de SARS-CoV-2	Anticuerpos IgG/IgM/IgA anti-SARS-CoV-2 y antígenos virales	Anticuerpos IgG/IgM anti-SARS-CoV-2
Características	Estándar de oro para la detección directa del genoma viral, (prueba de laboratorio).	Prueba para la detección de antígenos virales o anticuerpos específicos (prueba inmunoenzimática basada en la interacción antígeno-anticuerpo (realizada en laboratorio)).	Bajo costo, portable, libre de equipo de laboratorio, resultados en máximo 15 minutos
Periodo de ventana usual para resultados precisos	0-14 días	5-30 días	5-30 días
Inconvenientes	Caro, requiere de equipo especial, insumos y personal especializado, no es accesible para toda la población	Procedimiento laborioso el ensayo requiere de equipo y de un laboratorio.	Baja sensibilidad, los resultados dependen del sistema inmunitario de cada persona, puede tener reactividad cruzada

8. EPIDEMIOLOGÍA

La epidemia evolucionó rápidamente, afectando a diferentes entidades de China y otros países. El 30 de enero de 2020, la OMS declaró a la Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19), como “Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional” (ESPII). El 11 de marzo de 2020, se estableció por la misma organización que la COVID-19 se había extendido tanto en el planeta que constituía una pandemia, desde entonces se han observado casos y defunciones por la enfermedad en las seis regiones del mundo. La región de la OMS que tiene más casos registrados es la de América (40.38%), seguida de Europa (33.60%), Asia Sudoriental (16.25%), Mediterráneo Oriental (5.99%), África (2.13%) y Pacífico Occidental (1.65%).⁸⁰

8.1 Casos de la COVID-19 en México

La vigilancia epidemiológica de la COVID-19 en el país, se ha realizado desde los primeros días de enero del 2020, los resultados se notifican a la plataforma informática del SISVER que forma parte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México.

La Ciudad de México es la región con el mayor número de casos en el territorio nacional y representa por sí sola más de una cuarta parte (27%) de todos los casos acumulados por entidad. Los estados que registran menos casos acumulados son: Campeche, Chiapas y Colima. La tasa de incidencia acumulada nacional es de 1834.9 casos por 100,000 habitantes. Hasta el 10 de mayo de 2021, se han notificado un total de 6, 761,179 personas en todo el país (incluye casos totales, negativos y sospechosos totales) figuras 12, 13,14.⁸⁰

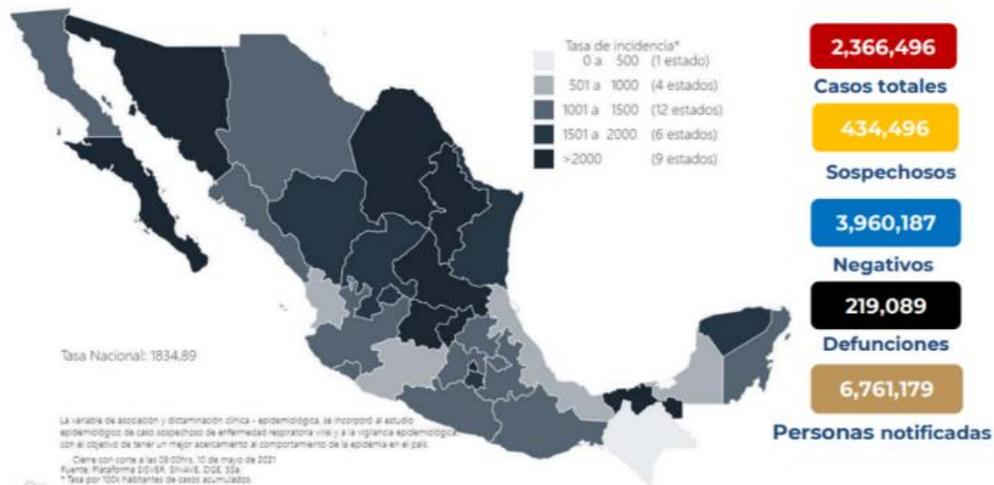


Figura 16. Mapa de la distribución de la tasa de incidencia de casos acumulados de COVID-19 por entidad de residencia en México. Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021⁸⁰

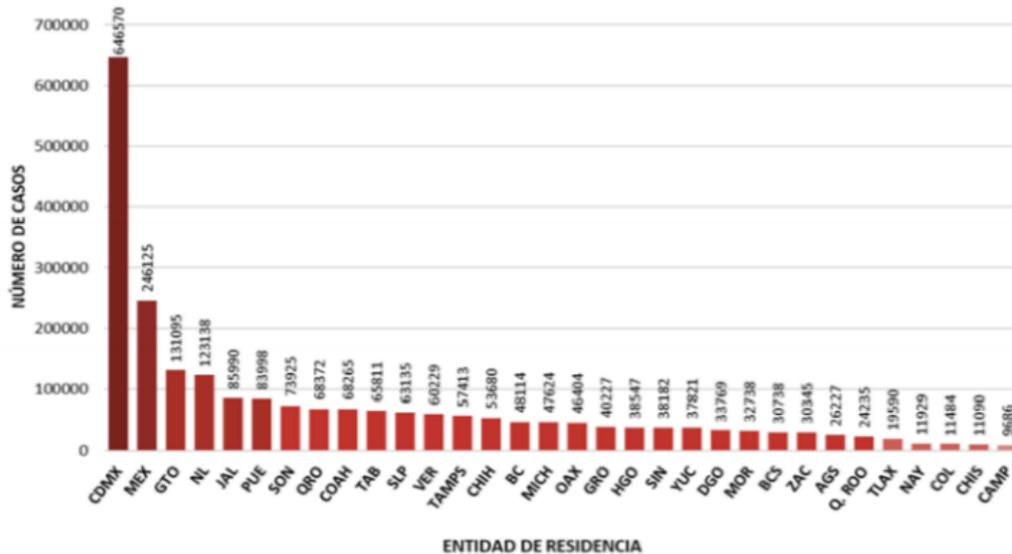


Figura 17. Casos totales acumulados por entidad federativa de residencia. Se observa la distribución por entidad federativa de residencia de los casos totales acumulados en México (2,366,496). Se muestran los casos acumulados por entidad en la República Mexicana, los diez primeros estados que acumulan el mayor número de casos totales corresponden a: Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Puebla, Sonora, Querétaro, Coahuila, y Tabasco, ya que concentran más de dos tercios (67%) de todos los casos de COVID19 del país. Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021⁸⁰

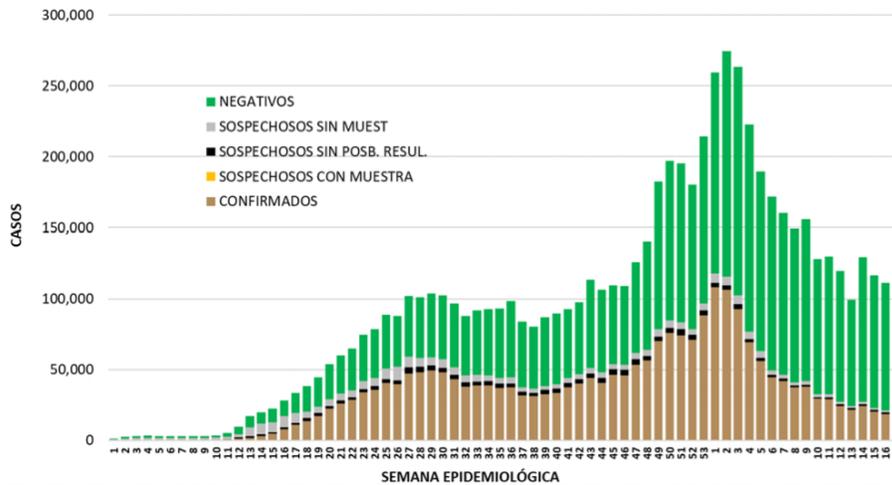


Figura 18. Casos confirmados, negativos y sospechosos con y sin muestra. Se observa la distribución por semana epidemiológica según la fecha de inicio de síntomas de los casos totales, negativos y los sospechosos, a nivel Nacional ascienden a 434,496 Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021⁸⁰

8.2 Casos Activos

Se consideran casos activos, aquellos casos positivos que iniciaron síntomas en los últimos 14 días. De esta forma es posible identificar los lugares donde hay mayor transmisión activa. Al 10 de mayo se tiene registrado 2,366,496 casos. Se aprecia en la tabla 10 las entidades con más casos hasta el 10 de mayo son la Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Nuevo León y Puebla lo que representa más de la mitad (52.3%) de todos los casos acumulados por entidad de notificación del país. El estado que registra el menor número de casos acumulados es Campeche con solo 10,067 lo que representa 0.4% del total de casos acumulados⁸⁰

Tabla 10 Casos positivos activos a COVID-19 por entidad de residencia⁸⁰

No.	Entidad	Casos Activos	Porcentaje	Porcentaje acumulado	No.	Entidad	Casos Activos	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	CDMX	5138	30.4	30.4	18	VER	307	1.8	85.3
2	MEX	1256	7.4	37.8	19	ZAC	295	1.7	87.0
3	TAB	1028	6.1	43.9	20	MICH	272	1.6	88.6
4	Q. ROO	829	4.9	48.8	21	MOR	259	1.5	90.1
5	CHIH	724	4.3	53.1	22	SIN	208	1.2	91.4
6	NL	590	3.5	56.6	23	OAX	204	1.2	92.6
7	TAMPS	587	3.5	60.1	24	COAH	193	1.1	93.7
8	YUC	532	3.1	63.2	25	HGO	182	1.1	94.8
9	PUE	451	2.7	65.9	26	COL	175	1.0	95.8
10	GRO	434	2.6	68.4	27	DGO	173	1.0	96.9
11	JAL	404	2.4	70.8	28	AGS	146	0.9	97.7
12	BCS	400	2.4	73.2	29	NAY	124	0.7	98.5
13	SON	386	2.3	75.5	30	CHIS	92	0.5	99.0
14	QRO	364	2.2	77.6	31	TLAX	85	0.5	99.5
15	GTO	339	2.0	79.6	32	CAMP	84	0.5	100.0
16	SLP	322	1.9	81.6					
17	BC	319	1.9	83.4					
					Total		16,902	100.0	

Se muestra el número de casos activos por entidad federativa de notificación, Ciudad de México (5138 de casos) y Estado de México (1256 casos) como las entidades con el mayor número de casos activos. Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021⁸⁰

8.3 Distribución demográfica de casos totales de COVID-19

La mayor proporción de los decesos por COVID-19 corresponde a pacientes del sexo masculino (62.4%). Seis de cada diez defunciones se presentan entre los 55 y 79 años en ambos sexos. El grupo de 45 a 54 años registra el 16% de las defunciones que han ocurrido por SARS-CoV-2 en el país (Tabla 11). Aun cuando la distribución de las defunciones por sexo es similar, entre los 35 a 54 años hay mayor proporción de hombres a diferencia de lo reportado para individuos entre los 60 y 89 años en que los porcentajes son discretamente mayores entre la población del sexo femenino, pero no se reporta una diferencia estadística relevante (tabla 12).⁸⁰

Tabla 11. Distribución de casos positivos y asociados a COVID-19 por edad y sexo⁸⁰

Características	Masculino		Femenino		Total de Casos	
	n	%	n	%	n	%
Sexo	1,184,085	50.0	1,182,411	50.0	2,366,496	100
Grupo de edad						
<1	1,815	0.2	1,574	0.1	3,389	0.1
1 a 4	4,453	0.4	3,910	0.3	8,363	0.4
5 a 9	7,618	0.6	6,973	0.6	14,591	0.6
10 a 14	14,842	1.3	14,782	1.3	29,624	1.3
15 a 19	33,089	2.8	35,378	3.0	68,467	2.9
20 a 24	79,073	6.7	85,924	7.3	164,997	7.0
25 a 29	120,976	10.2	127,890	10.8	248,866	10.5
30 a 34	127,066	10.7	130,384	11.0	257,450	10.9
35 a 39	123,362	10.4	125,263	10.6	248,625	10.5
40 a 44	116,984	9.9	118,990	10.1	235,974	10.0
45 a 49	120,804	10.2	124,254	10.5	245,058	10.4
50 a 54	107,331	9.1	109,979	9.3	217,310	9.2
55 a 59	93,563	7.9	90,813	7.7	184,376	7.8
60 a 64	73,194	6.2	68,129	5.8	141,323	6.0
65 a 69	56,735	4.8	50,192	4.2	106,927	4.5
70 a 74	42,301	3.6	35,548	3.0	77,849	3.3
75 a 79	29,352	2.5	24,599	2.1	53,951	2.3
80 a 84	17,904	1.5	15,261	1.3	33,165	1.4
85 a 89	9,331	0.8	8,192	0.7	17,523	0.7
90 a 94	3,207	0.3	3,241	0.3	6,448	0.3
>95	1,085	0.1	1,135	0.1	2,220	0.1

En la tabla se observa que el grupo más susceptible a la COVID-19 fue el de 30-34 años en ambos géneros.

Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/informe. COVID-19 /México- 10 de mayo de 2021

Tabla 12. Distribución de defunciones por COVID-19 por edad y sexo⁸⁰

Características	Masculino		Femenino		Total de Defunciones	
	n	%	n	%	n	%
Sexo	136,802	62.4	82,287	37.6	219,089	100
Grupo de edad						
<1	106	0.1	80	0.1	186	0.1
1 a 4	78	0.1	72	0.1	150	0.1
5 a 9	45	0.0	23	0.0	68	0.0
10 a 14	56	0.0	41	0.0	97	0.0
15 a 19	113	0.1	122	0.1	235	0.1
20 a 24	434	0.3	305	0.4	739	0.3
25 a 29	1,032	0.8	614	0.7	1,646	0.8
30 a 34	2,082	1.5	1,039	1.3	3,121	1.4
35 a 39	3,631	2.7	1,583	1.9	5,214	2.4
40 a 44	6,030	4.4	2,654	3.2	8,684	4.0
45 a 49	9,819	7.2	4,681	5.7	14,500	6.6
50 a 54	12,892	9.4	6,673	8.1	19,565	8.9
55 a 59	16,208	11.8	9,490	11.5	25,698	11.7
60 a 64	18,638	13.6	11,605	14.1	30,243	13.8
65 a 69	18,958	13.9	12,033	14.6	30,991	14.1
70 a 74	17,038	12.5	11,037	13.4	28,075	12.8
75 a 79	13,391	9.8	8,929	10.9	22,320	10.2
80 a 84	9,067	6.6	6,097	7.4	15,164	6.9
85 a 89	5,041	3.7	3,451	4.2	8,492	3.9
90 a 94	1,673	1.2	1,367	1.7	3,040	1.4
>95	470	0.3	391	0.5	861	0.4

El grupo con mayor número de defunciones fue el de 65-69 años para ambos sexos. Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021

8.4 Características clínicas y antecedentes de riesgo

Desde la notificación de los primeros casos en Wuhan, China en diciembre del 2019, la población adulta fue la que se vio más afectada, las comorbilidades más comunes son hipertensión, diabetes y obesidad. No se observan diferencias significativas de lo registrado previamente respecto a la distribución de comorbilidades en los casos positivos y las defunciones (figura 15 y 16); en quienes tienen una o más comorbilidades se incrementa el riesgo para morir. La presencia de patologías previas son factores predisponentes para presentar la forma más severa y complicada de COVID-19, siendo las más frecuentes la hipertensión, diabetes y obesidad.⁸⁰

