

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Interacción y relevancia biológica de la lectina DC-SIGN con la envuelta del virus emergente SARS-CoV-
2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria Labiod Becerro

DIRECTORES

Joanna Aleksandra Luczkowiak
Fátima Lasala Sánchez
Rafael Delgado Vázquez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Interacción y relevancia biológica de la
lectina DC-SIGN con la envuelta del virus
emergente SARS-CoV-2**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Nuria Labiod Becerro

DIRECTORES

Joanna Aleksandra Luczkowiak

Fátima Lasala Sánchez

Rafael Delgado Vázquez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE DOCTORADO
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

**Interacción y relevancia biológica de la
lectina DC-SIGN con la envuelta del virus
emergente SARS-CoV-2**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Nuria Labiod Becerro

DIRECTORES

**Joanna Aleksandra Luczkowiak
Fátima Lasala Sánchez
Rafael Delgado Vázquez**

Madrid, 2022

A mi madre y a mi padre

مكرسة لأمي وأبي

¿Qué para qué sirve? Pues para comprender cómo suceden las cosas. ¿Te parece poco? Para intentar formular reglas que alivien la insoportable angustia de nuestra existencia en esta miserable brizna de la inabarcable inmensidad del universo que es el mundo.

Almudena Grandes

Agradecimientos

Quiero darles las gracias a mis directores de tesis, a Rafael Delgado por darme la oportunidad y guiarme en estos cuatro años, a Fátima por la enseñanza y la ayuda y a Joanna no solo por su conocimiento, también por enseñarme a ser independiente.

Agradecer también a todo el laboratorio de Microbiología del Hospital 12 de Octubre, Paquita, Sagrario, Noe, Cristina y Bea, con mención especial a las que se convirtieron en mis amigas: Patricia Carnicero, Inés Calonge y Paula Bueno.

A las personas del laboratorio de arbovirus y enfermedades víricas importadas del Instituto de Salud Carlos III: Ana Vázquez, Laura Herrero, María Paz Sánchez-Seco, y Anabel Negrodo por enseñarme y hacerme ver que la virología era mi camino. También darles las gracias a Paquita y Lourdes por la paciencia conmigo cuando ni siquiera sabía coger una pipeta.

También quiero agradecer a José Manuel Echevarría la oportunidad de comenzar ya que sin él es muy posible que hoy mi camino fuese otro.

Quiero darles las gracias a mis biólogos porque para hacer la tesis, primero hay que hacer una carrera y sobrevivir a ella, sin duda lo mejor que me llevé de todo esto fuiste vosotros.

A mis amigos Ana, Paula, Carolina, Rodrigo, Laura y Marta mis mayores apoyos todos estos años, por escucharme y cuidarme incansablemente durante esta etapa, y a mis amigos César, Edu y Juanlu por las cervezas cuando más necesitaba distraerme.

A mi tía Montse, mis hermanas Mery y Zhara, también a mi sobrina Rocío y mi prima Aldara por el apoyo recibido.

A mis profesores, por enseñarme todo lo que sé.

A mis padres Miloud y Guadalupe. A mi padre por enseñarme a pensar por mí misma y enseñarme que la lucha y la constancia es al final la clave de todo, y a mi madre por enseñarme a tener la fuerza y el valor necesarios para poder hacerlo.

A Gabri, porque contigo he aprendido que la respuesta obvia se encuentra muchas veces delante de ti, a pesar de permanecer durante años enfrente tuyo.

A todos, por llevarme hasta aquí, gracias.

ABREVIATURAS

ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2 humana	Angiotensin converting enzyme 2
Ad5	Adenovirus-5	
ADN	Ácido desoxirribonucleico	
ARN	Ácido ribonucleico	
BHK-21	Células de Riñón de cría de hámster	Baby Hámster Kidney
CD4	Cumulo de diferenciación 4	
DC	Célula Dendrítica	Dendritic Cell
EBOV	Virus Ébola	
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein isothiocyanate
GP	Glicoproteína	
LLA	Leucemia linfoide aguda	
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio	Middle East respiratory syndrome coronavirus
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase Chain Reaction
PE	Ficoeritrina	Phycoerythrin
PE	Ficoeritrina	Phycoerythrin
SARS- CoV	Síndrome respiratorio agudo severo de Coronavirus	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	Síndrome respiratorio agudo severo de Coronavirus 2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
TLR	Receptores tipo Toll	Toll Like Receptor
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana	
VLP	Partículas como virus	Virus like Particles
VSV	Virus de la estomatitis vesicular	Vesicular Stomatitis Virus

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE

Índice

Capítulo I: Introducción	23
1. Coronavirus.....	23
1.1. Antecedentes y Clasificación.	23
1.2. Morfología, Organización Genómica y Ciclo Infeccioso.....	28
2. Relevancia de la glicosilación en el mecanismo de entrada viral.....	34
3. Visión panorámica del sistema inmune: inmunidad innata y adaptativa.....	38
3.1. Sistema inmune innato	38
3.2. Sistema inmune adaptativo.....	39
4. Células dendríticas y modulación del sistema inmune: Lectinas de tipo C:	
DC- SIGN	40
4.1. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)	41
4.2. Receptores tipo Toll (TLR)	41
4.3. Lectinas de tipo C (CLR)	42
5. Lectina de tipo C DC-SIGN	42
5.1. DC-SIGN (CD209): una molécula de adhesión en células dendríticas que media la migración de DC de sangre a tejidos	43
5.2. DC-SIGN como receptor de antígeno y sus ligandos.....	45
6. Lectina de tipo C L-SIGN	45
7. Escape inmunológico y rol de las DC en la diseminación viral.....	47
Capítulo II: Objetivos y justificación de la tesis doctoral.....	51
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	55
1. Líneas celulares	55
2. Generación de células inmortalizadas.....	57
3. Plásmidos	57
4. Virus replicativo.....	62
4.1. Vaccinia Virus rVV-18R-T7	62
4.2. SARS-CoV-2.....	63
5. Mutagénesis	64
5.1. Mutantes y PCR	64
5.2. Quinasa, Ligasa, DpnI	68

5.3. Transformación de células competentes.....	69
5.4. Siembra de colonias transformadas.....	69
5.5. Purificación de ADN plasmídico	69
5.6. Comprobación de la mutación mediante PCR de secuenciación	71
6. Construcción de virus recombinantes.....	71
6.1. Titulación del virus de la Viruela (Vaccinia Virus)	71
6.2. Virus recombinante de la estomatitis vesicular (VSV)	72
6.3. Virus recombinantes basados en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) con envuelta heteróloga.....	73
6.4. Virus recombinantes basados en el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) de primaria generación con envuelta heteróloga	74
6.5. Virus recombinantes basados en el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) de tercera generación con envuelta heteróloga	75
6.6. Virus recombinantes basados en el Virus de la Leucemia murina (MLV) con envuelta heteróloga.....	76
7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y generación de células dendríticas y macrófagos	76
8. Infección en cis con virus recombinantes.....	77
8.1. Infección directa en células inmortalizadas.....	77
8.2. Infección directa en células primarias.....	78
9. Infección en trans con virus recombinantes	78
9.1. Transinfección con células inmortalizadas.....	79
9.2. Transinfección con células primarias.....	80
10. Infección en trans con virus replicativo SARS-CoV-2.....	81
10.1. Transinfección con células inmortalizadas.....	81
10.2. Transinfección con células primarias	82
11. Producción de la proteína recombinante soluble SARS-CoV-2 S Hexapro	82
11.1. Transfección con fosfato cálcico.....	82
11.2. Purificación de la proteína recombinante soluble SARS-CoV-2 S Hexapro	83
12. Diseño y producción de la proteína recombinante Spike-SARS-CoV PP Hexapro soluble.....	84
12.1. Diseño de PCR	84
12.2. Purificación PCR.....	85
12.3. Generación de extremos cohesivos mediante digestión	85
12.4. Extracción de ADN del gel	86

12.5. Ligación.....	86
12.6. Transformación	86
12.7. Comprobación del clonaje mediante digestión	87
13. Ensayo de unión	87
13.1. Citometría de Flujo.....	87
13.2 ELISA con DC-SIGN soluble	89
14. Ensayos de neutralización	90
15. Análisis de glicosilaciones en las envueltas de las variantes de SARS-CoV-2	91
16. Análisis estadístico y creación de imágenes	92
Capítulo IV: Resultados.....	95
1. Infección en cis con virus recombinantes SARS-CoV-2	95
1.1. Infección directa en células inmortalizadas.....	95
1.2. Infección directa en células primarias	97
2. Infección en trans con virus recombinantes SARS-CoV-2	99
2.1. Transinfección con células inmortalizadas.....	99
2.2. Transinfección con células primarias	104
3. Infección en trans con virus SARS-CoV-2 replicativo.....	105
3.1. Transinfección con células inmortalizadas.....	105
3.2. Transinfección con células primarias	106
4. Ensayo de unión	107
4.1. Interacción con DC-SIGN	107
4.2. ELISA con DC-SIGN soluble	110
5. Búsqueda de anticuerpos anti-NTD Spike SARS-CoV-2	111
5.1. Ensayo de neutralización.....	111
5.2. Ensayo de unión	113
6. Análisis de glicosilaciones en las envueltas de las variantes SARS-CoV-2	122
Capítulo V: Discusión.....	131
Capítulo VI: Conclusiones.....	147
Resumen/Summary	151
Bibliografía	161

Capítulo I

INTRODUCCION

Capítulo I: Introducción

1. Coronavirus

1.1. Antecedentes y Clasificación.

Los Coronavirus, llamados así por su semejanza a una corona solar bajo el microscopio electrónico ([Almeida et al., 1968](#)), son causantes de infecciones del tracto respiratorio y gastrointestinal. Están incluidos en el orden *Nidovirales* y pertenecen a la familia *Coronaviridae*, la cual incluye las subfamilias *Coronavirinae* y *Torovirinae*. La subfamilia *Coronavirinae* incluye cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* ([Pal et al., 2020](#)).

Los coronavirus que son capaces de infectar al ser humano son siete; el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2), que pueden causar enfermedad grave, mientras que los coronavirus HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 y HCoV-229E cursan con sintomatología leve ([Andersen et al., 2020](#)), causando estos cuatro últimos en su conjunto, aproximadamente el 15% de los resfriados comunes ([Sariol & Perlman, 2020](#)).

En los últimos veinte años se han identificado tres coronavirus como altamente patógenos: SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

El primero, SARS-CoV (también denominado SARS-CoV-1), surgió como un caso de neumonía atípica el 16 de noviembre de 2002, en la provincia de Guangdong, China, extendiéndose a nueve ciudades de la provincia, y alcanzando su punto álgido en febrero del año 2003. Se inició así la primera fase de la epidemia, donde la dinámica del brote del virus estuvo determinada por el denominado “evento de supercontagio” (en inglés, superspreader event, SSE), donde un solo individuo produce la transmisión de la enfermedad a un gran número de contactos. La transmisión a nivel global se inició en el hotel Metropole (Hong Kong), donde el Dr. Liu Jianlun, profesor y nefrólogo jubilado que trabajaba de forma esporádica en el hospital de Guangdong, se infectó días antes de viajar a Hong Kong, transmitiendo el virus a 15 personas que se hospedaban en el hotel. Entre ellos, 3 huéspedes necesitaron hospitalización en Hong Kong, donde infectaron a 95 clínicos, y otros 5 huéspedes viajaron al extranjero, expandiendo el virus a Canadá, Vietnam, Singapur, Irlanda y Estados Unidos, dando inicio a la epidemia fuera de las fronteras chinas ([Andersen et al., 2020](#); [Shi & Wang, 2017](#); [Thompson, 2013](#)).

Una investigación posterior de la pandemia de SARS-CoV logró el aislamiento del virus a partir de animales comercializados en el mercado, concretamente una civeta de las palmeras enmascarada o Paguma (*Paguma larvata*) y un perro mapache (*Nyctereutes procyonoides*), mostrando que la

fuente de la epidemia probablemente se originó por un salto al hombre desde animales vivos comercializados que se encontraban infectados en el mercado de Guangdong ([Kan et al., 2005](#)).

Aunque el virus no se ha encontrado en la naturaleza, hallazgos posteriores mostraron que la civeta y el murciélago del género *Rhinolophus* son potenciales reservorios del SARS-CoV-1 humano ([Kan et al., 2005](#); [Shi & Wang, 2017](#)), lo que sugiere que esas especies sirvieron al virus como un paso intermedio para su adaptación y capacidad posterior de infectar a los humanos de manera más eficiente ([Gralinski & Menachery, 2020](#)).

El día 6 de julio del año 2003, la organización mundial de la salud (OMS) anunció que el virus que se extendió en 5 meses a 26 países, causando 774 muertes ([S. Liu et al., 2016](#)) con una tasa de mortalidad del 9,6% y 8096 casos de infección en humanos, había sido contenido. A pesar del anuncio, la OMS declaró que el mundo aún no estaba libre de la epidemia, ya que un nuevo caso futuro podría provocar un rebrote de la enfermedad.

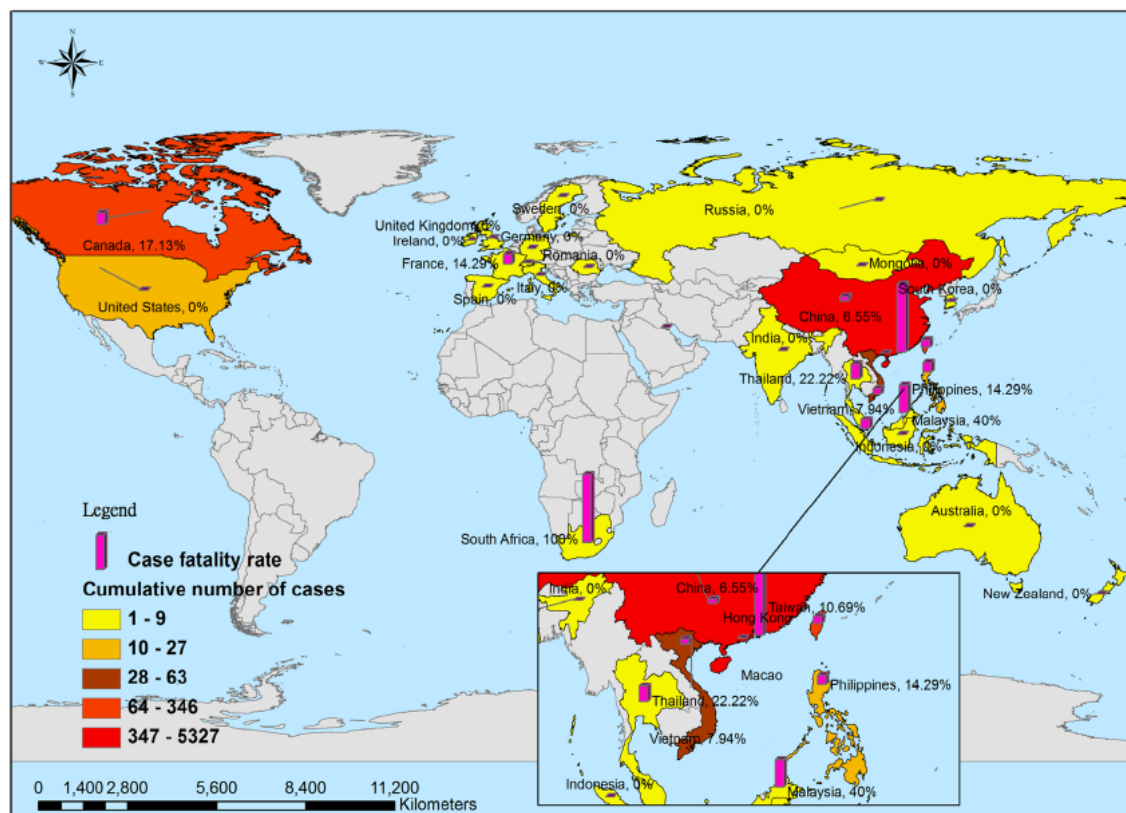


Ilustración 1. Distribución geográfica del SARS-CoV. El mapa muestra la distribución geográfica de los 8096 casos confirmados por laboratorio, 774 muertes y de los 1706 de personal sanitario infectado con SARS-CoV-1 desde el 1 de noviembre de 2002 al 31 de diciembre de 2003 ([Liu et al., 2016](#)).

Casi diez años más tarde de que el virus SARS-CoV-1 se diera a conocer al mundo, el 13 de junio del año 2012 se identificó otro coronavirus altamente patógeno en un hospital de Jeddah, en el Reino de Arabia Saudita. Se le denominó HCoV-EMC, aunque posteriormente se le rebautizó como coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). El paciente de 60

años, el cual presentaba una neumonía severa, murió 11 días después de su hospitalización debido a insuficiencia renal y respiratoria ([Zaki et al., 2012](#)).

Del 6 de abril al 17 de mayo de 2013 se notificaron 23 casos por el virus MERS-CoV en la región de Al-Ahsa, Arabia Saudita, con muertes en 9 de los casos. Los primeros casos donde el virus se extendió fuera la de península arábiga correspondieron a un caso notificado por el gobierno francés, donde un turista se contagió al viajar a Dubai, en Emiratos Árabes Unidos, y las infecciones de dos hermanos confirmados en laboratorio por el gobierno de Túnez, los cuales contrajeron el virus de su padre, el cual enfermó tras viajar a Qatar y Arabia Saudita ([Al-Tawfiq, 2013](#)).

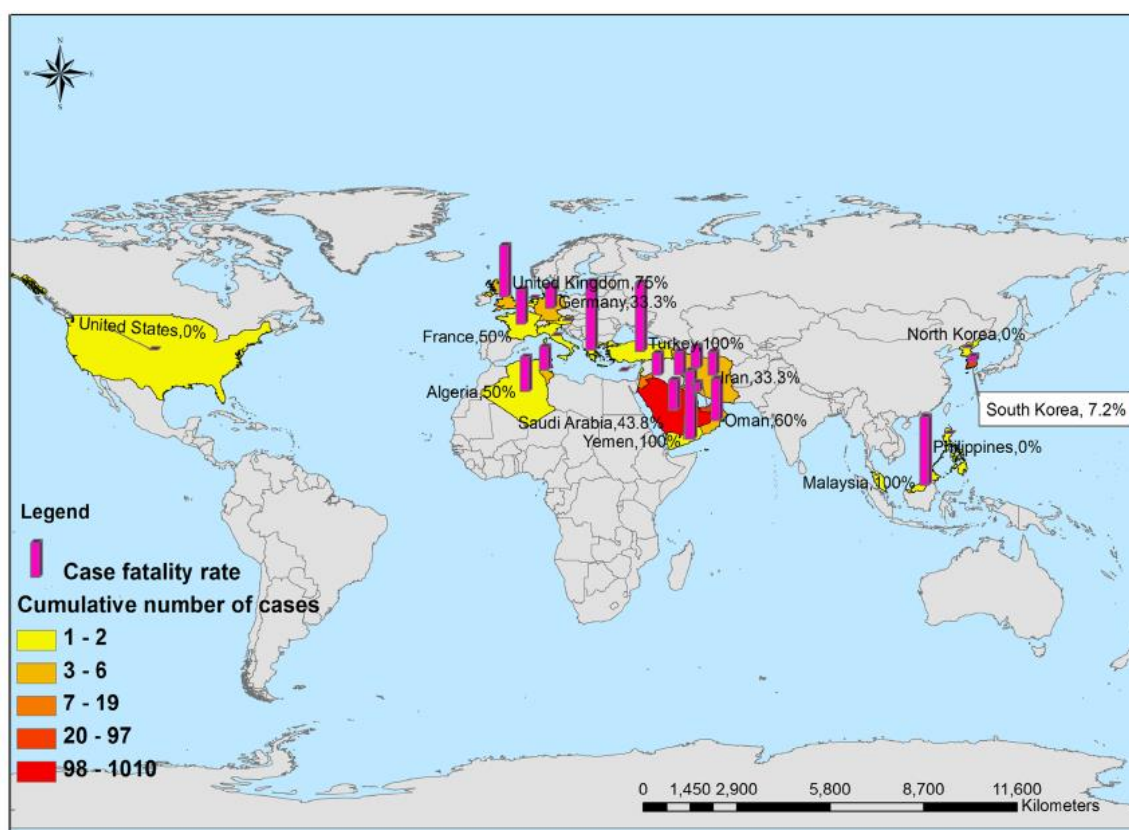


Ilustración 2. Distribución geográfica del MERS-CoV. El mapa muestra la distribución geográfica de los 1368 casos confirmados por laboratorio, 487 muertes y 183 infecciones de personal sanitario con MERS-CoV del 1 de abril de 2012 al 7 de julio de 2015 ([Liu et al., 2016](#)).

Investigaciones posteriores han demostrado que MERS-CoV es agente causante de cuadros clínicos que van desde la asintomatología hasta shock séptico y fallo multiorgánico. Se estima que la tasa de mortalidad del virus es de aproximadamente un 40% ([Al Awaidey & Khamis, 2019](#)).

Con el objetivo de detener la propagación del virus, los esfuerzos se centraron en averiguar el reservorio animal de MERS-CoV. Se recolectaron muestras de murciélagos salvajes en la zona donde había trabajado y vivido el primer paciente y otras zonas de Arabia Saudita. En una de las muestras de un murciélago sepulcral egipcio (*Taphozous perforates*), se halló un fragmento de 190 nucleótidos de la región de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de MERS-CoV, siendo

esta secuencia idéntica a la secuencia vírica del primer caso humano, aunque esto no pudo confirmarse debido a una interrupción en la cadena de frío de las muestras durante el transporte a Estados Unidos desde Arabia Saudita, distintos hallazgos han demostrado que el virus está filogenéticamente relacionado con los Betacoronavirus del linaje C de murciélagos ([Omrani et al., 2015](#)).

No solo los murciélagos parecen ser reservorios del virus MERS-CoV. Existen evidencias de que el virus ha estado circulando entre camellos árabigos 20 años antes del primer caso índice humano, ya que se detectaron anticuerpos MERS-CoV en sueros de los mismos que se encontraban almacenados desde principios de la década de los 90. Además, también se ha demostrado la transmisión entre especies en una infección humana tras la exposición directa con camellos infectados con el virus ([Memish et al., 2014](#)).

La aparición de estos dos virus emergentes mostró la necesidad de investigar los coronavirus como posibles candidatos a protagonizar pandemias futuras. Una investigación del año 2007 expuso la evidencia ya conocida de que la recombinación genética experimentada por los coronavirus, junto con la cultura de comer murciélagos en el sur de China, siendo estos un gran reservorio de virus similares a SARS-CoV, era una bomba de relojería, siendo el resurgimiento de SARS un hecho que no debía ser ignorado ([Cheng et al., 2007](#)).

A finales de diciembre del año 2019, distintos centros de salud locales informaron de pacientes con neumonías atípicas de etiología desconocida, los cuales de forma similar a SARS-CoV-1 y MERS-CoV, presentaban síntomas como dolor torácico, tos, disnea, y en casos severos neumonía bilateral. Estos pacientes se encontraban epidemiológicamente vinculados al Mercado Mayorista de Mariscos de Huanan, en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China ([CSMW, 2019](#)).

El Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades envió a la ciudad de Wuhan un equipo de respuesta rápida junto con autoridades de salud chinos el 31 de diciembre de 2019, con el objetivo de realizar una investigación epidemiológica y averiguar el origen del virus. Los hallazgos mostraron la identificación de un coronavirus nunca antes visto, el coronavirus 2019-nCoV (posteriormente denominado SARS-CoV-2), que se encontraba filogenéticamente clasificado como un nuevo beta-coronavirus, y que además se encontraba relacionado con el virus SARS-CoV-1 y SARS-CoV de murciélagos ([Zhou et al., 2020](#)). El 10 de enero se publicó la primera secuencia del virus, y posteriormente, con la colaboración de distintos institutos de investigación, se completó el genoma a través de la base de datos GISAD ([Gralinski & Menachery, 2020](#)).

En los siguientes días, se fue notificando casos confirmados de pacientes sin relación ninguna con el mercado chino. De forma muy rápida, los grupos de infectados por el virus con relaciones familiares y nosocomiales comenzaron a producirse, confirmando la transmisión de persona a persona del nuevo coronavirus ([Chan et al., 2020](#); [Deng & Peng, 2020](#)).

Con el objetivo de frenar la expansión del virus, el gobierno chino declaró el estado de emergencia en la ciudad de Wuhan el 23 de enero, dejando aislada la ciudad. Aunque esto sirvió para evitar la escalada de casos confirmados, el virus no se pudo contener. La transmisión del virus en China se vio favorecida por la coincidencia del brote con la festividad del Año Nuevo Lunar, en el que los viajes entre ciudades por el festival aumentan. Esto ocasionó que el virus rápidamente se extendiera en la provincia de Hubei y al resto del país, contándose diariamente los casos por miles a finales del mes de enero ([Hu, 2019](#)). La emergencia global se declaró el 30 de enero por la Organización Mundial de la Salud, en la que se confirmaba que el nuevo coronavirus era un agente de importancia en la salud pública internacional, y caracterizó oficialmente el brote como pandemia ([Team, 2020](#)). Al mismo tiempo, el 11 de febrero la OMS nombró a la enfermedad COVID-19, mientras que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus bautizó al virus como SARS-CoV-2 ([ICTV, 2020](#)).

El SARS-CoV-2 logró extenderse rápidamente a nivel mundial, causando medidas de contención extraordinarias en todo el mundo, y estresando los sistemas de salud de un modo sin precedentes. A fecha de 26 de octubre de 2021, se han notificado más de 243 millones de casos confirmados, y más de 4,9 millones de muertes desde el inicio de la pandemia ([WHO, 2021](#)).

Durante las primeras etapas de la pandemia se discutió el posible origen del virus, llegándose a especular sobre la posible manipulación intencionada del mismo, alegando que se trataba de una construcción artificial de laboratorio; sin embargo, Andersen y col. demostraron mediante análisis computacional que la mutación en RBD que presentaba SARS-CoV-2 no presentaba una afinidad ideal con su receptor ACE2 humano. Además, si se hubiese manipulado el virus, se habría utilizado alguno de los sistemas de genética inversa disponibles para Betacoronavirus ([Andersen et al., 2020](#)). El SARS-CoV-2 parece ser una versión vírica mutada del coronavirus CoV-RaTG13 aislado en murciélagos del género *Rhinolophus* en la provincia de Yunnan, China, por lo que es probable que el virus se originara en estos animales, donde después de sufrir la mutación, adquirió la capacidad de saltar de especie ([do Vale et al., 2021](#)). Distintos estudios hallaron que los pangolines malayos (*Manis javanica*) parecían ser los hospedadores intermediarios de SARS-CoV-2 ([Boni et al., 2020](#); [Rabi et al., 2020](#)).

A lo largo de la pandemia, distintos linajes genéticos han ido surgiendo y circulando por el mundo. La primera variante contenía una mutación en la posición aminoacídica 614 y sufrió un cambio de un ácido aspártico (D) por una Glicina (G), la cual se extendió rápidamente, desplazando epidemiológicamente a la cepa original de Wuhan, convirtiéndose en la variante de referencia.

Las variantes se han clasificado como variantes bajo monitoreo, variantes de preocupación, variantes de interés, o variantes de gran consecuencia, dependiendo de la mayor o menor facilidad y rapidez con la que se propaga cada una. Actualmente existen 4 variantes de gran preocupación: la variante británica también llamada Alpha o B.1.1.7, la variante sudafricana denominada también

Beta o B.1.351, la variante brasileña también bautizada como Gamma o B.1.351, y la variante india con los nombres Delta y B.1.617.2 ([CDC, 2021](#)).

1.2. Morfología, Organización Genómica y Ciclo Infeccioso.

Los coronavirus son virus envueltos, esféricos, cuyo tamaño oscila entre 60 140nm. Estos presentan un genoma ARN monocatenario no segmentado de polaridad positiva de unas 27 a 31 kilobases, constituyendo unos de los ARN viral no segmentados más grandes conocidos. Su genoma contiene un casquete 5' y una cola de poli A en su extremo 3', por lo que puede actuar como ARN mensajero en la traducción de la proteína viral Replicasa. El extremo 5' contiene una secuencia líder y una región no traducida (UTR) con múltiples estructuras en bucle, necesarias para la replicación y síntesis del ARN vírico. En el extremo 3' también hay una región no traducida (UTR) y genes accesorios intercalados dentro de los genes estructurales ([Fehr & Perlman, 2015](#)). Además, al inicio de los genes estructurales, existen secuencias reguladoras de la transcripción (TRS), que son necesarios para una correcta expresión de dichos genes.

El genoma codifica para cuatro proteínas estructurales: proteína de membrana (M), proteína de envoltura (E), proteína espícula (S), y la nucleocápside (N) ([Cui, 2019](#)).

El ciclo infeccioso general de los coronavirus comienza con la endocitosis de la partícula vírica en la célula huésped, mediante el acoplamiento de la proteína S a los receptores de la célula diana mediante el dominio de unión al receptor (RBD). Esta unión, que determina el tropismo tisular del virus, origina un reordenamiento estructural en S, que prepara a la proteína para la fusión de la membrana vírica con la membrana endosomal ([V'kovski et al., 2021](#)).

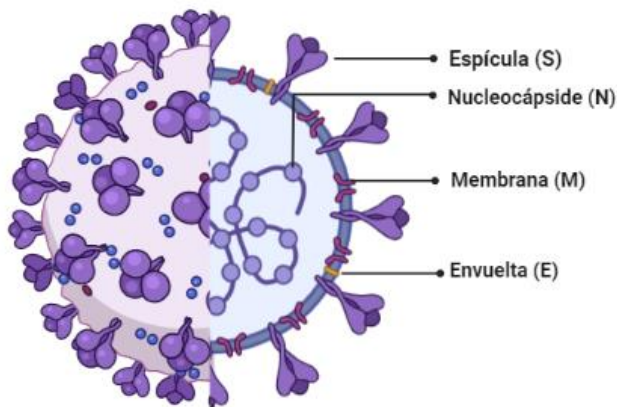


Ilustración 3. Virión de Coronavirus. Representación de las proteínas de membrana (M), proteína de envoltura (E), proteína de la espícula (S), y la proteína de la nucleocápside (N). Su tamaño oscila entre 60 140nm.

La liberación del genoma vírico en el citoplasma celular sucede gracias a la escisión proteolítica de la proteína S, dándose la fusión en el interior de los endosomas acidificados. La desencapsidación vírica deja el ARN mensajero libre en el citoplasma de la célula huésped para iniciar el proceso de traducción. A continuación, se inicia el proceso de traducción de las poliproteínas y las proteasas virales por parte de la maquinaria celular, las cuales permiten formar el complejo de replicación junto con la ARN polimerasa dependiente de ARN, iniciando la replicación viral mediante la síntesis de copias genómicas de polaridad negativa, siendo estas usadas como molde para la síntesis

de ARN genómico de sentido positivo ([Fehr & Perlman, 2015](#)), y para la generación de los moldes ARN subgenómicos que codifican las proteínas víricas accesorias y estructurales.

Tras la síntesis y replicación de los ARN subgenómicos, en el retículo endoplasmático (RE) se insertan las proteínas estructurales S, E y M, recorriendo la vía secretora hasta el compartimento intermedio del retículo endoplasmático-Golgi ([Tooze et al., 1984](#)) donde se encuentra la proteína N. El virus se ensambla y a través de la vía secretora constitutiva abandona la célula, emergiendo por gemación. La proteína M ejerce un papel de dirección en el ensamblaje de la partícula vírica a través de interacciones con las proteínas de S, E y N, dando lugar a la formación de la envuelta vírica ([de Haan & Rottier, 2005](#)).

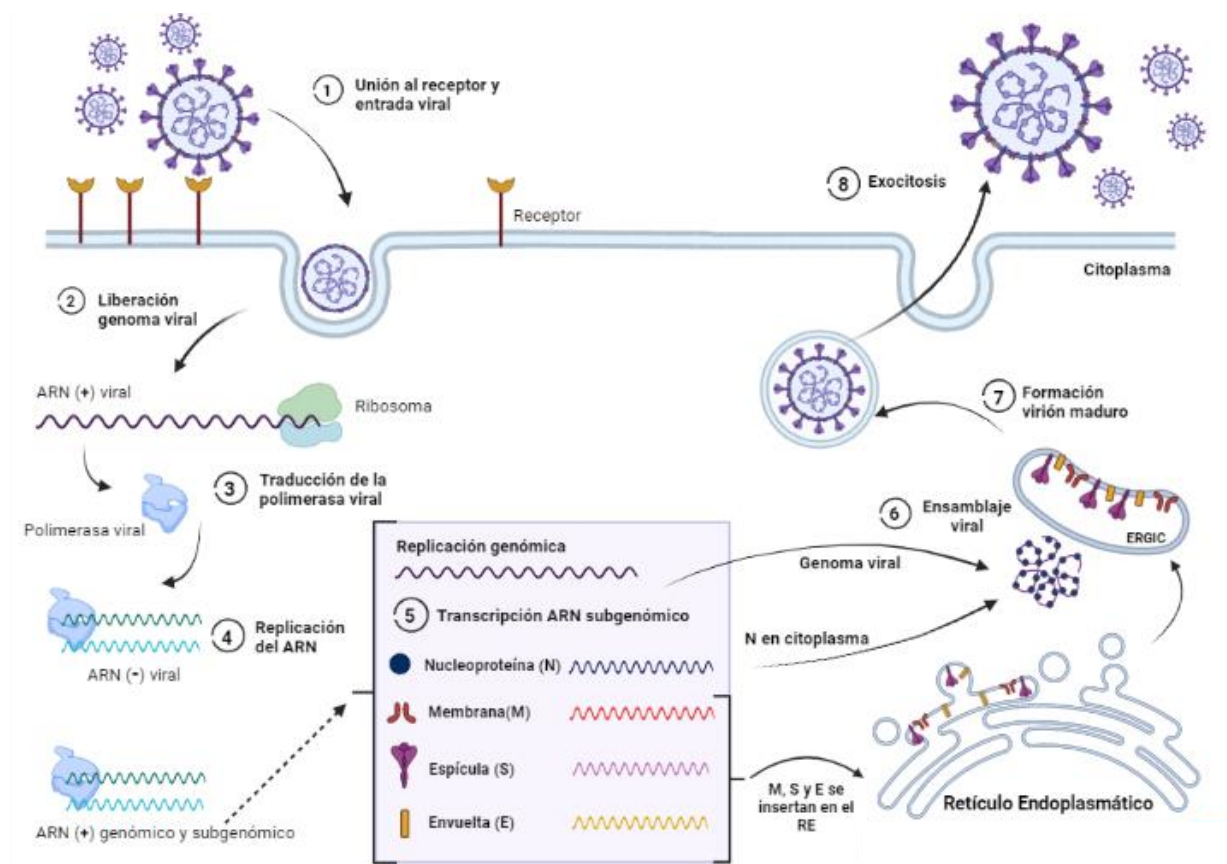


Ilustración 4. Ciclo infeccioso de los coronavirus. El virión se une al receptor de la célula huésped a través de su subunidad S1 de la proteína S (1). Esta interacción determina el tropismo del virus. Tras la unión al receptor, el virus accede al citoplasma mediante la escisión proteolítica dependiente de pH en las subunidades S1/S2 de la proteína S por Furina, Cathepsina, TMPRSS2 u otra proteasa, dando lugar a la fusión de las membranas viral y celular mediada por la subunidad S2. Después de la liberación del genoma viral (2), la polimerasa se traduce a partir del ARN genómico (3). Luego sigue la síntesis de ARN viral (4), con el ensamblaje de complejos de replicación-transcripción viral. Las proteínas estructurales virales (S, E y M) se traducen del ARN (5), para insertarse en el retículo endoplásmico (6) y trasladarse al compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC). Múltiples copias de la proteína N empaquetan el ARN genómico en estructuras helicoidales, interactuando con las proteínas M hidrofóbicas en el ERGIC, que sirven para dirigir el ensamblaje del virión (7). Los viriones que brotan de las membranas del ERGIC son transportados a través de la vía exocítica constitutiva fuera de la célula (8).