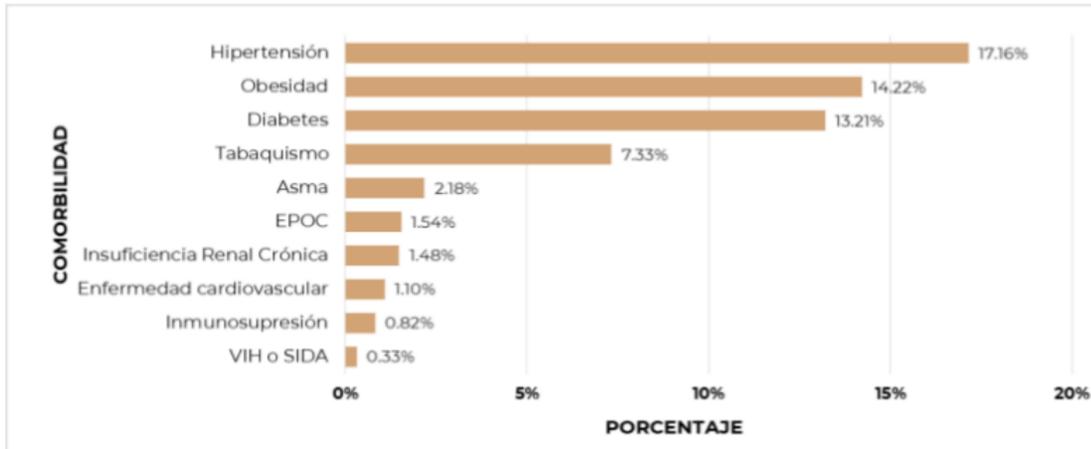


Figura 19. Principales comorbilidades en casos positivos a COVID-19. Las principales siendo las más frecuentes la hipertensión (17.12), diabetes (14.2) y obesidad (13.21) Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021.⁸⁰

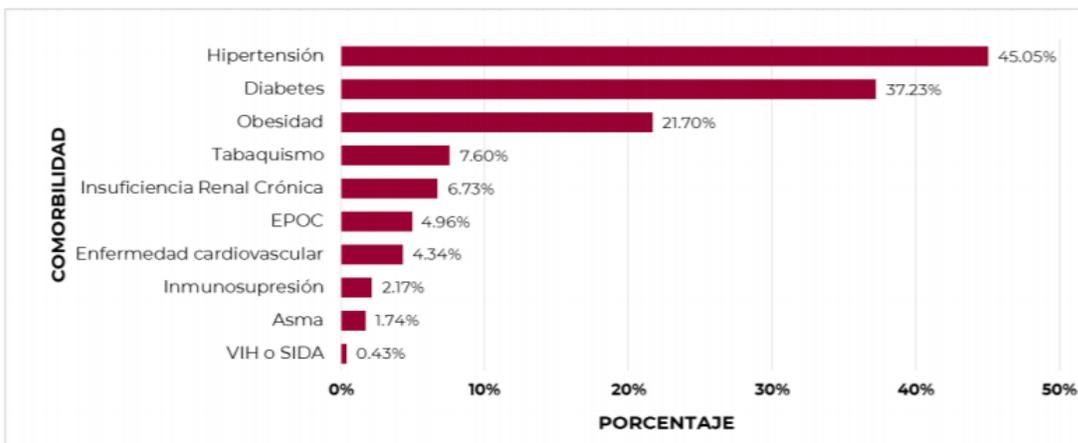


Figura 20. Principales comorbilidades en defunciones positivas a COVID-19 Como se puede observar las principales comorbilidades en defunciones positivas a la COVID-19, fueron: Hipertensión (45.05%), Diabetes (37.23%), tabaquismo (21.7%), Insuficiencia Renal crónica (7.60%). Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021.⁸⁰

8.5 Defunciones

En mayo del 2021 se registraron 219,089 defunciones totales por la COVID-19 en México, incluyendo las confirmadas a SARS-CoV-2 por laboratorio y defunciones por asociación o se dictaminaron clínico-epidemiológicos, se tienen 17,550 defunciones sospechosas por la COVID-19. Las defunciones por SARS-CoV-2 (positivas por diagnóstico de laboratorio) hasta el 9 de mayo de 2021 fueron de 182,867 (Figura 17), distribuidas en todo el país. El 64.9% de las defunciones acumuladas en el país se concentran en: CDMX, Estado de

México, Jalisco, Puebla, Guanajuato, Veracruz, Nuevo León, Baja California, Chihuahua y Sonora (Tabla 13).⁸⁰

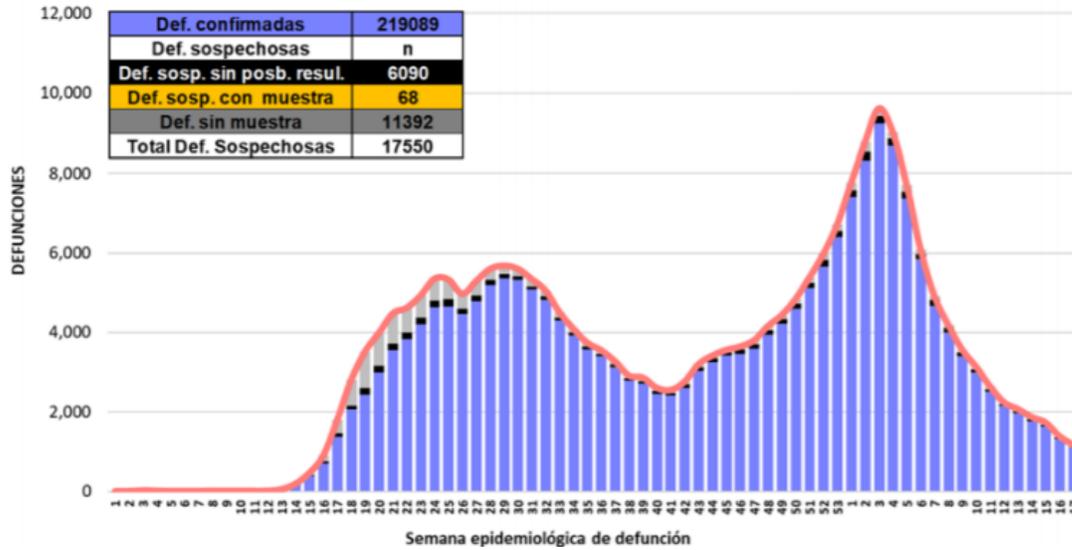


Figura 21. Distribución de defunciones positivas y sospechosa COVID-19 por semana epidemiológica de defunción. Se muestra la distribución de las defunciones totales por SARS-CoV-2 confirmadas por laboratorio, las defunciones sospechosas sin posibilidad de resultado, las defunciones sospechosas con muestra y defunciones sin muestra, y se señala la entidad de notificación, según la fecha de ocurrencia del deceso por semana epidemiológica. Se observa por semana epidemiológica las defunciones, un primer pico en la semana 30 (semana del 2020) y un segundo pico en la semana 4 (semana del 2021). Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México 10 de mayo de 2021⁸⁰

Tabla 13. Defunciones positivas y sospechosas a COVID-19 según entidad federativa de notificación⁸⁰

Entidad Federativa	Defunciones Totales	Defunciones Sospechosas
CDMX	42,315	6,185
MEX	25,220	3,925
JAL	11,899	706
PUE	11,641	510
GTO	10,614	296
VER	9,510	582
NL	9,501	296
BC	8,026	745
CHIH	6,795	804
SON	6,624	187
COAH	6,256	503
SIN	6,086	586
HGO	6,050	63
MICH	5,572	209
SLP	5,246	119
TAMPS	4,995	224
QRO	4,386	37
GRO	4,242	130
TAB	4,159	152
YUC	3,798	55
OAX	3,449	112
MOR	3,137	217
ZAC	2,733	28
Q. ROO	2,617	62
AGS	2,445	81
DGO	2,357	90
TLAX	2,267	58
NAY	1,874	34
CHIS	1,446	483
BCS	1,362	19
COL	1,278	9
CAMP	1,189	43
NAL	219,089	17,550

Tomado de: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México fuente: SSA/SPPS/DGE/DIE/InDRE/Informe. COVID-19 /México- 10 de mayo de 2021⁸⁰

9. ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE PÉPTIDOS POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Los experimentos *in silico* son procesos novedosos que incorporan el uso de software de simulación y modelos matemáticos predictivos confiables que permiten modelar diversas situaciones en diversos campos de la ciencia, incorporando Redes Neuronales Artificiales que modelan de manera muy eficiente y efectiva los péptidos predichos, siendo capaces de encontrar patrones de forma inductiva por medio de algoritmos de aprendizaje basado en datos existentes (o experimentales). Por lo que el desarrollo de estrategias para la generación de péptidos ayuda a la identificación, diagnóstico y predicción más precisa de los mismos, tal es el caso de las herramientas desarrolladas por IEDB.⁸²

9.1 IEDB

La base de datos de epítomos inmunes (IEDB, iedb.org) captura datos experimentales confinados en figuras, texto y tablas de la literatura científica y se encuentran disponibles de forma gratuita, son fáciles de buscar por la comunidad interesada en este campo de estudio.

El alcance de la IEDB se extiende a los datos de epítomos inmunitarios relacionados con todas las especies estudiadas e incluye contextos de unión a los anticuerpos, células T y MHC relacionados con presentación antigénica o asociados con enfermedades infecciosas, alérgicas, autoinmunes y/o relacionadas con trasplantes. IEDB ha sido accesible al público durante más de 10 años, su enfoque reciente logra funcionalidad mejorada para la realización de consultas e informes que satisfacen las necesidades de acceso de los usuarios y resumen los datos en constante aumento tanto en cantidad como en complejidad.^{14,17}

Los investigadores de ciencias biológicas pueden utilizar el IEDB para desarrollar nuevas vacunas, pruebas diagnósticas y terapias. La base de datos se completa con información

capturada o curada de literatura científica revisada por pares y de datos enviados por investigadores. A diciembre de 2016, se han seleccionado más de 18,000 referencias, y la base de datos contiene más de 260,000 epítomos y más de 1,200,000 ensayos de elución de ligandos MHC, células T, unión MHC y células B. Debido a que la base de datos se actualiza continuamente con nueva literatura, el IEDB ofrece a los investigadores que diseñan vacunas información completa y respaldada por investigaciones de calidad (Figura 18).

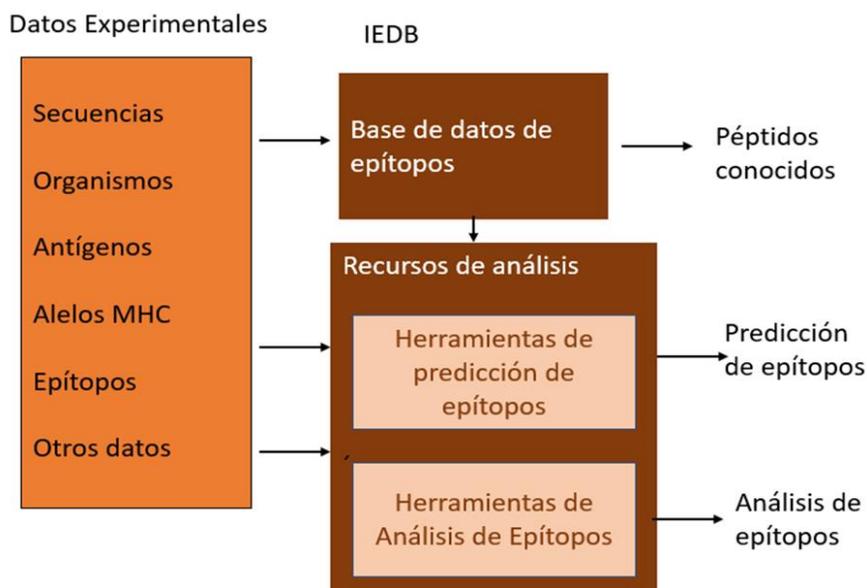


Figura 22. IEDB. El recurso de análisis captura información de epítomos experimentales en la base de datos, permite que los epítomos se conozcan libremente para la investigación. Esta información sirve para entrenar la herramienta de predicción de epítomos y también contiene herramientas para el análisis de péptidos. Tomado de Fleri, W. (2017).¹⁴

9.2 Datos que se incluyen en IEDB

El IEDB no captura datos ni revisiones previstas / inferidos. Todos los datos provienen de ensayos derivados empíricamente que reflejan la interacción de un receptor inmune adaptativo con un epítomo. Hay cuatro categorías de ensayos: linfocitos T, linfocitos B (incluidos los anticuerpos solubles), unión al MHC y elución del ligando del MHC.¹⁷

Los péptidos lineales no pueden exceder de 50 aminoácidos de longitud y deben probarse como inmunógenos. Los epítomos discontinuos muestran que los residuos específicos son importantes para su reconocimiento por anticuerpos, y receptores de células B. En la base de datos también se pueden predecir epítomos no peptídicos como carbohidratos, lípidos, productos químicos, metales y medicamentos. En todos los análisis se requiere un conjunto mínimo de información, para los péptidos lineales, se debe especificar la secuencia de aminoácidos, y para los epítomos discontinuos, se identifica el aminoácido y su posición respectiva (por ejemplo, G104, G106, L107 y W231, donde G, L y W se refiere a los diferentes aminoácidos). En todos los casos, se obtienen resultados positivos o negativos que indican la posibilidad de que estas moléculas puedan generarse *in vivo*, resultado positivo predice que si se generan y negativo que no se generan. En los ensayos de células T y B, además se debe definir el tipo de hospedera (por ejemplo, humano o ratón).¹⁷

9.3 Estructura de los datos

Cada registro en IEDB debe estar asociado con una estructura molecular claramente definida, para los epítomos peptídicos, el autor debe proporcionar una secuencia e identificar la fuente de la proteína y el tipo de organismo. Si bien algunos autores especifican un identificador GenBank o UniProt para cada proteína, la mayoría proporciona un nombre o abreviatura. Dado que la nomenclatura de proteínas es muy variable y una búsqueda de nombres de proteínas en GenBank puede producir una gran cantidad de resultados, la fuente de proteína asignada a un péptido dado por el IEDB debe tener una coincidencia de BLAST del 100%, con esa secuencia y debe corresponder a la proteína que indicó el autor.¹⁷

Cada epítomo peptídico también se deriva de una especie o una cepa en particular. En IEDB utiliza la taxonomía NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) para formalizar la asignación del organismo. El árbol de taxonomía extenso se ha modificado para incluir solo

las especies que se encuentran en IEDB y posteriormente, se integran en un buscador de organismos, con sinónimos y funciones de autocompletado para facilitar las consultas.

Ahora bien, en el caso del proceso de inmunización se describe como el hospedador se expuso o sensibilizó inicialmente. Por ejemplo, a un ratón se le inyectó una proteína, a un humano se le administró una vacuna o un humano contrajo una enfermedad específica. La ontología de enfermedades (DO por sus siglas en inglés Disease Ontology), se utiliza para proporcionar una lista estandarizada de nombres e identificadores de enfermedades, lo que permite vincular los datos del IEDB a otras bases de datos utilizando los mismos identificadores. El uso de ontologías externas como DO proporciona información útil, como definiciones, sinónimos y relaciones que el IEDB puede aprovechar para mejorar el contenido de la información.

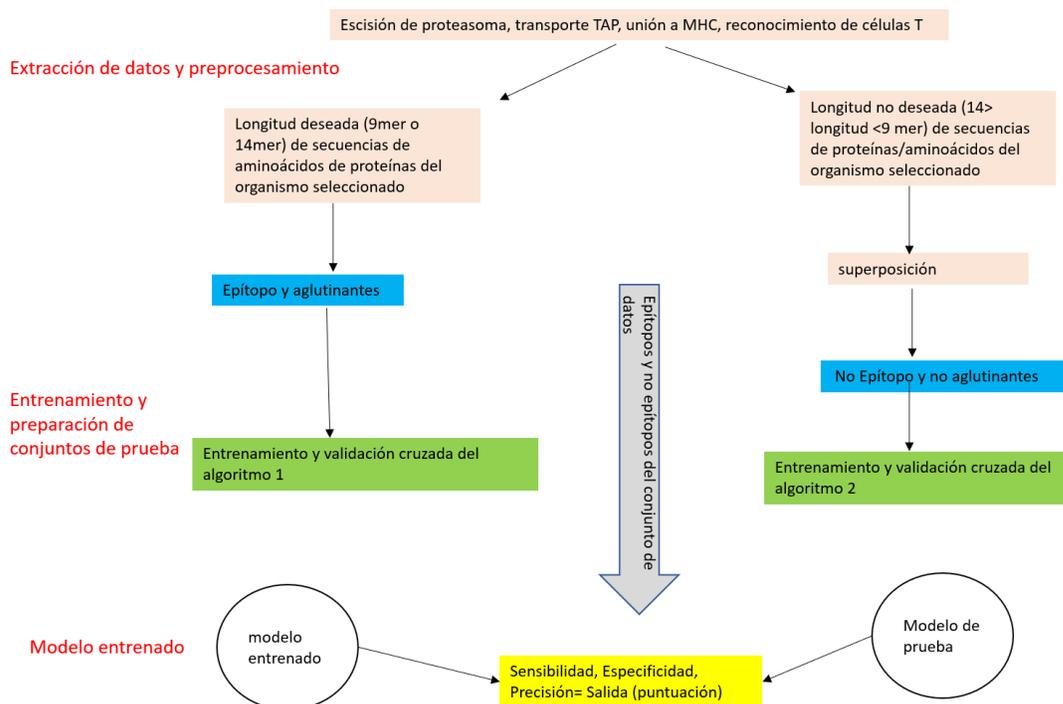


Figura 23. El flujo de trabajo general del desarrollo de herramientas inmunoinformáticas. Modificado de Kaliyamurthi, S. (2019)⁸²

La ontología de la investigación biomédica (OBI por sus siglas en inglés The Ontology of Biomedical Investigation), tiene una estructura de árbol jerárquica con todos los tipos de ensayos que se describen en la literatura, para capturar los detalles del experimento de la manera más precisa posible. Esta estructura permite a los usuarios buscar en muchos niveles, por ejemplo, en todos los ensayos de células T, o en ensayos de citocinas, o solo en ensayos de IL-2, y a medida que encontramos nuevos tipos de análisis, solicitamos a OBI que agregue nuevos términos a la ontología, que pueden ser utilizados por usuarios finales.¹⁷

La restricción de MHC es un parámetro importante relacionado con los ensayos de células T, así como con los ensayos de elución de ligandos y unión de MHC. Debido a que no existía ninguna ontología de alelos de MHC, el IEDB creó la Ontología de restricción de MHC (MRO, por sus siglas en inglés (MHC Restriction Ontology)). MRO modela el complejo de proteínas del MHC como compuesto de dos cadenas de proteínas diferentes, cada una de las cuales está codificada por diferentes loci que se unen para formar un complejo. Los usuarios pueden buscar por locus, cadena de proteínas o el complejo MHC completo. Además, se incluye información sobre haplotipos para ratones.¹⁷

9.4 HERRAMIENTA DE PREDICCIONES VINCULANTES CON MOLÉCULAS HLA CLASE I Y II

9.4.1 HLA

Los genes *HLA* se encuentran dentro del Complejo Principal de Histocompatibilidad_(MHC) humano, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (p21.3). Las moléculas clásicas de HLA de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) se expresan en todas las células nucleadas. Los péptidos extraños presentados en las moléculas de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos^{5,61}

Las moléculas clásicas de HLA clase II (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR) presentan péptidos provenientes de antígenos exógenos a linfocitos T CD4, mediante los procesos de presentación exógena y cruzada, según sea el caso. La expresión constitutiva de las moléculas de clase II se limita a las células de función especializada en la inmunidad, conocidas colectivamente como células presentadoras de antígenos profesionales, que incluyen principalmente células dendríticas, macrófagos y linfocitos B maduros. Sin embargo, algunas células como los queratinocitos, células epiteliales, así como células de pulmón e intestino, pueden ejercer funciones de células presentadoras de antígeno, ya que la presencia de antígeno induce en ellas, la expresión de moléculas del HLA clase II.⁶¹

El comité de nomenclatura para el HLA de la Organización Mundial de la Salud es el encargado de nombrar genes de histocompatibilidad de reciente identificación, así como las secuencias de los alelos y vigilar todo lo que concierne al sistema HLA. Los alelos de HLA se nombran con un número que es único para cada uno cuando son definidos serológicamente, de tal manera que el locus es denominado con una letra y con el número del alelo. Cuando se nombran con base en la secuencia nucleotídica, al locus se le denomina con una letra y un número de cuatro a ocho dígitos; los primeros dígitos corresponden al antígeno serológicamente identificado, los siguientes dígitos al subtipo y se asignan conforme se obtiene la secuenciación del gen. Así, por ejemplo, HLA-A*02:01 corresponde al locus A, grupo 2, alelo 1. Con seis dígitos se identifican los alelos que son diferentes en su secuencia nucleotídica pero no en la de aminoácidos; por ejemplo, HLA-A*02:03:01 y HLA-A*02:03:02 corresponden al locus A, grupo 2, alelos 3. Con siete y ocho dígitos se designan los alelos con polimorfismos en los intrones o en regiones no traducidas. Después de dos puntos, se puede usar un tercer conjunto de dígitos para sustituciones de nucleótidos sinónimos (silenciosos), y un cuarto conjunto se puede usar para cambios en regiones intrónicas. También se puede agregar un sufijo para indicar proteínas con

expresión nula (N) o baja (L) y aquellas que son secretadas (S), citoplasmáticas (C), aberrantes (A) o cuestionables (Q)

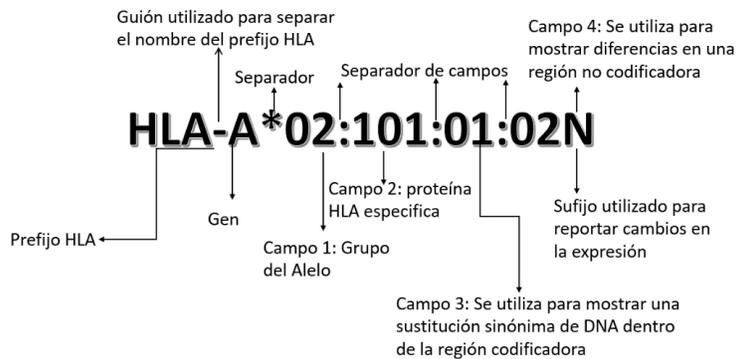


Figura 24. Nomenclatura actual del sistema HLA tomado de Bui HH ⁸⁸

9.4.2 Predicciones vinculantes del MHC clase I

Las células T específicas de antígeno no reconocen directamente los antígenos nativos, sino que el receptor de la célula T se une a un complejo molecular formado por una molécula de MHC y un epítipo peptídico. Para que un péptido se una y sea presentado por la molécula del MHC clase I, el antígeno debe ser procesado por la célula. Los antígenos endógenos son escindidos por el proteasoma y transportados al RE, donde serán acoplados a moléculas HLA de clase I mediante procesos complejos que dependen de interacciones con moléculas chaperonas, posteriormente pasan a través del aparato de Golgi y se dirigen a la superficie celular en vesículas exocíticas, para ser presentados en la membrana de la célula infectada a los linfocitos T CD8⁺.⁶¹

Su ranura de unión está cerrada en ambos extremos y puede acomodar péptidos de 8 a 15 aminoácidos de longitud. Las moléculas de MHC son altamente polimórficas y existen miles de variantes diferentes. La especificidad de unión del péptido también es muy amplia, y un MHC dado puede unirse y presentar una serie de péptidos diferentes. Para realizar predicciones de unión de péptidos a moléculas de clase I, el usuario ingresa una o más secuencias como texto sin formato, separando las secuencias con espacios en blanco, o

en formato FASTA, o especifica un archivo que contiene las proteínas. A continuación, un usuario puede seleccionar un método preferido de una lista recomendada por IEDB, basadas en redes neuronales artificiales entrenadas como los siguientes métodos: Consenso, netMHCpan, ANN, método de matriz de puntuación (SMM), SMMPMBEC, Biblioteca combinatoria, PickPocket y netMHCcons. El método recomendado por IEDB es la configuración predeterminada y generalmente es el Consenso, una combinación de tres métodos diferentes (ANN, SMM y Biblioteca combinatoria). Si estos métodos no están disponibles para el alelo seleccionado, se utilizará netMHCpan en su lugar. El usuario especifica las especies de MHC (humanos, ratones, primates no humanos y otros) y los alelos específicos. Estas herramientas predicen los valores de IC50 para péptidos que se unen a moléculas del MHC específicas y se pueden analizar múltiples alelos y longitudes de epítomos (9-14). Para los seres humanos, los alelos más frecuentes están disponibles para su selección de forma predeterminada, y también se puede seleccionar un conjunto de referencia de los 27 alelos más frecuentes de HLA (97% de la población mundial) y longitudes de péptidos de 9 y 10 aa.⁴⁸

El recurso de la base de datos IEDB contiene datos vinculantes para 173 moléculas MHC de clase I, que incluyen 119 alelos humanos para HLA-A, B y C. También tiene datos para macacos, chimpancés, ratones, vacas, cerdos y ratas. Los métodos de aprendizaje automático se vuelven a capacitar periódicamente cuando hay suficiente cantidad de datos nuevos disponibles en el IEDB.⁶¹

9.4.3 Predicciones vinculantes de HLA clase II

La vía de procesamiento de antígenos del MHC de clase II se aplica a proteínas exógenas es decir de fuentes extracelulares, como bacterias u hongos, que son fagocitados por la célula y escindidas por proteasas en el lisosoma. Las moléculas de MHC de clase II es un heterodímero que se sintetiza como proteína de exportación en ribosomas asociados al ER. Estas moléculas tienen una cadena alfa y una beta, que se ensamblan para formar una

molécula completa de MHC de clase II en el ER. Después de una serie de eventos complejos de procesamiento celular, el MHC de clase II es exportado en vacuolas exocíticas que se fusionan con endosomas que contienen péptidos exógenos procesados. Posteriormente moléculas de histocompatibilidad no clásicas participan en la unión del péptido a la molécula HLA clase II finalmente el complejo péptido HLA clase II se incorpora a la membrana celular para el escrutinio por las células T.^{17, 61}

La estructura y los principios básicos para la predicción vinculante de clase I y clase II tienen muchas cosas en común, pero también existen algunas diferencias importantes (Tabla 14). Con respecto a la estructura, las moléculas de MHC de clase I tienen una sola cadena alfa, que impacta en la unión y la hendidura de unión se encuentra entre los dominios alfa 1 y alfa 2. Debido a que el surco de unión está cerrado, sólo puede acomodar péptidos más cortos (8 a 14 aminoácidos). Las moléculas de MHC de clase II, sin embargo, tienen dos cadenas, alfa y beta, que impactan la unión. El surco de unión está abierto y puede acomodar péptidos más largos (13 a 25 aminoácidos). Las moléculas de MHC de clase I están presentes en todas las células nucleadas. Las moléculas de clase II se encuentran sólo en células presentadoras de antígenos, como macrófagos, células B o células dendríticas.^{5,65}

Tabla 14 Comparación de las herramientas de predicción de epítomos de clase I y clase II de MHC disponibles en IEDB^{14,17}

Características	MHC de clase I	MHC de clase II
Estructura	1 cadenas alfa y 1 beta-2 microglobulina	1 cadena alfa, 1 cadena beta
Péptido se une a la cadena	Alfa, dominios alfa 1 y alfa 2	Alfa y Beta
Hendidura de unión	Cerrada	Abierta
Loci	A, B y C	DP, DQ y DR
Presentación de células antigénicas	Todas las células nucleadas	Células dendríticas, macrófagos y células B
Linfocitos que responden	T citotóxicos (TCD8 ⁺)	Células T helper (CD4 ⁺)
Núcleo de unión (core # aa)	9	9
Residuos que flanquean el núcleo de unión	NA	0-5 en cada lado
Punto de corte recomendado (rango percentil de consenso de la IEDB)	1	10.0
Longitud del péptido	8-14	15
Algoritmo	8 (Consensus, NetMHCpan, artificial neural network, SMMPMBEC, SMM, Comblib, PickPocket and NetMHCcons)	6 (Consensus, NetMHCIIpan, NN-align, SMM-align, Combinatorial library, Sturniolo)
Especies hospedadoras para las que se dispone de predicción	8 (humano, ratón, gorila, chimpancé, macaco, cerdo, y rata)	2 (humano y ratón)
Número total de alelos disponibles	3600	DPA = 17, DPB = 128, DQA = 28, DQB = 104, DR = 256

9.4.4 Incorporación de datos de elución en la predicción de epítomos

Los avances técnicos recientes en la EM han llevado a una mayor disponibilidad de conjuntos de datos a gran escala de péptidos identificados como procesados naturalmente y presentados por moléculas MHC. Estos datos ahora proporcionan una valiosa fuente complementaria de datos en paralelo a los ensayos de unión que se pueden utilizar para mejorar la predicción de ligandos del MHC, ya que proporcionan una evaluación imparcial de los péptidos que se encuentran en la superficie celular. Por lo tanto, pueden brindar información sobre las distribuciones de longitud natural de los péptidos presentados, que se ven afectadas por procesos distintos de la preferencia de unión al MHC, como la escisión proteasomal, el transporte TAP y el recorte ERAP. Los datos de elución también pueden

revelar motivos de unión a péptidos no convencionales. Nosotros y otros pudimos demostrar posteriormente que estos motivos no convencionales corresponden a configuraciones de unión raras con el péptido que sobresale del surco de unión entre los anclajes o siendo N-terminal o C-terminal se extendió más allá de la posición de anclaje.⁵⁰

Las ventajas de los datos de elución vienen con la desventaja fundamental de que la detección de péptidos por los métodos actuales es, en el mejor de los casos, semicuantitativa y fuertemente afectada por factores como la expresión de proteínas intracelulares y los niveles de recambio. Por el contrario, los ensayos de unión a MHC proporcionan afinidades cuantitativas de péptidos definidos. Recientemente, desarrollamos una topología de red neuronal artificial novedosa que permite el entrenamiento de una sola red neuronal tanto en datos de unión como de elución de ligandos para moléculas MHC de clase I simultáneamente, aprendiendo así los puntos en común y las diferencias de los dos tipos de datos e impulsando el rendimiento predictivo general para la identificación de epítomos y ligandos MHC.⁴⁸

9.4.5 Predicciones de inmunogenicidad más allá de la unión y presentación del ligando MHC

En una comparación sistemática de péptidos inmunogénicos conocidos por desencadenar respuestas de células T con péptidos de afinidad MHC coincidentes que no lo hicieron, encontramos un enriquecimiento de ciertos aminoácidos, como los triptófanos, en los péptidos inmunogénicos. Este enriquecimiento presumiblemente refleja que ciertas cadenas laterales de aminoácidos tienen una mayor probabilidad de ser reconocidas por los receptores de células T como no propias. Incorporamos esto en una herramienta de predicción que proporciona una puntuación, independiente de la capacidad de unión del MHC, sobre la probabilidad de que un péptido sea inmunogénico, que ahora forma parte del conjunto de herramientas de IEDB. Recientemente hemos ampliado esta estrategia

utilizando enfoques de aprendizaje automático más complejos (como las redes neuronales), y extendiendo los mismos enfoques al reconocimiento de células T restringidas por MHC de clase II.⁴⁸

10. GISAID

GISAID ((Global Initiative on Sharing All Influenza Data)) es una iniciativa mundial para compartir todos los datos sobre la influenza derivó en una base de datos destinada a ser un repositorio únicamente sobre la influenza. Inicialmente estimulado por la amenaza global que representan las infecciones humanas con el virus de la influenza aviar altamente letal (H5N1). Por lo que GISAID introdujo un nuevo mecanismo para incentivar y promover el intercambio internacional de datos sobre el virus de la influenza. La innovación fundamental de GISAID consiste en brindar el acceso a los datos a través de un acuerdo de acceso de datos único que extiende una serie de "protecciones" y garantías clave a los que depositan información en la plataforma. Para acceder a GISAID, los usuarios se identifican para acceder y poder consultar datos. Con esto, los usuarios estarían de acuerdo en dar créditos en sus publicaciones a los que aportaron la información utilizada. Por lo que el uso de los datos de la plataforma debe ceñirse a los dispuestos por GISAID y así poder incentivar activamente a científicos y gobiernos de todo el mundo para compartir datos sobre el virus de la influenza de manera oportuna.^{12,57}