1.2.1. Proteína S

La proteína de la Espícula (Spike o S), conocida inicialmente como E2, es la responsable de los famosos picos en la envuelta del virión, emblema de los Coronavirus.

La proteína S se encuentra clasificada como una proteína de fusión de clase I, y es un homotrímero, el cual posee un peso molecular de 180kDa, y un tamaño aproximado de 1200 aminoácidos. Es sintetizada en el retículo endoplasmático y transportada a la membrana plasmática, donde es la encargada de interactuar con los receptores de la célula huésped y mediar la fusión posterior entre las membranas de la partícula vírica y la célula. La proteína S se divide en dos regiones S1 y S2. En la interacción de la proteína S con el receptor celular, la primera subunidad de la Espícula, S1, es la encargada de la interacción con los receptores celulares y la segunda, S2 media la fusión viral ([V'kovski et al., 2021](#)). Esta región S1 se subdivide a su vez en el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (CTD) donde a su vez se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD) y en este el motivo de unión al receptor (RBM) que reconoce e interactúa de forma específica con el receptor celular. La unión de la subunidad S1 al receptor celular desencadena un reordenamiento estructural desestabilizando el trímero previo a la fusión, dando como resultado el desprendimiento de la subunidad S1 y originando un cambio conformacional en la subunidad S2 a una forma pos-fusión. Durante este proceso, la subunidad S1 de SARS-CoV-2, al igual que otros coronavirus como SARS-CoV y MERS-CoV, sufre cambios conformacionales en su RBD en forma de bisagra, ocultando o exponiendo transitoriamente al mismo en dos estados llamados forma abierta o “up” y forma cerrada o “down”. En esta última conformación cerrada se sitúa al RBD en un estado inaccesible al receptor, mientras que el estado “up” posibilita la accesibilidad del RBD al receptor, aunque se cree que este es un estado menos estable ([Casalino et al., 2020](#); [Wrapp et al., 2020](#)).

De forma general para todos los Coronavirus, las regiones S1 y S2 son escindidas en los sitios de escisión S1/S2, los cuales son distintos entre Coronavirus. La proteasa Furina puede realizar la escisión en el motivo PRRARSV de SARS-CoV-2 y en el motivo RSVR ↓ SV en el caso del virus MERS-CoV durante su salida viral ([Millet & Whittaker, 2015](#)). En cambio, en SARS-CoV, el sitio S1/S2 después de la biosíntesis permanece sin escindir, probablemente a que su motivo SLLRST es un sitio de escisión desfavorable a la Furina. En el caso de SARS-CoV, tras la unión al receptor, es la proteasa L-Catepsina la encargada de realizar el corte en el motivo conservado AYT ↓ M. Estas escisiones son claves para la entrada viral por lo que, como de eficaz sea y el alcance que posean las proteasas en este proceso de activación, regulará y determinará los receptores funcionales del virus y, por tanto, el tropismo viral y su patogénesis ([Hatmal et al., 2020](#)).

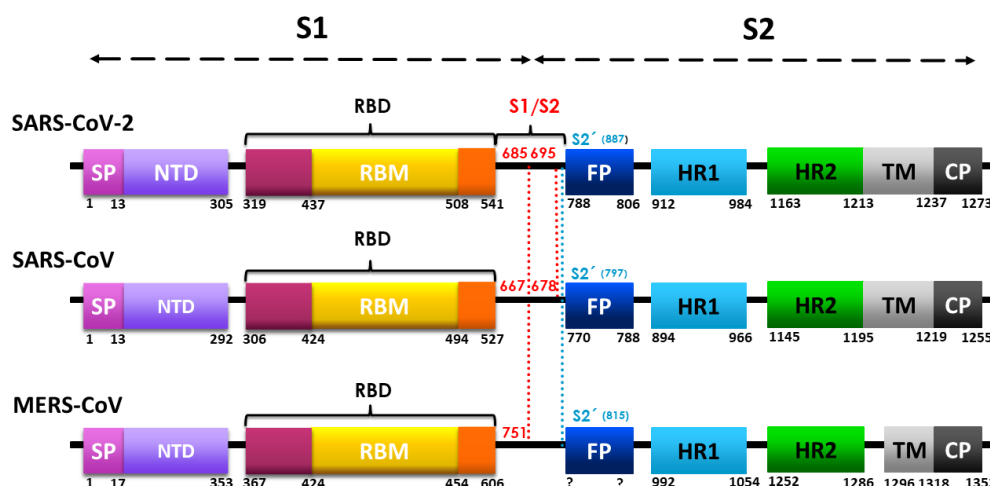


Ilustración 5. Representación de los genes de la proteína S en los coronavirus SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 y MERS-CoV. S1 / S2: sitios de escisión de Furina entre los dominios S1 y S2 de la proteína S; S2': sitio de escisión de la proteasa Furina; FP: péptido de fusión; HR1: repetición heptada 1; HR2: repetición heptada 2; TM: dominio transmembrana; CP: Dominio citoplasmático. Las líneas de puntos verticales indican los sitios de escisión de proteasa (rojo para los sitios de escisión de tipo furina S1 / S2 y azul para el sitio de escisión de tipo furina S2'). MERS-COV no contiene el segundo sitio de escisión S1 / S2. Ilustración modificada de [Hatmal et al., 2020](#)).

Se ha identificado a la proteína de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) como receptor funcional de la entrada viral para SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 ([Li et al., 2003](#); [Zhou et al., 2020](#)).

ACE2 se expresa en 72 tipos de células distintas, mayoritariamente en tejidos del tracto gastrointestinal y endocrino, así como en tejidos cardiovasculares, vejiga urinaria, riñón, testículos y tejidos musculares, y con expresión reducida en pulmón, tejidos linfoides y tejidos del sistema nervioso central. Su distinta expresión puede verse influida por factores como ambiente, sexo, comorbilidades, su interacción con otros genes del sistema renina-angiotensina y medicamentos entre otros. Se trata de una proteína de tipo transmembrana I, siendo esta una metalopeptidasa de zinc que puede adoptar dos conformaciones distintas. La primera es en forma transmembrana de longitud completa, la cual eleva su dominio extracelular a la membrana plasmática. La segunda es en forma soluble, donde circula por el torrente sanguíneo en pequeñas cantidades. Actualmente no se ha podido aclarar el papel que desempeña la forma soluble en la patogénesis de COVID-19 ([Medina-Enríquez et al., 2020](#)). Las concentraciones plasmáticas de ACE2 soluble cambian entre grupos de edad y sexo, siendo mayor en adultos y hombres en comparación con niños y mujeres ([Grasselli et al., 2020](#)). Se ha observado que el COVID-19 resulta en su estado más grave en hombres adultos por lo que se ha propuesto que una mayor concentración plasmática de ACE2 soluble conlleva una mayor concentración de ACE2 en la membrana celular, lo que podría dar lugar a una mayor susceptibilidad infectiva por SARS-CoV-2 ([Svärd et al., 2020](#)).

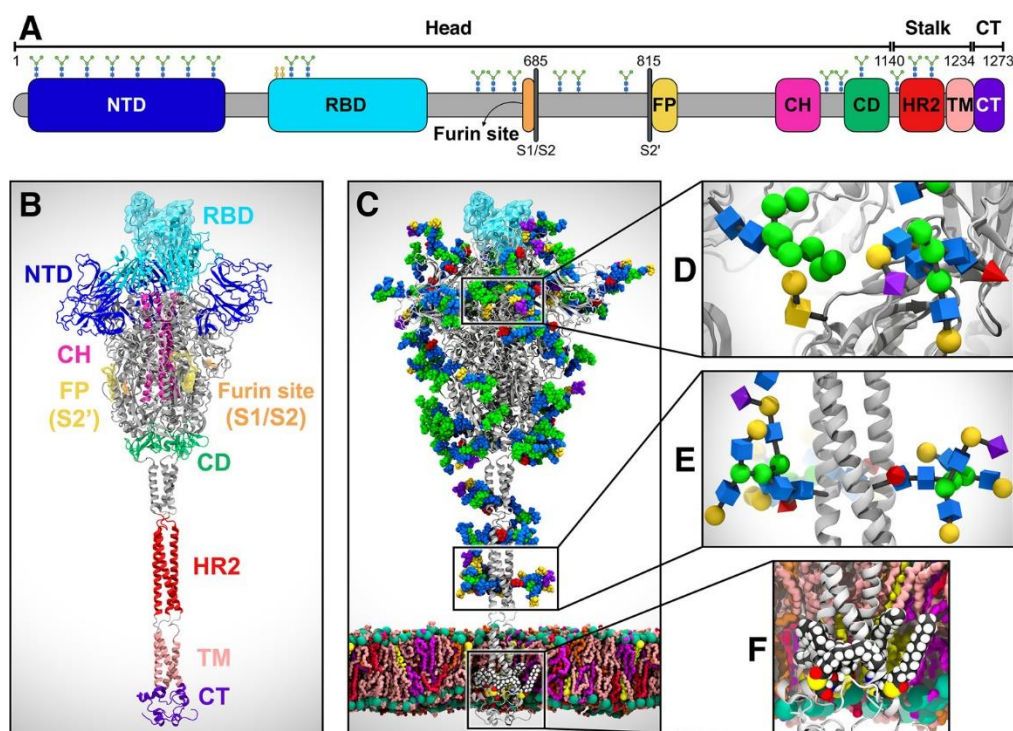


Ilustración 6. (A) Descripción general de la proteína S SARS-CoV-2. (B) Regiones de la proteína S: región N-terminal (NTD, 16–291), región de unión al receptor (RBD, 330–530), sitio de escisión de furina (S1/S2), péptido de fusión (FP, 817–834), hélice central (CH, 987–1034), región de conexión (CD, 1080–1135), región heptada repetida 2 (HR2, 1163–1210), región transmembrana (TM, 1214–1234) y cola citoplásmica (CT, 1235–1273). También se representan los N-glicanos (azul y verde) y O-glicanos (amarillo). (C) Ensamblaje de las regiones de cabeza, tallo y CT en el modelo de longitud completa de la proteína S. (D) Modelo de longitud completa glicosilado y palmitoilado de la proteína S en estado abierto, incrustado en una bicapa lipídica que imita la composición del compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi. La proteína se representa con dibujos grises, donde el RBD en el estado "abierto" se resalta con una superficie cian transparente. Los N- / O-glicanos se muestran como GlcNAc en azul, manosa en verde, fucosa en rojo, galactosa en amarillo y ácido siálico en púrpura, los átomos de O3 del colesterol se muestran como esferas amarillas. (E) Vista ampliada de la glicosilación de la cabeza de la proteína S. (F) Vista ampliada de la S-palmitoilación de la proteína S dentro de la TC. [Casalino et al., 2020](#).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína S de SARS-CoV-2 se une a su receptor ACE2 mediante el dominio RBM del RBD, dando lugar a la infección tras la fusión de membranas tras la activación de la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) y una segunda escisión en el sitio S2'. Seguidamente, ocurre la internalización de ACE2, dando lugar a su regulación a la baja en la superficie celular ([Medina-Enríquez et al., 2020](#)). Se ha puesto de manifiesto que la regulación a la baja del receptor ACE2 en la superficie celular tras la infección también puede contribuir, junto con los propios efectos virales y los factores inflamatorios, a la lesión de múltiples órganos en pacientes con COVID-19 ([Ni et al., 2020](#)). De la misma manera, ya se demostró que la infección por SARS-CoV-1 regula a la baja la expresión de ACE2 en estados patológicos de la enfermedad, dando como resultado altos niveles de ACE2 en su forma soluble en orina, sangre y otros fluidos corporales ([Furuhashi et al., 2020](#)).

A pesar de que la afinidad de la proteína S por ACE2 tanto en SARS-CoV-1 como en SARS-CoV-2 es idéntica, estos muestran tasas de transmisión muy diferentes ([Petersen et al., 2020](#); [Sungnak et al., 2020](#)).

1.2.2. Proteína M

La proteína de membrana (M), con un tamaño aproximado de 25-30 kDa, es la más abundante en el virón y, aunque estas se encuentran insertadas en la membrana del retículo endoplasmático, la gran mayoría no poseen secuencia señal. M posee tres dominios transmembrana, y tiene un papel clave determinando la forma de la envoltura en la partícula vírica; igualmente, también se la considera el principal organizador del ensamblaje de los Coronavirus debido a sus interacciones con las demás proteínas estructurales ([Masters, 2006](#)) como, por ejemplo, su interacción con la proteína S para la retención de esta última en el compartimento RE-Golgi ([Nafea & Fahad, 2021](#)).

1.2.3. Proteína E

La proteína de envoltura (E), junto con la proteína M, son proteínas implicadas en el ensamblaje del virus ([Pal et al., 2020](#)). La proteína E tiene un tamaño de 8 a 12 kDa, y su abundancia en la partícula vírica es menor, siendo esta la proteína estructural de menor tamaño. Aunque debido a esta característica se piensa que es posible que su función estructural en la envoltura vírica no sea realmente tal, y en realidad tenga más que ver con un desempeño morfogénico al tomar lugares estratégicos en la construcción de la envoltura vírica por la proteína M ([de Haan & Rottier, 2005](#)). Su expresión intracelular durante la replicación vírica es abundante, a pesar de que solo una pequeña fracción termina incorporándose a la envoltura vírica ([Venkatagopalan et al., 2015](#)).

Entre los Coronavirus, las proteínas E poseen un dominio altamente hidrofóbico, formando una hélice alfa anfipática que oligomeriza formando un poro en la membrana, lo que les permite actuar como canales iónicos ([DeDiego et al., 2007](#)) aunque, en el caso de SARS-CoV-1, este canal iónico no es necesario para la replicación viral, pero si para la patogénesis del virus ([Nieto-Torres et al., 2014](#)).

1.2.4. Proteína N

La proteína de la nucleocápside (N) varía notablemente su tamaño en los Coronavirus, con masas moleculares que oscilan entre 45 y 60 kDa, y es la única proteína que constituye la nucleocápside

del virus, dividiéndose en dos regiones claramente diferenciadas: un dominio N-terminal (NTD) y un dominio C-terminal (CTD) con la capacidad de unirse *in vitro* al ARN ([Chang et al., 2016](#)).

La proteína de la nucleocápside es la que se expresa en mayor abundancia dentro de células infectadas, localizándose en todo el citoplasma de las mismas ([de Haan & Rottier, 2005](#)), y más concretamente en el compartimiento retículo endoplasmático (RE)-Golgi, reforzando la propuesta de su función en el ensamblaje y gemación del virus ([Schoeman & Fielding, 2019](#)). Además, parece ser la única proteína capaz de fosforilarse para facilitar la condensación con el ARN y modular su interacción con este, aunque dicha fosforilación no parece jugar un rol clave en la regulación del ensamblaje del virus, si se ha planteado la hipótesis de que su desfosforilación podría facilitar el desensamblaje del virón durante la entrada viral ([de Haan & Rottier, 2005](#)).

2. Relevancia de la glicosilación en el mecanismo de entrada viral

Las proteínas sufren distintos cambios químicos en su fase final de síntesis, entre ellas se encuentra la glicosilación, considerada una de las modificaciones postraduccionales más complicadas, a pesar de ser de las que ocurren con mayor frecuencia ([Spiro, 2002](#)). La síntesis de la proteína S da lugar a un polipéptido muy glicosilado, variando el número de N-glicosilaciones entre los Coronavirus de 21 a 35. Su plegamiento es un paso relativamente lento, siendo este limitante en la velocidad del proceso de oligomerización, en el que la adición de oligosacáridos conlleva la formación y transposición de enlaces disulfuro intramoleculares.

En el transporte celular hacia la membrana plasmática de S, ya sea esta formando parte de la partícula vírica o de forma aislada, la proteína sufre modificaciones adicionales. Cuando S cruza el aparato de Golgi, las N-glicosilaciones maduran viéndose modificadas a su través ([de Haan & Rottier, 2005](#)).

En los vertebrados, el proceso enzimático de glicosilación utiliza distintos monosacáridos como la glucosa, galactosa, fucosa, N- acetilgalactosamina, manosa, N- acetilglucosamina, ácido siálico, ácido glucurónico y xilosa ([Ohtsubo & Marth, 2006](#)). La gran cantidad y diversidad de los distintos azúcares utilizados en este proceso da lugar a una gran variedad de posibles glicanos, debido a los diferentes enlaces anoméricos que pueden darse entre los dos monosacáridos y a la creación de ramificaciones dentro de las estructuras de glicanos. Todo esto determinará la orientación física y tridimensional del glicano, crítico para el reconocimiento por las moléculas que se unen a los carbohidratos.

La N-glicosilación es una de las formas más comunes de modificaciones proteicas, de forma general este proceso consiste en la adición en un enlace covalente de un nitrógeno amídico de asparagina a un núcleo con un alto contenido en manosa, en un motivo conservado de Asn-X-Ser / Thr durante la síntesis temprana de proteínas, tras el cual la proteína sufrirá una serie de complejos

procesos de corte y remodelación del azúcar a su paso por el RE-Golgi, dando como resultado una proteína con distintos oligosacáridos. Los virus utilizan la maquinaria celular del huésped para, mediante este proceso, modificar las proteínas de su envuelta y otorgarlas con capacidades de evasión del sistema inmune, estabilidad, adhesión e infección de la célula huésped ([Vigerust & Shepherd, 2007](#)).

En la O-glicosilación, sin embargo, la unión sucede entre una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un grupo hidroxilo de un residuo de treonina (Thr) o serina (Ser) presentes en el armazón polipeptídico, formando el antígeno Tn (GalNAc-Thr/Ser) ([Hang & Bertozzi, 2005](#)).

La proteína S de SARS-CoV-2 presenta 22 sitios de glicosilación ligadas a N y 4 sitios de glicosilación ligadas a O ([Gao et al., 2020](#); [Watanabe et al., 2020](#)). De los 22 sitios de N-glicosilación que presenta la proteína S de SARS-CoV-2, 19 se conservan en SARS-CoV, concretamente 9 glicanos de los 13 que se encuentran en la región S1 y 9 glicanos presentes en la región S2 se conservan en SARS-CoV-1 de lo que se deduce que estos dos virus poseen una maquinaria de fusión similar ([Ramírez Hernández et al., 2021](#)).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la glicosilación de S sucede en la vía secretora, y es llevada a cabo por el aparato celular del huésped. Esta adicción de azúcares otorga, a grandes rasgos, dos beneficios principales al virus. El primer beneficio es que esta glicosilación es necesaria para llevar a cabo las interacciones con los factores de unión de la superficie celular mediante los residuos de manosa, como los oligosacáridos que contienen ácido siálico y los glicosaminoglicanos (GAG) ([Robson, 2020](#); [Tortorici et al., 2019](#)). La segunda ventaja tiene que ver con el escape del virus a la respuesta inmune. Los glucanos presentes en la proteína enmascaran los epítomos polipeptídicos de reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes del hospedador, esquivando la neutralización; esta “armadura” protectora es denominada “escudo de glucanos” ([Doores, 2015](#)).

La proteína S de SARS-CoV-2 se encuentra menos glicosilada en comparación con MERS-CoV y SARS-CoV-1, lo que sugiere que este blindaje deja la superficie de la proteína más expuesta, y por tanto podría provocar una inmunidad humoral más eficiente. Aunque este escudo de glicanos no solo serviría para evitar la respuesta neutralizante, también podría tener funciones en la atenuación de la respuesta de las células T, en el que algunos glucanos de la proteína S podrían interferir con la presentación de antígenos en el complejo HLA ([Grant et al., 2020](#); [Zhao et al., 2021](#)).

Aunque este escudo de glicanos crea un blindaje que bloquea el reconocimiento de anticuerpos, existen anticuerpos neutralizantes muy potentes que son capaces de “atravesar” esta barrera y reconocer los epítomos subyacentes. Un anticuerpo monoclonal, el S309, neutraliza de forma potente SARS-CoV-1 y SARS-CoV 2, siendo capaz de reconocer un epítomo que contiene un glicano muy conservado entre los Sarbecovirus ([Pinto et al., 2020](#)). Esto pone de manifiesto la

importancia de los glicanos presentes en S para la producción de anticuerpos neutralizantes ([Zhao et al., 2021](#)).

Los glicanos presentes en S también podrían jugar un papel en la reacción cruzada con antígenos del huésped, dando lugar a fenómenos de autoinmunidad. Un reciente estudio ha mostrado que pacientes con COVID-19 presentan niveles de IgM e IgG contra carbohidratos propios inusualmente altos, incluyendo N-glicanos, gangliósidos, derivados de LacNAc, grupo sanguíneo H1 y sialil Lewis X ([Butler & Gildersleeve, 2020](#)), aunque cabe señalar que muchos de estos anticuerpos contra glicanos propios son de origen natural y, dada su baja afinidad y especificidad, aún está por aclararse el papel que juegan en los fenómenos de autoinmunidad en los pacientes con COVID-19 ([Kappler & Hennet, 2020](#)).

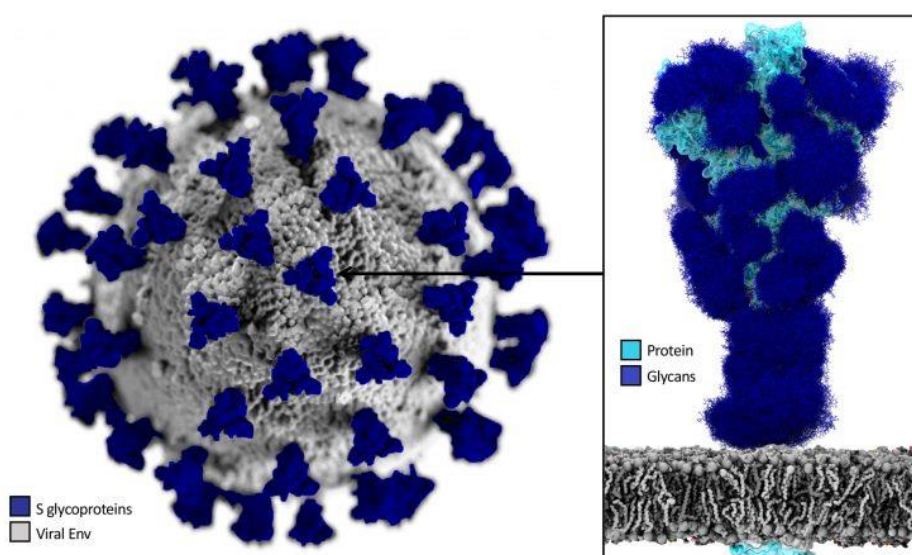


Ilustración 7. Escudo de glicanos de la proteína S del SARS-CoV-2. A la derecha, representación molecular de la proteína S con RBD en estado abierto (azul cian). El área protegida por los glicanos se presenta en azul oscuro [Casalino et al., 2020](#).

La GP de EBOV también presenta glicosilaciones, concretamente 17 N-glicosilaciones y multitud de O-glicosilaciones en la región mucina, contribuyendo las mismas a más de un tercio del peso molecular ([B. Wang et al., 2017](#)). Estas glicosilaciones son críticas para las interacciones y posterior uniones a los receptores lectina presentes en las células huésped. También resulta importante para estabilidad y fusión de la GP, de hecho, en un estudio realizado por Lennemann et al., se demostró, que eliminando las N-glicosilaciones presentes en GP1, disminuyó significativamente el uso de lectinas de tipo C, entre ellas DC-SIGN y L-SIGN, que se sabe que EBOV utiliza para su entrada viral ([Lennemann et al., 2014](#)). Estas glicosilaciones también actúan como un escudo, protegiendo al RBD de la actividad de los anticuerpos neutralizantes, enmascarando estos epítopos y evitando así la respuesta inmune específica.

La importancia de los glicanos en la infección viral está ampliamente demostrada, y es bien sabido su función en las etapas de entrada y liberación viral. Los glucanos desempeñan funciones como primera línea de contacto en la interacción con receptores específicos, facilitando su unión ([Watanabe et al., 2019](#)), así como correceptores o receptores específicos de entrada viral ([Alvarez et al., 2002](#)), por lo que los azúcares presentes, tanto en las glicoproteínas virales, como los existentes en las superficies celulares del huésped, son críticos para el mecanismo de entrada y de una diseminación viral eficiente.

En SARS-CoV-2, la proteína S puede unirse a ácidos siálicos o heparán sulfato para iniciar la unión, a pesar de la baja afinidad existente ([Baker et al., 2020](#)). Por otra parte, en el dominio N-terminal (NTD) de S1 de muchos Coronavirus presentan una región similar a la galectina, que tiene la capacidad de unirse a los azúcares presentes en la superficie celular, actuando como lectinas virales, como por ejemplo el ácido 5-N-acetil-9-O-acetilneuramínico. También existe en la S de SARS-CoV-2 un dominio de unión a gangliósido en el NTD de la proteína, dando lugar a interacciones de baja afinidad entre esta región de unión con las balsas lipídicas de la superficie celular, y facilitando así la unión del receptor ACE2 con el virus ([Zhao et al., 2021](#)).

3. Visión panorámica del sistema inmune: inmunidad innata y adaptativa

La función del sistema inmunológico es la protección de las agresiones exógenas y endógenas, es decir, la defensa contra la invasión de microorganismos y la vigilancia ante la emergencia de enfermedades autoinmunes, tumores cancerígenos y alergias. Entre los microorganismos capaces de infectar al ser humano se encuentran los virus, los cuales suelen ser controlados fácilmente con un daño a los tejidos limitado por el sistema inmune, aunque existen numerosos virus que son capaces de causar enfermedad evidente al huésped. Este daño dependerá de distintos factores propios del huésped como su edad, estado de salud, susceptibilidad genética y comorbilidades entre otras, factores propios del virus y factores asociados a las circunstancias de la infección. Igualmente, esta infección desencadenará una respuesta por parte del sistema inmune en el que intervendrán multitud de elementos. Para estudiar estas respuestas de forma más comprensible, se clasifica al sistema inmune según su funcionalidad en dos grandes respuestas: innata y adaptativa. Esta es una clasificación únicamente didáctica ya que ambas respuestas funcionan de manera integrada ([Rouse and Sehrawat, 2010](#); [Paola, 2012](#)).

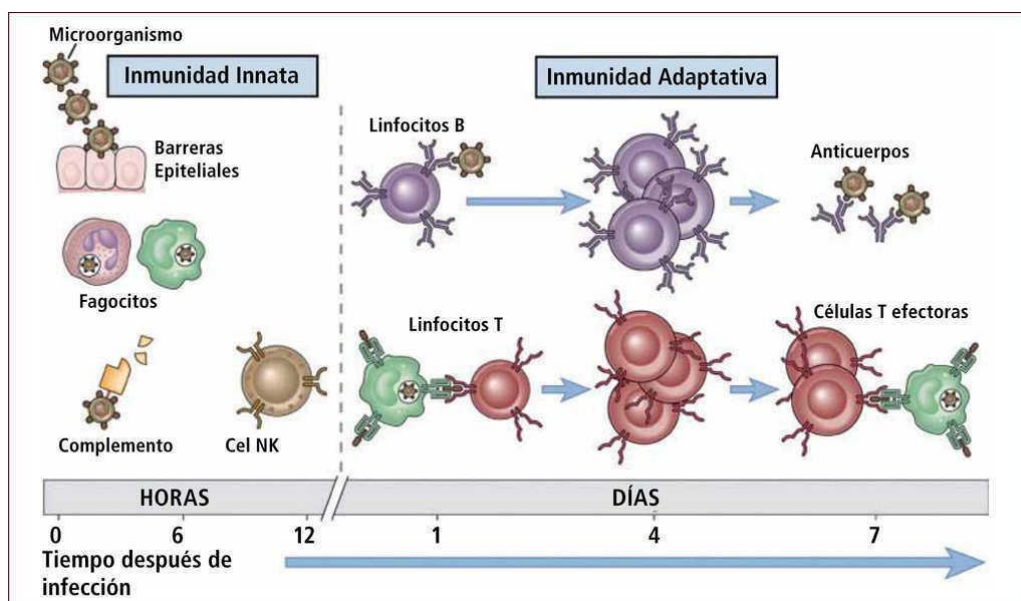


Ilustración 8. Clasificación elementos participativos en el sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo o específico. ([Paola et al., 2012](#)).

3.1. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa ante la agresión externa de forma no específica, y se encuentra presente en todos los organismos multicelulares, como plantas e insectos. Es el más antiguo, y está menos evolucionado que la respuesta inmune adaptativa, ya que el mismo mecanismo sirve para dar una respuesta genérica a diferentes microorganismos, por lo que no

confiere inmunidad a largo plazo. A pesar de estar menos evolucionada y ser menos específica, la respuesta inmune innata actúa con una fuerza de reacción muy rápida, produciéndose esta en horas, la cual requiere de distintos mecanismos y elementos que de forma general se pueden clasificar en: barreras físicas, químicas y biológicas (piel, enzimas secretoras y microbiota autóctona), células (macrófagos, células dendríticas, natural killer... etc), sistema del Complemento, citoquinas y receptores de reconocimiento de patrones (receptores de tipo Toll, receptores de tipo NOD, receptores de tipo RIG-I y receptores de lectina tipo C) ([Beutler, 2004](#); [Turvey and Broide, 2010](#); [Paola, 2012](#)).

3.2. Sistema inmune adaptativo

El nexo entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa son las células dendríticas (DC), ya que interactúan con el antígeno invasor, sufriendo un cambio en su estado de maduración, el cual conllevará a la regulación positiva de moléculas coestimuladoras y a la secreción de citoquinas proinflamatorias, necesarias para la diferenciación de células T efectoras y células B de memoria ([López et al., 2004](#)). A diferencia de la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa más evolucionados, que se desencadenan tras la exposición a antígenos invasores. Estos mecanismos son más potentes, y conllevan un aumento de la capacidad defensiva tras la reexposición al mismo agente; es por ello que este tipo de inmunidad se denomina adaptativa. La inmunidad específica o adaptativa reúne características propias, como una alta especificidad para diferenciar entre distintos agentes, una alta especialización que les permite responder de forma única a cada antígeno que reconoce, y capacidad para “recordar” y responder con mayor intensidad a exposiciones repetidas ante el mismo antígeno. El sistema inmune adaptativo, presente en todos los vertebrados, tiene dos tipos de respuestas: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

La inmunidad celular está mediada por los linfocitos T el cual presenta la mayor defensa para los microorganismos intracelulares ya que destruye las células infectadas o las elimina mediante fagocitosis.

La inmunidad humoral está mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B. Estos anticuerpos son polipéptidos compuestos por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas. Su región constante (Fc) determina su clase, así como su región variable (Fab) encargada del reconocimiento del antígeno. Los anticuerpos siempre inician sus efectos biológicos al unirse a los antígenos, y dicha unión, a pesar de no ser totalmente covalente, sí que posee una alta fuerza y especificidad ([Beutler, 2004](#); [Akira, Uematsu and Takeuchi, 2006](#); [Paola, 2012](#); [Abbas, 2019](#)).

Estos anticuerpos en las infecciones víricas, como en la infección por SARS-CoV-2, cobran una importancia vital durante el transcurso de la misma. La función biológica de los anticuerpos es neutralizar la función biológica de los antígenos invasores, donde dicha neutralización inhabilita al

antígeno, impidiendo que este sea infeccioso. En una infección vírica, destacan los llamados anticuerpos neutralizantes. Estos forman parte de la respuesta humoral del sistema inmune específico, reconocen y unen con alta especificidad epítomos presentes en las estructuras víricas, bloqueando la acción del virus al evitar la interacción con la célula huésped y, por tanto, impidiendo la infección celular.

La mayoría de los anticuerpos neutralizantes son muy específicos ante una variante vírica, y ven aumentada su potencia debido a la maduración por afinidad de las células B ([Gaebler et al., 2021](#)).

4. Células dendríticas y modulación del sistema inmune: Lectinas de tipo C: DC-SIGN

Las células dendríticas (DCs) y los Macrófagos forman parte de un sistema de vigilancia especializado contra las infecciones, formado por las llamadas células presentadoras de antígeno (APC) ([Belz et al., 2009](#)). Estas células presentadoras de antígeno resultan cruciales en el reconocimiento antigénico, ya que dicho reconocimiento determinará el tipo de célula T efectora que subsiguientemente mediará la respuesta inmune.

Existen dos grupos principales de células dendríticas: las células dendríticas plasmocitoides (pDC) y las células dendríticas convencionales o mieloides (mDC). Ambas expresarán diferentes tipos de receptores, que participarán en la modulación de los distintos procesos de regulación y tolerancia de la respuesta inmune ([Hossain & Wall, 2019](#)).

Las células dendríticas se encuentran presentes en la piel y el tejido mucoso ([Kooyk et al., 2008](#)), y circulan por los espacios extracelulares, sondeando la presencia de antígenos extraños para, una vez localizados, proceder a su presentación a las moléculas de histocompatibilidad principal de clase II (MHC II); o de forma menos eficiente, mediante presentación cruzada a las moléculas de histocompatibilidad de clase I, para rápidamente ser recicladas y cargadas con péptidos que han sido generados de forma más reciente. Este proceso, que desencadena un estado inflamatorio, suscita cambios fisiológicos y característicos, como el aumento de la superficie celular de las MHC, en el que las moléculas permanecen durante más tiempo en dicha superficie; además, aparece un proceso regulatorio a la alza de la expresión de moléculas coestimuladoras, induciendo la expresión de IL-2. En este escenario las células dendríticas abandonan los sitios de inflamación en un proceso regulado por quimioquinas para migrar hacia los ganglios linfáticos de drenaje, para pasar a un estado denominado estado activado o maduro, que lleva a una potente respuesta inmune adaptativa, poniendo de manifiesto el importante rol central que adquieren las células dendríticas en la toma de decisiones en el proceso de la respuesta inmune ([Erbacher et al., 2009](#)).

Las células dendríticas (DCs) actúan como el vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa, ya que las DCs inmaduras también poseen una función de importancia, expresando en su superficie celular una copiosa variedad de receptores, como los receptores de reconocimiento de patrones

(PRR), los receptores de tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR) ([Lundberg & Rydnert, 2014](#)).

4.1. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) sirven principalmente para identificar patrones moleculares asociados a peligros (DAMP) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos son esenciales para el inicio de la inmunidad adaptativa. La estimulación de los PRR conduce a la maduración de las células dendríticas inmaduras para estabilizar las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Además, en las células presentadoras de antígeno (APC), induce la expresión de moléculas coestimuladoras para inducir la proliferación y diferenciación en las células T, facilitando por tanto la presentación de antígenos; por lo que la presencia de los PRR, en resumidas cuentas, aporta dos beneficios claros al huésped. En primer lugar, puede desencadenar respuestas inmunes innatas para acabar directamente con el patógeno invasor y, si esto no es suficiente para eliminar la amenaza, puede iniciar respuestas inmunes adaptativas específicas, proporcionando una segunda protección ([Suresh et al., 2014](#)).

4.2. Receptores tipo Toll (TLR)

Los receptores tipo Toll (TLR) son un importante grupo que presentan características de receptores de reconocimiento de patrones presentes en macrófagos y células dendríticas, los cuales son capaces de clasificar al patógeno invasor y responder de manera individualizada ([Moreno, 2003](#)). Estos pueden reconocer y ligar PAMPs, que generalmente son estructuras muy bien conservadas, debido a que son indispensables en la supervivencia del patógeno ([Suresh et al., 2014](#)). La activación de PAMPs a través de los TRL conlleva a una doble función, por una parte, la activación de procesos propios de la respuesta innata para impedir la dispersión del patógeno como la producción de mediadores inflamatorios, fagocitosis y opsonización, y por otra parte asumir el papel de elemento vehicular entre la respuesta inmune innata y adquirida.

Las lectinas de tipo C (CLR) son receptores dependientes de calcio que están presentes en células dendríticas, y se caracterizan por su capacidad de reconocer azúcares presentes en patógenos, y además inducir cascadas de señalización para la activación de DCs y modular la señalización de los TLR ([Lundberg & Rydnert, 2014](#)). Estas proteínas se pueden encontrar de forma transmembrana o soluble y, a diferencia de los receptores de tipo Toll, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como lipopolisacáridos, las proteínas de tipo C pueden reconocer estructuras de glicanos presentes en el patógeno a través de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) presentes en su estructura ([Hossain & Wall, 2019](#)), aunque este reconocimiento de carbohidratos no diferencia entre glicanos de origen propio y de origen extraño.