Una publicación reciente consideró si el "cambio de paradigma" en el intercambio de datos por GISAID podría aplicarse de manera más general para ayudar en la preparación y respuesta a otras amenazas infecciosas emergentes, como las planteadas por el virus del Ébola y el virus Zika. Un sistema tan confiable podría complementar y aprovechar al máximo los últimos avances en la secuenciación rápida de muestras en el laboratorio y en el campo, para la investigación de brotes.^{12, 57}

Los genomas y los datos se suben a esta web por investigadores de cualquier país. Para cada genoma se incluye, además de la secuencia génica, otros datos clínicos y epidemiológicos de la muestra. GISAID provee el acceso abierto gratuito a los datos de este repositorio que incluyen el nombre científico del virus, el pase de cultivo en el que se secuenció (ya que pueden acumular mutaciones cuando se somete a crecimiento en cultivo celular), la fecha de la toma de la muestra, el lugar geográfico y físico de obtención de la muestra (elementos biológicos, entornos naturales como una cueva, etc.), la especie hospedadora (humana o animal), en el caso de la especie humana el género, edad, y estado clínico del individuo (hospitalizado, vivo, fallecido), el tipo de muestra de la que se aisló (frotis nasofaríngeo, esputo, lavado traqueobronquial, orina, heces, etc.) y datos del brote. Además, se incluyen datos técnicos sobre los modelos de los equipos utilizados en la secuenciación, la depth of coverage, es decir el número de veces que una determinada posición nucleotídica es secuenciada, y por tanto permite un ligero filtro por alta o baja cobertura. A finales del 2021 con la emergencia del Virus SARS-CoV-2, las instancias encargadas de la identificación del virus en China dieron a conocer al mundo esta nueva amenaza, a través del Repositorio GISAID, desde entonces GISAID se volvió referente para todo lo relacionado con el virus y sus variantes.^{12,57}

10.1 Nomenclaturas utilizadas en GISAD

10.1.1 Clado

La plataforma GISAID agrupa las variantes virales de SARS-CoV-2 en clados, esta nomenclatura está dada con base en grupos génicos, los cuales se caracterizan por mutaciones específicas, características de cada clado, que consideran cambio de nucleótido, inserción o un evento de recombinación.^{12,20,81}

Tabla 15 Principales clados definidos por GISAID para SARS-CoV-2^{81,83}

Clado	Mutaciones presentes
S	L84S en la proteína NS8.
V	G251V en la proteína NS3.
G	D614G en la proteína S.
GH	D614 en la proteína S y además tiene la mutación Q57H en la proteína NS3.
GR	D614 en la proteína S y además tiene la mutación G204R en la proteína de la nucleocápside del virus.

10.2 Linaje

El progreso en las tecnologías de secuenciación del genoma ha dado como resultado un número excepcionalmente alto de genomas del SARS-CoV-2 secuenciado durante la pandemia de la COVID-19 de 2019-2020.

Las secuencias del genoma se han hecho accesibles al público a través de varios repositorios, incluido GISAID (<https://www.gisaid.org/>). Además de los repositorios de genoma público, también están disponibles plataformas de código abierto para la visualización de datos en tiempo real y el análisis de datos genómicos, incluidos NextStrain (<https://nextstrain.org>) y CoV-GLUE (<http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk>). NextStrain se alimenta con secuencias del repositorio GISAID y utiliza el kit de herramientas de bioinformática Augur (<https://github.com/nextstrain/augur>) para rastrear la evolución molecular y el software Auspice (<https://nextstrain.github.io/auspice/>) para visualización interactiva de datos filogenómicos. Se pueden reportar nuevas secuencias del genoma del SARS-CoV-2 en la plataforma para identificar mutaciones nuevas o conocidas, asignarlas a linajes potenciales y visualizarlas en un contexto filogenético, la designación del linaje está construida por un prefijo alfanumérico y un sufijo numérico.^{12,83}

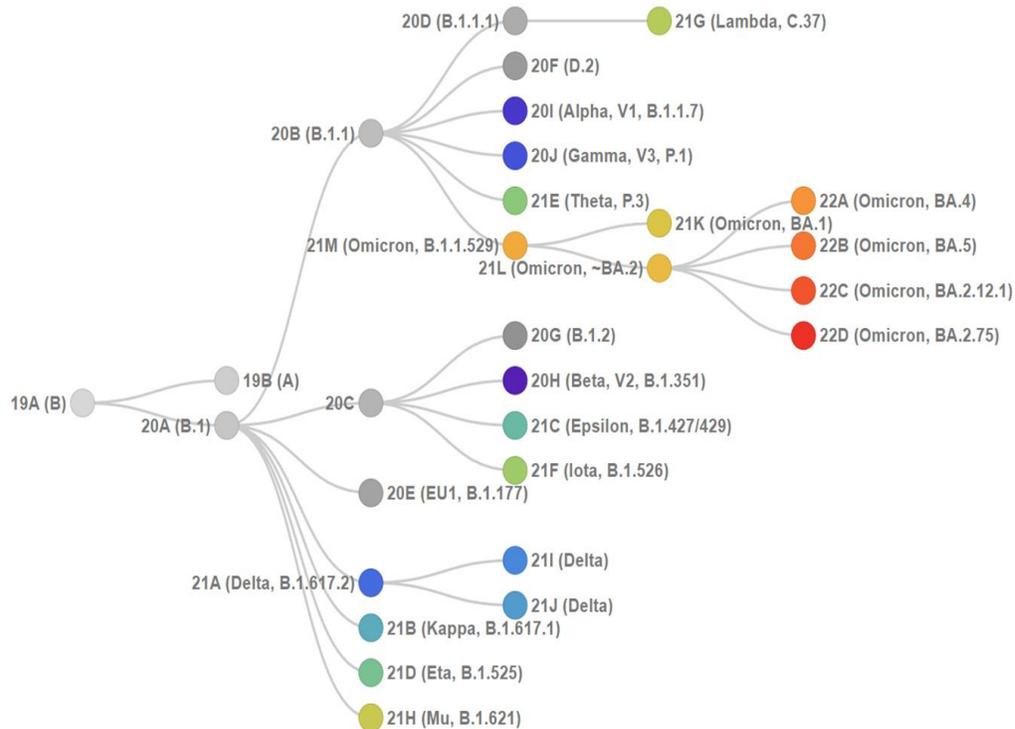


Figura 25. Principales variantes de circulación. Los clados 19A y 19B son linajes ancestrales que surgieron en Wuhan. El clado 20A surgió del 19A y fue dominante durante el brote europeo en marzo de 2020. Los clados 20B y 20C son grandes subclados genéticamente distintos del 20A que surgió a principios de 2020. Los clados del 20D al 20J surgieron durante el verano de 2020 e incluyen tres variantes de preocupación (VOC) [9]: Alfa (linaje B.1.1.7), Beta (linaje B.1.351), Gamma (linaje P.1). Los clados del 21A al 21J incluyen VoC Delta y varias variantes de interés (Vol): Lambda (linaje C.37), Mu (linaje B.1.621), Epsilon (linajes B.1.429) y algunos otros. Clados 21K (BA.1) y 21L (BA.2) Los sublinajes Omicron surgieron de la cepa 21M de Sudáfrica (linaje B.1.1.529); los clados 22A, 22B y 22C son los sublinajes que circulan actualmente de 21L Omicron. Generado por Nextstrain ⁸³

Con base en el conocimiento arriba descrito, nos propusimos realizar la siguiente investigación, la cual se basa en la búsqueda de péptidos potenciales para diagnóstico del virus SARS-CoV-2 mediante estrategias de bioinformática con enfoque a población mexicana.

11. JUSTIFICACIÓN

La reciente pandemia por la COVID-19 se extendió rápidamente en todo el mundo, por lo que es fundamental poder contar con una prueba diagnóstica eficaz que no pierda rápidamente su eficiencia debido a la variabilidad del virus. En este trabajo se propone una prueba diagnóstica a base de péptidos predichos *in silico* susceptible de generarse de manera natural, a partir de distintas proteínas del virus, para una oportuna detección de individuos infectados asintomáticos y/o sintomáticos.

12. HIPÓTESIS

Si las plataformas informáticas permiten predecir péptidos que forman complejos con los alelos del MHC más frecuentes en la población mexicana y con un buen puntaje de inmunogenicidad, entonces, es posible identificar aquellos con mayor capacidad inmunogénica y cobertura de población, para que formen parte de una prueba diagnóstica eficiente y permita el diagnóstico de individuos asintomáticos y presintomáticos.

13. OBJETIVOS

13.1 Objetivo general

Buscar y evaluar por estrategias bioinformáticas, el uso potencial de péptidos del SARS CoV-2 para ser utilizados en una posible prueba diagnóstica.

13.2 Objetivos particulares

- Obtener las secuencias de las variantes virales del SARS-Cov-2 que circularon en México hasta el 13 de mayo 2021
- Identificar las regiones de aminoácidos para las proteínas estructurales S, E, N, M y Nsp12_P323L de las variantes del virus SARS-CoV-2 que circularon hasta 13 de mayo 2021.

- Identificar los alelos de MHC más frecuentes en la población mexicana (amerindios y mestizos)
- Obtener los péptidos a partir de las proteínas S, N, E y M de SARS-CoV-2
- Determinar, las capacidades inmunogénicas y antigénicas de los péptidos seleccionados, mediante la predicción de su capacidad para formar complejos péptidos MHC, con alelos clase I y clase II de mayor frecuencia en la población mexicana
- Determinar, la capacidad inmunogénica de los péptidos antigénicos seleccionados, mediante la predicción de su capacidad para formar complejos péptidos MHC, con base en los alelos HLA I y HLA II de mayor frecuencia en mexicanos, mediante la base de datos IEDB.
- Determinar la cobertura de población la cual calcula la fracción de individuos que se predice responderán a un conjunto de inmunógenos con restricción por MHC.

14 METODOLOGÍA

14.1 Análisis de secuencia génicas de SARS-CoV-2

El 9 de mayo de 2021 se descargaron un total de 634 secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID (<https://www.gisaid.org/CoV2020/>). Se excluyeron las secuencias que solo secuenciaron el ORF (86 secuencias).

En las 7034 secuencias se buscaron las mutaciones más frecuentes (opción “Substitutions”) y posteriormente seleccionando secuencias de 10 en 10, se analizaron (opción “Analysis”) y se compararon con la cepa de referencia (opción “COVServer” y “Please choose the reference strain to compare with”). Por medio de la herramienta Nextrain se generó un árbol filogenético con las 7034 secuencias.

14.2 Identificación de alelos de HLA de mayor frecuencia en la población mexicana

Por medio de la plataforma Allele frequencies (<http://www.allelefrequencys.net/>)⁸⁵, se obtuvieron los alelos del HLA más frecuentes en la población mexicana, (Rstudio), así como la frecuencia relativa de cada HLA. Los resultados se compararon con diversos estudios ^{5,6}.

Se seleccionaron los HLA con una resolución de al menos 4 dígitos, por ejemplo, A*02:01.

14.3 Predicción de epítomos para células T

Para la elección de epítomos para células T CD8⁺ se llevó a cabo predicción de la unión de péptidos a moléculas de MHC de clase I, así como la predicción combinada de escisión proteasomal/transporte por el TAP/unión a MHC de clase I (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>)⁴⁸

Brevemente, se especificó la secuencia a analizar con todos los parámetros establecidos por defecto y se seleccionaron los HLA más frecuentes en la población mexicana. El umbral para péptidos de unión fuerte (IC50) se estableció en 50 nM para determinar los potenciales de unión e interacción del péptido/epítipo para células T CD8⁺ y el alelo de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La puntuación total generada por la herramienta es una puntuación combinada de proteasoma, complejo principal de histocompatibilidad (MHC), TAP (interacción N-terminal), definida como puntuaciones de análisis de procesamiento.

Para la predicción del epítipo para células T CD8⁺, seleccionamos los 10 alelos HLA clase I más frecuentes en la población mexicana. Los alelos específicos incluidos fueron: A*02:01, A*24:02, A*68:01, B*35:01, B*39:05, B*40:02, B*51:01, B*44:03, B*07:02, B*15:01.^{61,79,65}

Las secuencias de la proteína SARS-CoV-2 se ejecutaron contra este conjunto de alelos, utilizando el algoritmo recomendado por IEDB y un tamaño de 9 aminoácidos, se redujeron a una sola ocurrencia.

Los epítipos para linfocitos T cooperadores se examinaron utilizando la herramienta IEDB “MHC-II Binding Predictions” (<http://tools.iedb.org/mhcii/>)^{86,88}. La herramienta generó el rango percentil medio para cada epítipo por el método recomendado por IEDB y un tamaño de 15 aminoácidos. Para la predicción del epítipo para células T CD4⁺, aplicamos un algoritmo para predecir epítipos dominantes de HLA clase II, utilizando un percentil de consenso medio de corte de predicción 20% como se recomienda en IEDB.

Para la predicción del epítipo para células T CD4⁺, seleccionamos los 10 alelos HLA clase II más frecuentes en la población mexicana. Los alelos específicos incluidos fueron: DRB1*01:01, DRB1*04:04, DRB1*04:07, DRB1*07:01, DRB1*08:02, DRB1*11:01, DRB1*14:02, DRB1*14:06, DRB1*15:01, DRB1*16:02.^{38,61}

14.4 Inmunogenicidad

Los epítomos predichos para MHC de clase I fueron analizados por la herramienta Class I Immunogenicity (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>). Se especificó la secuencia que se desea escanear con todos los parámetros establecidos por defecto.

Los epítomos predichos para MHC de clase II fueron analizados con la herramienta / [CD4 T cell immunogenicity prediction](http://tools.iedb.org/CD4episcore/) (<http://tools.iedb.org/CD4episcore/>)^{86,87,88,89}. Se especificó la secuencia que se desea escanear con todos los parámetros establecidos por defecto, se seleccionó ordenar los péptidos por la posición en la proteína y se seleccionó el umbral de corte combinado máximo de 50.

14.5 Antigenicidad

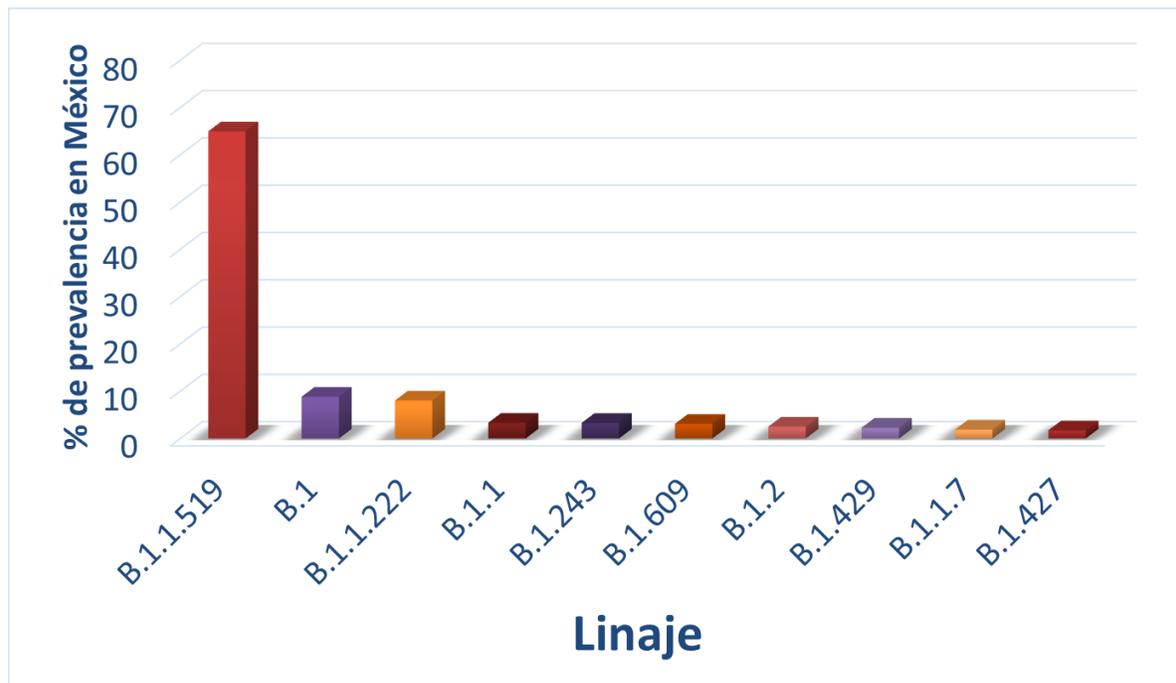
Los epítomos predichos fueron analizados por el servidor en línea Vaxijen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJ/VaxiJ.html>) para la predicción de antigenicidad utilizando un valor de corte > 0.4 .^{6,76}

14.6 Cobertura de población

La cobertura de población para epítomos de células T se calculó mediante la herramienta proporcionada por IEDB (<http://tools.iedb.org/population>)⁸⁶, en esta herramienta se ingresaron el conjunto de epítomos con las mejores características de IC50, Inmunogenicidad y antigenicidad con los alelos de HLA más frecuentes en la población mexicana por separado es decir los alelos HLA de clase I y posteriormente los de clase II. Además, se realizó el cálculo ingresando en conjunto HLA de clase I y II.

15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente, la Covid-19 es la principal enfermedad de preocupación de salud pública en el mundo, cuyo agente etiológico es el SARS-CoV-2, que es un virus envuelto, de RNA de polaridad positiva. En general los virus de RNA tienen una tasa alta de mutaciones que se generan durante la replicación de su genoma, debido a que carecen de enzimas que corrigen errores durante la replicación. Sin embargo, la proteína nsp14 del SARS-CoV-2 posee actividad de exonucleasa lo que permite que la mayoría de los errores que se generan se corrijan, por lo que la tasa de mutaciones en SARS-CoV-2 es menor a la de otros virus de RNA. No obstante, existe una considerable ocurrencia de mutaciones que dan lugar a los distintos clados, Figura 20. Por lo que identificamos los clados de SARS-CoV-2 que circularon en México entre el 28 de febrero del 2020 al 13 de mayo del 2021 (Tabla 16). Las secuencias se obtuvieron utilizando la plataforma GISAID y a partir de Nextstrain se obtuvo el árbol filogenético.



Gráfica 1. Linajes presentes en México hasta el 9 de mayo del 2021. El 63% corresponde al linaje B.1.1.519 y el 9% al linaje B.1.

Al contrastar los clados con los linajes virales que circularon en México pudimos encontrar que los linajes más frecuentes fueron B.1.1.519 y B.1 que corresponden a los clados GR y GH respectivamente. (Gráfica 1 y 2).

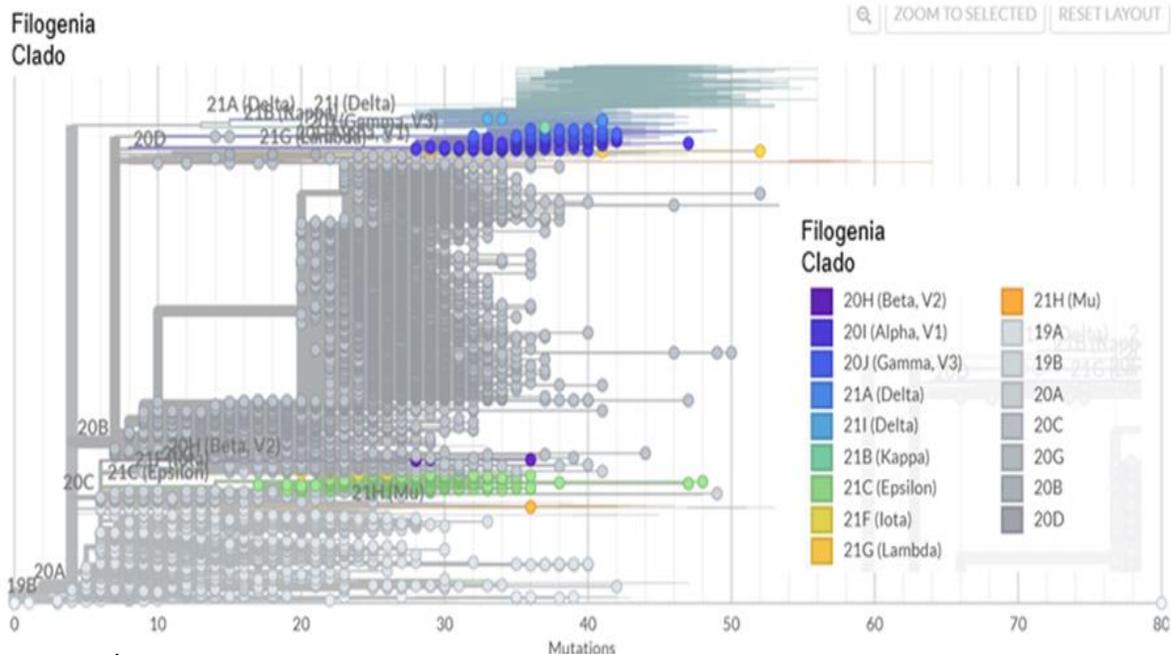
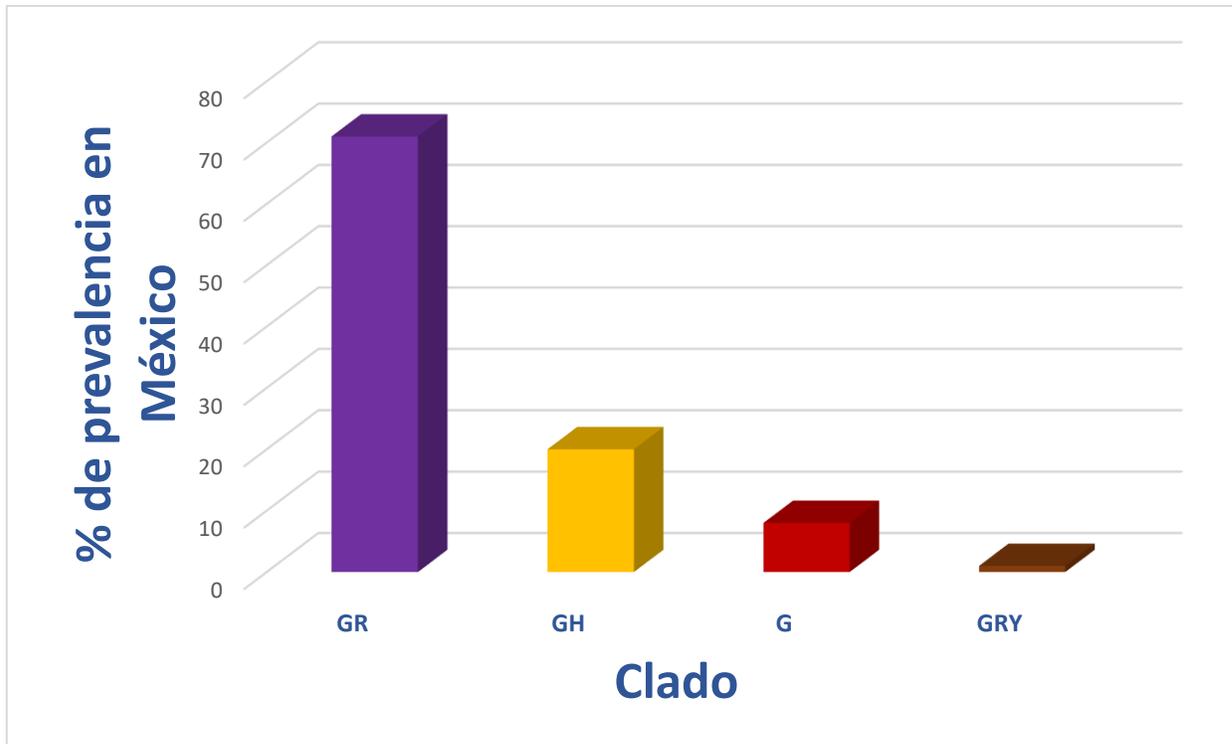


Figura 26. Árbol filogenético de SARS-CoV-2. El árbol filogenético muestra las 7034 secuencias descritas hasta el 13 de mayo del 2021.

Tabla 16. Distribución de Clados en México

Clado	N. de casos
G	1378
GH	577
GR	4939
GRY	104
GV	6
L	2
S	25
GK	2
Total, de casos	7034

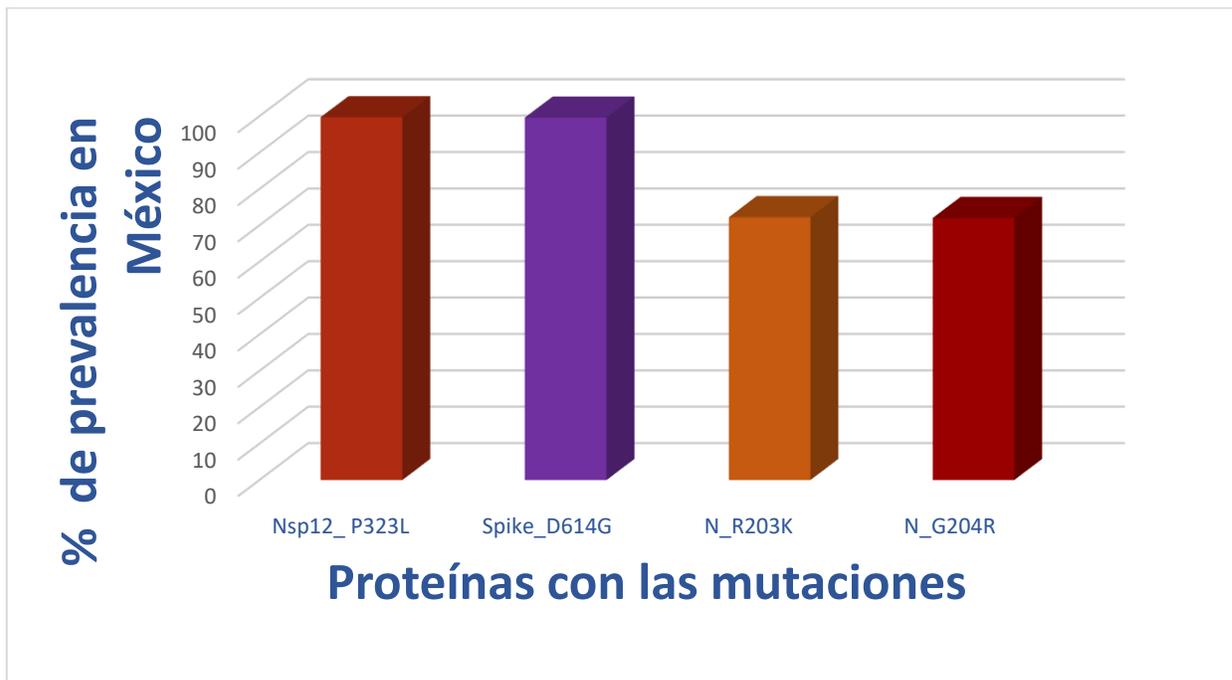
*Total de casos desde el 28 de febrero de 2020 al 9 de mayo de 2021



Gráfica 2. Distribución de clados presentes en México hasta el 9 de mayo del 2021. El 71% corresponde al clado GR y el 20% corresponde al clado G, desde el 28 de febrero de 2020 al 9 de mayo de 2021.

Las presiones selectivas introducen mutaciones en el genoma viral lo que promueve la diversidad génica de SARS-CoV-2, y la generación de los distintos clados lo que le permite al virus la evasión de la respuesta inmunitaria. Mediante las secuencias reportadas de los diferentes clados circulantes de SARS CoV-2 en la base de datos de GISAID, pudimos identificar y clasificar los de mayor prevalencia en nuestro país. Siendo los más frecuentes en la población mexicana, el clado GR con 4939 casos, el clado G con 1378 casos, el clado GH con 577 casos y el clado GRY con 104 casos, estos clados comparten la mutación en la proteína S (D614G), una sustitución del ácido aspártico (D) por glicina (G), esta mutación se relaciona con disminución en el tiempo de incubación de la enfermedad a 3 días en comparación con los casos del brote inicial en China que era de 5-14 días²⁴. Es importante mencionar que el número de casos reportados en GISAID para México no corresponden al número total de casos que ocurrieron en el país, ya que no se realiza la secuenciación de todas las muestras positivas. Se han identificado la segregación conjunta de cambios en

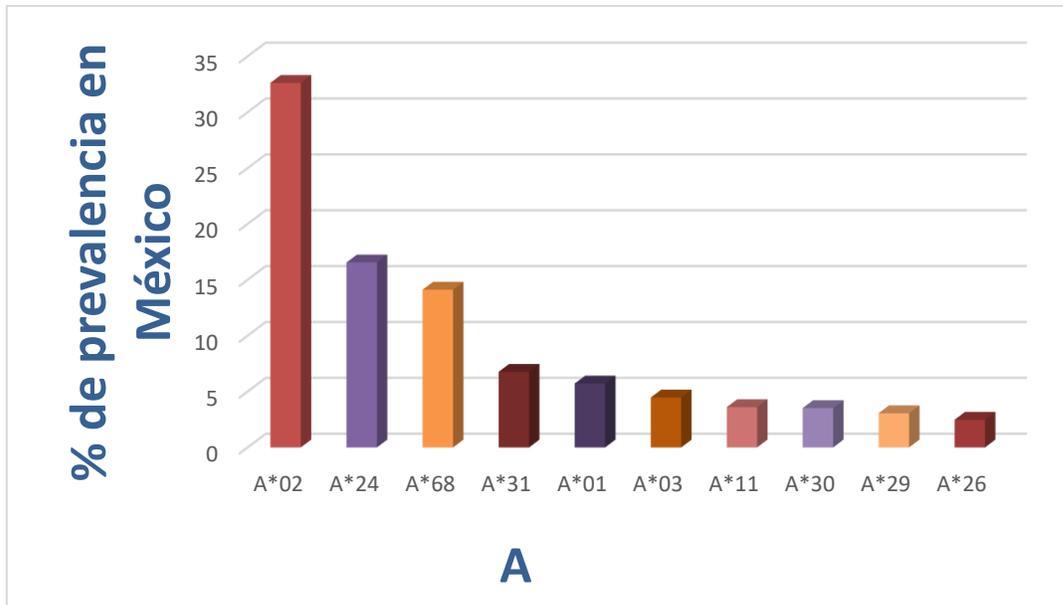
otros genes virales junto con la mutación D614G en la proteína S, como la mutación P323L en la polimerasa viral (Nps 12) que puede favorecer la replicación al alterar las interacciones con el proteoma de la célula hospedera y, por lo tanto, facilitar la replicación del virus, la proteína Nps12_P323L puede alterar la composición del complejo de replicación al modificar las interacciones moleculares (Grafica 3). La unión de la proteína S G614 a ACE2 a través del dominio de unión al receptor (RBD) en el dominio S1 de la proteína S, está asociada a una mayor transmisibilidad e infectividad del virus en comparación con el SARS-CoV, por lo que SARS-CoV-2 es más infeccioso y su afinidad por la unión a ACE2 es de 10 a 20 veces mayor que la de SARS-CoV^{24,65}. La mutación D614G puede mejorar la eficiencia de escisión de S1/S2 al aumentar la interacción entre la proteína S y la furina proteasa, lo que mejora la entrada viral en la célula hospedera dando como resultado una mayor infectividad. La mutación D614G reduce la eliminación de S1. Se ha observado la asociación intermolecular más fuerte de S1 con S2, lo que conduce a una disminución del desprendimiento de S1.^{24,65}