4.3. Lectinas de tipo C (CLR)

Las lectinas de tipo C conducen al procesamiento y presentación de antígenos en las moléculas MHC de clase I y II, reconociendo e internalizando antígenos glicosilados en los compartimentos intracelulares de las DCs. Es por ello por lo que estos receptores también son conocidos como receptores endocíticos o receptores de captación de antígenos.

Existen más de 60 tipos de receptores de Lectinas de tipo C en humanos. Algunas, como Dectin-1, pueden realizar un reconocimiento de carbohidratos independiente de Ca^{2+} y, a pesar de las diferencias presentes entre ellas, se pueden clasificar de forma general en dos grupos en base a la coordinación del ión Ca^{2+} y en un motivo de aminoácidos implicado en el reconocimiento del azúcar: lectinas tipo C de tipo manosa y lectinas de tipo C de tipo galactosa. En las primeras, el reconocimiento del azúcar es debido a la secuencia aminoacídica Glu-Pro-Asn en su CRD, como por ejemplo las lectinas de tipo C DC-SIGN, el receptor de manosa de macrófagos (MR) y Langerina. En el caso de las lectinas de tipo C de tipo galactosa, es la secuencia aminoacídica Gln-Pro-Asp la responsable del reconocimiento del azúcar, como ejemplo tenemos la lectina de tipo galactosa de macrófagos (MGL). El perfil de reconocimiento de carbohidratos se puede predecir en base a dichas secuencias en las lectinas de tipo C. Mientras que los receptores de tipo manosa poseen una especificidad básica por manosa y/o glicanos terminados en fucosa, los receptores de tipo galactosa reconocen estructuras de N-acetilgalactosamina (GalNAc) y glucano terminadas en galactosa ([van Vliet et al., 2008](#)).

Existe evidencia de que los TLR activados junto con los receptores de señalización lectinas de tipo C ceden información de antígenos específicos a los programas de diferenciación de las células dendríticas que afectan a la expresión de genes de citoquinas ([Robinson et al., 2006](#)).

5. Lectina de tipo C DC-SIGN

DC-SIGN, de sus siglas en inglés “*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule*”, es también llamado CD209, o molécula de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina (ICAM-3) específica de células dendríticas (DC). Es una lectina de tipo C que se expresa en la superficie de células dendríticas inmaduras presentes en los tejidos periféricos.

Los genes CD209 (DC-SIGN) y CD209L (L-SIGN/DC-SIGNR, LSECtin) identificados en humanos contienen la información para la expresión de las lectinas de tipo C, que sirven como receptores de adhesión para ICAM-2 e ICAM-3. El gen CD209, que contiene 6 intrones y 7 exones, se encuentra codificado en el cromosoma humano 19 ([Soilleux et al., 2002](#)).

DC-SIGN fue descrito por primera vez en el año 1992 como una lectina de unión a manosa que era capaz de unirse con mucha afinidad a la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia

humana (VIH). Posteriormente, se comprobó que esta lectina se unía a la molécula de adhesión intercelular (ICAM-3) y se expresaba altamente en células dendríticas inmaduras, participando así en la activación de linfocitos T mediada por DCs ([Geijtenbeek et al., 2000](#); [Svajger et al., 2010](#)).

La lectina de tipo C DC-SIGN o CD209 es una proteína transmembrana de tipo II de 404 aminoácidos y 44 kDa de peso molecular expresada por células dendríticas. Contiene un dominio N-terminal citoplasmático corto, un cuello extracelular de siete repeticiones en tándem completas en una secuencia de 23 aminoácidos altamente conservada y una repetición en tándem parcial seguido de un dominio lectina C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (CDR) ([Geijtenbeek et al., 2002](#); [Soilleux et al., 2002](#)). El dominio CDR es una estructura globular que consta de dos regiones con plegamiento α -hélice, 3 puentes disulfuro y 12 regiones con plegamiento de tipo β . Un bucle sobresale de la superficie de la proteína formando parte de tres sitios de unión a Ca^{2+} , siendo uno de ellos denominado principal común a todas las lectinas C, otro esencial para la conformación del dominio de reconocimiento de carbohidratos y el otro siendo esencial para la coordinación de las estructuras de los carbohidratos. El reconocimiento de estructuras de carbohidratos específicos se establece por el proceso en el que el Ca^{2+} interactúa en el sitio 2 con los aminoácidos Glu³⁴⁷, Asn³⁴⁹, Glu³⁵⁴ y Asn³⁶⁵, siendo esta región directamente relacionada con la interacción de DC-SIGN y sus ligandos ([Gupta & Gupta, 2012](#)).

5.1. DC-SIGN (CD209): una molécula de adhesión en células dendríticas que media la migración de DC de sangre a tejidos

DC-SIGN es también llamado CD209, o molécula de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina (ICAM-3) específica de células dendríticas (DC). Se expresa concretamente en células dendríticas inmaduras de tejidos periféricos, y podemos localizarla en diversos lugares, como amígdalas, tejidos mucosos, ganglios linfáticos, en DCs derivadas de monocitos, bazo, y subconjuntos de células dendríticas de la piel; así mismo, también podemos encontrar expresión de DC-SIGN en células especializadas presentadoras de antígeno (APC), como macrófagos deciduales, macrófagos alveolares de pulmón, así como células de Hofbauer presentes en la placenta ([Geijtenbeek et al., 2002](#)).

En las células dendríticas, DC-SIGN desempeña muchas funciones para el control de la inmunidad y desencadenamiento de sus respuestas. Un aspecto clave para ello es la capacidad de migración de las propias DCs. DC-SIGN media la salida de las DCs precursoras e inmaduras desde la sangre a los tejidos periféricos en respuesta a señales inflamatorias o a la necesidad de reposición de las células dendríticas residentes. Un proceso de varias etapas fuertemente reguladas mediará esta migración desde la sangre a los tejidos periféricos, en el que se verán implicados el rodamiento y la activación rápida de leucocitos y, a través de integrinas activadas y diapédesis, la adhesión a ligandos endoteliales, donde la migración transendotelial y rodamiento de células dendríticas estará

mediada por DC-SIGN, mientras que su detención estará intervenida por interacciones mediadas por integrinas ([Gupta & Gupta, 2012](#)). La salida también está fuertemente controlada, las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos interactúan con los leucocitos, estando el rodamiento sometido a la mediación de los propios leucocitos y de las selectinas, que también son receptores de lectinas de tipo C que se unen a carbohidratos como sialil Lewis X (sLex) de las células endoteliales ([Geijtenbeek et al., 2002](#)).

Los precursores de células dendríticas positivas para DC-SIGN se encuentran preparados para la migración de la sangre a tejidos periféricos inflamados, lo que permitiría un rápido reclutamiento de las mismas en lugares donde es necesaria una función de vigilancia y captación antigénica. Esto además se ve apoyado por la expresión de ICAM-2 en vasos linfáticos y la alta expresión hallada en células dendríticas inmaduras que se encuentran en los tejidos periféricos, poniendo de manifiesto la importancia de la interacción entre la lectina y la molécula de adhesión intercelular para la migración de las DC a los lugares donde se las necesita, se encuentren o no estos sitios en estado de inflamación.

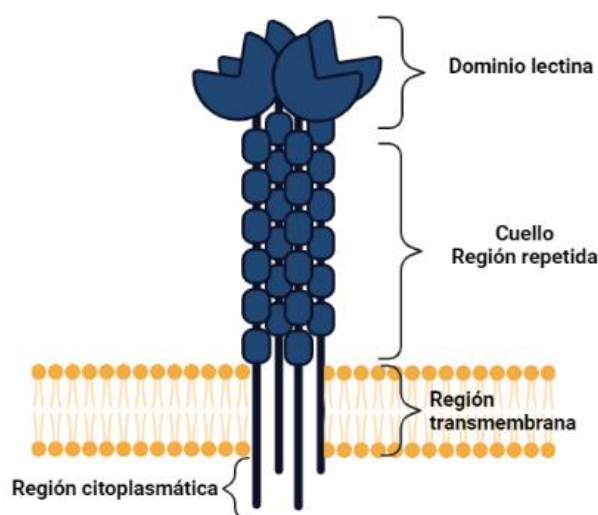


Ilustración 9. Representación de la lectina de tipo C DC-SIGN o CD209. El Receptor se divide en cuatro zonas diferenciadas: Región citoplasmática, Región transmembrana, Región repetida o cuello y dominio lectina.

DC-SIGN ve aumentada su expresión en monocitos en presencia de IL-4 y factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos. En un estado de inflamación, esta regulación positiva de DC-SIGN mediada por citoquinas induce la migración desde la sangre de las células dendríticas a los tejidos periféricos. En circunstancias fisiológicas, las interacciones sucedidas entre DC-SIGN-ICAM-2 (donde DC-SIGN reconoce una estructura con alto contenido en manosa en ICAM-2) median el rodamiento a lo largo de los revestimientos endoteliales de los precursores de células dendríticas positivas para DC-SIGN halladas en sangre, poniendo de manifiesto la potencial importancia de dicha interacción antes de la trans migración de las DC a los tejidos periféricos, estén inflamados o no, y posteriormente hacia los tejidos linfáticos a través de la linfa ([Geijtenbeek et al., 2000](#)).

5.2. DC-SIGN como receptor de antígeno y sus ligandos

Se ha demostrado que DC-SIGN reconoce diversos ligandos altamente glicosilados presentes en patógenos como virus y tejidos humanos a través del reconocimiento de carbohidratos mediado por el CDR del receptor. Concretamente, el receptor se une a la rama externa de trimanosa $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha$, que se encuentra presente en estructuras con un alto contenido en manosa, como por ejemplo en receptores de superficie de la envuelta de multitud de virus. Además, se ha demostrado que la utilización de manano inhibe las funciones de DC-SIGN, por lo que la interacción del receptor con sus ligandos está mediada por carbohidratos similares a manosa. Como hemos mencionado anteriormente, en los linfocitos el ligando natural de DC-SIGN es ICAM-3, ya que este presenta oligosacáridos de alto contenido en manosa asociadas a N-glicosilaciones ([Funatsu et al., 2001](#)); de hecho, se ha confirmado que la eliminación enzimática de estos últimos anula por completo su unión a DC-SIGN.

Igualmente, aparte de estructuras ricas en manosa, DC-SIGN también puede reconocer al oligosacárido no sialilado de Lewis X (Le^x) y glicanos Le^y presentes en *Helicobacter pylori* y *Schistosoma mansoni* ([Gupta & Gupta, 2012](#)) y parece que el oligosacárido Lewis X (Le^x) posee mayor especificidad y afinidad en contraste con otros oligosacáridos ([J. Wang et al., 2007](#)).

El homólogo DC-SIGN murino, denominado mSIGNR1, al igual que el humano, también tiene especificidad por carbohidratos similares a manosa, presentes tanto en patógenos como en tejidos, interactuando con $\text{Le}^{x/y}$ y $\text{Le}^{a/b}$ y con el ligando de selectinas Le^x sialilada. En las células endoteliales, concretamente en ICAM-2, se encuentra el glucano Le^y , con el que interacciona en las células dendríticas, siendo esta interacción específica de glucanos ([Gupta & Gupta, 2012](#)).

Como hemos mencionado anteriormente, DC-SIGN puede actuar como un receptor endocítico. Esta unión de un ligando soluble a DC-SIGN incita una veloz internalización de la superficie celular mediante la acción de un motivo dileucina.

La lectina contiene en su cola citoplasmática un grupo triácido con dos motivos de internalización putativos, por lo que los complejos DC-SIGN-ligando se dirigirán a compartimentos lisosomales tardíos de bajo pH, donde las enzimas proteolíticas procesarán el ligando para la posterior presentación de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC II a los linfocitos T CD4+. Todo esto indica el importante papel de DC-SIGN como receptor antigénico ([Engering et al., 2002](#)).

6. Lectina de tipo C L-SIGN

La lectina de tipo C L-SIGN, también conocida con las denominaciones DC-SIGNR o CD209L, es una proteína homóloga de DC-SIGN con una estructura parecida. Los genes codificantes tienen

una alta homología así como una similitud aminoacídica de un 77% y una especificidad de unión similar ([Gupta & Gupta, 2012](#)).

CD209L es una proteína transmembrana de unión a carbohidratos dependiente de calcio, que puede actuar como receptor de adhesión celular. Este receptor no reconoce carbohidratos fucosilados, pero al igual que DC-SIGN tiene la capacidad de interaccionar con carbohidratos N-glicanos con alto contenido en manosa y actuar como receptor viral. En la superficie celular se encuentra en diferentes estados de oligomerización tetraméricos, que suelen tener una alta afección por una variedad de sustratos diferentes como envueltas víricas así como distintos patógenos ([Léger et al., 2016](#)).

L-SIGN se expresa en células endoteliales presentes en los sinusoides hepáticos (LSEC), en una subpoblación específica de células endoteliales similares a macrófagos presentes en los ganglios linfáticos, así como en una población de células presentadoras de antígeno residente en el hígado, células alveolares humanas tipo II, células endoteliales de pulmón, tracto gastrointestinal y placenta ([Bashirova et al., 2001](#); [Soilleux et al., 2001](#)) y a diferencia de DC-SIGN no se expresa en células dendríticas ([Rahimi, 2020](#)).

Durante mucho tiempo se ha considerado similares los genes CD209L y CD209, aunque hay que destacar que estudios bioquímicos y estructurales han demostrado que tienen distintas funciones fisiológicas y distintas propiedades de unión a ligandos.

A pesar de que ambas lectinas se unen a oligosacáridos con alto contenido en manosa, solo DC-SIGN es capaz de interactuar con antígenos de grupos sanguíneos; por otra parte, este es capaz de unir ligandos duales funcionando tanto en adhesión como en endocitosis de patógenos, liberando el ligando a pH endosómico. CD209L, sin embargo, se une a un grupo restringido de ligandos, y no es capaz de mediar la endocitosis ni liberar a pH endosómico ([Guo et al., 2004](#)).

La diferencia más notable se manifiesta en la región del cuello extendida con repeticiones en tándem de la proteína. Mientras que en el receptor DC-SIGN este dominio se mantiene más o menos conservado, en la lectina DC-SIGNR existe un fuerte polimorfismo. Se ha puesto de manifiesto que la unión de alta afinidad de los ligandos se ve afectada por la variabilidad en esta región, ya que las diferentes variantes polimórficas nacidas de la expresión heterocigótica de L-SIGN da lugar a distintas longitudes de cuello, que se ven afectadas directamente por la distinta afinidad de unión al ligando de la lectina ([Gupta & Gupta, 2012](#)).

No obstante, a pesar de las diferencias en ambos receptores, la alta homología que presentan ambas lectinas parece indicar que ambas evolucionaron a partir de un antiguo suceso de duplicación de genes. Esta duplicación génica conservaría uno de los duplicados con su función útil, mientras que su homólogo podría evolucionar mediante mutación, quedando libre para asumir nuevas funciones. Esto explicaría que, a diferencia de DC-SIGN, el polimorfismo en el cuello de L-SIGN

le otorgaría a este la diversidad necesaria compatible con la acción de equilibrar la selección en el proceso evolutivo ([Khoo et al., 2008](#)).

7. Escape inmunológico y rol de las DC en la diseminación viral

Las células dendríticas son, con mucha probabilidad, la primera línea de defensa ante una invasión patógena. Se ha demostrado que DC-SIGN expresada en células dendríticas juega un papel importante en la entrada y diseminación de diferentes virus. Tal vez el caso más conocido sea el del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Cuando el virus penetra en el organismo, este sigue una infección convencional en la que se unirá a su receptor CD4 que junto a CCR5 o CXCR4 entrará en el linfocito T CD4+, iniciando su ciclo de vida. Pero en el año 2000 se describió por primera vez una vía alternativa. Un receptor, CD209 o DC-SIGN, presente en las células dendríticas, reconocía los oligosacáridos altos en manosa presentes en la proteína gp120 del VIH ([Martín-moreno & Muñoz-fernández, 2019](#)). DC-SIGN no es un receptor del virus de la inmunodeficiencia humana, ya que no media la entrada viral en la célula, pero sí confiere a las células dendríticas la capacidad de facilitar la transinfección, es decir, capturar el virus y transmitirlo a células susceptibles que expresan los receptores necesarios para la entrada vírica. Este mecanismo se ha demostrado como una ruta importante para la diseminación del virus desde las superficies mucosas hasta su replicación en las células T presentes en los órganos linfoides secundarios mediante la unión de DC-SIGN en las células dendríticas inmaduras ([Geijtenbeek et al., 2000](#)).

Los factores de unión del hospedador son elementos importantes en los mecanismos de infección vírica, ya que aumentan la densidad de las partículas virales en las superficies celulares, aumentando su adhesión a las mismas y, por tanto, potenciando la el acceso a sus receptores reales ([Thépaut et al., 2021](#)). Estos mecanismos facilitan la infección en trans donde la presentación secundaria por células no permisivas evadiendo el sistema de reconocimiento inmunológico juega un papel, no solo en el virus del VIH, sino también otros virus.

Las lectinas DC-SIGN y L-SIGN son potenciales cofactores de unión y entrada para el virus Ébola (EBOV), ya que interaccionan con la glicoproteína del mismo, facilitando la entrada en cis y la infección en trans del virus en células endoteliales ([Alvarez et al., 2002](#)).

De la misma forma, se ha demostrado que el virus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) interacciona con L-SIGN en transinfección pero no en infección en cis ([Chan et al., 2006](#)), y que las células dendríticas pueden diseminar el virus SARS-CoV-1 mediante la interacción del mismo con la lectina DC-SIGN. Las células dendríticas no se infectaron directamente con el virus, pero sí pudieron unir mediante DC-SIGN la proteína S de SARS-CoV-1, transfiriendo el virus a células susceptibles ([Yang et al., 2004](#)).

El virus de la Hepatitis C (VHC) también interacciona con las lectinas de tipo C DC-SIGN y L-SIGN mediante la proteína E2 de su envoltura, siendo estos factores de unión de alta afinidad y siendo elementos que median la transmisión vírica a hepatocitos adyacentes ([Cormier et al., 2004](#); [Lozach et al., 2004](#)).

DC-SIGN y L-SIGN han demostrado ser receptores de entrada del virus Dengue (DENV), dando lugar a una infección productiva liberando viriones infecciosos capaces de diseminar la infección a células permisivas ([Tassaneeritthep et al., 2003](#)).

Capítulo II

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DE LA TESIS DOCTORAL

Capítulo II: Objetivos y justificación de la tesis doctoral

DC-SIGN, también llamado CD209, es una lectina de tipo C transmembrana que se expresa en células dendríticas (DCs) inmaduras siendo capaz de reconocer oligosacáridos con alto contenido en manosa, que, aunque son poco frecuentes en moléculas humanas, son habituales en virus y bacterias. Este hecho, convierte a este receptor de antígenos, en objetos de interés para el estudio y la investigación de los mecanismos de infección y diseminación virales.

DC-SIGN juega un papel substancial en la respuesta inmunológica mediando la activación de linfocitos T y desempeñando una serie de funciones para el control de la inmunidad y el desencadenamiento de sus respuestas.

DC-SIGN presenta un papel biológico doble; por un lado, desempeña funciones en la inducción de repuestas inmunes necesarias para la eliminación de microorganismos, por otro lado, los patógenos también son capaces de utilizar DC-SIGN para modular el funcionamiento de las células dendríticas donde se expresan, esquivando así la respuesta inmune.

Se ha demostrado que DC-SIGN puede participar en la entrada viral en un proceso de infección directa (en *cis*) y también puede influir en los mecanismos de diseminación viral capturando y transmitiendo partículas virales a células susceptibles en un proceso denominado en *trans*. Estas funciones se han propuesto en el ciclo vírico del VIH, Ébola, Zika, Dengue, SARS-CoV-1 entre otros virus, así como en el tráfico de células dendríticas, y la activación de linfocitos T, demostrando que la importancia de la expresión de DC-SIGN en estas células puede desempeñar un papel en los mecanismos de entrada y diseminación viral. Se ha evidenciado que la proteína S (Spike) del coronavirus SARS-CoV-1 se une al receptor DC-SIGN en el proceso conocido de infección en *trans*, mediando a posteriori la entrada viral a través de las células que expresan ACE2, mejorando la capacidad infectante del virus.

Por tanto, en la presente tesis doctoral, se quiere analizar la relevancia biológica de la lectina de tipo C DC-SIGN en los mecanismos de entrada y diseminación viral del nuevo coronavirus, estudiando su posible papel como receptor directo o receptor auxiliar del virus SARS-CoV-2.

De forma adicional también se quiso explorar el papel de DC-SIGN en los mecanismos de infección y diseminación viral de los coronavirus SARS-CoV-1 y MERS-CoV.

Por otro lado, el control de la gravedad de la COVID-19 ha resultado prioritario en el transcurso de la pandemia. El uso de anticuerpos monoclonales terapéuticos cuya diana es el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus SARS-CoV-2 para bloquear la infección al neutralizar las partículas virales, controlando así la enfermedad, ha sido utilizado ampliamente con éxito, pero la posible aparición de mutantes de escape ha puesto de manifiesto la necesidad de contar con anticuerpos cuya diana vaya dirigida a otros dominios de la proteína viral. En este escenario

resultan de especial interés los anticuerpos dirigidos al dominio N-terminal (NTD) de la proteína S del virus.

La presencia de estos anticuerpos dirigidos al dominio NTD en sueros de pacientes, podría inhibir la unión de la proteína S al receptor DC-SIGN, al bloquear la región de interacción con el mismo. Esto podría tener implicaciones en la patogénesis y la capacidad infectante del nuevo betacoronavirus ya que, un anticuerpo capaz de inhibir la interacción de DC-SIGN con el dominio NTD de la proteína S de SARS-CoV-2, anularía el papel de factor de unión de DC-SIGN al bloquear la interacción antígeno-receptor. Esto impediría la adhesión de partículas virales y el aumento de las mismas en la superficie celular por parte de DC-SIGN, dificultándose la infección a través del receptor canónico ACE2.

La identificación de nuevos anticuerpos anti-NTD de la proteína S del virus SARS-CoV-2 en sueros de pacientes que inhibiesen la interacción descrita en la presente tesis, con su receptor de unión DC-SIGN podría mejorar parcialmente el entendimiento del mecanismo de patogénesis del virus SARS-CoV-2, así mismo, la identificación y el posterior aislamiento de dichos anticuerpos, podría resultar una herramienta terapéutica alternativa para el control de la COVID-19 en los pacientes más graves.

Se establece así, como objetivo, estudiar la implicación del receptor DC-SIGN en la patogénesis del virus SARS-CoV-2 mediante la búsqueda de anticuerpos anti-NTD de la proteína S del virus en sueros de donantes vacunados y/o convalecientes.

De forma adicional, dada la relevancia de los coronavirus en el contexto actual de pandemia por COVID-19, también se quiso explorar el papel de DC-SIGN en los mecanismos de infección y diseminación viral de los coronavirus SARS-CoV-1 y MERS-CoV.

Capítulo III

MATERIALES Y METODOS

Capítulo III: Materiales y Métodos

1. Líneas celulares

293T (ATCC ® CRL-3216 TM), también conocidas como HEK-293 son células de riñón embrionario humano generadas por ADN de Adenovirus-5 (Ad5) ([Graham et al., 1977](#)) a partir de un feto sano abortado de forma legal bajo la ley alemana. Esta línea celular contiene el antígeno mayor T del virus de simio 40 (SV40).

293T ACE2, son células HEK-293T que expresan constitutivamente la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE2). La línea celular HEK-293T-hACE2 se creó transduciendo células HEK-293T con un vector lentiviral que expresa ACE2 bajo el control del promotor del factor de elongación humano 1a (EF1a). La línea celular se obtuvo a través de BEI Resources, NIAID, NIH: Human Embryonic Kidney Cells (HEK-293T) Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2, HEK-293T-hACE2 Cell Line, NR-52511.

293T KO hNPC1, se tratan de células 293T a las cuales mediante el sistema de CRISPR se le ha inutilizado el gen NPC1 para obtener células estables que no expresen la proteína humana Niemann-Pick de tipo C1 (hNPC1), la cual es necesaria para la infección del virus Ébola al ser este su receptor. La generación de esta línea celular se efectuó en el laboratorio del Dr. Rafael Delgado y fue realizado por la Dra. Joanna Luczkowiak.

Vero E6, originalmente el linaje Vero fue aislado a partir de una línea celular epitelial de riñón de mono verde africano por Y. Yasumura and Y. Kawakita en 1962 ([Yasumura & Kawakita, 1963](#)). Las Vero E6 son un subclon de Vero 76.

BHK-21, así llamadas por sus siglas en inglés “Baby Hámster Kidney” inicialmente se derivaron de riñones de crías de hámster de un día de edad pertenecientes a la especie *Mesocricetus auratus*, comúnmente conocido como hámster dorado sirio. Inicialmente se trataba de una mezcla de células epiteliales y fibroblastos donde pronto predominan estos últimos ([Stoker & Macpherson, 1964](#)). La línea celular se obtuvo a través de Kerafast, BHK-21/WI-2 cells for Generating VSV, Referencia: EH1011.

Calu-3 2B4, es una línea celular epitelial de adenocarcinoma de pulmón. Las 2B4 son concretamente una población clonal clasificada para la expresión de ACE2. Esta línea celular ha sido proporcionada por el Dr. Luis Enjuanes (CNB-CSIC, Madrid, España).

Jurkat, es una línea inmortalizada de linfocitos T células que expresan CD4 en su superficie a partir de la sangre periférica de un enfermo de leucemia linfocítica aguda (LLA) ([Schneider et al., 1977](#)).

Jurkat DC-SIGN gfp, son células Jurkat transducidas con un vector retroviral recombinante a partir del plásmido pNGVL-VSV-G - que codifica la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), pNGVL-MLV-gag-pol - que codifican las proteínas de la cápside y matriz del virus de la leucemia murina (MLV), y LZR-DC-SIGN-CITE-GFP – que codifica la secuencia de DC-SIGN junto con el reportero de la proteína fluorescente verde (GFP) para expresar el receptor DC-SIGN en la superficie celular. La expresión de DC-SIGN fue cuantificada y comprobada mediante citometría de flujo.

Jurkat DC-SIGN PMX, son células Jurkat que expresan la lectina DC-SIGN y carecen del gen reportero gfp.

Raji, es una línea celular derivada de linfocitos B humanos a partir de la maxila izquierda de un paciente con linfoma de Burkitt ([Pulvertaft, 1965](#)).

Raji DC-SIGN, son células Raji transducidas para expresar DC-SIGN de forma estable en su superficie.

Jurkat L-SIGN, células Jurkat transducidas con un vector retroviral recombinante que codifican el gen del receptor L-SIGN, proteína homóloga del receptor DC-SIGN.

Jurkat Langerina, son células Jurkat que expresan de forma estable el receptor Langerina también llamado CD207. La Langerina es una lectina tipo C, transmembrana tipo II presente en las células de Langerhans.

2. Generación de células inmortalizadas

Se generaron líneas celulares inmortalizadas 293T que expresan las lectinas de tipo C DC-SIGN y L-SIGN. Para ello se construyeron retrovirus recombinantes del virus de la leucemia murina (MLV) con los vectores LZR-DC-SIGN-Cite-gfp, LZR-L-SIGN-Cite-gfp y PMX-DC-SIGN mediante transfección con Lipofectamina 3000 (Invitrogen).

Un día antes de la transducción celular, se sembraron 2.5×10^6 células 293T en una placa de 6 pocillos (Corning). 24 horas más tarde se infectaron con los retrovirus a una MOI: 3-5 dejándose incubar a 37°C durante 24 horas, para a continuación remplazar el medio por DMEM al 5% de suero bovino fetal inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina. Los siguientes días se fue observando el crecimiento celular y remplazando el medio de cultivo hasta la llegada del mismo a un 90% de confluencia.

La expresión positiva y estable de la lectina DC-SIGN gfp y L-SIGN gfp en células 293T transducidas fue confirmada mediante la luminiscencia de gfp observada a través del microscopio digital EVOS M5000 (Invitrogen). La línea celular fue purificada utilizando bolas magnéticas marcadas con el anticuerpo humano Anti-DC-SIGN (R&D Systems, Cat: MAB161-100) y columnas de hierro (Miltenyi Biotec). Las células fueron contadas mediante cámara de Neubauer y se resuspendieron 10^7 células en 80 µl de buffer PBS 0,5% suero bovino fetal inactivado con calor, 2 mM EDTA a pH 7,2 y 20 µl de bolas magnéticas, dejando las células en incubación 15 minutos en refrigeración a 4°C.

Tras la incubación se añadió 1 ml de buffer y se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. Se aspiró completamente el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µl del mismo buffer. Una vez resuspendidas se traspasaron a la columna magnética, lavándose la misma tres veces con 500 µl de buffer. Finalmente, se eluyó en 1 ml de buffer en una placa de 10 centímetros (Corning) y se añadieron 10 ml de medio DMEM al 10% de suero bovino fetal inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina, dejándose incubar a 37°C con 5% CO₂.

3. Plásmidos

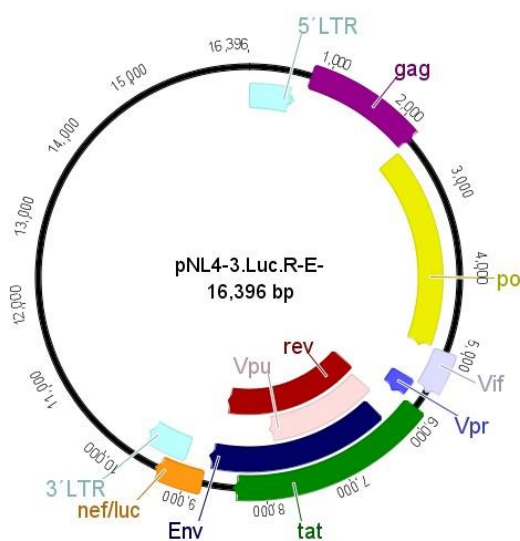
Todos los plásmidos sintetizados en la presente tesis contienen las secuencias Kozak y fueron optimizados para mejorar la traducción de proteínas en el sistema eucariota.

pSARS-CoV-2 S HexaPro, vector pαH de expresión que contiene la secuencia optimizada de la proteína estabilizada Spike soluble de SARS-CoV-2. Contiene 6 prolinas para su estabilización (mutaciones F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P) y el sitio de escisión RRAR por Furina S1/S2 (682-685) ha sido reemplazado por GSAS. Contiene en su dominio C-terminal un dominio

de trimerización del fago T7 y una etiqueta de 8x His y 2x Strep para su purificación. Este plásmido fue adquirido en Addgene (Cat: 154754).

pNGVL-MLV-gag-pol, vector de expresión que codifica el cDNA del virus de la leucemia murina (MLV), concretamente de los genes *gag* responsable de las proteínas estructurales de la partícula y de *pol* que codifica para la DNA polimerasa del virus. Este plásmido fue cedido por el Dr. G. Nabel de University of Michigan (Michigan, US).

pNL4-3.Luc.R-E-, vector de VIH-1 que contiene los genes *Env*, *Nef* y *Vpr* defectivos, el gen de luciferasa de luciérnaga como reportero. Este plásmido contiene las secuencias 5' (1-634) y 3' (9076-9709) LTR del virus, *gag* (790-2292), *pol* (2085-5096), *rev* (5969-8643), *tat* (5830-8414), *env* (6221-8785), *vpu* (6061-6306), *vif* (5041-5619), *nef/luc* (8787-9407) y *vpr* (5559-5849) necesarios para la construcción del esqueleto VIH-1, lo que hace necesario contranfectar con un vector de expresión que codifique la envuelta del virus a estudiar para producir partículas infecciosas. Este plásmido se adquirió en NIH AIDS Reagent Program (Ref: ARP- 3418).



pSARS-CoV-2, vector de expresión que codifica la proteína de la espícula de la envuelta (S) optimizada de SARS-CoV-2. La secuencia está basada en la cepa de referencia Wuhan-Hu-1 del 4 de enero del 2020 (Genbank: NC_045512). Este plásmido fue cedido por el Dr. Juan García Arriaza (CNB-CSIC, Madrid, España).

pSARS-1, vector de expresión que codifica la proteína de la espícula de la envuelta (S) optimizada de SARS-1 bajo un promotor Enhanced de CMV. La secuencia está optimizada para una mejor expresión de la proteína. Este vector se adquirió en SinoBiological (Cat: VG40150-G-N) y la secuencia aminoacídica es idéntica a la secuencia de SARS coronavirus CUHK-W1 (GenBank AAP13567.1).

pVSV-ΔG-Luciferase Plasmid Expression Vector, este plásmido codifica ARN en sentido antígenómico las proteínas de la nucleocápside (N), fosfoproteína (F), y la subunidad grande de la

polimerasa (L) del virus de la estomatitis vesicular (VSV). El ARN antigenómico de Δ G-Luciferasa se expresa a partir del promotor del bacteriófago T7 el cual se encuentra unido directamente a la secuencia 5', este vector se ha modificado para contener la secuencia no codificante de la ribozima de la hepatitis delta (VHD) al sitio 3' necesaria para la generación del ARN antigenómico. El gen de la glicoproteína (GP) se ha reemplazado por el gen de luciferasa de luciérnaga. Este vector se adquirió en Kerafast (Cat: EH1007).

VSV- Δ G-GFP Plasmid Expression Vector, plásmido que codifica ARN de sentido antigenómico del virus de la estomatitis vesicular (VSV) donde el gen de la glicoproteína (GP) ha sido sustituido por el gen de la proteína verde fluorescente o Green fluorescent protein (GFP). Este plásmido codifica ARN en sentido antigenómico las proteínas de la nucleocápside (N), fosfoproteína (F), y la subunidad grande de la polimerasa (L) del virus de la estomatitis vesicular (VSV). El ARN antigenómico de Δ G-GFP se expresa a partir del promotor del bacteriófago T7 el cual se encuentra unido directamente a la secuencia 5', este vector se ha modificado para contener la secuencia no codificante de la ribozima de la hepatitis delta (VHD) al sitio 3' necesaria para la generación del ARN antigenómico. Este vector se adquirió en Kerafast (Cat: EH1003).

pBS-N-T ϕ , vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la proteína de la nucleocápside (N) del virus de la estomatitis vesicular. Es necesario la infección con un virus recombinante de Vaccinia que codifique para el bacteriófago T7 para la expresión del vector. Este plásmido se adquirió en Kerafast (Cat: EH1012).

pBS-P-T ϕ , vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la fosfoproteína (P) del virus de la estomatitis vesicular. Es necesario la infección con un virus recombinante de Vaccinia que codifique para el bacteriófago T7 para la expresión del vector. Este plásmido se adquirió en Kerafast (Cat: EH1012).

pBS-L-T ϕ , vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la proteína la subunidad grande de la polimerasa (L) del virus de la estomatitis vesicular. Es necesario la infección con un virus recombinante de Vaccinia que codifique para el bacteriófago T7 para la expresión del vector. Este plásmido se adquirió en Kerafast (Cat: EH1012).

pBS-G, vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la glicoproteína de la envuelta (G) del virus de la estomatitis vesicular. Es necesario la infección con un virus recombinante de

Vaccinia que codifique para el bacteriófago T7 para la expresión del vector. Este plásmido se adquirió en Kerafast (Cat: EH1012).

14AGW3 SC_pcDNA 3.1 (+) Makona Ebola_GP, vector de expresión que contiene la secuencia optimizada de la glicoproteína (GP) del virus Ébola Zaire bajo la expresión de un promotor de Citomegalovirus (CMV). La secuencia está basada en la cepa de referencia Makona (GenBank: KM233102). Este plásmido fue adquirido en Life Technologies.

LZR-DC-SIGN-Cite-gfp, plásmido que codifica la envuelta del receptor DC-SIGN y el gen reportero gfp con expresión en la membrana celular. Además, este plásmido contiene las secuencias 3' y 5'LTR del virus de la Inmunodeficiencia humana tipo 1 responsables de la integración de la lectina en la célula eucariota.