Gráfica 3. Mutaciones más frecuentes de SARS-CoV-2 en México desde el 28 de febrero de 2020 hasta el 9 de mayo de 2021

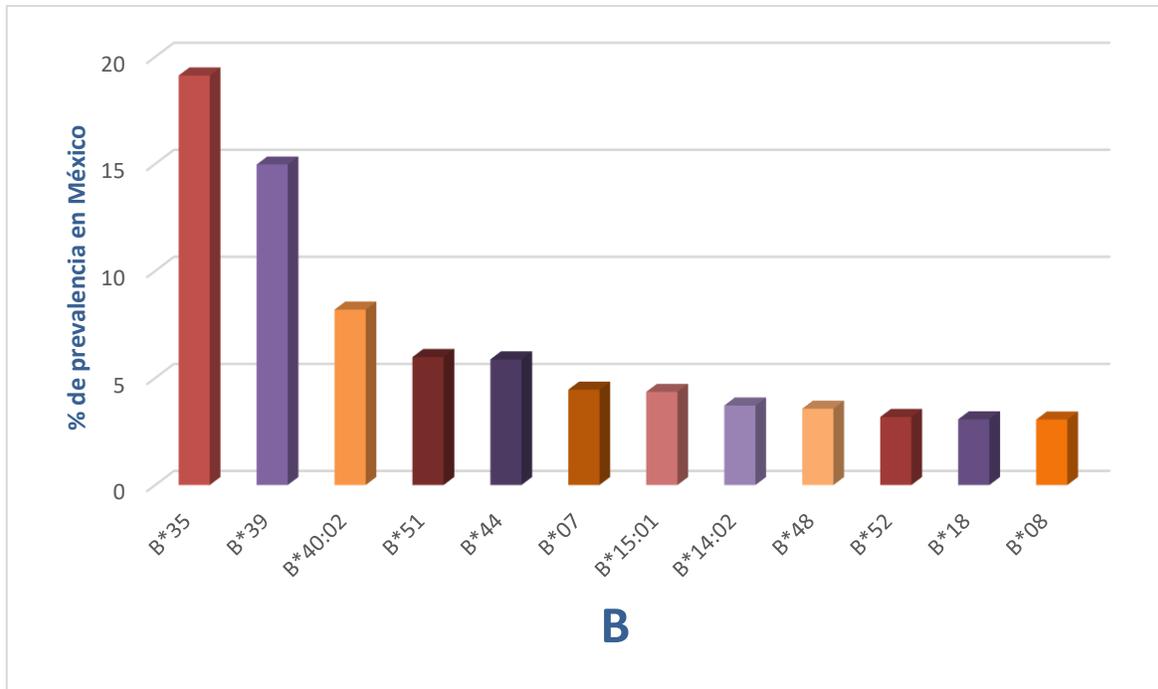
La población mexicana tiene una gran diversidad génica, resultado del mestizaje a partir de la conquista española y de eventos migratorios masivos que ocurren además en todo el mundo, por lo que, para el diseño de pruebas diagnósticas consideramos las frecuencias alélicas de los genes HLA más frecuentes en la población mexicana, ya que los alelos del HLA son componentes críticos de la vía de presentación del antígenos virales, confieren susceptibilidad viral y los genotipos HLA individuales pueden inducir diferencias en la respuesta antiviral mediada por células T y B. Por ende, la especificidad de los anticuerpos generados anti-SARS-CoV-2 en las personas infectadas, depende de la capacidad inmunogénica de los péptidos generados durante el procesamiento antigénico natural y de su capacidad de inducir complejos “péptido MHC” (pMHC).

Por lo que identificamos los alelos del MHC más frecuentes en la población mexicana y encontramos que los más frecuentes de clase I (Gráfica 3), son A*02 y A*24. Es importante resaltar, que se ha descrito en la literatura que el HLA-A*02:01 se asocia a un mayor riesgo de desarrollar la COVID-19, ya que mostró una capacidad menor para presentar antígenos del SARS-CoV-2 en comparación con otras moléculas HLA clase I, tal es el caso de las moléculas HLA-A*11:01 y HLA-A*24:02 que reportamos en esta tesis que están presentes en la población mexicana. Más aún, se ha reportado que estos 2 últimos alelos desencadenan respuestas antivirales mediadas por células T más eficientes contra el SARS-CoV-2.⁶² Ahora bien, los HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*31:01, HLA-A*68:01, HLA-B*18:01, HLA-B*35:01, HLA-B*38:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*51:01, son frecuentes en la población mexicana como podemos constatar en las tablas 3 y 4, al respecto de estos haplotipos, nuestros estudios *in silico* demuestran que los péptidos predichos que se asocian a estas moléculas de HLA confieren protección y tienen afinidad fuerte con estas moléculas, como lo veremos más adelante en los ensayos de generación de complejos pMHC.^{3,61}



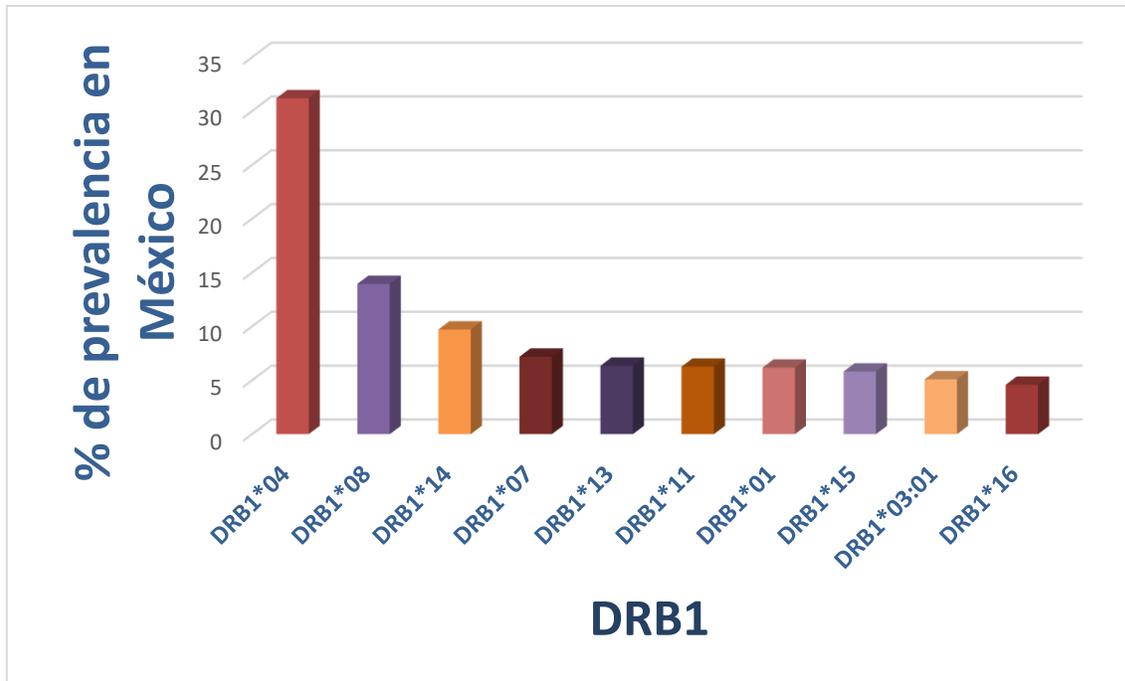
Grafica 4. Distribución de moléculas HLA de clase I locus A en la población mexicana. Los alelos de mayor frecuencia fueron A*02, A*24, A*68.

También se identificaron los alelos del MHC locus B más frecuentes en la población mexicana y encontramos que los más frecuentes de clase 1 (Gráfica 4), son B*35, B*39 y B*40:02. Es importante resaltar, que se ha descrito en la literatura que el HLA-B*35:01 se asocia a un menor riesgo de desarrollar la COVID-19 en forma grave, ya que mostró una capacidad elevada para presentar antígenos del SARS-CoV-2 en comparación con otras moléculas HLA clase I locus B ⁶¹ además es el alelo de mayor frecuencia con 19% de presencia en la población mexicana.



Gráfica 5. Distribución de moléculas HLA de clase I locus B en la población mexicana Los alelos de mayor frecuencia fueron B*35, B*39, B*40:02.

Otro aspecto fundamental fue el desarrollo de péptidos para alelos del HLA de clase II (Gráfica 5), ya que si bien la respuesta antiviral depende de mecanismos citotóxicos mediados por linfocitos T CD8⁺, la activación de células T CD4⁺ es fundamental en la inducción de la respuesta inmune en general, por lo que identificamos cuáles eran los alelos de clase II de mayor frecuencia en la población mexicana. Nuestro estudio arrojó que DRB1*04, DRB1*08 y DRB1*14 fueron los de mayor prevalencia en la población, al respecto se ha descrito que DRB*04 se asocia a mayor susceptibilidad de padecer la CoV-19, DRB1*08 y DRB1*1 presentan mayor probabilidad de susceptibilidad para padecer la COVID-19 grave.



Grafica 6. Distribución de HLA de clase II en la población mexicana. Los alelos más frecuentes BRB1*04, DRB1*08, DRB1*14

Para el diseño de los péptidos *in silico* se seleccionaron las proteínas S, N, E, M y la replicasa viral (NSP12_P323L) de SARS-CoV-2 mediante el uso plataformas bioinformáticas, (tabla 17y 18). Se trabajó con 300,000 péptidos. Las predicciones para epítomos de clase I de las proteínas fueron validadas por IEDB y por Vaxijen, y se encontraron 13 péptidos potenciales de la proteína S, 4 de la proteína E, 4 de la proteína M, un epítomo de la proteína N, así como, 17 posibles péptidos de la proteína NSP12_P323L. Estos péptidos cuentan con las mejores características de afinidad por las moléculas del HLA de mayor frecuencia en la población (afinidad menor a 50 nM), lo que indica fuerte unión e interacción del complejo péptido-HLA I con las células T CD8+. También, se evaluó el adecuado procesamiento natural de los péptidos mediante la herramienta de escisión proteasomal/transporte de TAP/MHC de clase I de IEDB, las puntuaciones más altas corresponden a los péptidos cuya predicción indica que pueden ser procesados naturalmente, consideramos que los valores \geq a .1 pueden ser procesados por las células. Se descartaron los péptidos con las puntuaciones más bajas, debido a que

estas puntuaciones indican un procesamiento ineficiente, no se procesan de forma natural y no representan epítomos naturales reconocidos por las células T CD8⁺. Los péptidos seleccionados se validaron por medio de la herramienta Immunogenicity (<http://tools.iedb.org/immunogenicity>), los valores más altos, indican una mayor probabilidad de inducir una respuesta inmune.

Los péptidos de mayor capacidad inmunogénica y antigénica predichos para moléculas de histocompatibilidad clase I fueron: de la proteínas S, los péptidos LPFNDGVYF y WPWYIWLGF estos se unen al HLA-B*35:01, el péptido de la proteína E, FLAFVVFL que se asocia a la molécula HLA-A*02:01, el péptido de la proteína N, SPRWYFYYL que interacciona con la molécula HLA-B*07:02, el de la proteína M, LVIGAVILR que es reconocido por HLA-A*68:01, los de la proteína NSP12_P323L, TSFGPLVRK; VVSTGYHFR que se unen al HLA-A*68:01. En la tabla 20 se muestran los péptidos predichos que sugerimos para el desarrollo de una prueba diagnóstica ya que cuentan con las características de inmunogenicidad y unión a moléculas del MHC más frecuentes en la población mexicana.

Tabla 17. Epítomos de las proteínas S D614G, E, N, M NSP12_P323L para MHC I de la población mexicana

Proteína	Alelo	Inicio	Fin	Péptido	Puntuación total	IC 50	Inmunogenicidad	Antigenicidad
S D614G	HLA-B*35:01	84	92	LPFNDGVYF	1.9	3.5	0.11767	0.5593
	HLA-A*02:01	133	141	FQFCNYPFL	1.25	5.1	0.03301	0.8139
	HLA-A*02:01	269	277	YLQPRTFLL	1.17	4.6	0.1305	0.4532
	HLA-A*68:01	258	266	WTAGAAAYY	1.11	23.5	0.15259	0.6306
	HLA-B*35:01	1272	1280	WPWYIWLGF	0.7	43.4	0.41673	1.4953
E	HLA-A*02:01	20	28	FLAFVVFL	1.05	6.5	0.30188	0.5308
	HLA-A*02:01	26	34	FLLVTLAIL	0.59	21.7	0.17608	0.9645
N	HLA-B*07:02	105	113	SPRWYFYFL	0.76	15.7	0.34101	0.734
M	HLA-A*68:01	138	146	LVIGAVILR	0.9	9.6	0.2601	1.1027
	HLA-B*35:01	37	45	FAYANRNRF	0.99	23.6	0.10537	0.7785
NSP12_ P323L	HLA-A*02:01	458	466	RQLLFVVEV	0.16	26.1	0.23144	0.816
	HLA-A*02:01	852	860	SLAIDAYPL	0.1	27.8	0.19545	0.7576
	HLA-B*35:01	850	858	FVSLAIDAY	1.64	9.2	0.1401	0.5865
	HLA-A*68:01	315	323	TSFGPLVRK	0.14	12.3	0.11594	1.7142
	HLA-A*68:01	332	340	VVSTGYHFR	0.72	13.4	0.11058	1.4741
	HLA-A*68:01	314	322	LTSFGPLVR	0.28	38.9	0.10142	0.9036

En la tabla se indica la proteína de la cual se obtuvo el péptido, el alelo de HLA con el que interacciona la proteína, el número de aminoácido en el que inicia el péptido, el número de aminoácido en el que termina el péptido, la secuencia de aminoácidos del péptido, la puntuación total del procesamiento natural del péptido, la IC50 que indica la afinidad por las moléculas de HLA y finalmente la inmunogenicidad y antigenicidad del péptido. En negritas se señalan los péptidos con las mejores características.

De manera similar se predijeron los epítomos de HLA de clase II (Tabla 18), considerando solo los epítomos que tuvieran un Rango ajustado menor a 1, un IC50 menor a 50 nM, también se evaluó el potencial inmunogénico de los epítomos para células T, evaluando su capacidad de inducir respuestas inmunitarias protectoras *in silico*, la "puntuación de inmunogenicidad" oscila entre 0 y 100, los valores más bajos indican que los péptidos son inmunogénicos y valores altos predicen péptidos no inmunogénicos (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>), se seleccionaron los péptidos con un valor de inmunogenicidad menor a 50 y un valor de antigenicidad > 0.4.

Los valores de antigenicidad (puntuaciones mayores a 0.4 Vaxijen) para los alelos de HLA de clase II se muestran en la Tabla 21. Los péptidos predichos en IEDB muestran un rango percentil alto ya que la plataforma indica que los epítomos para HLA clase II al ser procesados por la vía exógena, arrojan puntuaciones más altas que los del HLA de clase I. Los epítomos de mayor capacidad inmunogénica y antigénica provienen de la proteína M

que es la más abundante del virión, estos péptidos se unen a la molécula HLA-DRB1*11:01 y son los siguientes, FIASFRLFARTRSMW; IASFRLFARTRSWS; ASFRLFARTRSMWSF; las tres secuencias comparten el mismo núcleo (FRLFARTRS).

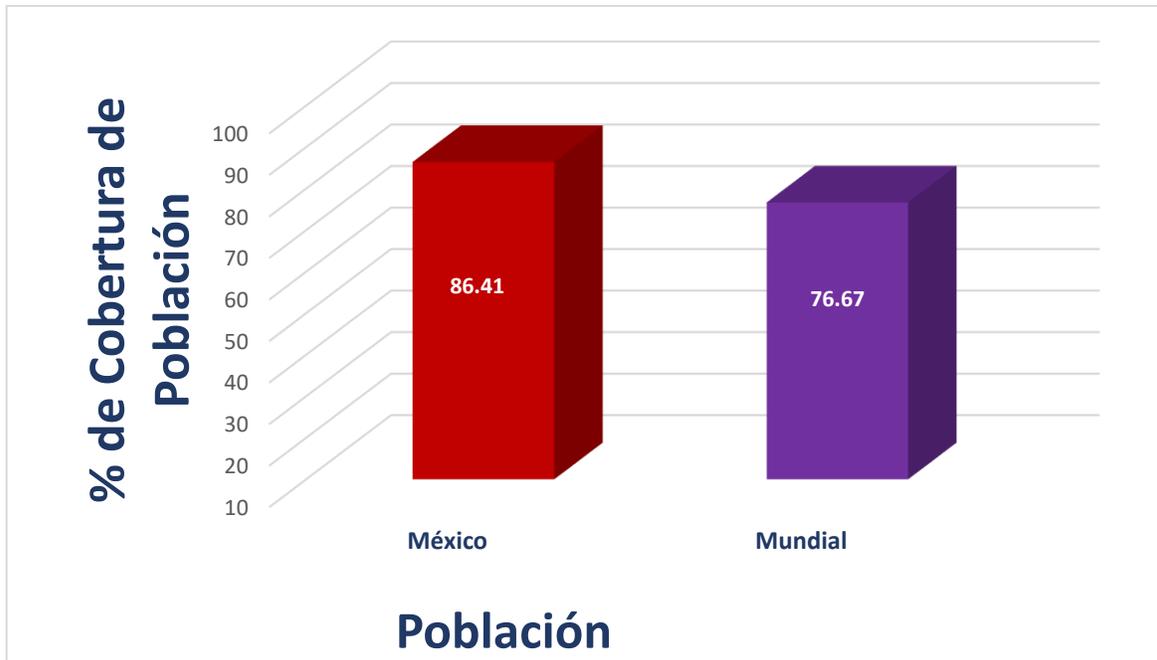
Debido a lo antes descrito consideramos que estos tres epítomos (FIASFRLFARTRSMW; IASFRLFARTRSWS; ASFRLFARTRSMWSF) reúnen las características necesarias de inmunogenicidad y unión a moléculas del MHC más frecuentes en la población mexicana, para ser considerados para el desarrollo de pruebas diagnósticas, ya que potencialmente el trabajo *in silico* permite predecir que pueden generarse de manera natural y serían capaces de inducir anticuerpos neutralizantes que pueden ser detectados por las pruebas diagnósticas a desarrollar.

Tabla 18. Epítomos de las proteínas S D614G, E, N, M NSP12_P323L para MHC II de la población mexicana

Proteína	Alelo	Inicio	Fin	Péptido	Rango ajustado	Core	IC 50	Inmunogenicidad	Antigenicidad
S D614G	HLA-DRB1*13:02	112	126	SKTQSLIVNNATNV	0.03	LIVNNATNV	5.05	76.5843	0.6256
	HLA-DRB1*13:02	114	128	TQSLIVNNATNVVI	0.01	IVNNATNVV	2.2	77.1074	0.4333
	HLA-DRB1*13:02	113	127	KTQSLIVNNATNVV	0.01	IVNNATNVV	2.25	77.351	0.6303
	HLA-DRB1*15:01	237	251	RFQTLALHRSYLT	0.84	LALHRSYLT/LLALHRSYL	31.6	79.0987	0.547
	HLA-DRB1*13:02	115	129	QSLIVNNATNVVIK	0.01	IVNNATNVV	2.2	81.2386	0.4343
	HLA-DRB1*16:02	55	69	FLPFFSNVTWFAIH	0.72	FFSNVTWFH	45.48	81.929	0.4883
HLA-DRB1*13:02	116	130	SLIVNNATNVVIK	0.01	IVNNATNVV	2.2	82.5027	0.4707	
E	HLA-DRB1*01:01	29	43	VTLAILTALRLCAYC	0.38	LAILTALRL	6	80.3355	0.8599
	HLA-DRB1*04:04	18	32	LLFLAFVVFLLVTLA	0.61	FLAFVVFLL	23	89.6735	0.8122
	HLA-DRB1*01:01	25	39	VFLVTLAILTALRL	0.38	LLVTLAILT/LAILTALRL	6	69.8411	0.7218
	HLA-DRB1*15:01	17	31	VLLFLAFVVFLLVTL	0.53	VLLFLAFV	21	85.5368	0.6386
	HLA-DRB1*01:01	26	40	FLLVTLAILTALRLC	0.38	LAILTALRL	6	76.2224	0.6311
HLA-DRB1*15:01	16	30	SVLLFLAFVVFLLVT	0.53	VLLFLAFV	22	84.5955	0.5446	
N	HLA-DRB1*11:01	84	98	IGYYRRATRIRGGD	0.42	YRRATRIR	8.25	60.8885	0.6649
	HLA-DRB1*11:01	83	97	QIGYYRRATRIRGG	0.39	YRRATRIR	7.75	60.0887	0.4614
M	HLA-DRB1*11:01	96	110	FIASFRLFARTRSMW	0.48	FRLFARTRS	10.05	46.8256	0.4072
	HLA-DRB1*11:01	97	111	IASFRLFARTRSMWS	0.48	FRLFARTRS	9.85	48.8113	0.4424
	HLA-DRB1*11:01	98	112	ASFRLFARTRSMWSF	0.48	FRLFARTRS	9.8	49.4611	0.7304
	HLA-DRB1*04:07	98	112	ASFRLFARTRSMWSF	0.79	FARTRSMWS	248.34	49.4611	0.7304
	HLA-DRB1*16:02	99	113	SFRLFARTRSMWSFN	0.5	FARTRSMWS	39.3	51.3443	0.7955
	HLA-DRB1*04:07	100	114	FRLFARTRSMWSFNP	0.8	FARTRSMWS	249.71	62.0303	0.8873
NSP12_P323L	HLA-DRB1*14:06	532	546	QMNLKYAISAKNRAR	0.39	LKYAISAKN	49.93	50.3235	1.5044
	HLA-DRB1*14:06	534	548	NLKYAISAKNRARTV	0.34	LKYAISAKN	48.41	53.7904	1.3422
	HLA-DRB1*14:06	621	635	LRIMASLVLRARKHT	0.18	LRIMASLVLR	39.79	62.7849	0.6646
	HLA-DRB1*15:01	620	634	MLRIMASLVLRARKHT	0.22	LRIMASLVLR	19.25	65.7207	0.5283
	HLA-DRB1*15:01	619	633	NMLRIMASLVLRARKH	0.01	LRIMASLVLR	9	68.0392	0.4897
	HLA-DRB1*15:01	618	632	PNMLRIMASLVLRARK	0.01	LRIMASLVLR	7.65	68.0484	0.4128
	HLA-DRB1*14:06	618	632	PNMLRIMASLVLRARK	0.1	IMASLVLR	35.17	68.0484	0.4128

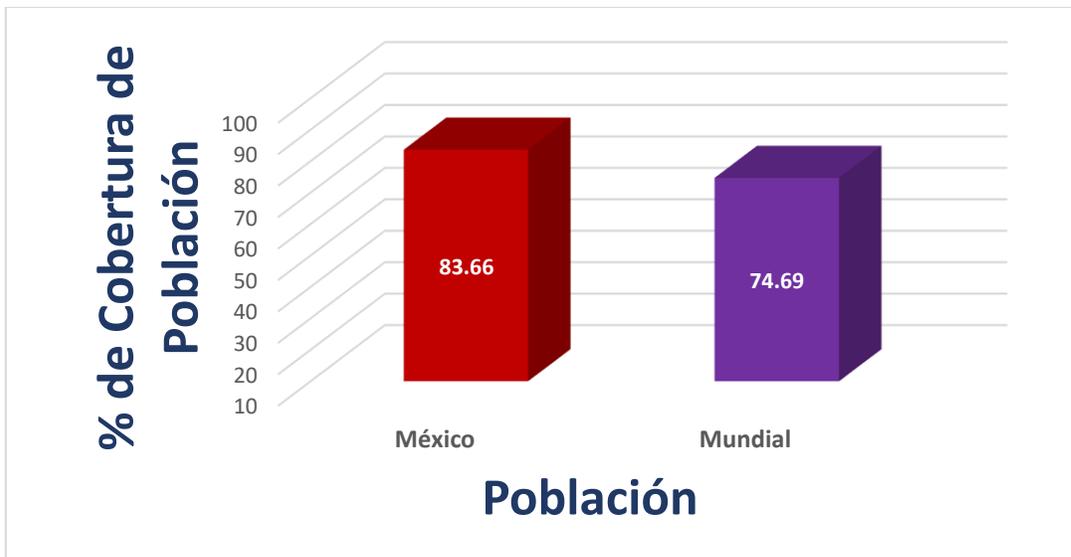
En la tabla se indica la proteína de la cual se obtuvo el péptido, el alelo de HLA con el que interacciona la proteína, el número de aminoácido en el que inicia el péptido, el número de aminoácido en el que termina el péptido, la secuencia de aminoácidos del péptido, el rango ajustado (menor a 1), el Core (indica los 9 aminoácidos), la IC50 que indica la afinidad por las moléculas de HLA y finalmente la inmunogenicidad y antigenicidad del péptido. En negritas se señalan los péptidos de mayor puntuación.

Ya que se busca que las pruebas diagnósticas diseñadas tengan el menor margen de resultados falsos negativos, se predijo la incidencia en la población de los complejos pMHC seleccionados. Para esto se determinó la cobertura de población, la cual estima el porcentaje de individuos dentro de una población (México o Mundial) en la que es probable que al menos un epítipo diseñado *in silico* pueda interaccionar con sus alelos de HLA clase I y II. Además, se consideró que los epítipos pudieran ser procesados por las células de manera natural, tomando en cuenta para la población mexicana los conjuntos de alelos del HLA más representativos de las poblaciones Amerindia y Mestiza, lo que representa la fracción de individuos que expresan al menos uno de un conjunto dado de alelos (Allele Frequency). Debido a que existe un desequilibrio de vinculación por las poblaciones que existen en México los datos del desequilibrio no están completos y representa un sesgo. Con base a lo anterior y analizando los distintos péptidos predichos para los alelos HLA de clase I y clase II de mayor frecuencia en la población mexicana, es deseable considerar al menos un péptido procedente de cada una de las proteínas estudiadas, para que formen parte de la prueba diagnóstica a considerar. Ya que, como se puede observar en los histogramas el 86.41% de la población mexicana reconocería al menos uno de los péptidos predichos, del conjunto de péptidos evaluados asociados a alelos del HLA clase I más frecuentes en la población, (Gráfica 6). En esta gráfica se compara el porcentaje de cobertura de población mexicana (86.41%) con la cobertura de la población mundial (76.67%) de los complejos pHLA con las mejores características que arroja nuestro estudio.



Gráfica 7. Cobertura de población de epítomos para HLA de clase I. La cobertura de población indica el porcentaje del conjunto de epítomos para células T de las proteínas S, N, M, E, NSP12_p323L de SARS-CoV-2 que interaccionan con los alelos de HLA de clase I más frecuentes en la población mexicana (86.41) y mundial (76.67%).

Para los epítomos de HLA de clase II se observó que cubren 83.66% de la población mexicana y el 76.69% de la población mundial (Gráfica 7). Al estudiar la cobertura de población combinada (clase I y II), se observó que tanto en la población mexicana como en la población mundial se cubre más del 90% en ambas poblaciones (Gráfica 8).



Gráfica 8. Cobertura de población de epítomos de HLA de clase II. Conjunto de epítomos de células T S, N, M, E, NSP12_p323L de SARS-CoV-2 para la cobertura de población mexicana (83.66) y mundial (74.69%).



Gráfica 9. Cobertura de población de epítomos de HLA de clase I y clase II. Conjunto de epítomos de células T S, N, M, E, NSP12_p323L de SARS-CoV-2 para la cobertura de población mexicana (97.78%) y mundial (94.09%).

La importancia de generar pruebas diagnósticas para la población mexicana radica en que se genere el menor número de casos falsos negativos, lo que impactaría en la vigilancia epidemiológica, ya que se contaría con datos de incidencia más cercanos a la realidad y los pacientes contarían con un diagnóstico oportuno en los primeros estadios de la enfermedad. Lo anterior permite instaurar el tratamiento lo antes posible para evitar más casos con la forma severa de la enfermedad y con esto tratar de disminuir la cantidad de decesos.

Con este trabajo se propone el desarrollo de una prueba diagnóstica (por ELISA) que detecte anticuerpos generados en el paciente (a partir del día 7) después del contagio. Consideramos que la prueba debe ser una combinación de los péptidos predichos en este estudio y deberán incluirse tanto los reconocidos por moléculas HLA clase I como por moléculas HLA clase II, con la finalidad de poder alcanzar aproximadamente el 97.78% de efectividad a nivel Nacional y del 94.09% a nivel mundial. Ahora bien, si la prueba detectara

antígenos proponemos que sea mediante el sistema de ELISA y los anticuerpos cargados en la prueba reconozcan los péptidos predichos en este trabajo.

Es importante mencionar que el desarrollo de estas pruebas debe realizarse siempre y cuando se hayan realizado la validación de los péptidos mediante experimentos *in vitro*, que validen su inmunogenicidad.

16. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 7034 secuencias genómicas del virus SARS-CoV-2 reportadas a partir de aislados virales de mexicanos en GISAID.
- A partir de las 7,034 secuencias, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las proteínas S, E, N, M, NSP_12 y se identificaron las mutaciones más frecuentes en GISAID.
 - Las mutaciones en proteínas estructurales predominantes en el país fueron SD614G, N R203K y N G204R. La mutación en proteínas no estructurales más frecuente en México fue la NSP12_P323L.
 - Se encontró que el clado viral más frecuente en el País, hasta el 10 de mayo del 2021, fue el clado G con 4,939 aislados reportados con estas mutaciones en GISAID.
 - El linaje predominante para el mismo periodo fue el B.1.1.516 presente en el 63% de las secuencias estudiadas.
 - Los alelos del HLA clase I más frecuentes en la población Amerindia y Mestiza mexicana fueron: A*02; A*24; A*68; B*35 y B*39, B*40:02.
 - Los alelos del HLA clase II más frecuentes en la población Amerindia y Mestiza mexicana fueron: BRB1*04, DRB1*08, DRB1*14.
 - Se predijeron más de 30,000 péptidos a partir de las proteínas propuestas por IEDB.

- A partir de los péptidos obtenidos se predijeron los péptidos inmunogénicos que interaccionan con las moléculas del sistema HLA de clase I y clase II más frecuentes en la población mexicana.
- De los péptidos predichos que interaccionan con las moléculas del sistema HLA más frecuentes en la población mexicana, se identificaron los péptidos LPFNDGVYF, WPWYIWLGF de la proteína S, FLAFVVLL de la proteína E, SPRWYFYLL de la proteína N, LVIGAVILR de la proteína M y los péptidos TSFGPLVRK, VVSTGYHFR de la proteína NSP_12P323L, como los de mayor inmunogenicidad y con la capacidad de interaccionar con las moléculas del sistema HLA de clase I más frecuentes.
- Las predicciones arrojaron a los péptidos FIASFRLFARTRSMW; IASFRLFARTRSWS; ASFRLFARTRSMWSF de la proteína M como los de mayor inmunogenicidad y con capacidad de interaccionar con las moléculas del sistema HLA de clase II más frecuentes.
- Se predijo que el 86.41 % de individuos de la población mexicana tiene la capacidad de reconocer inmunológicamente al menos uno de los péptidos asociados a alelos del HLA clase I identificados en este estudio, así como con el 76.67% de la población mundial.
- Se predijo que el 83.66 % de individuos de la población mexicana tiene la capacidad de reconocer inmunológicamente al menos uno de los péptidos asociados a alelos del HLA clase II identificados en este estudio, así como con el 74.6% de la población mundial.
- Se determinó que el porcentaje de cobertura de población aumenta al 97.78% para la población mexicana y al 94.09% en la población mundial, si se considera que el conjunto de péptidos interacciona tanto con moléculas clase I y II.