LZR-L-SIGN-Cite-gfp, plásmido que codifica la envuelta del receptor L-SIGN y el gen reportero gfp con expresión en la membrana celular. Además, este plásmido contiene las secuencias 3' y 5'LTR del virus de la Inmunodeficiencia humana tipo 1 responsables de la integración de la lectina en la célula eucariota.

pACE2, plásmido que contiene la secuencia de la proteína humana de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). El gen *ACE2* (689-3136) se encuentra bajo un promotor *CMV enhancer* (1-380), promotor *CMV* (381-584) y contiene una secuencia de resistencia a Ampicilina (6583-7443). Este plásmido fue cedido por el Dr. Andrea Cara de Istituto Superiore di Sanità (Roma, Italy).

pSpike_501Y_V2, plásmido que contiene la secuencia de la proteína Spike del linaje B.1.351 también conocido como Beta, 20H / 501Y.V2 o variante sudafricana. Este linaje contiene las mutaciones D80A, D215G, A701V, N501Y, E484K, K417N y N614G. El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+).

Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia GISAD: hCoV-19/ SouthAfrica /N00344/ 2020/ EPI_ISL_712096.

pSpike_B.1.1.7, vector de expresión que codifica la envuelta de la proteína Spike perteneciente al linaje B.1.1.7 también conocido como Alpha, 20I / 501Y.V1 Variant of Concern (VOC) 202012/01 o variante británica. Este linaje contiene las mutaciones N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A,

D1118H, N614G además de una delección en 69/70. El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+).

Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia GISAD: hCoV-19/England/CAMC-A64871/2020/ EPI_ISL_608430.

pSpike_P_1, vector de expresión que contiene la secuencia de la envuelta Spike perteneciente al linaje B.1.1.28 también conocido como Gamma, P1 o variante brasileña. Este linaje contiene las mutaciones K417T, E484K, N614G y N501Y en RBD. El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+).

Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia GISAD: hCoV-19/Brazil/AM-20843269RC /2020/ EPI_ILS_833140.

pSpike_B.1.617.2, vector de expresión que contiene la secuencia de la envuelta Spike perteneciente al linaje B.1.617.2 también conocido como Delta o variante india. Este linaje contiene las mutaciones T19R, E156G DEL 157/158, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, T19R, E156G, DEL157/158, L452R, T478K, D614G, P681R y D950N. El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+). Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia GISAD: EPI_ILS_1970335.

pOMICRON, vector de expresión que contiene la secuencia de la envuelta Spike perteneciente al linaje B.1.529 también conocido como Omicron, variante BA1. El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+). Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia GISAD: EPI_ISL_6640917.

pMERS, vector de expresión que contiene la secuencia de la envuelta Spike del coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente medio (MERS-CoV). El gen se encuentra clonado en un pCDNA 3.1 (+). Este plásmido fue sintetizado por GeneArt Gene Synthesis (Invitrogen) usando como secuencia de referencia HCoV-EMC/2012 (GeneBank: NC_019843).

pRSV-Rev, vector de expresión lentiviral que contiene la secuencia de la proteína Rev de VHI-1 bajo el control transcripcional del promotor RSV U3. Se trata de un plásmido perteneciente al sistema lentiviral de tercera generación. Este plásmido fue adquirido en Addgene (Cat: 12253).

pMDLg/pRRE, vector de expresión lentiviral que contiene las secuencias de *gag* la cual codifica las principales proteínas estructurales del virión, *pol* que codifica para las enzimas virales *transcriptasa inversa* (RT), la *integrasa* (IN) y la *proteasa* (PR), y RRE el cual es un sitio de unión para la proteína Rev la cual se encarga de la exportación del ARNm desde el núcleo. Se trata de un plásmido perteneciente al sistema lentiviral de tercera generación. Este plásmido fue adquirido en Addgene (Cat: 12251).

pRRLSIN.cPPTLuciferase.WPRE, vector de expresión lentiviral que codifica para el gen reportero luciferasa de luciérnaga. Este plásmido se adquirió en Addgene (Cat: 69251).

4. Virus replicativo

4.1. Vaccinia Virus rVV-18R-T7

Virus recombinante de la viruela (rVV) de la cepa Ankara que codifica el ARN de la polimerasa del bacteriófago T7 y que tiene delecionado el gen del receptor soluble de interferón tipo I B18R para eludir el estado antiviral. El gen del bacteriófago T7 se encuentra subclonado en un plásmido pSC11 bajo el control del promotor p7.5 para generar el plásmido pSC-T7. Este plásmido contiene el gen de E.coli *LacZ* bajo el control del promotor de Vaccinia *p11*. Ambos genes, tanto la polimerasa T7 como E. coli *LacZ* se encuentran flanqueados por las secuencias del gen *Timidina quinasa* del virus Vaccinia.

La infección en células con rVV produce la expresión la polimerasa del bacteriófago T7, necesaria para la expresión de las proteínas de VSV en la transfección con los plásmidos pBS-N-T ϕ , pBS-P-T ϕ , pBS-L-T ϕ y pBS-G. La generación de estos virus mediante genética reversa fue usada para la recuperación de virus recombinantes del virus de la estomatitis vesicular (rVSV). Este virus se adquirió en Kerafast (Cat: EH1021).

La titulación del virus Vaccinia se realizó siguiendo el protocolo de M.Whitt ([Whitt, 2010](#)).

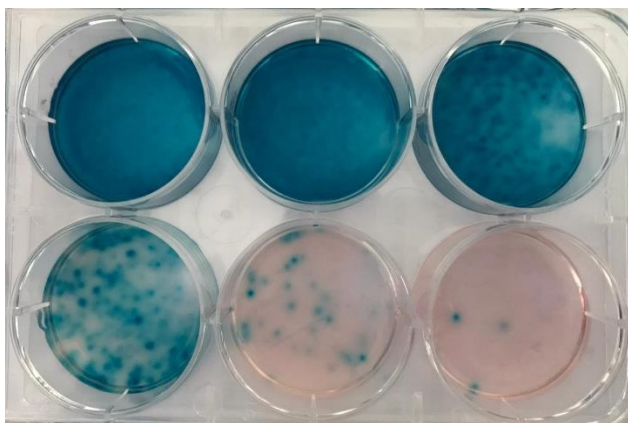


Imagen 1. Titulación del virus Vaccinia. Titulación mediante diluciones seriadas del virus Vaccinia el cual expresa β -Galactosidasa que hidroliza el X-gal formando placas azules. La última dilución detectada mediante la formación del color corresponde a 10^{-8} .

4.2. SARS-CoV-2

El virus replicativo SARS-CoV-2 con la mutación en Spike N614G, es un aislado clínico nasofaríngeo de un paciente varón inmunocomprometido, extraído en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, España, GISAID: EPI_ISL_1120962).

4.2.1. Cultivo y titulación del virus replicativo SARS-COV-2

El virus replicativo SARS-CoV-2 (aislado clínico 213196167, pase 2, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España) se cultivó en células Vero E6 en frascos de cultivo de 25 centímetros con medio de cultivo DMEM al 2% de suero bovino fetal inactivado por calor, 25mg de Gentamicina y 2mM L-glutamina.

Se fue adicionando medio fresco a las células según la aparición de efecto citopático (ECP) en las mismas. A continuación, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y se almacenó a -80°C para posteriores experimentos.

La titulación vírica se calculó en base a la dosis infecciosa del cultivo al 50% (DICT50) y se determinó siguiendo el siguiente procedimiento ([Amanat et al., 2020](#)).

Se sembraron 2×10^4 células Vero E6 en placa de 96 pocillos (Corning) con medio de cultivo DMEM con 10% de suero bovino fetal el día antes del experimento. Las células se infectaron con una dilución en serie en base 10 del virus replicativo en sextuplicado y se le añadió medio de cultivo DMEM al 5% de suero bovino fetal dejándose incubar a 37°C durante 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se lavaron un par de veces las células Vero E6 con PBS, para a continuación, ser fijadas con 150 µl de una solución de metanol que contenía paraformaldehído al 10% durante 24 horas a 4°C.

Al día siguiente, se retiró el medio de fijación y se lavaron tres veces las células con 200 µl de PBS, para seguidamente, permeabilizar las Vero E6 con 150 µl de PBS que contiene 0,1% Triton X-100, dejándose incubar 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células tres veces con 200 µl de PBS para seguidamente, dejar bloqueando la monocapa celular añadiendo 200 µl PBS con 0,1% de Tween 20 (Sigma) (PBST) y 3% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se descartó el buffer y se añadió a las células 100 µl del anticuerpo diluido 1:1000 en PBST con 1% de leche desnatada rabbit anti-SARS-CoV Nucleocapsid antibody (#200-401-A50, Rockland Immunochemicals, Inc.) dejándose incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación del anticuerpo primario, se lavó la placa con 100 µl de PBS tres veces, para seguidamente añadir 100 µl del anticuerpo secundario anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074, Cell Signaling Technology) diluido 1:1000 en PBST con 0,1% de leche desnatada. Se dejó incubar 1 hora. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células

tres veces con 100 µl de PBS y se añadió 100 µl del revelador OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina) SIGMAFAST OPD (Sigma–Aldrich) dejándose incubar 10 minutos. La reacción se paró con 50 µl de ácido clorhídrico 3M.

La cuantificación se realizó mediante densidad óptica a 490 nm (OD490) con el fotómetro de placas Thermo Scientific Multiskan FC plate reader (Thermo Fisher Scientific).

La coloración amarillo-anaranjado producida por el sustrato (OPD) de la peroxidasa de rábano picante (HRP) es detectada dando un resultado numérico. La señal positiva se seleccionó calculando la media de los controles negativos más 3 desviaciones estándar.

La TCID₅₀ por sus siglas en inglés “50% Tissue Culture Infectious Dose” la cual nos indica la cantidad de virus necesario para destruir o producir efecto citopático (ECP) en el 50% de las células o cultivos infectados, del virus replicativo SARS-CoV-2 se calculó mediante el método de Reed-Muench ([Reed & Muench, 1938](#)).

5. Mutagénesis

5.1. Mutantes y PCR

SARS-CoV-2 N614G, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagénesis Kit, Biolabs) en el cual se cambió el aminoácido de la cepa original Wuhan-Hu-1 el ácido aspártico (D) por una Glicina (G) en la posición aminoacídica 614. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-2 614G Fw:** GCTGTACCAGGCGTGAAGTGTGA
- **SARS-CoV-2 614G Rv:** ACTGCCACCTGATTGCTG

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de la cepa original SARS-CoV-2 WuhanHu-1 (Genbank: NC_045512) usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 614G Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 614G Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico pSARS-CoV-2 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 66°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

SARS-CoV-2 Δ21 C-T, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs) en el cual se delecionaron los 21 últimos aminoácidos en C-terminal de la cepa original Wuhan-Hu-1 para el aumento de expresión de la proteína consiguiendo una mayor eficiencia en la generación de partículas virales. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw:** TGAATGTTCGTGTTTCTGGTG
- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv:** GCTGCCACAGCTACAACA

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de SARS-CoV-2 WuhanHu-1 (Genbank: NC_045512) usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico pSARS-CoV-2 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

SARS-CoV-1 Δ21 C-T, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs) en el cual se delecionaron los 21 últimos aminoácidos en C-terminal del plásmido de expresión pSARS-1 (SinoBiological, Cat: VG40150-G-N) para el aumento de expresión de la proteína consiguiendo una mayor eficiencia en la generación de partículas virales. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-1 Δ21 C-T Fw:** TAAATGTTCATCTTCCTGCTGTTCC
- **SARS-CoV-1 Δ21 C-T Rv:** GGAGCCACAGGAACAGGC

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) del plásmido de expresión pSARS-1 (SinoBiological, Cat: VG40150-G-N) usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-1 Δ21 C-T Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-1 Δ21 C-T Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico SARS-CoV-1 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 66°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

pSpike_501Y_V2 Δ21 C-T, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante del linaje B.1.351 de SARS-CoV-2 producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs) en el cual se delecionaron los 21 últimos aminoácidos en C-terminal del plásmido de expresión pSpike_501Y_V2 (Invitrogen) para el aumento de expresión de la proteína consiguiendo una mayor eficiencia en la generación de partículas virales. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw:** TGAATGTTCGTGTTTCTGGTG
- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv:** GCTGCCACAGCTACAACA

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de la variante sudafricana usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico pSpike_501Y_V2 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

pSpike_B.1.1.7 Δ21 C-T, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante del linaje B.1.1.7 de SARS-CoV-2 producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs) en el cual se delecionaron los 21 últimos aminoácidos en C-terminal del plásmido de expresión pSpike_B.1.1.7 (Invitrogen) para el aumento de expresión de la proteína

consiguiendo una mayor eficiencia en la generación de partículas virales. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw:** TGAATGTTCGTGTTTCTGGTG
- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv:** GCTGCCACAGCTACAACA

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de la variante británica usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico pSpike_B.1.1.7 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

Spike_P_1 Δ21 C-T, plásmido de expresión de la proteína de la espícula (S) mutante del linaje B.1.1.28 de SARS-CoV-2 producido mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagénesis Kit, Biolabs) en el cual se delecionaron los 21 últimos aminoácidos en C-terminal del plásmido de expresión Spike_P_1 (Invitrogen) para el aumento de expresión de la proteína consiguiendo una mayor eficiencia en la generación de partículas virales. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw:** TGAATGTTCGTGTTTCTGGTG
- **SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv:** GCTGCCACAGCTACAACA

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de la variante brasileña usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV-2 Δ21 C-T Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico pSpike_P_1 a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 63°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

SARS-CoV PP-HexaPro, plásmido construido a partir de la envoltura de SARS-CoV-1 reclonada en el vector pαH-HexaPro (ver materiales y métodos 11.) en el cual se introdujo una sustitución consistente en dos prolinas. La presencia de estos dos residuos consecutivos al comienzo de la hélice central aumentan los niveles de expresión de los ectodominios estabilizando la conformación prefusión de la proteína ([Pallesen et al., 2017](#)).

La sustitución de los aminoácidos Lisina (K) y Valina (V) fue realizada mediante PCR de mutagénesis (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs), introduciendo 2 prolinas (PP) consecutivas en las posiciones aminoacídicas 1574 y 1573. Los cebadores utilizados en la mutagénesis fueron:

- **SARS-CoV PP Fw:** CAGACTGGACCCTCCAGAGGCTGAGG
- **SARS-CoV PP Rv:** CTCAGGATGTCATTTCAGC

El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia de la proteína de la espícula (S) de SARS coronavirus CUHK-W1 (GenBank AAP13567.1) usando la herramienta NEBaseChanger® V1.3.0.

La mezcla de reacción utilizada en el ensayo estaba compuesta por 12.5 µl de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1.25 µl del cebador SARS-CoV PP Fw a concentración 10 µM, 1.25 µl del cebador SARS-CoV PP Rv a concentración 10 µM, 9 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del ADN plásmidico SARS-CoV PP-pαH-HexaPro a una concentración de 25 ng.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 30 segundos de desnaturalización inicial a 98°C, 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 57°C y 7 minutos a 72°C, seguido de una extensión final de 2 minutos a 72°C.

5.2. Quinasa, Ligasa, DpnI

El producto de PCR amplificado y mutado necesitó de su recircularización y purificación eliminando los amplicones del plásmido de origen.

Tras el ensayo de amplificación se realizó un tratamiento con tres enzimas denominado KLD por sus siglas en inglés (Kinasa, Ligasa, DpnI), donde la enzima Quinasa fosforila el ADN amplificado, la enzima Ligasa es responsable de la recircularización del plásmido (necesitando en este un fosforo en su 5' para poder cerrarlo), y la enzima de restricción de tipo II DpnI, la cual corta los enlaces fosfodiéster dentro de la cadena de nucleótidos escindiendo solo el ADN metilado en la adenosina del sitio de reconocimiento GATC 5', ya que solo tiene actividad de restricción, efectuando el corte en el mismo sitio de reconocimiento o bien cerca de él, por lo que el corte es resistente y predecible. Solo necesita Mg^{+2} como cofactor, no necesita de ATP.

5.3. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes consiste en la introducción del producto de ligación en una bacteria, concretamente en *Escherichia coli* químicamente competentes (Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit, Biolabs).

Para la transformación se añadieron 5 µl de la reacción de ligación obtenida previamente descrita a 50 µl de células competentes, para someterlas posteriormente a un choque térmico consistente en 30 minutos de incubación en hielo, seguidos de 30 segundos a 42°C en termobloque (peqLab, Biotechnologie GmbH) y finalizados en 5 minutos de hielo. Finalmente se añadieron 950 µl de medio SOC dejándose incubar a 37°C durante 1 hora en agitación a 200 rpm.

5.4. Siembra de colonias transformadas

Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo de sales reducidas al mínimo LB agar de Miller (Difco™ LB Agar Miller Luria-Bertani, BD) con Ampicilina y se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se chequearon las colonias crecidas y se añadieron individualmente a 5 ml de medio LB Broth (Lennox, Condalab) con ampicilina y se dejaron incubar a 37°C en agitación a 200 rpm toda la noche.

5.5. Purificación de ADN plasmídico

Continuando el proceso de clonación, se purificó el ADN plasmídico mediante la técnica comercial Miniprep (High Purity Plasmid Miniprep Kit, NeoBiotech). Para ello se recogieron 3 ml del caldo de cultivo de las bacterias y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos.

Pasado el tiempo de centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 250 µl de buffer de resuspensión, tras lo cual se traspasó el contenido a un Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 250 µl de buffer de lisis para romper las membranas celulares y liberar el inserto de interés al medio, dejándolo actuar durante 5 minutos.

Una vez finalizada la lisis, se añadieron 350 µl de buffer de neutralización y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se traspasó el sobrenadante a una columna y se recentrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto para, posteriormente realizar una serie de lavados en los que se añadieron 700 µl de buffer W10 y 700 µl de buffer W9 con una centrifugación intermedia de 1 minuto a 12.000 rpm. Finalmente se centrifugaron en seco para asegurar el eliminado del buffer de lavado y se eluyó el ADN purificado añadiendo 30 µl de buffer de TE.

El purificado se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop LCR) para conocer los parámetros de pureza y concentración mediante la ley de Lambert-Beer y se conservó a -20°C hasta su utilización.

Tras la Miniprep se realizó una PCR de secuenciación para la comprobación de la correcta introducción de la mutación en la secuencia del inserto diana, tras ello se realizó una segunda purificación de mayor volumen para la obtención de una mayor concentración de ADN plásmidico en una técnica comercial denominada Maxiprep (PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit, Invitrogen).

Tras la comprobación de la mutación en los vectores de expresión, se preparó el volumen a purificar para la Maxiprep, para ello se añadieron 150 µl del caldo de cultivo de bacterias con el inserto de interés y 150 ml de medio LB Broth (Lennox, Condalab) con ampicilina y se dejó incubar toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.

Al día siguiente, se centrifugó el caldo de cultivo bacteriano a 4000 g durante 10 minutos, tras ello se decantó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de buffer de equilibrado (EQ1) a las columnas del kit. Mientras las columnas se equilibraban, se añadieron 10 ml del buffer de resuspensión (R3) al pellet celular y se agitó en vórtex (Vortex TopMix FB15024, Fisher Scientific) hasta homogeneización. Seguidamente se añadieron 10 ml de buffer de lisis (L7) para romper las membranas celulares y se incubó 5 minutos, para a continuación, neutralizar su acción con 10 ml de buffer de neutralización (N3). El contenido se traspasó a las columnas ya equilibradas.

Tras la elución del caldo bacteriano, se descartó la columna interna con el filtrado y se lavó la columna con 50 ml de buffer W8 y se realizó la elución el ADN plásmidico unido a la columna con 15 ml de buffer E4.

Inmediatamente, se realizó la precipitación del vector con el inserto de interés, para ello se añadieron 10,5 ml de Isopropanol al eluido y se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de etanol 70% al pellet celular,

se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet bacteriano. Una vez seco, se añadieron 150 µl de buffer TE y se congelaron a -20°C.

5.6. Comprobación de la mutación mediante PCR de secuenciación

La presencia de la mutación generada se comprobó mediante una PCR de secuenciación en la que se añadió 1 µl del plásmido purificado en Miniprep a una concentración de 200 ng/ µl a una mezcla de reacción (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) de 1 µl de BigDye, 1 µl de Buffer 5x, 5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del cebador de la envuelta vírica. Las condiciones de PCR de secuenciación fueron una desnaturalización inicial de 96°C durante 1 minuto, 25 ciclos de 2 minutos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 1 minuto a 60°C.

El producto de amplificación se preparó precipitando el ADN para la secuenciación. Para ello a cada muestra se le añadieron 25 µl de Etanol 100% y 1 µl de Acetato Sódico y se centrifugó a 2000 g durante 20 minutos. Pasado el tiempo se retiró el sobrenadante y se añadieron 150 µl de Etanol 70% y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Finalmente se retiró el medio y se añadieron 20 µl de Formamida. La secuenciación de Sanger posterior se realizó con el secuenciador de ADN 3130 XL (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación Genómica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital 12 de octubre (Madrid).

El análisis de las secuencias se realizó en el programa Geneious V6.1.8.

6. Construcción de virus recombinantes

6.1. Titulación del virus de la Viruela (Vaccinia Virus)

Para la recuperación primaria del VSV se usó el sistema de expresión de la ARN polimerasa de Vaccinia T7 desarrollado por Thomas Fuerst y Bernie Moss ([Fuerst et al., 1986](#)) siendo necesario una infección de rVV a una multiplicidad de infección (MOI) adecuada, es decir el número de genomas virales que infecta una célula. Esta MOI se expresa como el título vírico dividido entre el número de células a infectar.

Se efectuó una titulación de Vaccinia Virus rVV-18R-T7 (Kerafast). Para ello se sembraron 3×10^5 células BHK-21 en placa de 6 pocillos (Corning) con medio DMEM (BioWhittaker Europe) Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa suplementado al 10% de suero bovino fetal, inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina y se dejó crecer toda la noche.

Se realizaron diluciones seriadas de rVV en Opti-MEM (Gibco) para realizar posteriormente infecciones de MOI: 0.1 a 0.5.

La monocapa de BHK-21 se lavó varias veces con Opti-MEM para eliminar el posible suero presente en las células y se añadió la dilución correspondiente de rVV. Se dejó el virus adsorber durante 1 hora a 37°C, seguidamente se retiró el inoculo y se añadió medio DMEM con 5% de suero bovino fetal dejándose incubar durante 48 horas a 37°C hasta la visualización de efecto citopático (ECP).

Tras dos días, se retiró el medio de la placa y se añadió medio DMEM con 5% de suero bovino fetal, 0.9% de Bacto-Agar calentado hasta disolución y enfriamiento a 50°C con 0.033% X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Se dejó incubar a 37°C durante 30-60 minutos hasta que se detectó la formación de color.

La titulación se realiza situando el límite de la detección de coloración en la última dilución realizada.

6.2. Virus recombinante de la estomatitis vesicular (VSV)

Para la producción de pseudotipos o partículas víricas recombinantes con envueltas heterólogas basadas en VSV es necesario poseer virus recombinantes de VSV sin la secuencia de su glicoproteína integrada en el genoma (rVSV- Δ G) para poder generar dichas partículas. Para ello se produjeron stocks de rVSV- Δ G ([Whitt, 2010](#)) según la metodología descrita a continuación.

6.2.1. Recuperación primaria del virus

En primer lugar, se realizó una recuperación primaria del virus, para ello se sembraron $2-5 \times 10^5$ células BHK-21 a una confluencia del 90-95% en placa de 6 pocillos (Corning). Al día siguiente se infectó la placa con virus recombinante de Vaccinia (rVV) que expresa el ARN de la polimerasa del bacteriófago T7 a una MOI: 5 (ver materiales y métodos 4.1.). Se incubó a 37°C durante 45 minutos.

Por otro lado, se prepararon las mezclas de transfección (Lipofectamine™ 3000, Invitrogen™) en el tubo A se añadieron 500 μ l de Opti-MEM junto con 3 μ g de pBS-N-T ϕ , 5 μ g de pBS-P-T ϕ , 1 μ g de pBS-L-T ϕ , 8 μ g de pBS-G y 44 μ l del reactivo p3000. En el tubo B se añadieron 500 μ l de Opti-MEM y 66 μ l de Lipofectamina 3000. Se mezclaron ambos tubos y se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Tras los 45 minutos de infección, se retiró el inoculo de Vaccinia (rVV) y se añadió la mezcla de transfección para dejarlo en incubación durante 6 horas a 37°C. Posteriormente se eliminó la

mezcla de las placas de transfección y se añadió 2 ml de medio DMEM al 5% de suero bovino fetal dejándose incubar durante 40-48 horas a 37°C con 5% CO₂.

6.2.2. Amplificación de la recuperación primaria del virus

El mismo día de la transfección de la recuperación primaria del virus, se sembró en una placa de 6 pocillos (Corning) 2-5x10⁵ células BHK-21 con medio DMEM 10% (BioWhittaker Europe) Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa suplementado al 10% de suero bovino fetal, inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina y se dejaron crecer toda la noche. Al día siguiente, se reemplazó el medio por 750 µl de Opti-MEM y se incubaron a 37°C, al mismo tiempo se preparó una mezcla de transfección (Lipofectamine™ 3000, Invitrogen™) en la que se añadieron a un tubo A 250 µl de Opti-MEM, 2 µg de VSV-G y 4 µl de p3000. En el tubo B se añadieron 687,5 µl de Opti-MEM y 41,25 µl de Lipofectamina 3000. Se mezclaron ambos tubos y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadió la mezcla de transfección a las placas de BHK-21 y se puso en incubación a 37°C durante 24-30 horas. Se evaluó la eficiencia de transfección examinando la formación de sincitios a las 24 horas post-transfección.

Por otro lado, se recogió el sobrenadante de la recuperación primaria del virus y se pasó por un filtro de 0.22 µm, transfiriéndose parte del filtrado a las placas de VSV, retirando previamente la mezcla de transfección presente en las células. El resto se congeló a -80°C para ser usado en posteriores amplificaciones. Se incubaron las placas a 37°C durante 24-72 horas hasta la aparición de sincitios. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1200 rpm para eliminar restos celulares.

El sobrenadante contiene las partículas víricas de VSV necesarias para la construcción de virus recombinantes con envueltas heterólogas.

6.3. Virus recombinantes basados en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) con envuelta heteróloga

El día antes de la transfección, se sembraron células BHK-21 a concentración de 1.2x10⁶ en placa de 10 centímetros con medio DMEM (BioWhittaker Europe) Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa suplementado al 10% de suero bovino fetal, inactivado previamente por calor, 25mg de Gentamicina y 2mM L-glutamina y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Al día siguiente se reemplazó el medio por 5ml de medio Opti-MEM.

La transfección se realizó en tubos de medio de cultivo usando el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen). Para la construcción de las partículas basadas en VSV, se añadieron 500 µl de Opti-

MEM al tubo A, 15 µg de la envuelta del virus recombinante rVSV-SARS-CoV-2/ SARS-CoV/ MERS-CoV o 6 µg en el caso de rVSV-EBOV-Makona o 2 µg en el caso de VSV-G y 30 µl del reactivo p3000. En el tubo B se añadieron 500 µl de Opti-MEM al tubo B y 22,5 µl de Lipofectamina 3000. Se unió la mezcla de ambos tubos y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se añadió la mezcla a la placa de transfección y se dejó incubar a 37°C con 5% CO₂ durante 24 horas.

Al día siguiente, se cambió el medio por 5ml de medio DMEM al 5% de suero bovino fetal y se añadieron partículas víricas rVSV-G a un MOI: 3 infectando durante 1 hora. Posteriormente se retiró el medio y se lavó de 8 a 10 veces la placa de transfección con 5 ml de PBS x1. Posteriormente se añadieron 6 ml de medio Opti-MEM y se dejó incubar 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Pasado un día, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante contiene las partículas recombinantes que se almacenaron a -80°C.

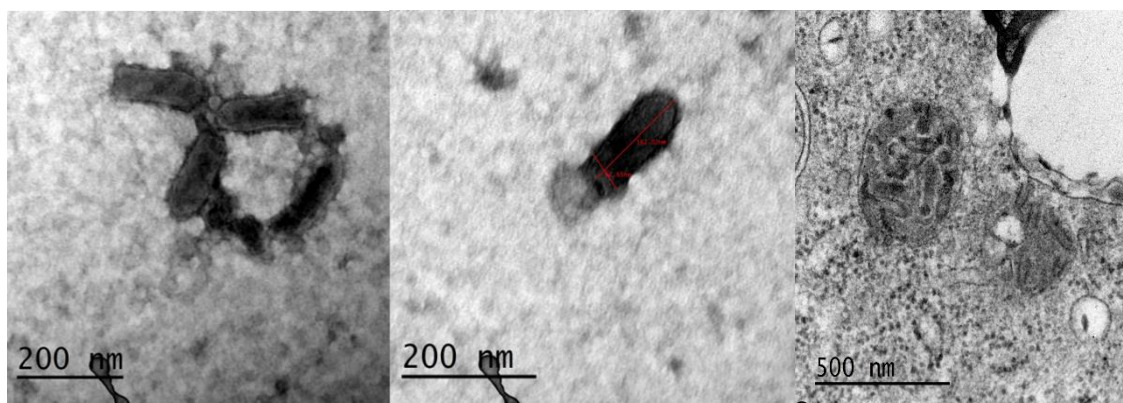


Imagen 2. Viriones rVSV-EBOV. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de las células BHK-21 productoras de las partículas rVSV EBOV. Las fotos fueron tomadas por la Dra. Marina Alonso del Servicio de Anatomía Patológica y ME. Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

6.4. Virus recombinantes basados en el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) de primaria generación con envuelta heteróloga

Los virus recombinantes se produjeron en células 293T. Las construcciones virales se realizaron sembrando 8×10^6 células 293T en placas de 10 centímetros (Corning) con medio de cultivo DMEM (BioWhittaker Europe) Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa suplementado al 10% de suero bovino fetal, inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina. Al día siguiente se cambió el medio de las placas de transfección por 5 ml de medio de cultivo reducido Opti-MEM x1 (Gibco). La transfección se realizó en tubos de cultivo (Cultube™ Sterile Culture Tubes, Simport™) usando el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen™).

Para la construcción de los virus recombinantes se añadieron 500 µl de Opti-MEM al tubo A. En el caso de la construcción de SARS-CoV-2 se añadieron 14 µg del plásmido empaquetador pNL4-3.Luc.R-E- y 6 µg de la envuelta del virus recombinante SARS-CoV-2 o 9 µg pNL4-3.Luc.R-E- y 1 µg de envuelta si la construcción vírica es virus Ébola (EBOV). Tras la adición del ADN se añadieron 30 µl del reactivo p3000. A continuación, se adicionó 500 µl de Opti-MEM al tubo B y 22,5 µl de Lipofectamina 3000. Se mezclaron los tubos A y B dejándose incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se añadió la mezcla a las placas de transfección y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas. Pasados dos días, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1200rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante contiene las partículas virales que se almacenaron a -80°C.

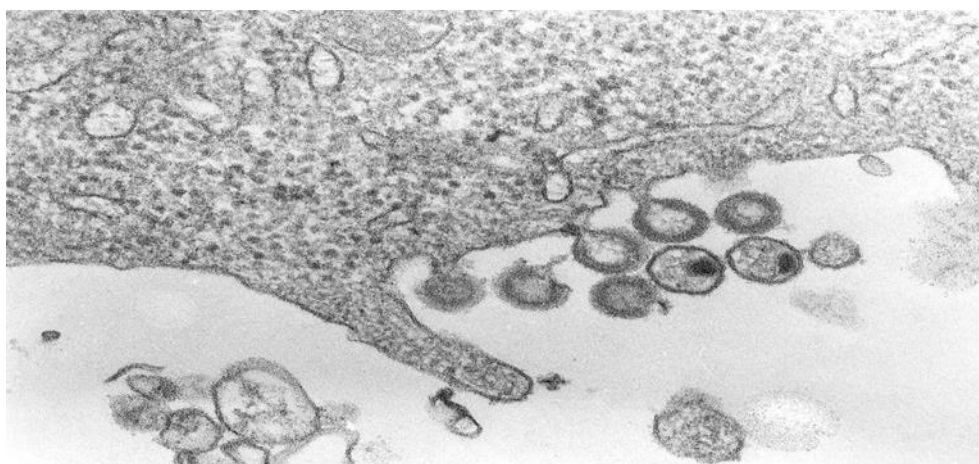


Imagen 3. Viriones pNL4Luc-EBOV. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de las células 293T productoras de las partículas EBOV basadas en VIH. Las fotos fueron tomadas por el Servicio de Anatomía Patológica y ME. Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

6.5. Virus recombinantes basados en el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) de tercera generación con envuelta heteróloga

Los virus recombinantes se produjeron según el procedimiento descrito por Barde y col. ([Barde et al., 2010](#)) en células 293T.

Las construcciones virales se realizaron sembrando 8×10^6 células 293T en placas de 10 centímetros (Corning) con medio de cultivo DMEM (BioWhittaker Europe) Dubelcco modificado por Eagles con 4.5 g/l de glucosa suplementado al 10% de suero bovino fetal, inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina. Al día siguiente, se cambió el medio de las placas de transfección por 5 ml de medio de cultivo reducido Opti-MEM x1 (Gibco). La transfección se realizó en tubos de cultivo (Cultube™ Sterile Culture Tubes, Simport™) usando el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen™).

Para la construcción de los virus recombinantes se añadieron 500 µl de Opti-MEM al tubo A. Con los virus recombinantes de Coronavirus se añadieron 6 µg del plásmido empaquetador pMDLg/pRRE, 6 µg de la envuelta del Coronavirus correspondiente, 2 µg pRSV-Rev y 10 µg del plásmido reportero pRRLSIN.cPPTLuciferase.WPRE.

Con las partículas víricas recombinantes de Ébola (EBOV) se añadieron 2 µg de la envuelta EBOV, 2 µg pRSV-Rev, 6 µg del plásmido empaquetador pMDLg/pRRE y 10 µg del plásmido reportero pRRLSIN.cPPTLuciferase.WPRE.

Tras la adición del ADN se añadieron 40 µl del reactivo p3000. A continuación, se añadieron 500 µl de Opti-MEM al tubo B y 30 µl de Lipofectamina 3000. Se mezclaron los tubos A y B dejándose incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se añadió la mezcla a las placas de transfección y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas. Pasados dos días se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante contiene las partículas virales que se almacenaron a -80°C.

6.6. Virus recombinantes basados en el Virus de la Leucemia murina (MLV) con envuelta heteróloga.

Los virus recombinantes se produjeron para la creación de líneas celulares inmortalizadas 293T-DC-SIGN-gfp y 293T-L-SIGN-gfp.

Un día antes, se sembraron 8x10⁶ células 293T en placa de 10 centímetros en DMEM al 10% y se dejaron incubar toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se transfectaron con el kit de Lipofectamina 3000. Para ello se utilizaron dos tubos; en el tubo A se añadieron 500 µl de Opti-MEM, 10 µg pNGVL-MLV-gag-pol, 2 µg VSV-G y 8 µg LZR-DC-SIGN-Cite-gfp para la construcción de la línea 293T-DC-SIGN-gfp u 8 µg LZR-L-SIGN-Cite-gfp para la construcción de la línea 293T-L-SIGN-gfp y 40 µl de p3000. En el tubo B se añadieron 500 µl de Opti-MEM y 20 µl de Lipofectamina. Se mezclaron ambos tubos dejándose incubar durante 20 minutos. Pasado el tiempo se añadió la mezcla de transfección a las células dejándose incubar 48h a 37°C. Pasados los dos días se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos y se congeló hasta su uso a -80°C.

7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y generación de células dendríticas y macrófagos

Se obtuvieron muestras de sangre de 4 donantes sanos (Hospital 12 de Octubre, Madrid) bajo consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica o “*peripheral blood mononuclear cell*” por sus siglas en inglés (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente

de densidad Ficoll (Ficoll Paque, GE17-5442-02, Sigma-Aldrich) y se derivaron para generar células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos derivados de monocitos (M1-MDM, M2-MDM).

Para ello se añadieron 4 ml de Ficoll a un tubo de 14 ml (Sarstedt) y se añadió con pipeta 12 ml de sangre 3 veces diluida con cuidado de no romper ambas fases, para seguidamente centrifugar 1800 rpm durante 40 minutos. Pasado el tiempo de centrifugación, se recogieron con pipeta Pasteur los PBMCs presentes en la interfase y se traspasaron a un tubo de 14 ml en el cual se añadieron 5 ml de medio RPMI como lavado, para posteriormente centrifugar los tubos a 1200 rpm durante 10 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se volvieron a lavar y centrifugar las células con 10 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium, Lonza).

Se purificaron los PBMC utilizando bolas magnéticas marcadas con el anticuerpo humano Anti-CD14 y columnas de hierro (Miltenyi Biotec). Se contaron las células con cámara de Neubauer y se resuspendieron 10^7 PBMCs en 80 μ l de buffer PBS 0,5% suero bovino fetal inactivado con calor, 2 mM EDTA a pH 7,2 y 20 μ l de bolas magnéticas CD14, dejando las células en incubación 15 minutos en refrigeración.

Tras la incubación se añadió 2 ml de buffer y se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. Se aspiró completamente el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 μ l del mismo buffer. Una vez resuspendidas se traspasaron a la columna magnética, lavándose la misma tres veces con 500 μ l de buffer. Finalmente, se eluyó en 1 ml de buffer en una placa de 10 centímetros (Corning) y se añadieron 10 ml de medio RPMI al 10% de suero bovino fetal inactivado previamente por calor, 25 mg de Gentamicina y 2 mM L-glutamina dejándose incubar durante una semana a 37°C con 5% CO₂.

Estos monocitos purificados se siguieron derivando mediante su activación con citoquinas IL-4 (500 U / mL) y GM-CSF (1000 U / mL) (Miltenyi Biotec) para la generación de células dendríticas (DCs). Para la generación de macrófagos M2 (M2-MDM) se utilizaron las citoquinas M-CSF (1000 U / mL) (Miltenyi Biotec) y GM-CSF (1000 U / mL) y, por último, GM-CSF (1000 U / mL) para la generación de macrófagos M1 (M1-MDM).

La activación mediante citoquinas se realizó cada dos días durante 1 semana con incubación a 37°C y 5% de CO₂.

8. Infección en *cis* con virus recombinantes

8.1. Infección directa en células inmortalizadas

Se realizaron infecciones en *cis* con virus recombinantes de SARS-CoV-2 basados en el virus de la estomatitis vesicular (rVSV-SARS-CoV-2) en distintas líneas celulares adherentes BHK-21 y

293T, de forma directa y transfectando con el plásmido LZR-DCSIGN y en células en suspensión inmortalizadas, Jurkat, Jurkat DC-SIGN, Raji y Raji DC-SIGN para la comprobación del papel DC-SIGN como receptor directo en la infección vírica.

Se sembraron 3×10^5 células 293T y 1.5×10^5 células BHK-21 en placa de 24 pocillos (Corning) con medio DMEM al 10% de suero bovino fetal el día antes del ensayo. Al día siguiente, se transfectaron (Lipofectamine 3000, Invitrogen™) pocillos de ambas líneas celulares con 500 ng de LZR-DCSIGN, pocillos con 500 ng de pACE2 y pocillos con 500 ng de LZR-DCSIGN y pACE2.

Para ello, se añadieron en el tubo A 25 μ l de Opti-MEM, la concentración adecuada de cada plásmido y 1 μ l del reactivo p3000 para cada pocillo. En el tubo B se añadieron 25 μ l de Opti-MEM y 1 μ l de Lipofectamina 3000. Se mezclaron ambos tubos y se dejaron incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación se añadieron 50 μ l de la mezcla al pocillo correspondiente y se dejó hasta el día siguiente a 37°C con 5% de CO₂.

Por otra parte, se prepararon 3×10^5 células de las líneas en suspensión en placa de 96 pocillos con fondo redondo (Corning) y se infectaron todas las placas con las partículas víricas rVSV-SARS-CoV-2. Se usó rVSV-EBOLA-Makona y rVSV-G como control y se dejaron infectar durante 24 horas. Al día siguiente se retiró el medio de las placas, se lavó una vez con PBS x1 y se lisaron las células con 120 μ l de buffer de lisis durante 10 minutos para medir la producción de luciferasa.

Se repitió el mismo experimento infectando con virus basado en VIH en paralelo y dejando infectar durante 48 horas hasta lisis.

8.2. Infección directa en células primarias

Se infectaron 5×10^4 células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M1-MDM, M2-MDM) (ver materiales y métodos 7) sembradas en placa de 24 pocillos con rVSV-SARS-CoV-2 MOI: 1 y se dejó incubar 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente, se lavaron las células 3 veces con PBS para su posterior lisis y medición de producción de luciferasa.

9. Infección en trans con virus recombinantes

Todas las lecturas de las transinfecciones fueron analizadas con el programa GraphPad PrismV8.

9.1. Transinfección con células inmortalizadas

9.1.1. SARS-CoV-2

Para los ensayos de infección en trans se utilizaron distintos virus recombinantes correspondientes a los sistemas basados en VSV, rVSV-SARS-CoV-2, rVSV-SARS-CoV-2 614G, rVSV-SARS-CoV-2 B.1.1.7, SARS-CoV-2 B.1.1.28, SARS-CoV-2 B.1.351, rVSV-SARS-CoV-1, rVSV-EBOV, rVSV-VSV-G, y VIH, VIH-SARS-CoV-2, VIH -SARS-CoV-1 Δ 21, y VIH-EBOV y se probó su interacción con las lectina DC-SIGN/L-SIGN, y Langerina en células diana Vero E6.

Para ello, se sembraron 1.5×10^5 células Vero E6 en placa de 24 pocillos con medio DMEM 10% de suero bovino fetal el día previo al ensayo. Al día siguiente, se prepararon 3×10^5 células Jurkat, Jurkat-DC-SIGN, y Jurkat Langerina en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se infectaron con los virus recombinantes a MOI: 1. Previamente los controles con anticuerpo Anti-DC/L-SIGN (MAB16211, R&D Systems) y manano a 25 $\mu\text{g/ml}$ se dejaron incubar 20 minutos antes de la adicción de las partículas víricas. Previamente a la infección todos los tubos se complementaron con 1mM CaCl_2 y se dejaron incubando durante 2 horas en rotación a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de infección, se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante 5 minutos, para seguidamente, retirar el medio y resuspender en 1 ml de PBS suplementado con 0,5% de suero bovino fetal y 1 mM CaCl_2 y recentrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Estos lavados se repitieron tres veces, para finalmente ser resuspendidos en 750 μl de medio RPMI al 5% de suero bovino fetal y traspasado a la placa de Vero E6. Se dejó incubar 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 .

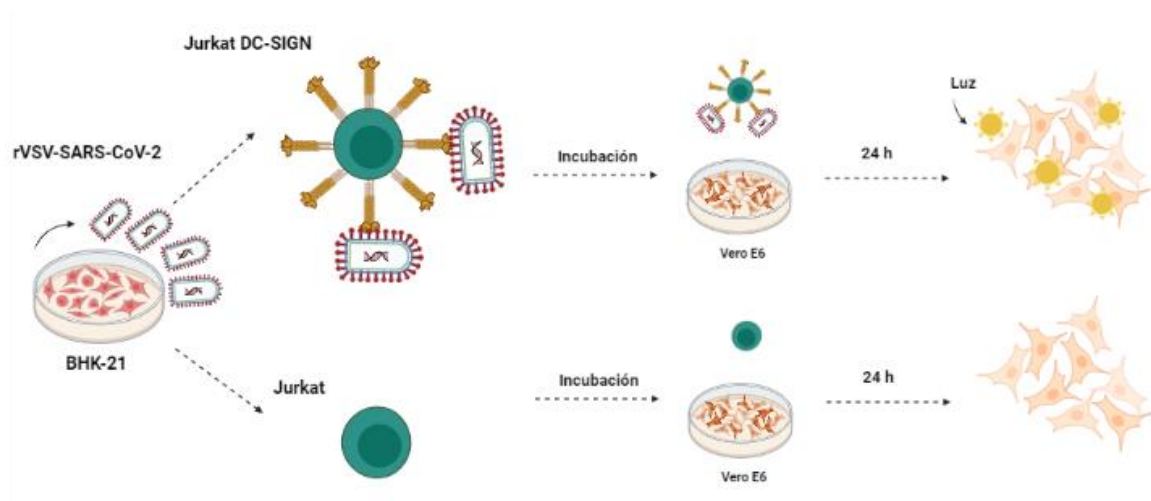


Ilustración 10. Representación gráfica del proceso de la infección en trans. La producción de virus recombinantes basados en rVSV se realiza en células BHK-21. Una vez obtenidos los virus se incuban con células Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN durante 2h a temperatura ambiente. Tras los lavados se añaden a células Vero E6 y se incuban 24h a 37°C . Al día siguiente se realiza la lectura de infección.

Al día siguiente, se lavó la monocapa celular tres veces con 0,5 ml de PBS y se lisaron con 120 μ l de buffer de lisis para cuantificarse, diez minutos más tarde, la actividad de luciferasa.

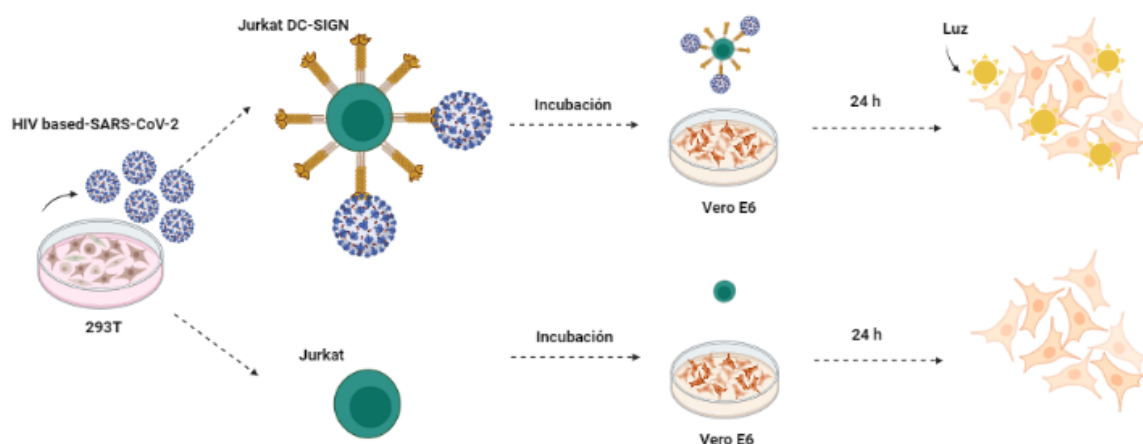


Ilustración 11. Representación gráfica del proceso de la infección en trans. La producción de virus recombinantes basados en VIH se realiza en células 293T. Una vez obtenidos los virus se incuban con células Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN durante 2h a temperatura ambiente. Tras los lavados se añaden a células Vero E6 y se incuban 24h a 37°C. Al día siguiente se realiza la lectura de infección.

9.2. Transinfección con células primarias

Para la infección en *trans* se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Ficoll Paque, GE17-5442-02, Sigma-Aldrich) y se derivaron para generar células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos derivados de monocitos (M1-MDM, M2-MDM) (ver materiales y métodos 7.).

Una vez derivadas las células, se sembraron 5×10^4 en placa de 24 pocillos antes del ensayo de transinfección. Por otra parte, se prepararon 3×10^5 células Jurkat y Jurkat-DC-SIGN, en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se infectaron con los virus recombinantes a MOI: 0.5-2. Previamente, los controles con anticuerpo Anti-DC/L-SIGN (MAB16211, R&D Systems) se dejaron incubar 20 minutos antes de la adición de las partículas víricas. Previamente a la infección todos los tubos se complementaron con 1mM CaCl_2 y se dejaron incubando durante 2 horas en rotación a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de infección, se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante 5 minutos, para seguidamente, retirar el medio y resuspender en 1 ml de PBS suplementado con 0,5% de suero bovino fetal y 1mM CaCl_2 y recentrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Estos lavados se repitieron dos veces, para finalmente ser resuspendidos en 750 μ l de medio RPMI al 5% de suero bovino fetal y traspasado a las placas con las células primarias. Se dejó incubar 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 .

Al día siguiente, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos y se realizaron tres lavados con PBS suplementado con 0,5% de suero bovino fetal y 1mM CaCl_2 para finalmente adicionar 100 μl de buffer de lisis para realizar la medición de luciferasa.

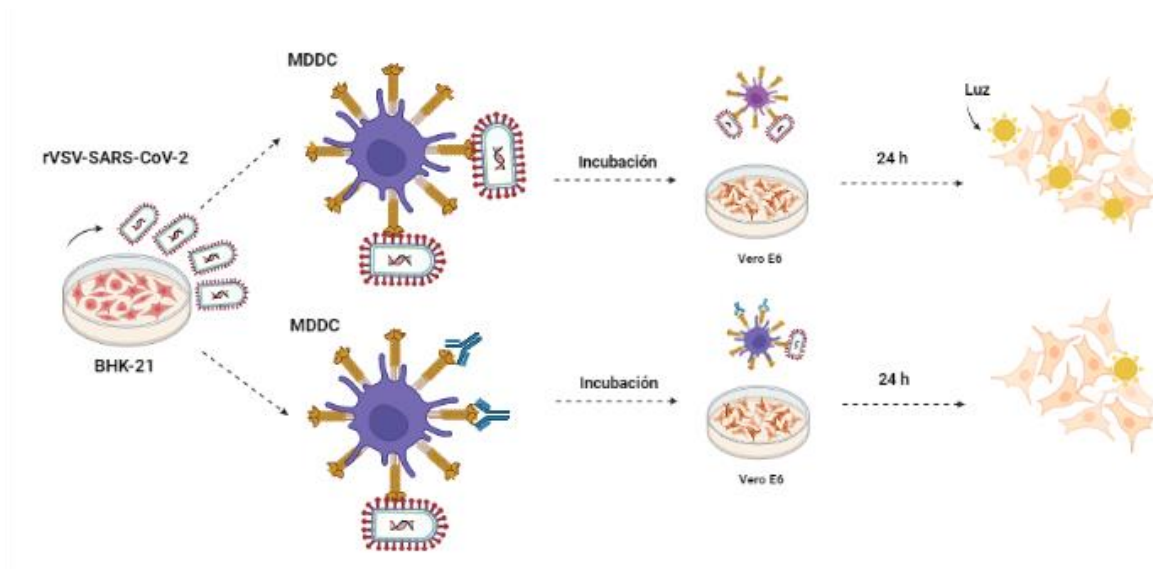


Ilustración 12. Representación gráfica del proceso de la infección en trans. La producción de virus recombinantes basados en rVSV se realiza en células BHK-21. Una vez obtenidos los virus se incuban con líneas primarias de MDDC con y sin anticuerpo humano anti-DC-SIGN durante 2h a temperatura ambiente. Tras los lavados se añaden a células Vero E6 y se incuban 24h a 37°C. Al día siguiente se realiza la lectura de infección.

10. Infección en trans con virus replicativo SARS-CoV-2

10.1. Transinfección con células inmortalizadas

Para la transinfección con virus replicativo, el día anterior al ensayo se sembraron 2×10^4 células Calu-3 2B4 en una placa de 96 pocillos (Corning). Al día siguiente, 5×10^4 células Jurkat y Jurkat DC-SIGN se infectaron con SARS-CoV-2 a MOI: 1. Como control se usó anticuerpo Anti-DC/L-SIGN antibody (MAB16211, R&D Systems) y se dejó incubar durante 20 minutos con las células previamente a la infección. Tras la adición del virus se dejaron rotar los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron 4 veces con PBS 5% de suero bovino fetal y 1mM CaCl_2 .

Finalmente, se resuspendieron las células en 700 μl de RPMI al 5% de suero bovino fetal y se co-incubaron con las Calu-3 durante 48 horas.

10.2. Transinfección con células primarias

Se derivaron células de 4 donantes sanos (Hospital 12 de Octubre, Madrid) bajo consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Ficoll Paque, GE17-5442-02, Sigma-Aldrich) y se derivaron para generar células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos derivados de monocitos (M1-MDM, M2-MDM) según el procedimiento descrito previamente (ver materiales y métodos 7.).

Para el experimento de infección en *trans*, se prepararon 2×10^4 células Calu-3 2B4 por pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning) cultivadas con medio DMEM al 10% de suero bovino fetal. Al día siguiente se prepararon 2×10^4 de MDDCs y se infectaron con SARS-CoV-2 a MOI: 0.1-1. Previamente a la infección se dejó incubar durante 20 minutos el control de infección de la lectina DC-SIGN MDDCs con el anticuerpo Anti-DC/L-SIGN antibody (MAB16211, R&D Systems).

Tras esto, se dejó en rotación durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS 0,5% suero bovino fetal 1mM CaCl₂ y se resuspendieron en 700 µl de RPMI 5% suero bovino fetal y se co-cultivaron con las Calu-3 2B4 durante 48 horas.

11. Producción de la proteína recombinante soluble SARS-CoV-2 S HexaPro

Hexapro es una proteína estabilizada soluble de la proteína S de SARS-CoV-2 creada por el grupo del Dr. Jason McLellan (Department of Molecular Biosciences, University of Texas, USA) ([Hsieh et al., 2020](#)). Su nombre se debe a que contiene 6 prolina para su estabilización (mutaciones F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P), y además el sitio de escisión RRAR por Furina S1/S2 (682-685) ha sido reemplazado por GSAS. Todos estos cambios permiten que la proteína vea aumentada su termoestabilidad, sus niveles de expresión, así como su capacidad de retener la conformación en prefusión tetramérica.

11.1. Transfección con fosfato cálcico

El método de transfección de fosfato cálcico fue desarrollado por primera vez por Graham y van der Ebb y que Wigler modificó posteriormente ([Graham & van der Eb, 1973](#); [Wigler et al., 1977](#)), es usado para la introducción de ADN en células de eucariotas con el objetivo de conseguir una expresión transitoria de la proteína o para producir transformantes estables en líneas celulares inmortalizadas.

El fundamento se basa en la capacidad del fosfato cálcico de formar un precipitado de ADN facilitando la unión de este en la superficie celular y la posterior entrada del ADN en la célula mediante endocitosis. La mezcla del ADN con la solución concentrada de CaCl_2 se añade posteriormente mediante goteo a un tampón fosfato mediante soplado de burbujas de aire, de manera que la aireación de dicho tampón durante la adición de la mezcla ADN- CaCl_2 forma un precipitado fino, esto es fundamental ya que, si el ADN forma grumos, este no se adherirá ni penetrará en la célula con eficacia.

Para la producción de la proteína estable SARS-CoV-2 S HexaPro se utilizó el plásmido construido por J. McLellan (Addgene, Cat: 154754). Para ello se creció el plásmido y se purificó mediante Maxiprep.

Un día antes de la transfección con el kit Calcium Phosphate Transfection (Invitrogen, Cat: K278001), se sembraron 25×10^6 células 293T en una placa de 15 centímetros con DMEM al 10% de suero bovino fetal dejándose incubar a 37°C . Al día siguiente, se reemplazó el medio por 25 ml de DMEM al 5% de suero bovino fetal, se añadió 26,8 μl de Cloroquina y se reservó en el incubador a 37°C . A continuación, se prepararon dos tubos de cultivo; en el tubo A se añadieron 108 μl CaCl_2 2M, 90 μg del plásmido SARS-CoV-2 S HexaPro y agua estéril hasta completar 900 μl . En el tubo B se añadieron 900 μl de solución salina tamponada HEPES 2X (HBS). Una vez añadidos los reactivos, se mezclaron el contenido de ambos tubos mediante el soplado de burbujas de aire con pipeta Pasteur durante 2-3 minutos para seguidamente, añadir la mezcla a las células sembradas en la placa. Se dejó incubar durante 8 horas a 37°C tras lo cual se reemplazó el medio con DMEM al 5% de suero bovino fetal para volver a realizar una segunda incubación a 37°C durante 72 horas.

Pasados los tres días de incubación se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 4000 g durante 20 minutos. El clarificado se pasó por un filtro de 0,22 μm y se le añadió una pastilla de inhibidor de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Cat: 11836170001). Seguidamente se colocó la proteína en hielo y se procedió a su purificación.

11.2. Purificación de la proteína recombinante soluble SARS-CoV-2 S HexaPro

La purificación se llevó a cabo siguiendo un protocolo optimizado ([Stadlbauer et al., 2020](#)).

La agarosa Ni-NTA es una matriz de cromatografía de afinidad utilizada para purificar proteínas recombinantes que llevan una etiqueta His. Los residuos de histidina presentes en la etiqueta de x6 Histidinas de la proteína recombinante SARS-CoV-2 S HexaPro se une a las posiciones libres en la esfera de coordinación de los iones de níquel presentes en la agarosa con mucha especificidad y afinidad.

Para ello se incubó el sobrenadante con agarosa cargada con Niquel²⁺ (Ni-NTA Agarose, Qiagen, Cat: 30210) lavada previamente con PBS x1 a un ratio de 6 ml por 200 ml de sobrenadante y se puso en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se cargó la mezcla en columnas de polipropileno (Polypropylene Columns 5ml, Qiagen Cat: 34964) en una cámara frigorífica a 4°C, por elución por gravedad, se lavaron 4 veces con solución de lavado para seguidamente eluir con buffer de elución con imidazol. Las fracciones se recogieron en un tubo de 50 ml que se puso directamente en hielo.

Tras la elución de proteínas, las fracciones se concentraron usando tubos de 50K Amicon centrífugal units (Millipore) a 4000 *g* durante 30 minutos a 4°C. La proteína soluble fue resuspendida en Tris pH 8.0 y almacenada inmediatamente a -80°C.

La proteína fue visualizada mediante gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y cuantificada mediante el kit de ensayo de proteínas Pierce Micro BCA (Thermo Fisher Scientific).

12. Diseño y producción de la proteína recombinante Spike-SARS-CoV PP Hexapro soluble

Se construyó una proteína recombinante soluble de la Spike del virus SARS-CoV. El diseño se realizó usando el plásmido pSARS-1 (Sinobiological) cuya secuencia aminoacídica es idéntica al SARS coronavirus CUHK-W1 (GenBank AAP13567.1) y se reclonó el ectodominio de la envoltura en el vector pαH-HexaPro.

12.1. Diseño de PCR

Para la extracción de la envuelta de SARS-CoV-1 a partir del plásmido de partida, se diseñaron cebadores de PCR que contenían los sitios de restricción KpnI y BamHI necesarios para el reclonaje de la proteína, seguidos de una secuencia Kozak:

- **SARS-CoV-KpnI-Fw:** 5'AAAGGTACCGCCACCATGTTTCATCTTCCTG 3'
- **SARS-CoV-BamHI-Rv:** 5'AAAGGATCCTGGCCACTTGATGTATTG 3'

La mezcla de reacción consistió en 1 µl del plásmido a concentración 100 ng/ µl, 5 µl del buffer 10x con MgCl₂, 4 µl de MgCl₂ a 25 mM, 1 µl dNTPs a concentración 10 mM, 2,5 µl del cebador SARS-CoV-KpnI-Fw a concentración 10 µM, 2,5 µl del cebador SARS-CoV-BamHI-Rv a

concentración 10 μM , 1 μl de la Taq polimerasa Expand high fidelity y 33 μl de agua destilada estéril libre de nucleasas.

El termociclador elegido para la realización del ensayo fue el Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, donde las condiciones de amplificación exponencial fueron 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, y 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 3 minutos y 30 segundos a 68°C, seguido de una extensión final de 7 minutos a 68°C.

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se cargaron 5 μl del producto de PCR y se dejó correr a bajo voltaje. Una vez visualizada la banda de 3.8 Kb de peso molecular, se procedió a su extracción del gel para su posterior purificación.

12.2. Purificación PCR

Se visualizó la banda de PCR de 3.8 Kb mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Una vez comprobado su tamaño se procedió a la purificación del producto de PCR usando el kit Centrifugal filter units Amicon Ultra 30K (Milipore, Cat: UFC503096). Para ello se cargó todo el producto de PCR en la columna Amicon y se completó con agua destilada Mili Q hasta un volumen final de 500 μl . A continuación, se centrifugó a 14.000 x *g* durante 30 minutos. Para recuperar el producto de PCR concentrado, se colocó boca abajo la columna Amicon en un tubo de microcentrifuga limpio e inmediatamente se centrifugó a 1000 x *g* durante 2 minutos.

12.3. Generación de extremos cohesivos mediante digestión

Para la generación de extremos cohesivos en la envuelta de SARS-CoV, se realizó una digestión del producto de PCR. La mezcla de reacción consistió en 1 μg del producto de PCR purificado, 2 μl de la enzima de restricción BamHI, 2 μl de la enzima de restricción KpnI, 4 μl del buffer 2.1 (NEB) completándose con agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen final de 30 μl . La digestión se realizó incubando la mezcla de reacción a 37°C durante 2 horas.

Para la generación de extremos cohesivos del vector p α H-HexaPro se realizó una digestión del plásmido. La mezcla de reacción consistió en 1 μg del plásmido SARS-CoV-2 S HexaPro, 2 μl de la enzima de restricción BamHI, 2 μl de la enzima de restricción KpnI, 2 μl del buffer 2.1 (NEB) completándose con agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 μl . La digestión se realizó incubando la mezcla de reacción a 37°C durante 2 horas.

Las digestiones se corrieron por electroforesis cargando todo el producto digerido en un gel de agarosa al 0,8% a bajo voltaje. Una vez visualizadas las bandas; 3,8 Kb de peso molecular de la

envoltura SARS-CoV-1 y 5 Kb del vector pαH-HexaPro, se procedió a su extracción del gel y su posterior purificación.

12.4. Extracción de ADN del gel

Una vez extraído el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado, se procedió a su purificación. Para ello se utilizó el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). En un Eppendorf se pesó la banda cortada y se agregó 3 volúmenes de Buffer QG a 1 volumen de gel (100 mg de gel ~ 100 µl) y se incubó a 50°C durante 10 minutos. A continuación, se agregó un volumen de Isopropanol y se mezcló el contenido invirtiendo un par de veces el tubo. Seguidamente se cargó el contenido en la columna QIAquick y se centrifugó 1 minuto a 17,900 x *g*. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µl de tampón QG a la columna para seguidamente centrifugar 1 minuto a 17,900 x *g*. Se descartó el sobrenadante y se lavó la columna añadiendo 750 µl de tampón PE y centrifugando 1 minuto a 17,900 x *g* y una segunda centrifugación en vacío a la misma velocidad. Para finalizar, se añadió 12 µl de buffer de elución y se dejó incubar 4 minutos antes de centrifugar a 17,900 x *g* durante 2 minutos.

12.5. Ligación

Se realizó la ligación del ectodominio de la envoltura de SARS-CoV-1 con el vector pαH-HexaPro. La mezcla de reacción consistió en 3 µl del inserto, 1 µl del vector, 2 µl 10xBuffer, 1 µl de la ligasa T4 a concentración 5 u/ µl (Thermofisher) y 13 µl de agua estéril libre de nucleasas. Se dejó incubar durante 30 minutos a 22°C.

12.6. Transformación

Para la transformación se añadieron 5 µl de la reacción de ligación obtenida previamente descrita a 50 µl de células *E. coli* químicamente competente One Shot™ TOP10 (Invitrogen, Cat: C404010) para someterlas posteriormente a un choque térmico consistente en 30 minutos de incubación en hielo, seguidos de 30 segundos a 42°C en termobloque (peqLab, Biotechnologie GmbH) y finalizados en 5 minutos de hielo. Finalmente se añadieron 300 µl de medio SOC dejándose incubar a 37°C durante 1 hora en agitación a 200 rpm.

Posteriormente se procedió a su siembra de colonias transformadas (ver materiales y métodos 5.4.) y su purificación mediante Miniprep (ver materiales y métodos 5.5.).

12.7. Comprobación del clonaje mediante digestión

Para la comprobación de la correcta ligación, se procedió a la selección de enzimas de restricción concretas de cada fragmento. El ectodominio de la envoltura de SARS-CoV-1 contiene dos sitios de restricción: BamHI y KpnI, a diferencia de SARS-CoV-2 S HexaPro que contiene tres sitios de restricción: BamHI, KpnI y EcoRI, por lo que se realizó una digestión con dichas enzimas para la confirmación del clonaje. La mezcla de reacción para la digestión de 30 clones consistió en 5 µl de la enzima de restricción BamHI, 5 µl de la enzima de restricción KpnI, 5 µl de la enzima de restricción EcoRI, 60 µl del Buffer 2.1 (NEB), completándose con agua destilada estéril libre de nucleasas hasta un volumen final de 600 µl. Se pipeteó 15 µl de la mezcla de reacción con 1 µg del plásmido de cada uno de los clones, dejándose incubar a 37°C durante 2 horas y 30 minutos.

Tras la digestión, se procedió a la comprobación del número de bandas corriendo mediante electroforesis las digestiones en un gel de agarosa al 0,8%.

En aquellos clones que presentaron dos bandas en el gel, se confirmó la correcta ligación mediante su secuenciación (ver materiales y métodos 5.6.).

Se seleccionó un clon correcto y se realizó una PCR de mutagénesis para la introducción mediante mutagénesis de dos prolinas en la envoltura (ver materiales y métodos 5.1.).

13. Ensayo de unión

13.1. Citometría de Flujo

La población de interés se separó en función del tamaño. Una vez seleccionada la población celular, se analizaron los datos como porcentaje de células con fluorescencia del anticuerpo unido a la molécula de interés, es decir, el anticuerpo anti-his conjugado con Ficoeritrina (PE) en su incubación con las células Jurkat DC-SIGN. La fluorescencia negativa se determinó analizando la fluorescencia del anticuerpo unido al anticuerpo anti-his conjugado con Ficoeritrina en su incubación con las células Jurkat que carecen de la expresión de la lectina.

El ensayo de unión es una técnica empleada para la investigación de interacciones receptor-ligando.

De manera resumida, se expone la proteína S de SARS-CoV-2 soluble al receptor de estudio, en este caso DC-SIGN expresada en una línea linfocitaria Jurkat. La incubación posterior de un anticuerpo anti-His conjugado con PE permitirá conocer la existencia de interacción entre receptor-ligando mediante citometría de flujo a través de la medición de señal PE del anticuerpo unido al tag-His de la proteína S de SARS-CoV-2.

Para ello, se puso a punto la técnica utilizando distintas condiciones. El protocolo final para el estudio de la interacción DC-SIGN y la proteína S de SARS-CoV-2 fue el siguiente:

1. En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se añadieron 5×10^5 células Jurkat DC-SIGN y células Jurkat parentales sin expresión de la lectina usadas como control.
2. Se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos.
3. Se retiró el medio y se añadió la proteína S soluble Hexapro con una concentración de proteína total de 25µg.
4. Se añadió PBS con un 0,5% de suero bovino fetal y 1mM de CaCl_2 a un volumen final de 50 µl.
5. Se dejó incubar a 37°C durante 1 hora.
6. Pasado el tiempo de incubación se añadió 1 ml de PBS con un 0,5% de suero bovino fetal y 1mM de CaCl_2 y se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos.
7. Se repitió el lavado x2 veces.
8. Finalmente se añadió 8 µl del anticuerpo anti-His PE (PE mouse anti-His Tag Antibody, Cat: 362603, Biolegend) y se llevó con PBS 0,5% SBF 1mM de CaCl_2 a un volumen final de 50 µl.
9. Se dejó incubar 1 hora a 37°C.
10. Se añadió 1 ml de PBS 0,5% SBF 1mM de CaCl_2 y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.
11. Se repitió el lavado x2 veces.
12. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de PBS y se añadió a un tubo de citometría que contenía 100 µl de paraformadehído al 4%.
13. Se midió con citometría de flujo la señal PE del anticuerpo anti-His.

Como control de señal PE y expresión de DC-SIGN se utilizó el anticuerpo anti-DC-SIGN PE (PE anti-human CD209 (DC-SIGN) Antibody, Cat: 330105). Así mismo, como control de unión a la lectina DC-SIGN se utilizó manano a una concentración final de 25 µg/ml.

Para el estudio de anticuerpos anti-NTD SARS-CoV-2 presentes en sueros de donantes vacunados y/o convalecientes, se incubó la proteína de S SARS-CoV-2 Hexapro a una concentración de 25µg y un volumen final de 25µl junto a los sueros de los donantes a una dilución final de 1/50, durante 20 minutos antes de añadir las células y comenzar el protocolo previamente descrito. Como control de unión a RBD se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-RBD SARS-CoV-2 (Sinobiological), y como control de unión a DC-SIGN se utilizó manano a una concentración de 25 µg/ml.

El citómetro utilizado en los ensayos fue un citómetro espectral Aurora (Cytex® Aurora).

Los resultados de citometría obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo (FlowJo™ v10.8).

13.2 ELISA con DC-SIGN soluble

Se desarrolló un ELISA casero recubierto con DC-SIGN humano soluble cedido por el Dr. Franck Fieschi del Institut de Biologie Structurale (Grenoble, France) para medir la unión de la lectina con la Spike de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1.

Para el desarrollo del ELISA se cubrió la placa con 150 ng por pocillo de DC-SIGN humano soluble en PBS frío pipeteando 50 µl en cada pocillo. A continuación, se cubrió la placa con parafilm y se dejó adherir la proteína toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavó la placa tres veces con 200 µl de buffer de lavado PBST (PBS x1 con 0,1% de Tween 20) y se añadió 200 µl de buffer de bloqueo (PBST con 3% de leche desnatada) dejándose incubar 2 horas.

Tras el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se hicieron en PBST con 1% de leche desnatada diluciones seriadas en base 2 de la proteína SARS-CoV-2 S HexaPro y Spike-SARS-CoV-1-PP comenzando con una concentración de 1000 ng por pocillo para la titulación de la proteína. Seguidamente se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación, se lavó la placa tres veces con 200 µl de buffer de lavado PBST y se añadió el anticuerpo primario mouse anti-SARS-CoV S Protein S2 Antibody (Biolegend, Cat: 944302) a una dilución 1:1000 en PBST con 1% de leche desnatada para la detección de la proteína SARS-CoV-2 S HexaPro y la dilución 1:1000 en PBST con 1% de leche desnatada del anticuerpo primario mouse anti-SARS Coronavirus Spike Protein Antibody (Invitrogen, Cat: MA1-41093) para la detección de la proteína Spike-SARS-CoV-1-PP. Se dejó incubar una hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavó la placa tres veces con 200 µl de buffer de lavado PBST y se añadió a todos los pocillos el anticuerpo secundario anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling, Cat: #7076) a una dilución 1:1000, dejándose incubar una hora a temperatura ambiente.

Pasada la incubación, del anticuerpo primario, se lavaron los pocillos tres veces con 200 µl de buffer de lavado PBST y se reveló la placa con OPD. Para ello se añadieron 100 µl de la solución SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich, Cat: P9187-50SET) a cada pocillo dejando incubar 10 minutos. Pasado el tiempo, se detuvo la reacción añadiendo 50 µl de ácido clorhídrico 3M.

Se midió la densidad óptica a 490 nm (OD490) usando un lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific).

14. Ensayos de neutralización

Para comprobar si la presencia de anticuerpos anti-NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 en sueros de pacientes pueden modular la actividad neutralizante del virus en presencia de lectinas, realizamos ensayos de neutralización con células 293T que expresan el receptor canónico ACE2 y 293T que expresan la lectina de tipos C DC-SIGN.

Los ensayos de neutralización se realizaron con sueros de personal sanitario en presencia de virus recombinantes SARS-CoV-2 basados en rVSV utilizando células diana 293T-ACE2 y la línea celular generada en la presente tesis 293T DC-SIGN. Los sueros del personal sanitario perteneciente al Hospital Universitario 12 de Octubre se obtuvieron del estudio de OMS (Solidarity II cohort, IRB approval ref CEIm 20/157) bajo consentimiento informado. Dichos sueros pertenecen a personal sanitario vacunado sin haber pasado previamente la infección natural por SARS-CoV-2 y personal sanitario convaleciente vacunado.

24 horas antes del ensayo, se sembró una placa de células 293T-ACE2 y una placa de 293T-DC-SIGN de 96 pocillos a una concentración de 4×10^4 células/pocillo con DMEM al 10% de suero bovino fetal.

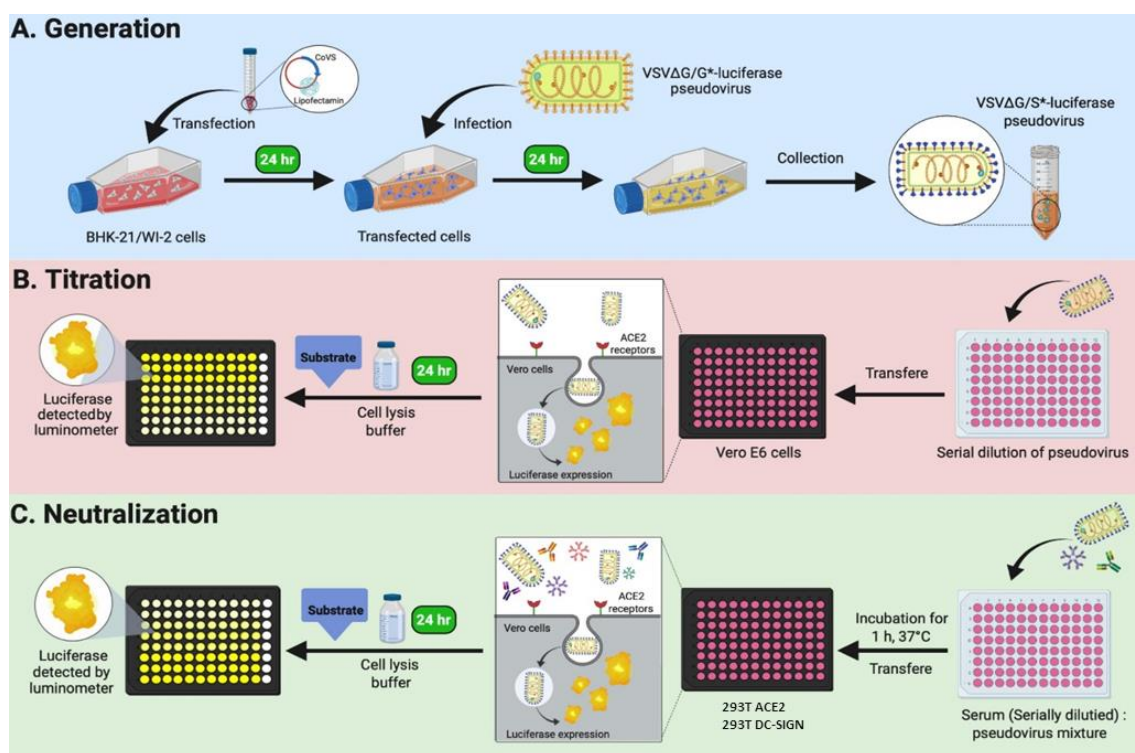


Ilustración 13. Proceso completo del ensayo de Neutralización. Resumen del proceso completo del ensayo de neutralización. (A) Generación de virus recombinantes basados en rVSV. (B) Titulación de los virus recombinantes basados en rVSV. (C) Ensayo de neutralización. Ilustración modificada de [Almahboub et al., 2020](#).

Al día siguiente, en una placa de 96 pocillos de fondo en U, se realizaron diluciones seriadas partiendo de 1/50 de los sueros en DMEM al 5% de suero bovino fetal. 60 µl de cada dilución se incubaron con 60 µl de virus recombinantes rVSV SARS-CoV-2 previamente titulado, a 37°C durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se traspasaron 100 µl a las células 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN sembradas el día anterior y se dejó incubar durante 24 horas a 37°C.

Al día siguiente, se lavó la monocapa celular una vez con 0,5 ml de PBS y se lisaron con 50 µl de buffer de lisis para cuantificarse, diez minutos más tarde, la actividad de luciferasa.

15. Análisis de glicosilaciones en las envueltas de las variantes de SARS-CoV-2

Para el análisis de N-glicosilaciones presentes en las envueltas víricas de las variantes Alpha, Beta, Gamma, Delta y Omicron se utilizó la herramienta online NetNGlyc-1.0 la cual predice sitios de N-glicosilación usando redes neuronales artificiales que identifican los sequones Asn-Xaa-Ser/Thr.

Para ello se introdujo la secuencia aminoacídica completa de las envueltas en el programa, el cual generó un gráfico que ilustraba los potenciales sitios de glicosilación a lo largo de la longitud de la secuencia.

El programa utiliza los caracteres “+” y “-” para asignar la potencialidad de los niveles de confianza para sitios positivos y negativos. Cualquier sitio potencial que cruce el umbral predeterminado de 0,5 representa un sitio glicosilado predicho (siempre que ocurra en la secuencia requerida Asn-Xaa-Ser/Thr sin prolina en Xaa). La puntuación "potencial" es la salida promediada de las nueve redes neuronales denominadas “jurado”.

El acuerdo al que llegue el Jurado (acuerdo de jurado) indica cuántas de las nueve redes neuronales apoyan la predicción. La leyenda del acuerdo de Jurado respecto a los sitios de N-glicosilación es la siguiente:

+ Potencial > 0.5

++ Potencial > 0.5 Acuerdo de Jurado (9/9) OR Potencial > 0.75

+++ Potencial > 0.75 y Acuerdo de Jurado

++++ Potencial > 0.90 y Acuerdo de Jurado

Para los sitios no glicosilados:

- Potencial < 0,5
- Potencial < 0,5 y acuerdo del jurado (los nueve < 0,5)
- Potencial < 0,32 y acuerdo del jurado

Tras el análisis de las secuencias, se trasladaron los resultados como motivos coloreados a las secuencias mostradas en Geneious. Cada + se trasladó como un motivo morado. Cada – como un motivo rojo.

16. Análisis estadístico y creación de imágenes

El análisis estadístico realizado en la presente tesis doctoral se realizó usando el programa estadístico Graphpad v8. Las imágenes fueron creadas con Biorender.com

Capítulo IV

RESULTADOS

Capítulo IV: Resultados

1. Infección en cis con virus recombinantes SARS-CoV-2

1.1. Infección directa en células inmortalizadas

La infección en *cis* con el virus recombinante de SARS-CoV-2 basado en VSV presentó una infección basal en las células 293T parental (no mostrada) con el virus sin diluir. En el ensayo de infección realizado con una dilución del virus 1/1000 (Figura 1) se puede observar bajos niveles de infección en las células 293T parentales y una fuerte infección en las células que expresan su receptor ACE2. Las células 293T que fueron transfectadas para que expresaran el receptor DC-SIGN obtuvieron niveles de RLU/s cercanos a un orden mayor de magnitud a los valores basales y las células 293T que expresan simultáneamente ACE2 y DC-SIGN mostraron unos niveles similares de infección a los ensayos en células 293T ACE2.

En las células adherentes BHK-21 se aprecian niveles basales en las líneas parentales y transfectadas con el receptor DC-SIGN y una fuerte infección en las células transfectadas con ACE2.

Las líneas celulares linfocíticas manifestaron ausencia de infección tanto en las células parentales como en las DC-SIGN estables.

Todas las líneas celulares que expresan DC-SIGN mostraron niveles de infección con el virus recombinante rVSV-EBOV usado como control (Figura 1), demostrando el funcionamiento *in vivo* del receptor DC-SIGN. El anticuerpo anti-DC-SIGN se utilizó como control ya que reduce la infección dependiente del receptor DC-SIGN en los ensayos de infección con EBOV como muestra la disminución de los valores de RLU/s en la infección con el anticuerpo.

Por otro lado, se realizó también una infección directa sobre células linfocitarias Jurkat y Jurkat DC-SIGN con el virus recombinante rVSV MERS-CoV. Los resultados muestran que el virus es capaz de infectar las células Jurkat DC-SIGN, pero no su línea parental (Figura1). La infección en *cis* con el anticuerpo humano anti-DC-SIGN igualmente muestra niveles apreciables de infección, pero con una bajada de valores en RLU/s, por lo que dicha infección es dependiente de la presencia de la lectina.

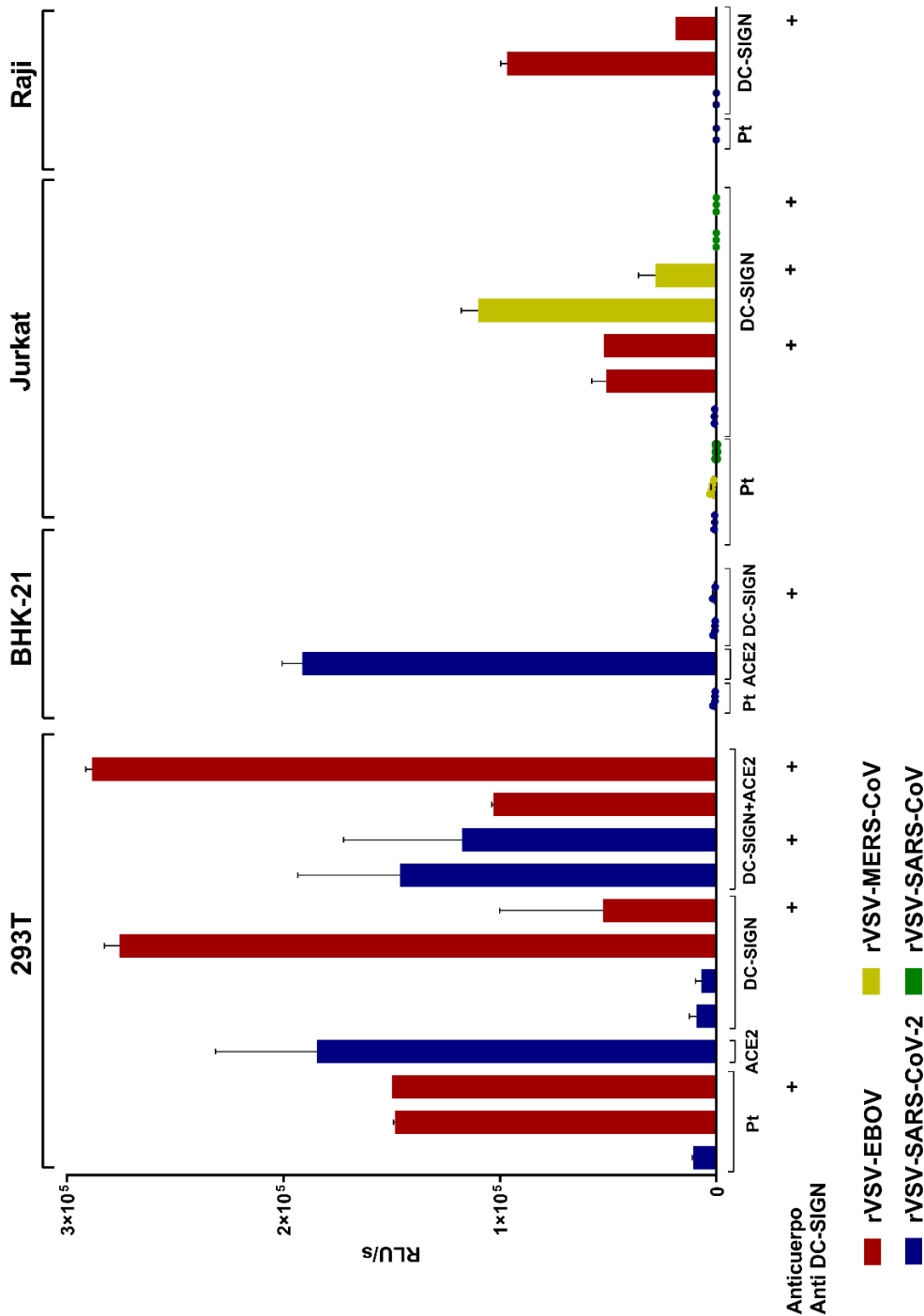


Figura 1. Infección directa con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1 y EBOV. Infección con SARS-CoV-2 (azul) dilución 1/1000 en líneas celulares 293T parentales (Pt), 293T-ACE2, 293T transfectadas con LZR-DC-SIGN-Cite-gfp, 293T-ACE2, BHK-21 parentales (Pt), BHK-21 transfectadas con pACE2, BHK-21 transfectadas con LZR-DC-SIGN-Cite-gfp, Raji parentales (Pt) y Raji DC-SIGN. Infección con SARS-CoV-2 (azul), MERS-CoV-1 (verde) en células Jurkat parentales (Pt), Jurkat DC-SIGN. En rojo se muestra la infección del virus rVSV-EBOV usado como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN. El anticuerpo anti-DC-SIGN se usó como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN. Los valores mostrados en las columnas corresponden a la media aritmética $\pm$ SEM de los valores de unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) a las 24h post-infección en tres réplicas de tres experimentos independientes.

1.2. Infección directa en células primarias

La infección directa realizada con el virus basado rVSV SARS-CoV-2 en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDC) mostró ausencia total de infección en las mismas con ausencia de valores RLU/s (Figura 2).

Esperando una mayor infección en presencia del receptor D/L-SIGN se usó como control virus recombinante EBOV basado en rVSV, y como control de infección independiente de D/L-SIGN se usó rVSV-G los cuales mostraron altos valores de RLU/s, los cuales se veían disminuidos con el uso del anticuerpo anti DC/L-SIGN en la infección con EBOV y similares con dicho anticuerpo en la infección con VSV.

La infección directa realizada con el virus basado rVSV MERS-CoV en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) mostró altos niveles de infección en las mismas, sin embargo, la infección en las MDDC con el anticuerpo anti-DC-SIGN que fue usado como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN también presentó niveles comparables de infección.

La infección directa realizada con el virus rVSV-SARS-CoV-1 en células MDCC mostró una ausencia total de infección, mostrando que el virus no utiliza DC-SIGN como receptor directo de infección.

Los resultados muestran significancia estadística en la infección en cis con EBOV en MDDC, no así con MERS-CoV, y VSV.

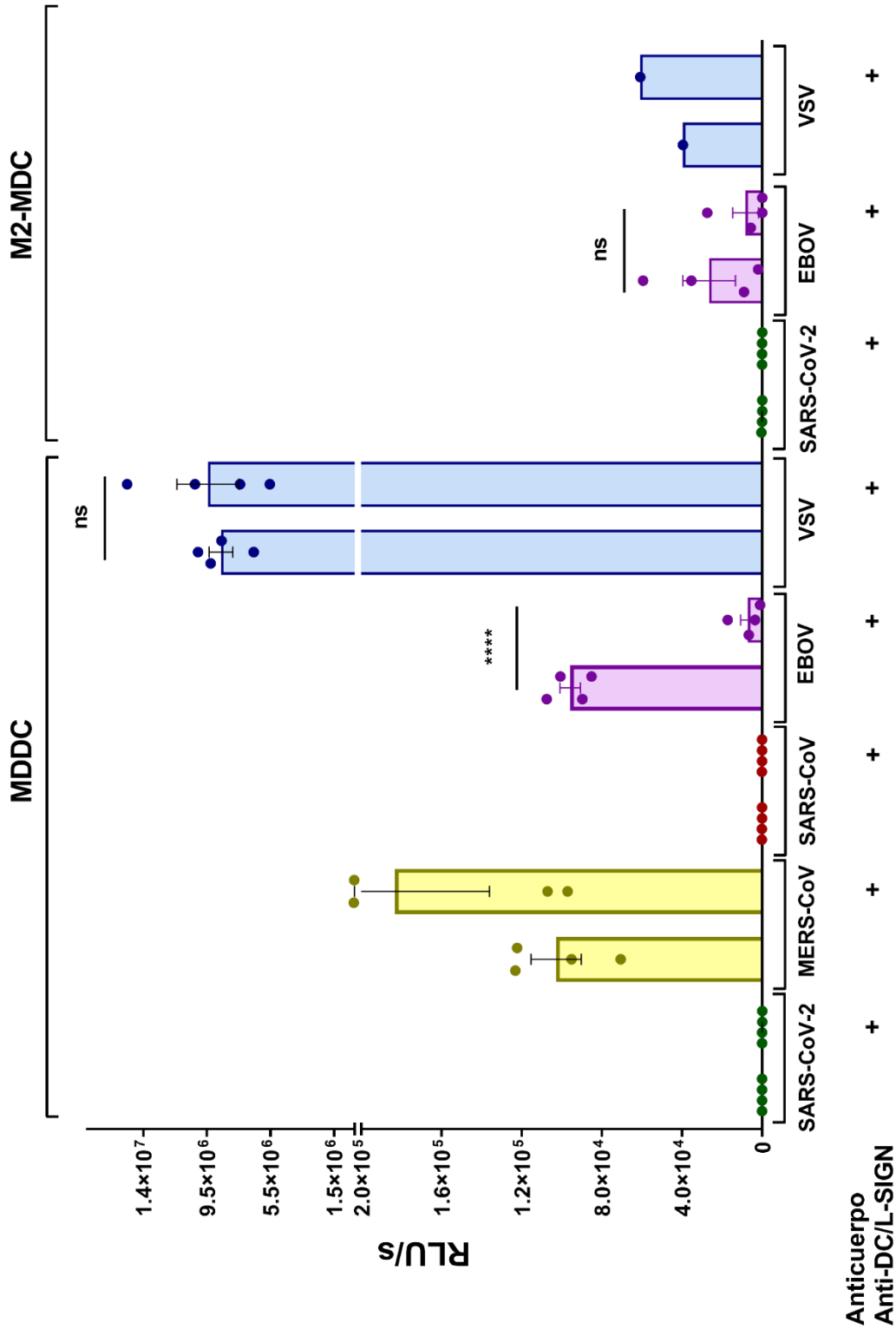


Figura 2. Infección directa en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDC) con virus recombinantes de SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, EBOV y VSV basados en rVSV. Las barras representan la media $\pm$ SEM por triplicado en dos experimentos independientes con células de 4 donantes distintos en unidades relativas de luz (RLU/s) a las 24h post-infección. Los resultados individuales se muestran como puntos dispersos. Se usó como control de DC-SIGN EBOV y como control de infección independiente VSV. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

2. Infección en *trans* con virus recombinantes SARS-CoV-2

2.1. Transinfección con células inmortalizadas

La infección en *trans* con virus recombinantes basados en rVSV de la cepa de Wuhan SARS-CoV-2 614D y cepa de referencia SARS-CoV-2 614G en células incubadas Jurkat muestran ausencia de interacción en células Vero E6, por otra parte, en células incubadas Jurkat DC-SIGN puede observarse alta interacción con el receptor DC-SIGN en las células diana Vero E6 24 horas después de la infección en *trans* (Figura 3).

El control con manano mostró una reducción en RLU/s similar en ambos virus.

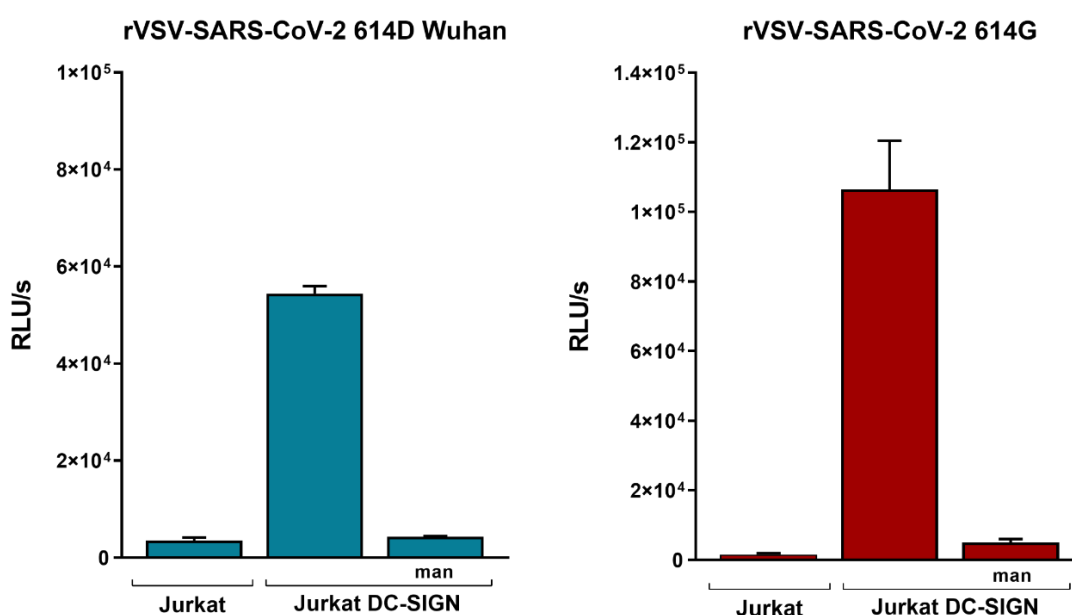


Figura 3. Infección en *trans* de virus recombinante rVSV-SARS-CoV-2 614D cepa Wuhan-hu-1 y cepa de referencia 614G. Transinfección con rVSV-SARS-CoV-2 Wuhan-hu-1 614D (en azul) y virus recombinante rVSV-SARS-CoV-2 614G cepa de referencia (en rojo) en líneas celulares Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN. Se usó manano como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN. Los valores mostrados en las columnas corresponden a la media aritmética $\pm$ SEM de los valores de unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) a las 24h post-infección en cinco réplicas de cinco experimentos independientes en células Vero E6.

Por otro lado, la infección en trans en células Jurkat y Jurkat DC-SIGN con las variantes de SARS-CoV-2 Alpha, Beta, Gamma y Delta mostró que el uso del receptor DC-SIGN por parte de la proteína S del virus se mantenía a pesar de los distintos niveles de transinfección en las mismas (Figura 4).

El uso del receptor DC-SIGN fue mayor en las variantes Beta y Delta presentando valores altos de RLU/s, por otra parte, se observaron en las variantes Alpha y Gamma valores cercanos a niveles basales.

Por otra parte, se puede observar que los valores de RLU/s de la variante Omicron son muy similares a la cepa ancestral Wuhan.

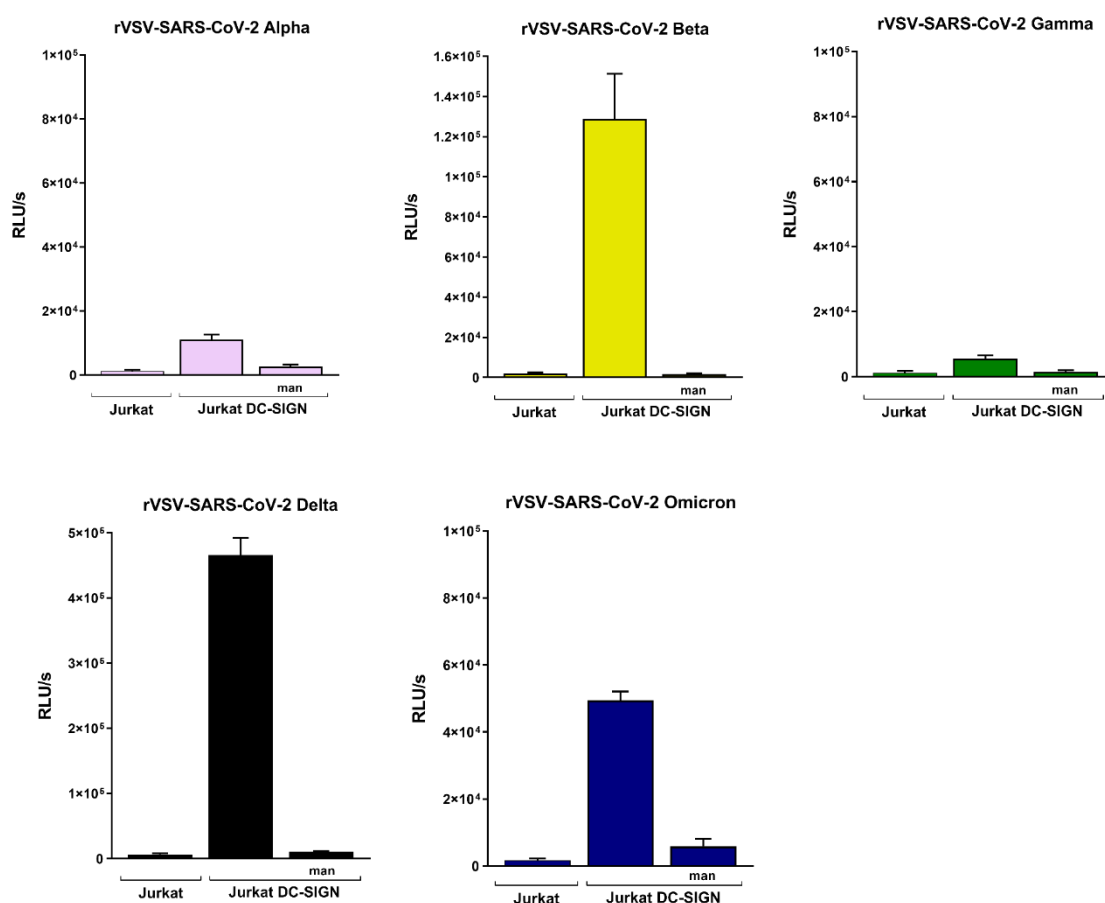


Figura 4. Infección en trans de virus recombinantes de las variantes de SARS-CoV-2. Transinfección en células diana Vero E6 con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2 Alpha (en rosa), rVSV-SARS-CoV-2 Beta (en amarillo), rVSV-SARS-CoV-2 Gamma (en verde), rVSV-SARS-CoV-2 Delta (en negro) y Omicron (azul oscuro) en líneas celulares Jurkat parentales, Jurkat DC-SIGN. Se usó manano como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN. En la columna Infección se muestran los valores correspondientes de la infección directa en células Vero E6 del virus usado en la incubación con las líneas linfocitarias. Los valores mostrados en las columnas corresponden a la media aritmética $\pm$ SEM de los valores de unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) a las 24h post-infección en cinco réplicas de cinco experimentos independientes en células Vero E6.

Por otra parte, para determinar si entre las envueltas de las variantes los valores de RLU/s son iguales, o también, dicho de otra forma, si la relación entre estas variables numéricas es equivalente, realizamos el cálculo de ratio Jurkat DC-SIGN/Jurkat partiendo de los valores de transfección previamente mostrados:

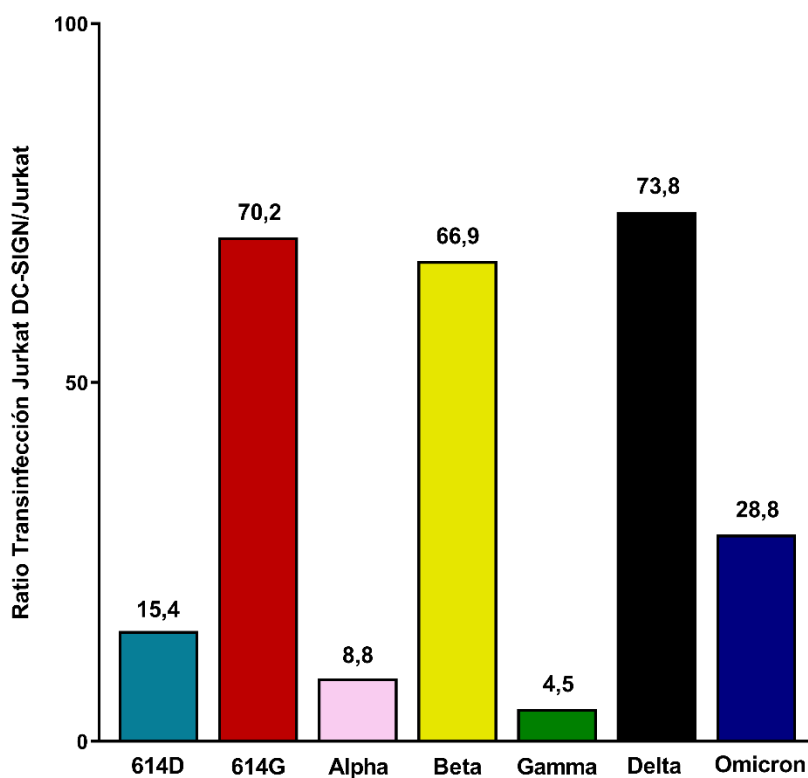


Figura 5. Ratio de transfección de las células Jurkat DC-SIGN de las variantes 614G (rojo), Alpha (azul oscuro), Beta (amarillo), Gamma (verde), Delta (morado), Omicron (rosa) respecto a la variante ancestral de SARS-CoV-2 Wuhan-hu-1 614D (azul).

También se ensayó la infección en *trans* con el coronavirus rVSV-SARS-CoV-1 en células linfocitarias Jurkat y Jurkat DC-SIGN usando como diana celular final Vero E6.

Los resultados muestran que la proteína S hace uso del receptor DC-SIGN de igual forma que SARS-CoV-2. Los valores de RLU/s disminuidos con el control del uso de la lectina, manano demuestran que la transfección es específica de DC-SIGN (Figura 6).

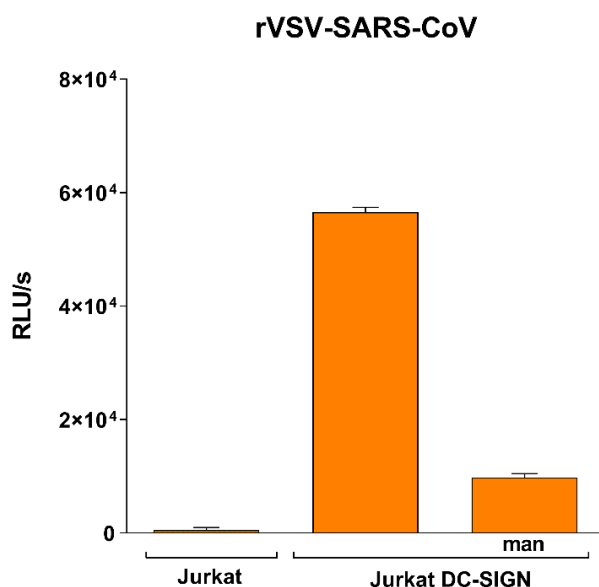


Figura 6. Infección en trans con el virus recombinante rVSV-SARS-CoV. Transinfección con rVSV-SARS-CoV-1 en células diana Vero E6 con las líneas celulares Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN. Se usó manano como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN.

Los valores mostrados en las columnas corresponden a la media aritmética $\pm$ SEM de los valores de unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) a las 24h post-infección en tres réplicas de cinco experimentos independientes en células Vero E6.

La infección en trans se realizó también células diana pulmonares Calu-3. Los valores de RLU/s son más bajos que en las células diana Vero E6 pero se sigue manteniendo el uso del receptor DC-SIGN por parte del SARS-CoV-2.

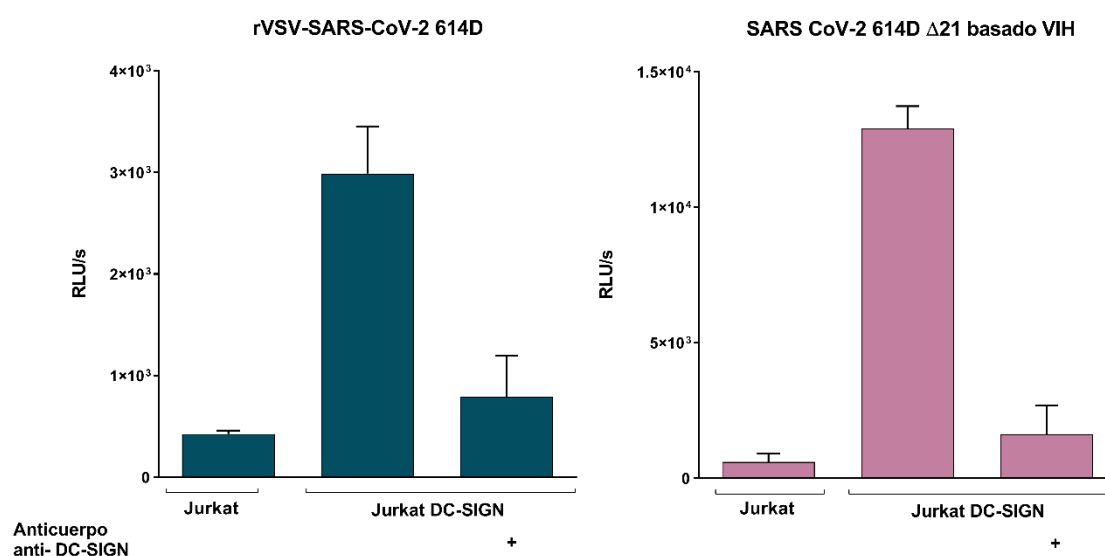


Figura 7. Infección en trans de virus recombinante SARS-CoV-2 614D cepa Wuhan basado en rVSV y VIH. Transinfección en células diana Calu-3 con rVSV-SARS-CoV-2 614D (en azul oscuro) y VIH (rosa oscuro) en líneas celulares Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN. Se usó el anticuerpo anti-DC-SIGN como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN. Los valores mostrados en las columnas corresponden a la media aritmética $\pm$ SEM de los valores de unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) a las 24h post-infección en duplicado en dos experimentos independientes en células Calu-3.

La figura 7 muestra que el ensayo de infección en trans en las células diana Calu-3, DC-SIGN promueve una transinfección eficaz con los virus recombinantes basados en rVSV y VIH.

Por otro lado, se quiso comprobar si el homólogo de DC-SIGN, L-SIGN era capaz de actuar como receptor auxiliar con el virus SARS-CoV-2. Para ello se realizó un ensayo de infección en trans con células Jurkat y Jurkat L-SIGN y Jurkat DC-SIGN en células diana Vero E6.

La lectina L-SIGN mostró valores de RLU/s más altos en ensayos de transinfección en la línea linfocitaria Jurkat L-SIGN por parte de la proteína S de SARS-CoV-2 y valores disminuidos en con su control con anticuerpo humano anti-DC/L-SIGN, manifestando el uso de la lectina L-SIGN por parte del virus (Figura 8).

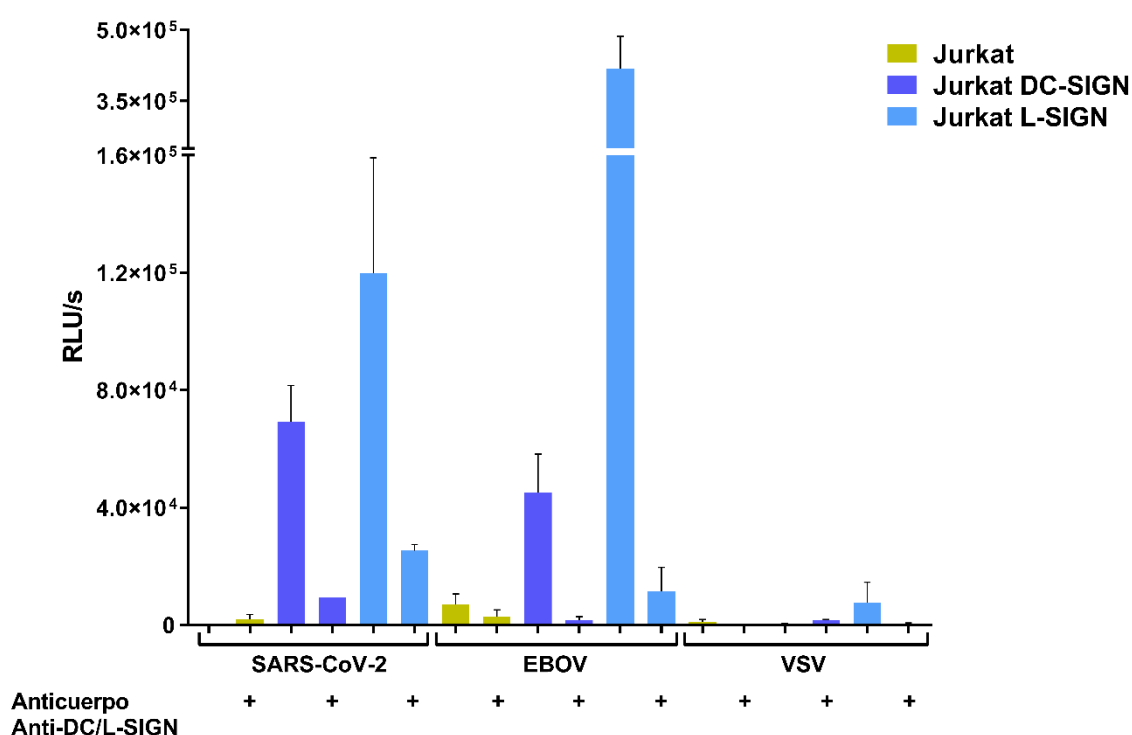


Figura 8. Infección en trans en líneas celulares linfocitarias Jurkat, Jurkat DC-SIGN y Jurkat L-SIGN con virus recombinantes SARS-CoV-2, EBOV y VSV basados en rVSV. Las barras representan la media $\pm$ SEM de tres réplicas en dos experimentos independientes en unidades relativas de luz (RLU/s) a las 24h post-infección. Se usó como control de DC-SIGN EBOV y como control de infección independiente VSV. Los resultados muestran uso del receptor L-SIGN por parte de la proteína S de SARS-CoV-2 y. El anticuerpo anti-DC/L-SIGN se usó como control de la inhibición de la infección mediada por L-SIGN.

2.2. Transinfección con células primarias

El ensayo de infección en trans en células dendríticas derivadas de monocitos con virus recombinante basado en rVSV-SARS-CoV-2 dio lugar a valores de RLU/s elevados, mostrando que DC-SIGN promovió una transinfección eficaz por SARS-CoV-2 de MDDC a células Vero E6 (Figura9). El control usado con el anticuerpo anti-DC-SIGN mostró una reducción sustancial en la infectividad observada con una inhibición del 98%, confirmando la especificidad de la lectina en el proceso de transinfección por SARS-CoV-2.

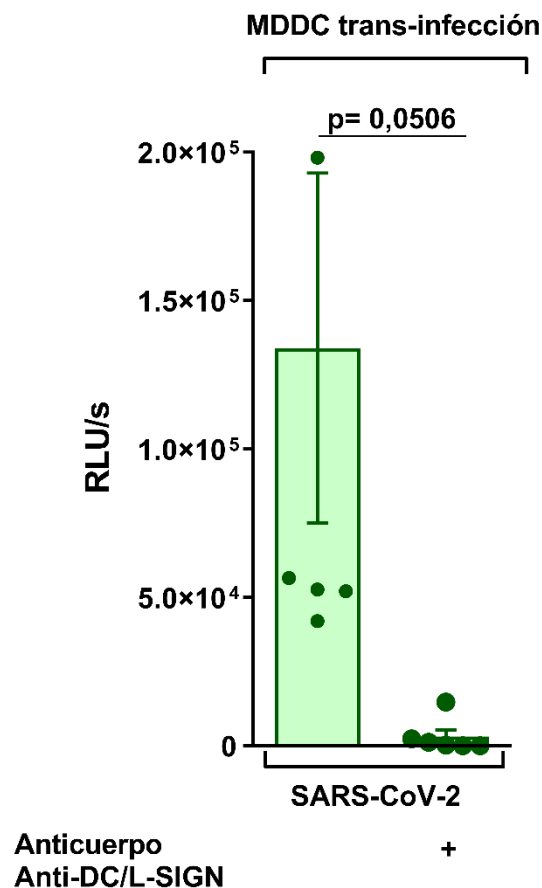


Figura 9. Infección en trans en MDDC con virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2 en células diana Vero E6. Las barras representan la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con células de diferentes donantes realizados por duplicado. Los resultados individuales se presentan como diagrama de puntos dispersos. Como control de la inhibición de la transinfección mediada por DC-SIGN, se utilizó el anticuerpo anti-DC/L-SIGN. Los valores de infección se expresan como Unidades Relativas de Luz (RLU). La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

Por otro lado, se realizó el mismo experimento con los virus recombinantes basados en rVSV de SARS-CoV-1 y MERS-CoV. Los resultados mostraron que ambos virus presentan una transinfección promovida por DC-SIGN (Figura 10).

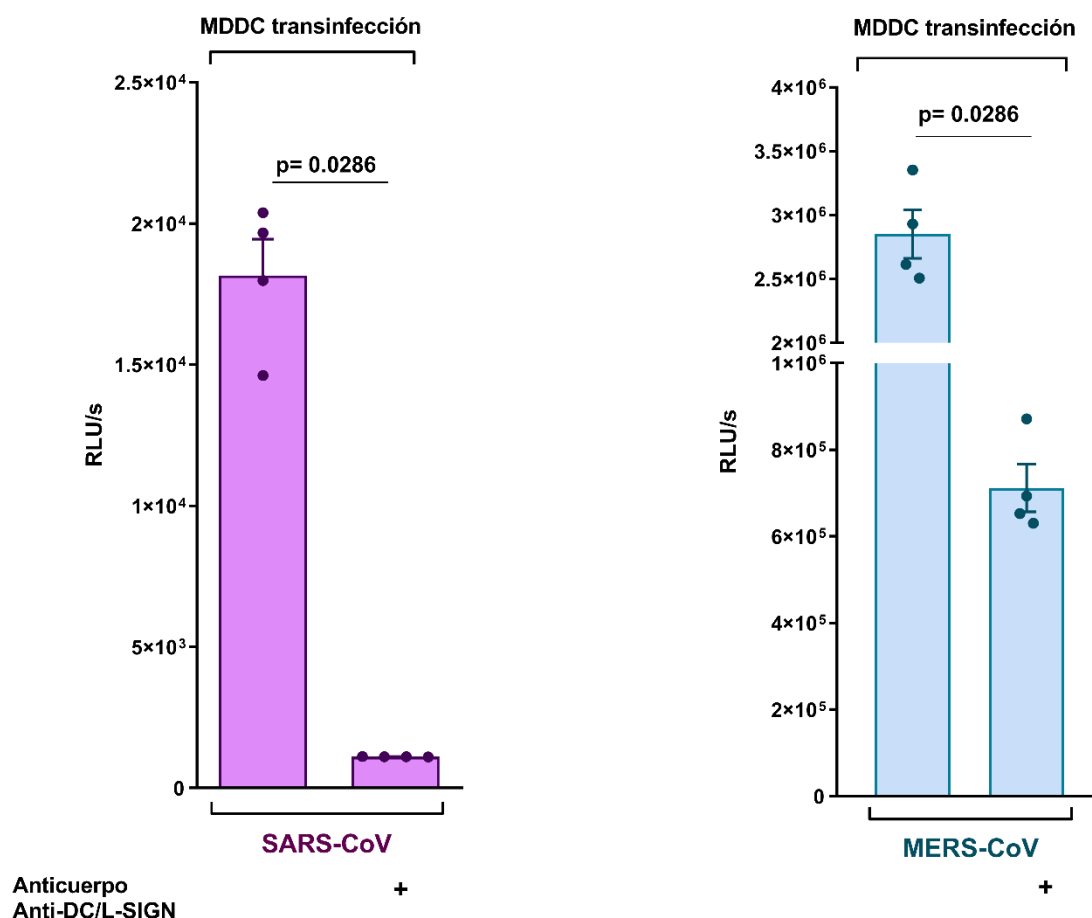


Figura 10. Infección en trans en MDDC con virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-1 y MERS-CoV. Transfección con SARS-CoV-1 (en rosa oscuro) y MERS-CoV (en azul) en células diana Vero E6. Las barras representan la media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes con células de diferentes donantes realizados por duplicado. Los resultados individuales se presentan como diagrama de puntos dispersos. Como control de la inhibición de la transfección mediada por DC-SIGN, se utilizó anticuerpo anti-DC-SIGN. Los valores de infección se expresan como Unidades Relativas de Luz (RLU). La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

3. Infección en trans con virus SARS-CoV-2 replicativo

3.1. Transfección con células inmortalizadas

Para la transfección con virus SARS-CoV-2 replicativo obtenido mediante el cultivo de una muestra clínica humana se utilizaron las células inmortalizadas Jurkat y Jurkat DC-SIGN para la incubación con el mismo y células inmortalizadas Calu-3 2B4 como diana celular.

La transfección mostró que DC-SIGN promovió una infección en trans eficaz en las células Calu-3 2B4 mediada por las células Jurkat DC-SIGN, a diferencia de las células Jurkat que no mostraron valores de transfección apreciables (Figura 11). Además, el anticuerpo anti-DC/L-SIGN mostró una reducción ($p < 0.0001$) en los valores de infección mostrando la dependencia de la lectina en la eficacia de la infección en trans.

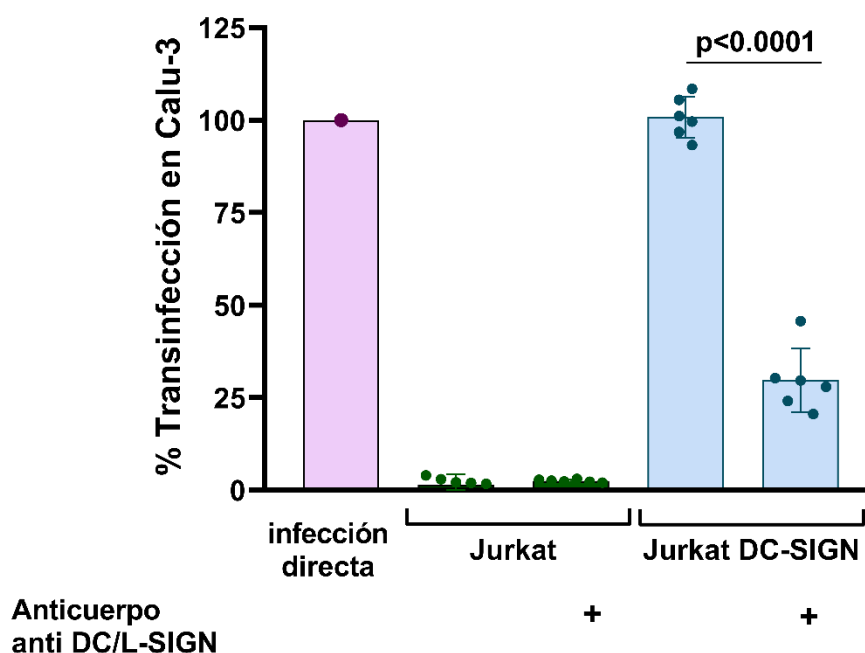


Figura 11. Transinfección mediada por DC-SIGN de una línea linfocitaria con el aislado clínico de SARS-CoV-2. El aislado clínico de SARS-CoV-2 se utilizó con un MOI: 1. La barra de infección directa establecida como 100% de la infección corresponde a la media de seis réplicas de infección directa de células Calu-3 con la misma MOI del SARS-CoV-2 auténtico. Las barras representan la media $\pm$ SEM de dos experimentos por triplicado. Como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN, se utilizó el anticuerpo anti-DC/L-SIGN. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

3.2. Transinfección con células primarias

Se utilizaron células dendríticas para confirmar los experimentos de transinfección realizados con virus replicativo en Jurkat y Jurkat DC-SIGN y Calu-3 2B4 como diana celular.

Para ello, se derivaron células dendríticas a partir de monocitos aislados de sangre periférica (ver materiales y métodos 7.) para ser incubadas con SARS-CoV-2 replicativo, revelándose de igual forma, en células Calu-3 2B4 (Figura 12). Como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN, se utilizó Ab humano anti-DC-SIGN el cual mostró valores reducidos de infección.

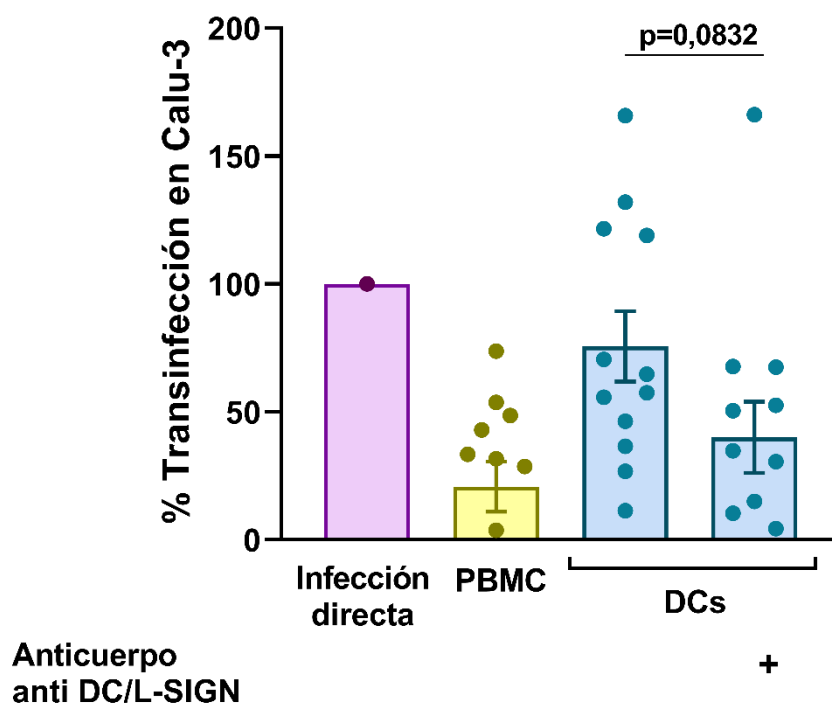


Figura 12. Transinfección mediada por DC-SIGN de una línea celular respiratoria Calu-3 con el aislado clínico de SARS-CoV-2. El aislado clínico de SARS-CoV-2 se utilizó con un MOI: 0,1-1. La barra de infección directa establecida como 100% de la infección corresponde a la media de seis réplicas de infección directa de células Calu-3 con la misma MOI del SARS-CoV-2 auténtico. Los MDDC (en azul) y PBMC (en amarillo) para este experimento se obtuvieron de 4 donantes de sangre sanos diferentes. Las barras representan la media de triplicados de dos experimentos independientes (3 donantes y un donante respectivamente) $\pm$ SEM de la media. Como control de la inhibición de la infección mediada por DC-SIGN, se utilizó el anticuerpo anti-DC/L-SIGN. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

4. Ensayo de unión

4.1. Interacción con DC-SIGN

Los niveles de expresión de la lectina DC-SIGN se pudieron conocer mediante la medición de la señal de PE del anticuerpo humano anti-DC-SIGN conjugado con Ficoeritrina (PE), que previamente fue incubado con las líneas linfocitarias Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN.

Los niveles de expresión de la lectina se muestran a continuación:

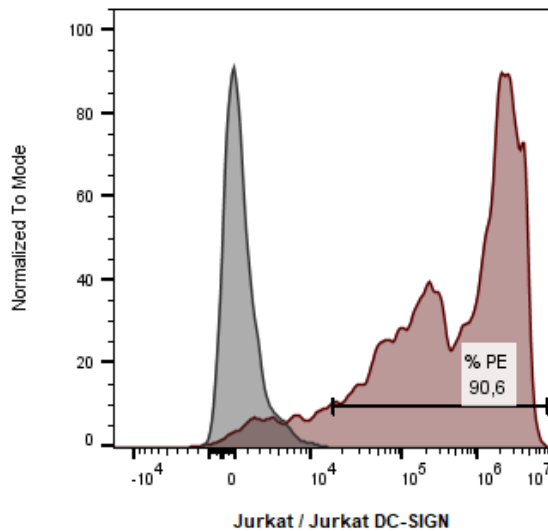


Figura 13. Análisis de la expresión de DC-SIGN en las líneas linfocitarias Jurkat mediante el uso del anticuerpo Anti-DC-SIGN_PE. El pico rojo claro representa las Jurkat DC-SIGN teñidas con el anticuerpo Anti-DC-SIGN_PE. El pico gris representa las Jurkat parentales sin teñir.

El análisis de expresión de la lectina DC-SIGN indicó una expresión de esta de un 95,2% en la superficie celular de las Jurkat-DC-SIGN. Así mismo, la ausencia de unión del anticuerpo anti-DC-SIGN PE a la línea parental Jurkat confirma la ausencia de expresión en la misma (Figura 13).

Por otra parte, los resultados de las células Jurkat parentales y Jurkat DC-SIGN incubadas con la proteína S soluble Hexapro de SARS-CoV-2 confirman la unión de la proteína de membrana a la lectina.

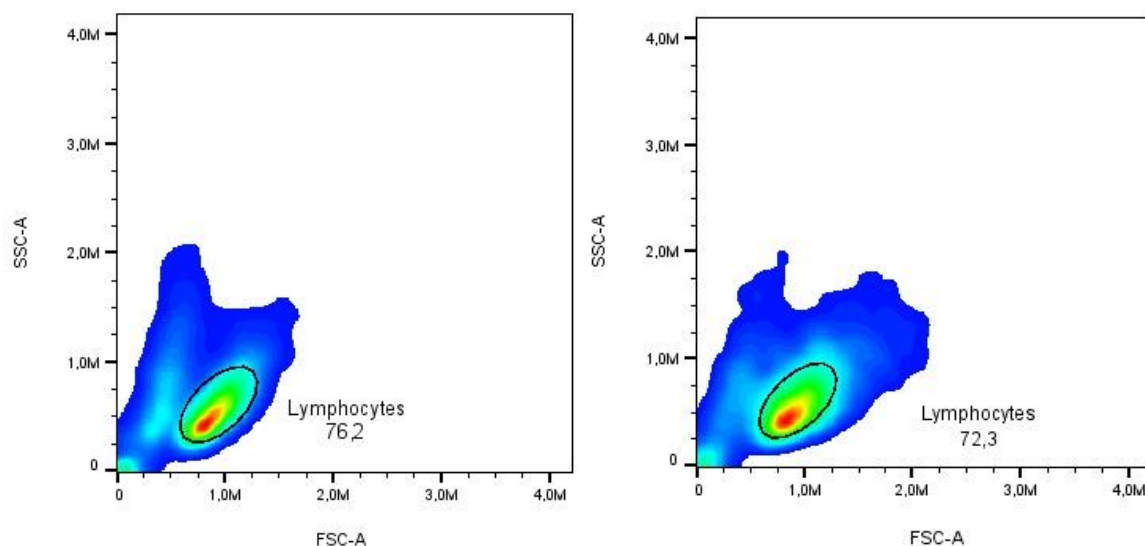


Figura 14. Selección de la población linfocitaria en el ensayo de unión a DC-SIGN. La imagen de la izquierda representa la selección de la población Jurkat parental, la imagen de la derecha representa la selección de la población Jurkat DC-SIGN.

El ensayo de citometría consistió en la selección de la población linfocitaria viva para el análisis de la señal del anticuerpo anti-His PE.

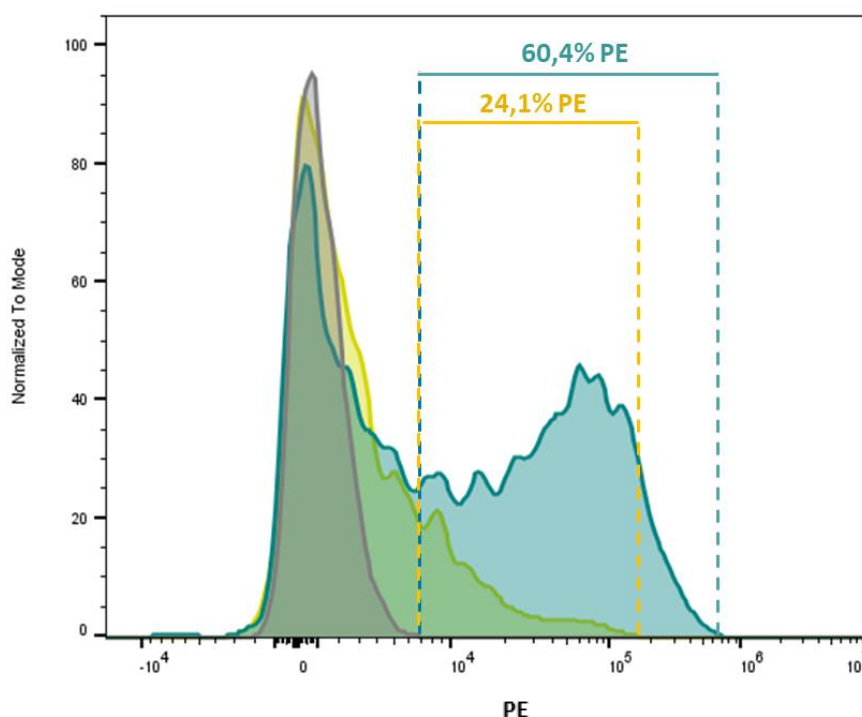


Figura 15. Ensayo de interacción de la proteína S de SARS-CoV-2 con DC-SIGN. Para la medición de la unión entre la proteína S y DC-SIGN se realizó un análisis de la población linfocitaria mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His en su unión a la proteína S Hexapro. Como control negativo de fluorescencia se seleccionó la población Jurkat parental incubada con la proteína S (pico gris). El pico azul representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro. El pico amarillo representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión a la proteína soluble S Hexapro incubada con manano.

El ensayo de unión muestra que la proteína S soluble de SARS-CoV-2 Hexapro se une a la lectina de tipo C DC-SIGN presente en la línea linfocitaria Jurkat DC-SIGN concretamente el porcentaje de unión en el ensayo fue de un 60,4% (Figura 15).

Además, el control con manano demostró que esta unión es específica ya que el porcentaje de unión al receptor disminuye a un 24,1% cuando se incubaba con las células ya que este es un inhibidor de las funciones de DC-SIGN. Por otra parte, también se puede observar que la unión es específica observando el control Jurkat parental, el cual al carecer de DC-SIGN no presenta ningún tipo de unión y por tanto hay ausencia de señal de PE.

4.2. ELISA con DC-SIGN soluble

El ELISA realizado con DC-SIGN soluble y la proteína adquirida SARS-CoV-2 S HexaPro y la proteína construida en la presente tesis (ver materiales y métodos 12.) Spike-SARS-CoV PP Hexapro siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver materiales y métodos 11.), la visualización de coloración demostró la unión lectina-antígeno y, por tanto, el reconocimiento de DC-SIGN por parte de la proteína S de SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 (Figura 16).

El límite de detección se calculó como la última señal positiva por encima del corte establecido como el promedio más tres desviaciones estándar de la señal del blanco. La última señal positiva corresponde a 62,5ng de proteína soluble en ambas envueltas.

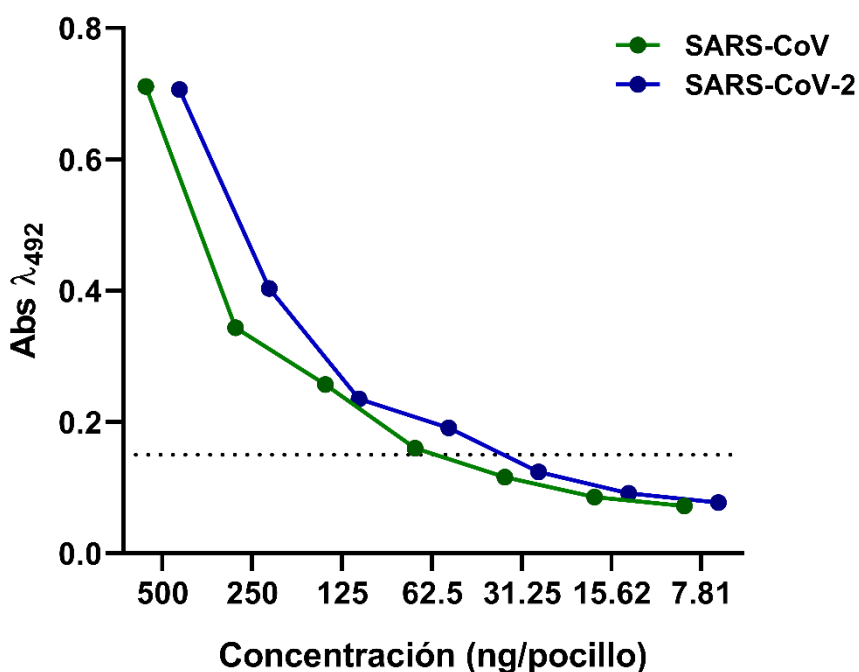


Figura 16. ELISA con DC-SIGN soluble y la proteína soluble de SARS-CoV-2 y SARS-CoV. En el eje X se representa la concentración de la proteína S por pocillo y el eje Y su absorbancia a una longitud de onda de 492. El límite de detección se calculó como la última señal positiva por encima del corte establecido como el promedio más tres desviaciones estándar de la señal del blanco se representa en la gráfica como una línea de puntos. La última señal positiva corresponde a 62,5ng de las proteínas de SARS-CoV-2 y SARS-CoV.

5. Búsqueda de anticuerpos anti-NTD Spike SARS-CoV-2

5.1. Ensayo de neutralización

Para comprobar si la presencia de anticuerpos anti-NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 en sueros de pacientes, puede modular la actividad neutralizante del virus en presencia de lectinas realizamos ensayos de neutralización con células 293T que expresan el receptor canónico ACE2 y 293T que expresan la lectina de tipos C DC-SIGN.

Los resultados del ensayo de neutralización en presencia del suero del paciente vacunado 408 que no se había infectado previamente con el virus autentico, en el modelo celular 293T ACE2 y 293T DC-SIGN con virus recombinantes de la cepa de referencia SARS-CoV-2 614G basados en rVSV fueron los siguientes:

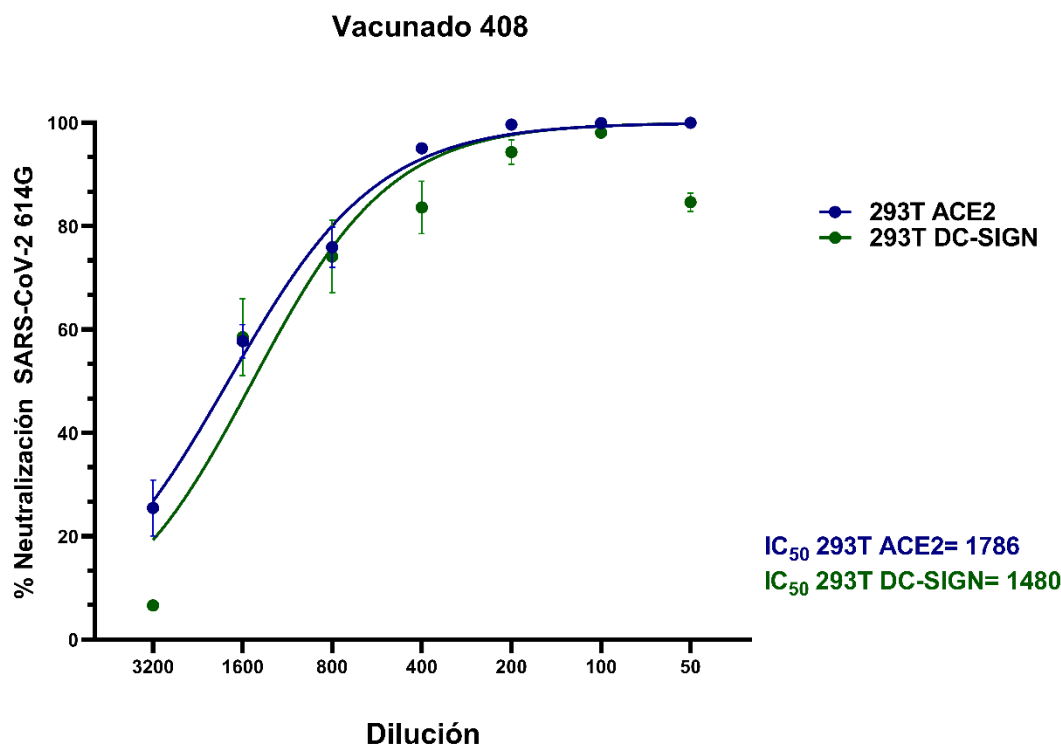


Figura 17. Neutralización con el suero vacunal 408 en células 293T y 293T DC-SIGN. Curva de neutralización en células 293T ACE2 (azul) y 293T DC-SIGN (verde) con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2 614G en presencia del suero vacunal 408. A pie del gráfico se muestran las diluciones inhibitorias del 50% del suero en ambas líneas celulares. El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad PrismV8.

Como se puede observar, la actividad neutralizante del virus en presencia del suero, tanto en células diana 293T ACE2 como en las células 293T DC-SIGN, es similar, siendo la concentración

(en este caso dilución) inhibitoria del 50% del suero 408 de 1/1786 en el sistema 293T ACE2 y 1/1480 en el sistema de 293T DC-SIGN (Figura 17).

También se comprobó el suero del paciente vacunado 311 que tampoco había tenido contacto previamente con el virus auténtico. Los resultados del ensayo de infección en presencia del mismo fue el siguiente:

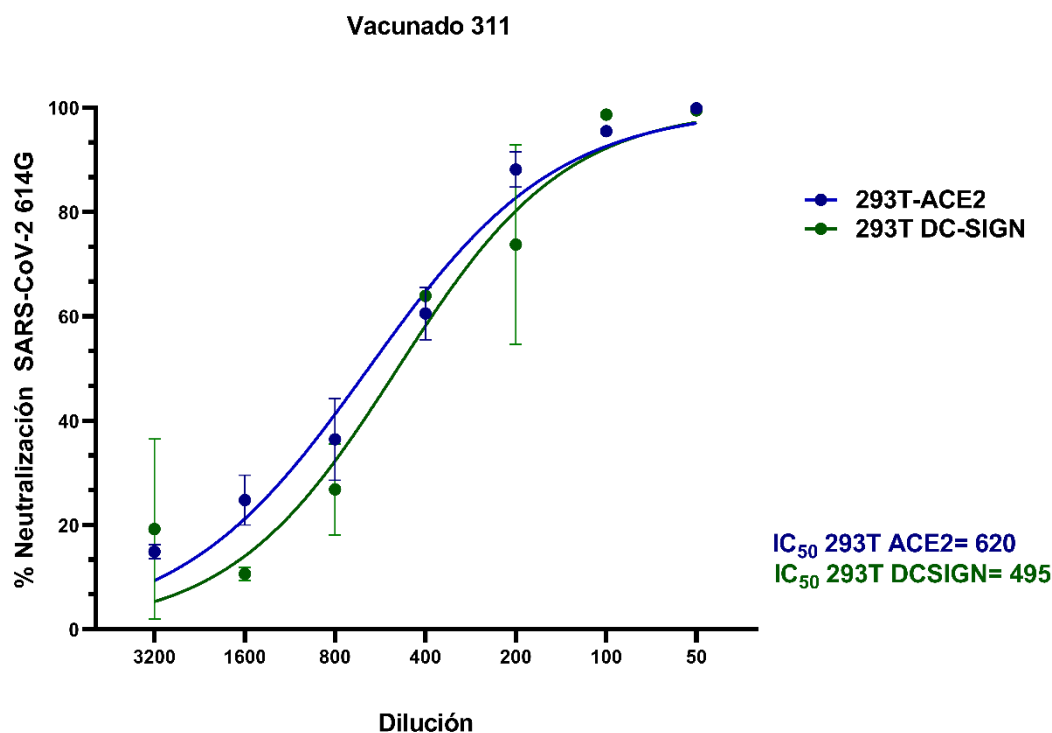


Figura 18. Neutralización con el suero vacunal 311 en células 293T y 293T DC-SIGN Curva de neutralización en células 293T ACE2 (azul) y 293T DC-SIGN (verde) con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2 614G en presencia del suero vacunal 311. A pie del gráfico se muestran las diluciones inhibitorias del 50% del suero en ambas líneas celulares. El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad PrismV8.

La curva de la actividad neutralizante del suero vacunal 311 en la línea celular 293T que expresa el receptor ACE2 resulta similar a la curva de la actividad neutralizante en las células 293T DC-SIGN no existiendo entre ellas diferencias significativas, siendo la IC_{50} de 1/620 en la línea celular 293T ACE2 y 1/495 en la línea celular 293T DC-SIGN (Figura 18). Para comprobar si la presencia de los anticuerpos anti-NTD de la proteína S, puede verse influida de una infección natural al virus auténtico, probamos un suero convaleciente vacunal, el suero 105. Los resultados de la actividad de dicho suero fueron los siguientes:

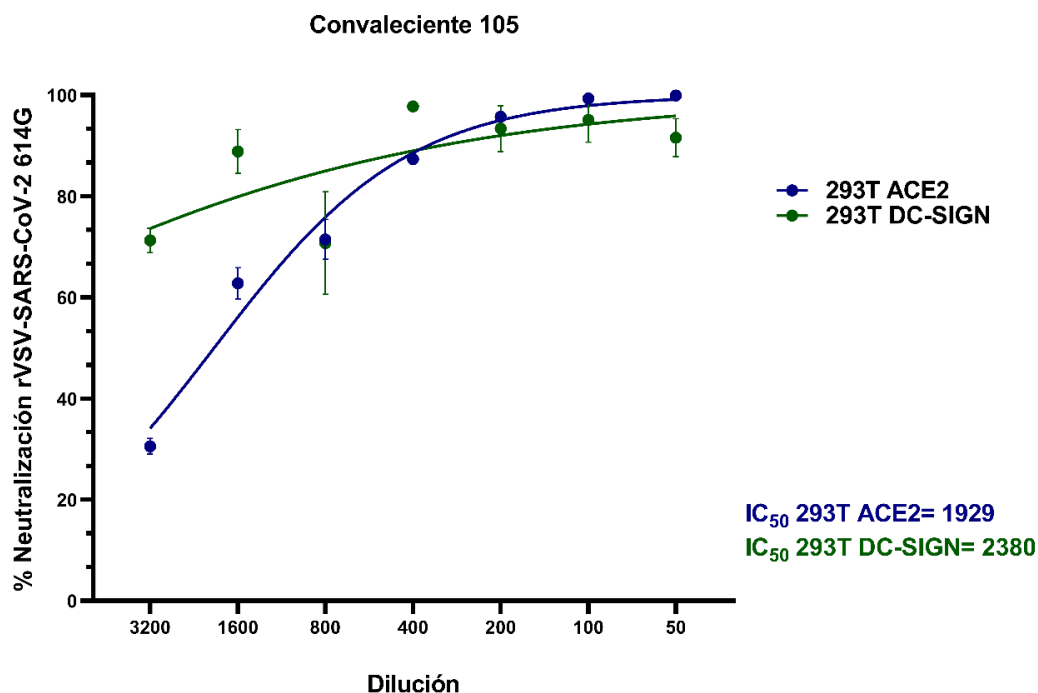


Figura 19. Neutralización con el suero convaleciente 105 en células 293T y 293T DC-SIGN Curva de neutralización en células 293T ACE2 (azul) y 293T DC-SIGN (verde) con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-2 614G en presencia del suero convaleciente vacunal 105. A pie del gráfico se muestran las diluciones inhibitorias del 50% del suero en ambas líneas celulares. El análisis estadístico se realizó con el programa informático GraphPad PrismV8.

Los resultados de infección muestran que la actividad neutralizante en presencia del suero convaleciente vacunal 105 es similar en ambos sistemas, siendo la IC₅₀ de 1/1929 en las células 293T ACE2 y 1/2380 en las células 293T DC-SIGN (Figura 19).

Los ensayos de neutralización no muestran presencia de anticuerpos anti-NTD de la proteína S que modulen la actividad neutralizante en los sueros de los donantes vacunados y del donante convaleciente vacunado.

5.2. Ensayo de unión

Con el objetivo de hallar la presencia de anticuerpos anti-NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 que modifiquen la actividad neutralizante en presencia de lectinas debido a la inhibición por parte de estos, de la interacción entre la proteína S de SARS-CoV-2 y DC-SIGN realizamos los ensayos de neutralización previamente descritos (ver resultados 5.1.). La relativa lentitud de los mismos, unido a la mayor sensibilidad del análisis de interacción entre la proteína vírica y la lectina DC-SIGN de los ensayos mediante citometría de flujo, llevó a una búsqueda de estos anticuerpos a

través de los ensayos de unión de DC-SIGN con la proteína S soluble Hexapro en presencia de dichos sueros.

Para ello, utilizamos la línea celular linfocitaria Jurkat y Jurkat DC-SIGN gfp. Los niveles de expresión de la lectina se cuantificaron mediante la medición de la señal del anticuerpo anti-DC-SIGN-PE y los niveles de gfp presentes en la misma célula:

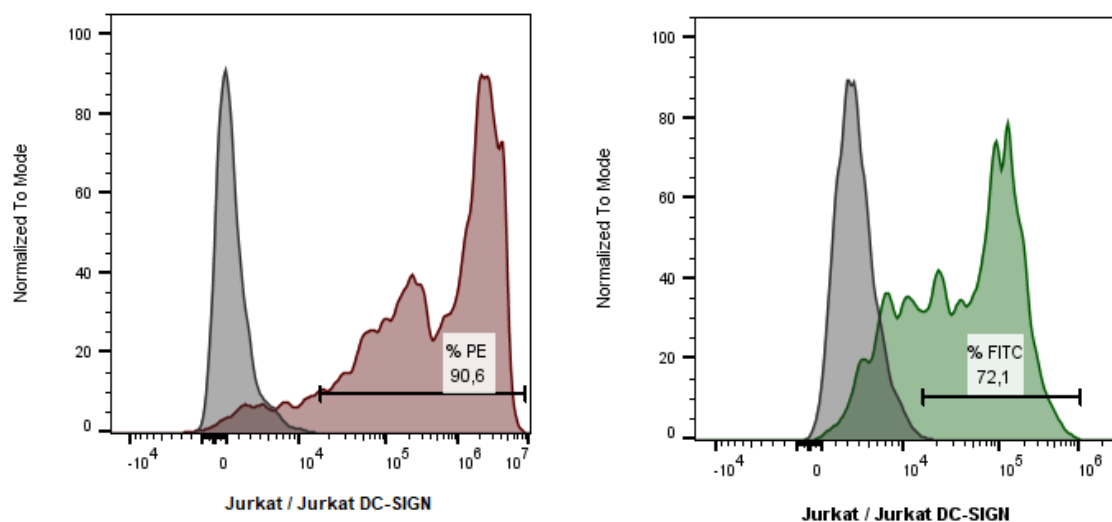


Figura 20. Análisis de la expresión de DC-SIGN en líneas linfocitarias. El análisis de la expresión de DC-SIGN en las líneas Jurkat se realizó mediante la medición de la señal de Ficoeritrina del anticuerpo anti-DC-SIGN_PE. El pico rojo representa el porcentaje de las Jurkat DC-SIGN teñidas con el anticuerpo anti-DC-SIGN_PE. El pico gris representa el porcentaje de las Jurkat parentales sin teñir (izquierda del gráfico). El análisis de la expresión de DC-SIGN en las líneas linfocitarias se realizó mediante la medición de señal GFP presente en las células Jurkat DC-SIGN gfp. El pico verde claro representa el porcentaje de la población positiva a la señal GFP de las Jurkat DC-SIGN. El pico gris representa el porcentaje de la población negativa a la señal GFP en las células Jurkat parentales. La ausencia de señal debido a la carencia de la expresión del receptor DC-SIGN en su superficie se utilizó como control negativo de la fluorescencia.

Los resultados de citometría con los controles de unión positivo a DC-SIGN, el control de unión a DC-SIGN negativo con manano y de unión a RBD anti-RBD SARS-CoV-2 fueron los siguientes:

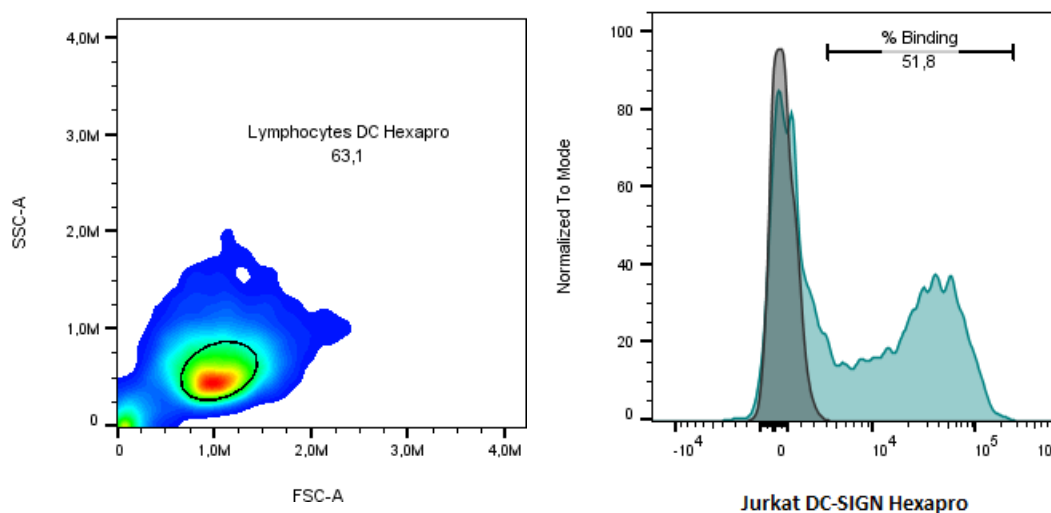


Figura 21. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico azul representa el porcentaje de la población linfocitaria Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

El análisis de la señal PE del anticuerpo anti-His-PE en ensayo de unión de las células Jurkat DC-SIGN con la proteína S soluble Hexapro mostró un 51,8% de unión en la población linfocitaria viva (Figura 21). Esta unión nos sirvió de referencia para estudiar las modificaciones de unión en presencia de otros anticuerpos.

Uno de esos anticuerpos fue un control de unión, para ello utilizamos el anticuerpo anti-RBD Spike SARS-CoV-2 que va dirigido al dominio RBD de la proteína S y por tanto, al no interaccionar con el dominio NTD de la misma, la unión del antígeno en su interacción con DC-SIGN no se vería modificada.

Los resultados (ver figura 22) mostraron una señal PE del anticuerpo anti-His-PE en las células Jurkat DC-SIGN en presencia del anticuerpo anti-RBD Spike de un 48,5%, señal muy similar a la señal control (ver figura 21) de un 51,8%, por lo que los anticuerpos anti-RBD no modifican la interacción de la proteína S con el receptor DC-SIGN.

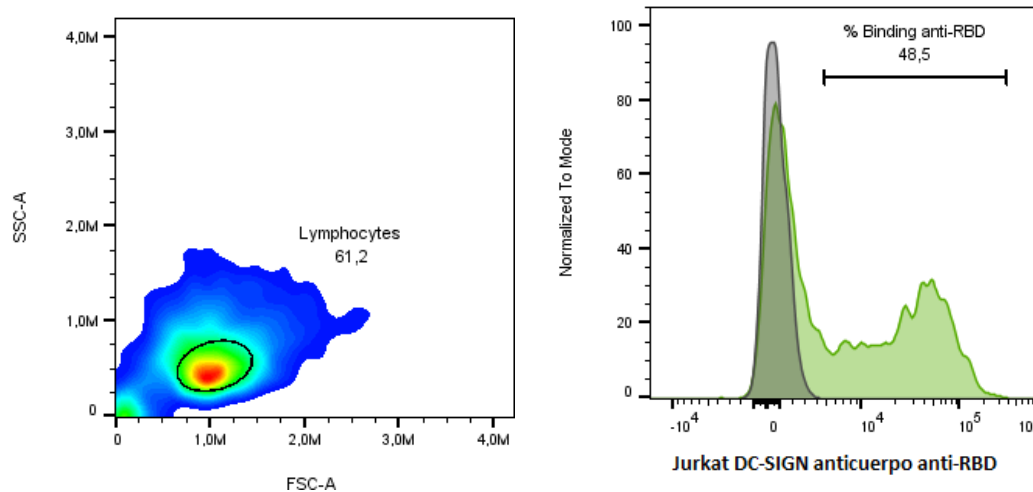


Figura 22. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del anticuerpo monoclonal anti-RBD. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del anticuerpo anti-RBD Spike. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico verde representa el porcentaje de la población linfocitaria Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro incubado con el anticuerpo anti-RBD Spike. A la izquierda del gráfico, se representa la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

Como control negativo de unión a DC-SIGN se utilizó manano:

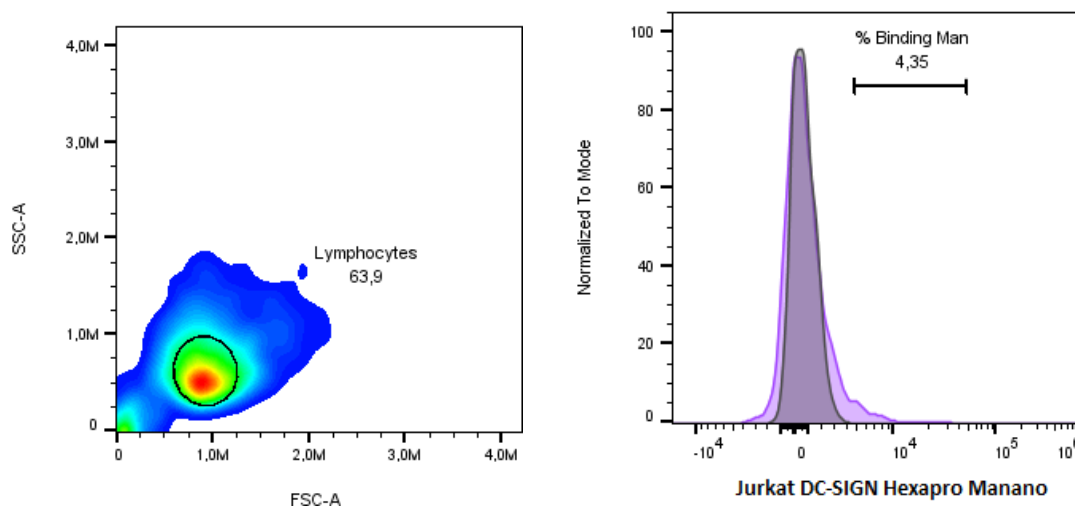


Figura 23. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia de manano. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia de manano. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico morado representa el porcentaje de la población linfocitaria Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia de manano. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

En el ensayo se utilizaron tres sueros negativos para descartar inhibiciones específicas del mismo. Los sueros pertenecen a mujeres gestantes del año 2019. El suero C- Grupo es una mezcla de 10 sueros, también se utilizaron los sueros individuales C- 19 y C- 52. Todos los sueros fueron

recogidos previamente a la pandemia de COVID-19, bajo consentimiento informado en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

Los resultados del ensayo de unión con los sueros negativos fueron los siguientes:

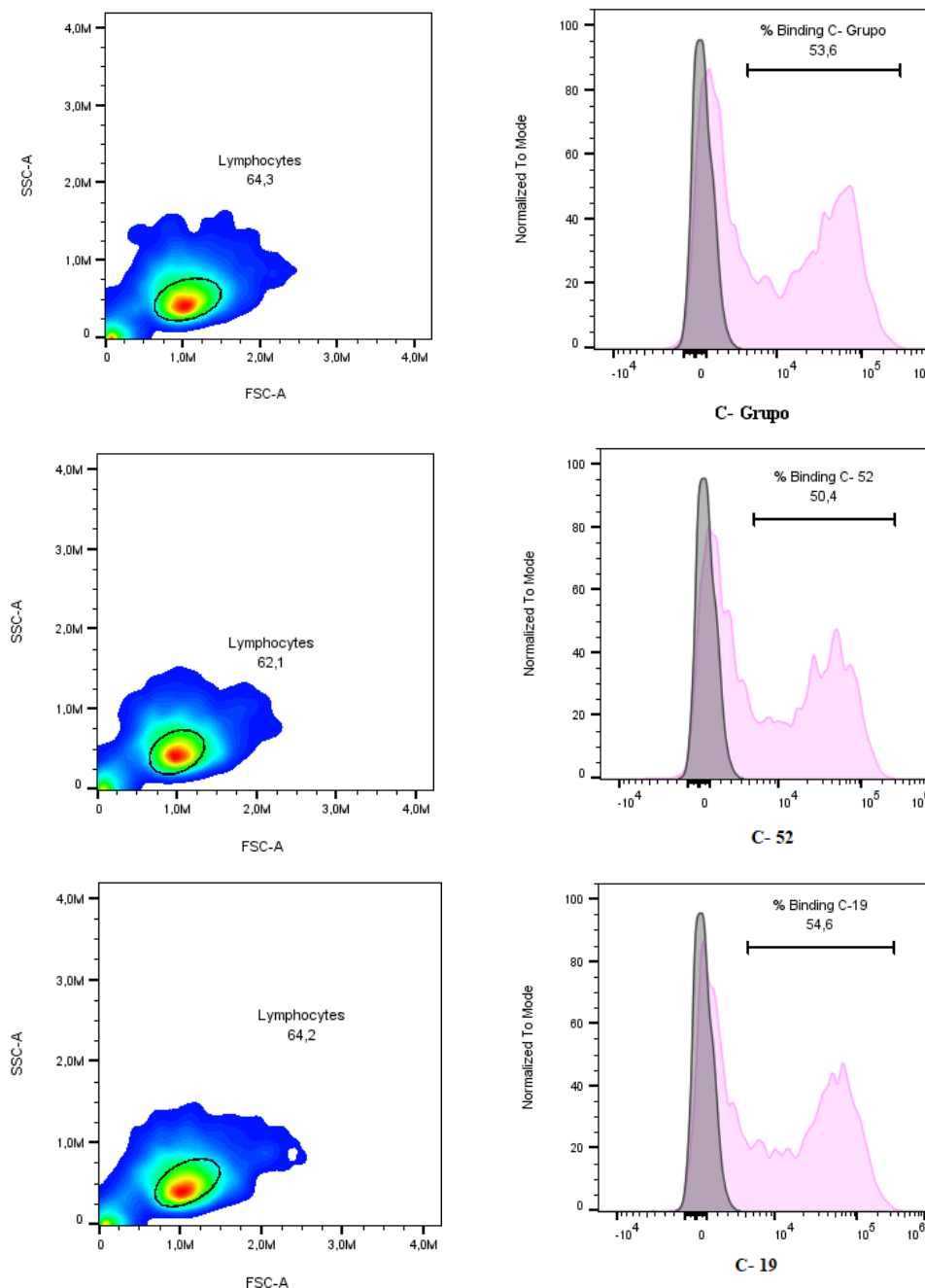


Figura 24. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia de sueros negativos. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia de los sueros C- Grupo, C- 52 y C-19. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico rosa representa el porcentaje de la población linfocitaria Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero C- Grupo, C- 52 y C-19. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

Los resultados de citometría de los ensayos de unión de DC-SIGN con la proteína soluble S Hexapro en presencia de los sueros negativos C- Grupo, C-19 y C-52 revelaron que las señales PE correspondientes al anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína S Hexapro en la población linfocitaria Jurkat DC-SIGN viva, fueron de 53,6%, 54,6 y 50,4% respectivamente (ver figura 24). Estos valores son muy similares a la señal control de la unión de la proteína S Hexapro en su interacción con DC-SIGN que fue de un 51,8% (ver figura 21). Este resultado mostró la ausencia de elementos presentes en el suero capaces de inhibir de forma inespecífica la interacción antígeno-receptor.

Para la búsqueda de anticuerpos anti-NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 se utilizaron seis sueros pertenecientes al personal sanitario perteneciente al Hospital Universitario 12 de Octubre que fueron obtenidos del estudio de OMS (Solidarity II cohort, IRB approval ref CEIm 20/157) bajo consentimiento informado. Dichos donante fueron vacunados con las dos primeras dosis de mRNA vaccine BNT162b2 (Vacuna BioNTech, Pfizer) y última dosis de mRNA-1273 (Spikevax, Moderna Biotech). Los sueros se recogieron dos meses tras la administración de la segunda dosis (2M) y un mes y medio tras la administración de la tercera dosis (3M). Los sueros recogidos dos meses tras la administración de la segunda dosis fueron el 127 2M, 406 2M y 463 2M. Los sueros recogidos un mes y medio tras la administración de la tercera dosis fueron el 127 3D, 406 3D y 463 3D. Entre los sueros se encuentran donantes vacunados que no han pasado la infección natural por el virus y sueros de donante que se habían infectado previamente con SARS-CoV-2.

Los resultados del ensayo de unión de la lectina DC-SIGN con la proteína trimérica soluble S Hexapro en presencia de los anticuerpos recogidos dos meses tras la administración de la segunda dosis fueron los siguientes:

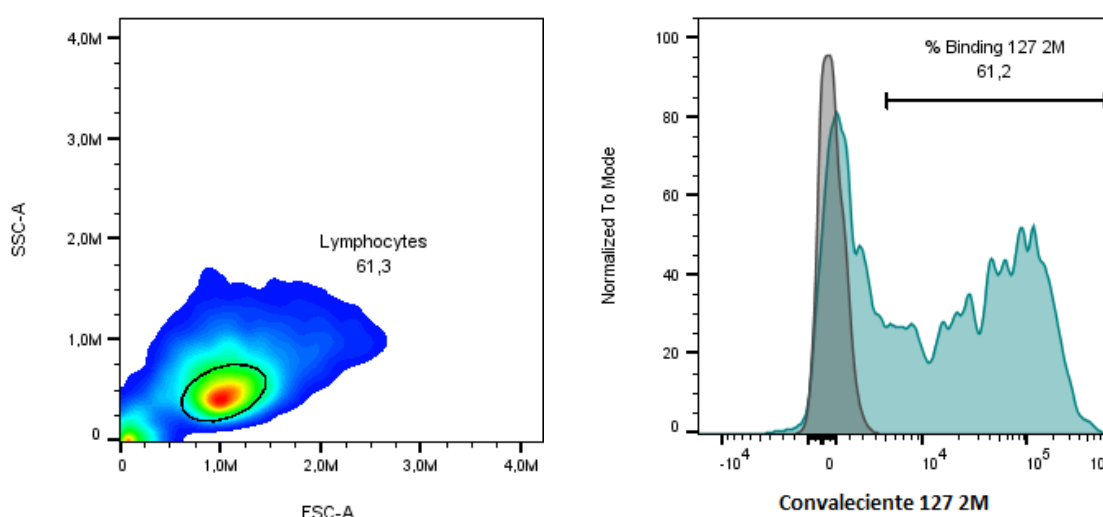


Figura 25. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero convaleciente 127 2M. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero convaleciente vacunal 127 2M. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico azul representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 127 2M. A la izquierda población linfocitaria seleccionada para el análisis.

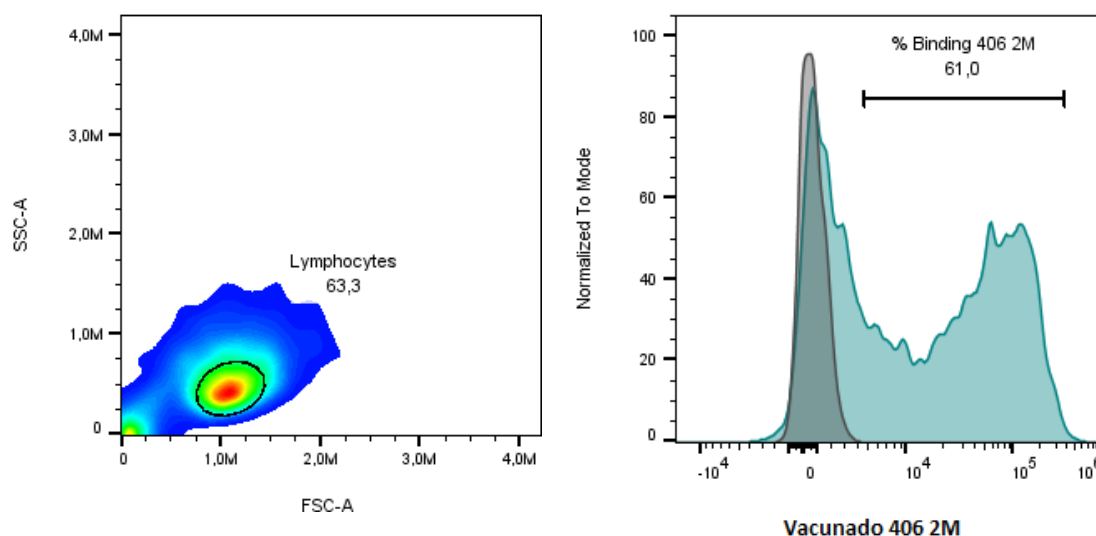


Figura 26. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero vacunal 406 2M. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero vacunal 406 2M. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico azul representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 406 2M. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

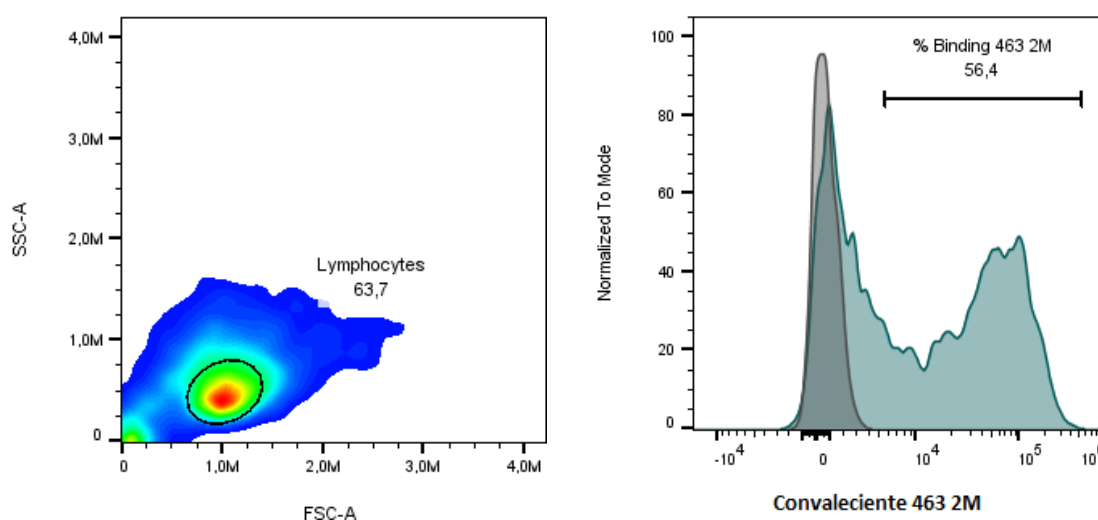


Figura 27. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero convaleciente 463 2M. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero vacunal 463 2M. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico azul representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 463 2M. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

Los resultados del ensayo de unión con los sueros recogidos dos meses tras la administración de la segunda dosis vacunal muestran que la señal PE en el ensayo con los sueros vacunados convalecientes 127 2M y 463 2M fueron de un 61,2% (Figura 25), y un 56,4% (Figura 27) respectivamente mientras que con el suero vacunado 406 2M sin infección natural previa fue de un 61% (Figura 26). Las señales de unión antígeno-receptor en presencia de estos sueros son similares

a la señal de unión de un 51,8% de la proteína soluble S Hexapro con el receptor DC-SIGN. También se testaron sueros recogidos un mes y medio tras la administración de la tercera dosis vacunal, los resultados de unión de la proteína soluble S Hexapro a DC-SIGN. Estos sueros fueron el suero vacunado sin infección natural previa a la administración de la vacuna 406 3D, y los sueros convalecientes vacunados 127 3D y 463 3D. Los resultados del ensayo de unión en presencia de los mismos fueron los siguientes:

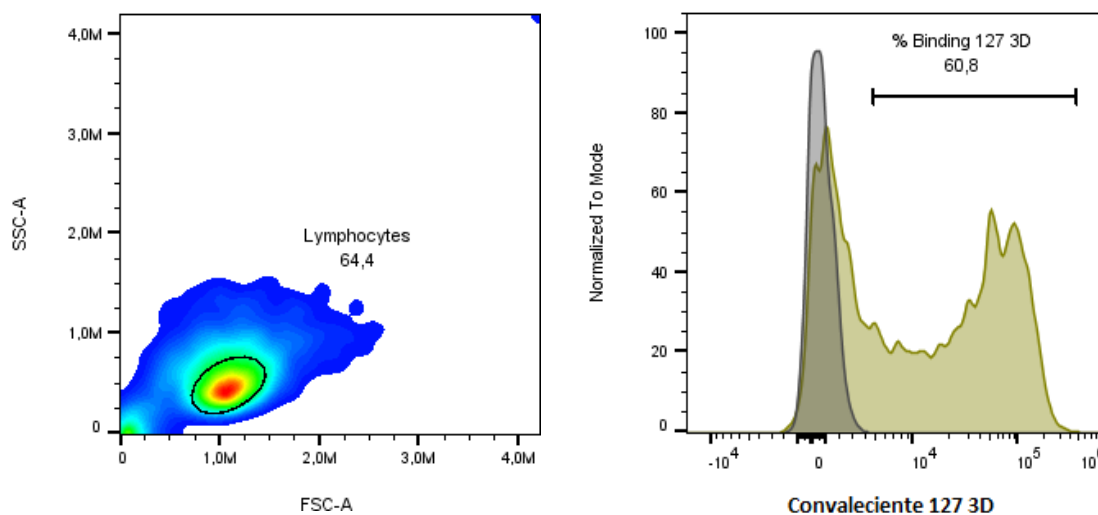


Figura 28. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero convaleciente 127 3D. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero vacunal 127 3D. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico amarillo representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 127 3D. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

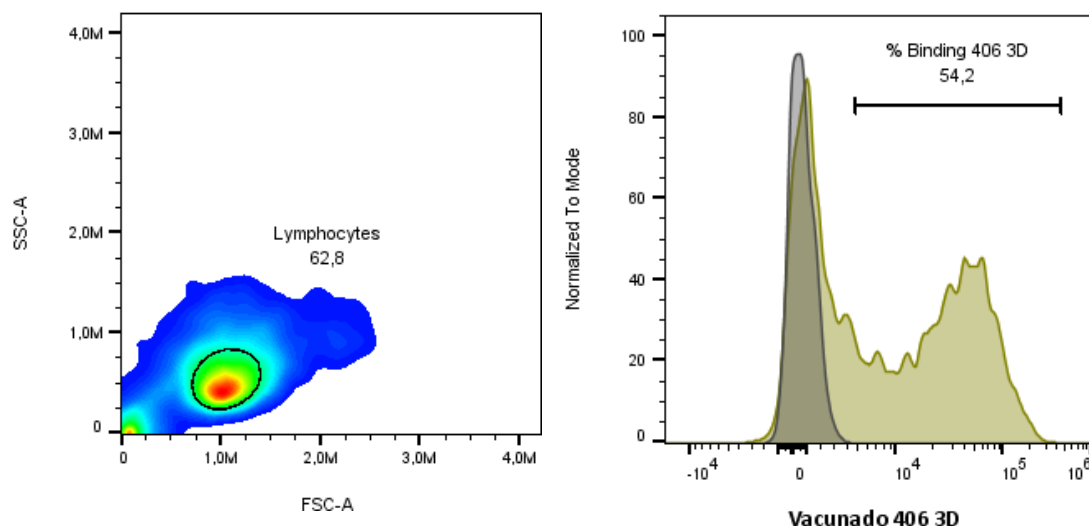


Figura 29. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero vacunal 406 3D. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero vacunal 406 3D. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico amarillo representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 406 3D. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

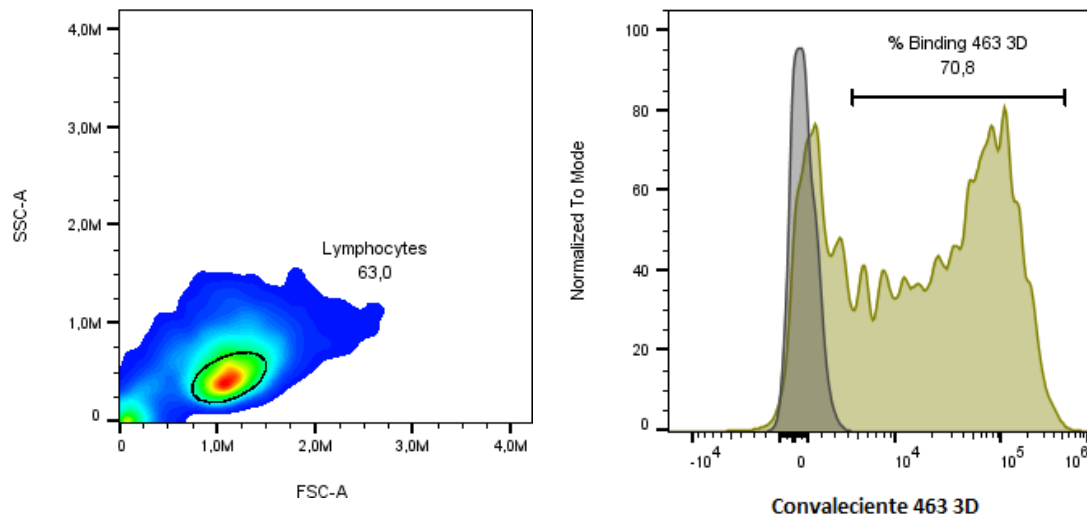


Figura 30. Ensayo de interacción de la proteína S con DC-SIGN en presencia del suero convaleciente 463 3D. El análisis de la población Jurkat DC-SIGN se realizó mediante la medición de señal PE del anticuerpo anti-His-PE unido a la proteína soluble S Hexapro en presencia del suero vacunal 463 3D. A la derecha del gráfico, el pico gris representa el porcentaje de la población Jurkat parental sin unión al antígeno. El pico amarillo representa el porcentaje de la población Jurkat DC-SIGN positiva a la señal de PE del anticuerpo anti-His en su unión con la proteína S soluble Hexapro en presencia del suero 463 3D. A la izquierda del gráfico, se muestra la población linfocitaria seleccionada para el análisis.

Los resultados del ensayo de unión de la proteína soluble trimérica S Hexapro al receptor DC-SIGN expresada en la línea celular Jurkat DC-SIGN gfp en presencia de los sueros convalecientes vacunados tras un mes y medio después de la administración de la tercera dosis 127 3D y 463 3D fueron de un 60,8% y un 70,8%, mientras que en el suero vacunal sin previa infección natural por el virus 406 3D fue de un 54,2%. Estos resultados muestran que no hay presencia de anticuerpos que inhiban la interacción con DC-SIGN.

6. Análisis de glicosilaciones en las envueltas de las variantes SARS-CoV-2

Los resultados del análisis de las variantes Alpha, Beta, Gamma, Delta y Omicron, trasladados a las secuencias en Geneious fue el siguiente:

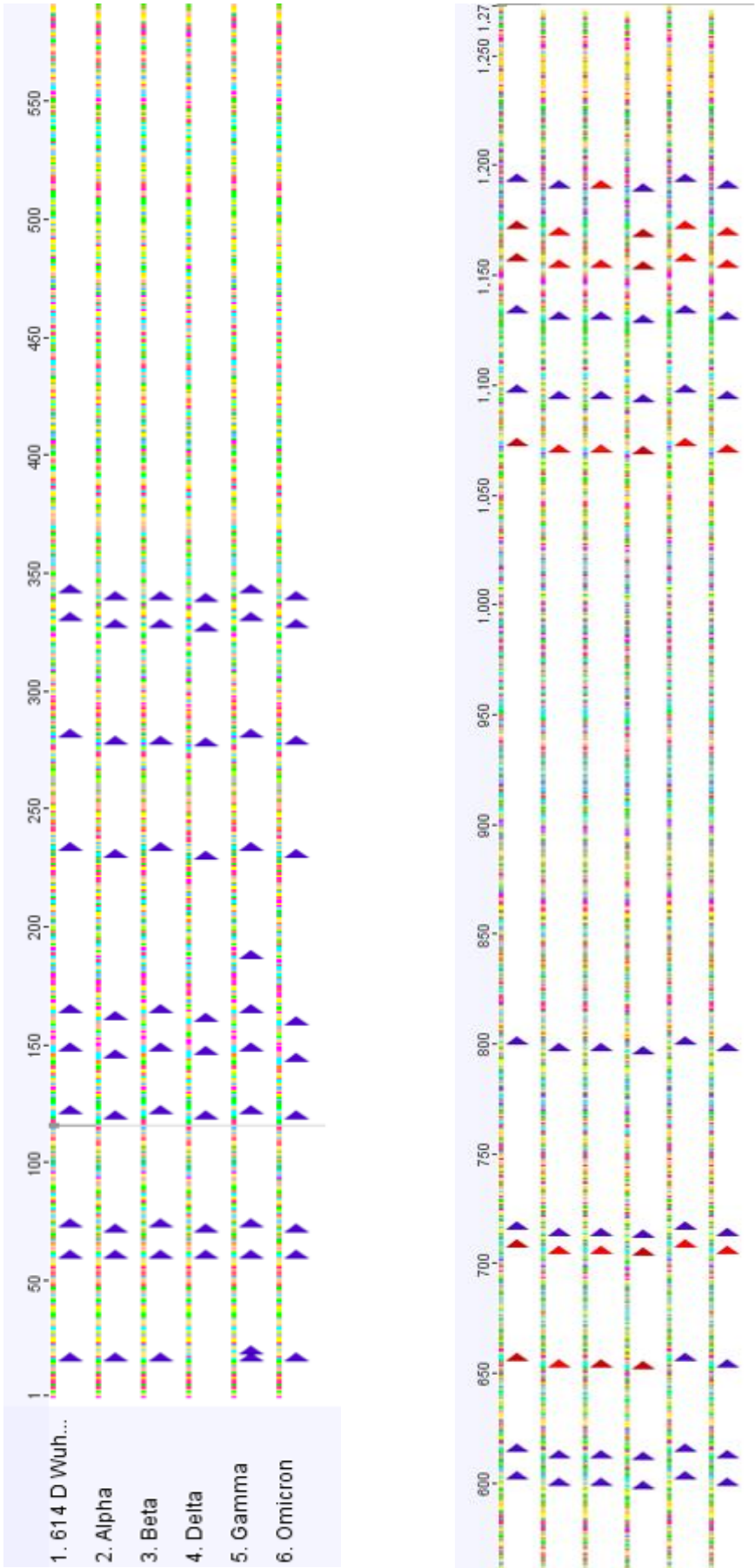


Figura 31. Análisis de las secuencias de las envueltas 614D Wuhan, Alpha, Beta, Gamma, Delta y Omicron con la herramienta online NetNGlyc-1.0. Los motivos coloreados señalan los potenciales sitios de N-glicosilación usando redes neuronales artificiales que identifican la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Thr. Los motivos de N-glicosilación se relacionan con la potencialidad de predicción trasladándose cada + como un motivo morado y cada - o ausencia de N-Glicosilación como un motivo rojo.

El análisis de N-glicosilación para las variantes fue el siguiente:

614D Wuhan-hu-1

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	17 NLTT	0.6606	(8/9)	+
Sequence	61 NVTW	0.7820	(9/9)	+++
Sequence	74 NGTK	0.7192	(9/9)	++
Sequence	122 NATN	0.6781	(8/9)	+
Sequence	149 NKSW	0.6318	(7/9)	+
Sequence	165 NCTF	0.6220	(8/9)	+
Sequence	234 NITR	0.7613	(9/9)	+++
Sequence	282 NGTI	0.7378	(9/9)	++
Sequence	331 NITN	0.5970	(7/9)	+
Sequence	343 NATR	0.5671	(8/9)	+
Sequence	603 NTSN	0.5783	(6/9)	+
Sequence	616 NCTE	0.7163	(9/9)	++
Sequence	657 NNSY	0.4724	(6/9)	-
Sequence	709 NNSI	0.3528	(9/9)	--
Sequence	717 NFTI	0.6426	(9/9)	++
Sequence	801 NFSQ	0.6146	(8/9)	+
Sequence	1074 NFTT	0.4084	(7/9)	-
Sequence	1098 NGTH	0.5496	(5/9)	+
Sequence	1134 NNTV	0.5800	(6/9)	+
Sequence	1158 NHTS	0.3730	(9/9)	--
Sequence	1173 NASV	0.3998	(8/9)	-
Sequence	1194 NESL	0.6791	(9/9)	++

Variante Alpha

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	17 NLTT	0.6608	(8/9)	+
Sequence	61 NVTW	0.7798	(9/9)	+++
Sequence	72 NGTK	0.6976	(9/