- Se propone la realización de dos tipos de pruebas diagnósticas teniendo como base una prueba de ELISA, una de ellas identificaría antígenos virales y los otros anticuerpos generados por los individuos; Las pruebas deberán desarrollarse a partir del conjunto de péptidos predichos que interaccionan con moléculas de clase I y II de los HLA descritos.

17. PERSPECTIVAS

- Validar *in vitro* los epítomos asociados a HLA de clase I y II
- Evaluar la producción de anticuerpos neutralizantes *in vivo* a partir del desafío con los péptidos predichos.
- Realizar la evaluación de los péptidos y anticuerpos neutralizantes por medio de ELISA.

18. REFERENCIAS

1. Abbott. Abbott launches Novel Coronavirus Test. Abbott 2020. <https://www.abbott.com/corpnewsroom/product-and-innovation/abbott-launches-novel-coronavirus-test.html>.
2. Arya, R., Kumari, Et al. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>
3. Augusto, D. G., & Hollenbach, J. A. (2022). HLA variation and antigen presentation in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection. *Current Opinion in Immunology*, 76, 102178. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102178>
4. Azkur, A. K., et al.(2020). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75(7), 1564–1581. <https://doi.org/10.1111/all.14364>
5. Bui, H. H., Sidney, J., Dinh, K., Southwood, S., Newman, M. J., & Sette, A. (2006). Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*, 7, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-153>
6. Can, H., Köseoğlu, A. E., Erkunt Alak, S., Güvendi, M., Döşkaya, M., Karakavuk, M., Gürüz, A. Y., & Ün, C. (2020). In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79645-9>
7. Chan, J.F.-W., et al., 2020a. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395 (10223), 514–523.
8. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., et al . (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
9. Chen, Y., & Li, L. (2020). SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 515–516. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30235-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30235-8)
10. Created with BioRender.com
11. Domingo, P., Mur, I., Pomar, V., Corominas, H., Casademont, J., & de Benito, N. (2020). The four horsemen of a viral Apocalypse: The pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102887>
12. Elbe, S., & Buckland-Merrett, G. (2017). Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1), 33–46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
13. Fara, A., Mitrev, Z., Rosalia, R. A., & Assas, B. M. (2020). Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! *Open Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.200160>
14. Fleri, W. (2017). The Immune Epitope Database: How Data Are Entered and Retrieved. *Journal of Immunology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5974574>
15. Gandhi, M., Yokoe, D. S., & Havlir, D. V. (2020). Asymptomatic Transmission, the Achilles' Heel of Current Strategies to Control Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 1–3. <https://doi.org/10.1056/nejme2009758>
16. García, L. F. (2020). Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 11(June), 4–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01441>
17. Grifoni, A., et al (2020). Theory A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2 Theory A Sequence

- Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002>
18. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem* 2020; 295: 12910-12934 [PMID: 32661197 DOI: 10.1074/jbc.REV120.013930]
 19. Hosseini, A., Hashemi, V., Shomali, N., Asghari, F., Gharibi, T., Akbari, M., Gholizadeh, S., & Jafari, A. (2020). Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132, 110859.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110859>
 20. <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>.
 21. Hu, B., Huang, S., & Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
 22. J. Dinnes, J.J. Deeks, A. Adriano, et al., Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection, *Cochrane Database Syst. Rev.* 8 (2020) CD013705, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013705>.
 23. Jackson, C. B., Farzan, M., & Chen, B. (n.d.). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x> (73)
 24. Jackson, C. B., Zhang, L., Farzan, M., & Choe, H. (2021). Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.026>
 25. Jacofsky, D., Jacofsky, E. M., & Jacofsky, M. (2020). Understanding Antibody Testing for COVID-19. *Journal of Arthroplasty*, 35(7), S74–S81.
<https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.04.055>
 26. Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, 61(3), 180–202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>
 27. Kindt Thomas J, Goldsby Richard A, O. B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. In Mc Graw Hill, 6(11), 951–952.
 28. Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85(June).
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
 29. Knoops, K., Kikkert, M., Van Den Worm, S. H. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Van Der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., & Snijder, E. J. (2008). SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, 6(9), 1957–1974. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>
 30. Lai, C. K. C., & Lam, W. (2021). Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 226–230.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.069>
 31. Li, F., 2016. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual review review of virology* 3, 237–261. *
 32. Li, G., Fan, Y., et al (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
 33. Li, Z., et al (2020). Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *Journal of Medical Virology*, (February). <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>

34. Llanes, A., Restrepo, C. M., Caballero, Z., Rajeev, S., Kennedy, M. A., Leonart, R. (2020). Betacoronavirus genomes: How genomic information has been used to deal with past outbreaks and the covid-19 pandemic. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms21124546>
35. Logue, J., et al (2019). Global Virology III: Virology in the 21st Century. *Global Virology III: Virology in the 21st Century*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29022-1>
36. Machhi, J., et al (2020). The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), 359–386. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>
37. Malik, Y. A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian Journal of Pathology*, 42(1), 3–11.
38. Martinez-liu, C., Mart, N., Arellanos-soto, D., Galan-huerta, K., Lozano-sepulveda, S., Mart, C., & Rivas-estilla, A. M. (2021). SARS-CoV-2 in Mexico : Beyond Detection Methods , Scope and Limitations. 1–13.
39. Martini, S., Nielsen, M., Peters, B., & Sette, A. (2020). The Immune Epitope Database and Analysis Resource Program 2003–2018: reflections and outlook. *Immunogenetics*, 72(1–2), 57–76. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01137-6>
40. Mertens, P., De Vos, N., Martiny, D., Jassoy, C., Mirazimi, A., Cuypers, L., Van (2020). Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Frontiers in Medicine*, 7(May). <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00225>
41. Murphy KP. *Janway's Immunobiology*. 8th. New York, NY: Taylor & Francis Group; 2012.
42. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28:e63
43. Ortiz-Prado, et al (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(1). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094>
44. Paces, J., Strizova, Z., Smrz, D., & Cerny, J. (2020). COVID-19 and the Immune System. 9973, 379–388.
45. Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R. C., Zella, D., & Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
46. Pavon Lenin, Jiménez Maria, Gracés M. (2016). *Molecular, Celular Y Traslacional*.
47. Perera RS, Ding XC, Tully F, Oliver J, Bright N, Bell D, et al. Development and clinical performance of high throughput loop-mediated isothermal amplification for detection of malaria. *PLoS One* 2017;12
48. Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., van Endert, P. M., & Holzhütter, H.-G. (2003). Identifying MHC Class I Epitopes by Predicting the TAP Transport Efficiency of Epitope Precursors. *The Journal of Immunology*, 171(4), 1741–1749. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1741>
49. Porte, L., Legarraga, P., Vollrath, V., Aguilera, X., Munita, J. M., Araos, R., (2020). Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-

- CoV-2 in respiratory samples. *International Journal of Infectious Diseases*, 99, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.098>
50. Ribero, M. S., Jouvenet, N., Dreux, M., & Nisole, S. (2020). Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathogens*, 16(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
 51. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051267>
 52. Saulle, I., Vicentini, C., Clerici, M., & Biasin, M. (2021). Antigen presentation in SARS-CoV-2 infection: the role of class I HLA and ERAP polymorphisms. *Human Immunology*, 82(8), 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.05.003>
 53. Seyed Hosseini, E., Riahi Kashani, N., Nikzad, H., Azadbakht, J., Hassani Bafrani, H., & Haddad Kashani, H. (2020). The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 551(September), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.08.011>*
 54. She G-S, Ku K, Baek S-H, Kim SJ, Kim SI, Kim B-T, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays targeting SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2020
 55. Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA* 2020b;323:1582
 56. Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., et al. (2020). COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death and Differentiation*, 27(5), 1451–1454. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0530-3>
 57. Shu, Y., & McCauley, J. (2017). GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance*, 22(13), 2–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494>
 58. Song, Z., et al., 2019. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses* 11 (1), 59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
 59. Taefehshokr, N., Taefehshokr, S., & Heit, B. (2020). Mechanisms of dysregulated humoral and cellular immunity by SARS-CoV-2. *Pathogens*, 9(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121027>
 60. To, K. K. W., et al, (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
 61. Trowsdale J, Knight J.C. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14(67), 301–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153455>.Major
 62. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
 63. Vajixen, <http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>
 64. Woloshin S. (2020). False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection Challenges and Implications. *New England Journal of Medicine*, 1–2. <https://doi.org/DOI:10.1056/NEJMp2009027>
 65. Woo, P.C., et al., 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2 (8), 1804–1820. *

66. Xia, S., et al (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Research*, 30(4), 343–355.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>
67. Ye, Q., Wang, B., & Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19.’ *Journal of Infection*, 80(6), 607–613.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
68. Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 172(June 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>
69. Zhengtu, L., et al (2020). Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, (February). <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>
70. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020)
71. Zhu, Z., et al., 2018. Predicting the receptor-binding domain usage of the coronavirus based on kmer frequency on spike protein. *Infect. Genet. Evol.: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 61, 183–184.
72. Zimmer, K. (2020). What Do Antibody Tests For SARS-CoV-2 Tell Us About. *TheScientist*. Retrieved from https://www.the-scientist.com/news-opinion/what-do-antibody-tests-for-sars-cov-2-tell-us-about-immunity--67425?utm_campaign=TS_OTC_2020&utm_source=hs_email&utm_medium=email&utm_content=86410531&_hsenc=p2ANqtz-_DzwLcioDJSIWtf9lWp8oLXZ-6DB6aEogoSt4aJ-uYoG_d
73. Rai, P., Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2021). Detection technologies and recent developments in the diagnosis.pdf. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 441–455.
74. Majumdar, P., & Niyogi, S. (2021). SARS-CoV-2 mutations: The biological trackway towards viral fitness. *Epidemiology and Infection*, 0–7.
<https://doi.org/10.1017/S0950268821001060>
75. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html>
76. Alhamid, G., Tombuloglu, H., Rabaan, A. A., & Al-Suhaimi, E. (2022). SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(11), 103465. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103465>
77. Filchakova, O., Dossym, D., Ilyas, A., Kuanysheva, T., Abdizhamil, A., & Bukasov, R. (2022). Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*, 244(January), 123409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123409>
78. Gong, F., Wei, H. X., Li, Q., Liu, L., & Li, B. (2021). Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.682405>
79. Lopez-Leon, S., Wegman-Ostrosky, T., Perelman, C., Sepulveda, R., Rebolledo, P. A., Cuapio, A., & Villapol, S. (2021). More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12.<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95565-8>
80. Informe Técnico Diario COVID-19 MÉXICO [Internet] Informe Técnico Diario COVID-19 MÉXICO. 2021.Disponible en:

81. CoVariants. Shared mutations [Internet]. CoVariants. 2021[cited 06 Jan 2022]. Disponible en: <https://covariants.org/shared-mutations>
82. Kaliyamurthi, S., Selvaraj, G., Junaid, M., Khan, A., Gu, K., & Wei, D.-Q. (2019). Cancer Immunoinformatics: A Promising Era in the Development of Peptide Vaccines for Human Papillomavirus-induced Cervical Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(32), 3791–3817. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181106094133>
83. Clade Naming & Definitions-SARS-CoV-2 Workflow Documentation. Disponible en línea: https://docs.nextstrain.org/projects/ncov/en/latest/reference/naming_clades.html (consultado el 13 de mayo de 2022).
84. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
85. N. Takezaki, M. Nei, K. Tamura, POPTREEW: Web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities, *Mol. Biol. Evol.* 31 (2014) 1622–1624, <https://doi.org/10.1093/molbev/msu093>
86. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, Wheeler DK, Sette A, Peters B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D339-D343. doi: 10.1093/nar/gky1006. PMID: 30357391; PMCID: PMC6324067.
87. Tenzer S, Peters B, Bulik S, Schoor O, Lemmel C, Schatz MM, Kloetzel PM, Rammensee HG, Schild H, Holzhütter HG. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell Mol Life Sci.* 2005 May;62(9):1025-37. doi: 10.1007/s00018-005-4528-2. PMID: 15868101.
88. Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothé BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics.* 2005 Jun;57(5):304-14. doi: 10.1007/s00251-005-0798-y. Epub 2005 May 3. PMID: 15868141.
89. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, Keşmir C, Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol.* 2013 Oct;9(10):e1003266. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003266. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24204222; PMCID: PMC3808449.

19. ANEXO

>Spike_hCoV-19 Mexico/CMX Spike_D614G

MFVFLVLLPLVSSQCVNFTNRTQLPSAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTKQSLIV
NNATNVVIKVCEFQFCNYPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDL
E
GKQGNFKNLSEFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK
CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISN
CVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGTIAD
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLSDKVGNYLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCV
N
FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLTILEITPCSFGGVSVITP
GTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNS
Y
ECDIPIGAGICASYQTQTNSHRRARSVASQSIAYTMSLGAENSVVYSNNSIAIPTNFTI
SVTTEILPVSMAKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE
VFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDC
VFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDC
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM
QMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALN
TLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAP
A
ICHDGKAHFPREGVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDP
LQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL
QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDDDD
SEPVLKGVKLHYT

>N_R203K_hCoV-19 Mexico/CMX_N

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALT
QHG
KEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEA
G
LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGS
QASSRSSSRNSTRNSTPGSSKRTSPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKG
QQ
QQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDY
KH
WPQIAQFAPSASAFFGISRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDKDPNFKDQVILLNKHIDAY
KTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA

>NSP12_P323L_hCoV-19 Mexico/CMX_NSP12

RVCGVSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKFLKTNCCRFQEKDEDDNLIDSY

FVVKRHTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFFKFRIDGDMVPHISRQRLTKYTMADLVY
ALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDFVENPDILRVYANLGERVRQALLKT
VQFCDAMRNAGIVGLTLDNQLNGNWYDFGDFIQTPGSGVPVVDSSYSSLMPILTTR
ALTAESHVDTDLTKPYIKWDLKDYDFTEERLKLFDYFYWDQTYHPNCVNCLDDRCILH
CANFNVLVSTVFPLTSFGPLVRKIFVDGVPFVSTGYHFRELGVVHNQDVLHSSRLSFK
ELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAFQTVKPGNFKDFYDFAVSKGFF
KEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYRYNLPTMCDIRQLLFVVEVVDKYFDCYDGGCIN
ANQVIVNNLDKSAGFPFNKWKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRNVIPITITQMNLYAIS
AKNRARTVAGVVICSTMTNRQFHQKLLKSIATRIGATVIGTSKFYGGWHNMLKTVYSDV
ENPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARKHTTCCSLSHRFYRLANCAQVLESEM
V
MC
GGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTANVNALLSTDGDKIADKYVRNLQHRLYE
CLYRNRDVTDFVNEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVASIKNFKSVLYYQ
NNVFMSEAKCWTEETDLTKGPHEFCSQHTMLVKQGDDYVYLPYDPSPRILGAGCFVDDIV
K
TDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFLYLQYIRKLHDELGTGHMLDMYSVMLTN
DNTSRYWEPEFYEAMYTPHTVLQ
>E

>E_hCoV-19_hCoV-19 Mexico/CMX_E

MYSFVSEETGLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYS
RVKNLNSSRVPDLLV
>M_hCoV-19 Mexico/CMX_M

MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPV
TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMA CLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL
NVPLHGTILTRPLLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYK
LGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTHSSSSDNIALLVQ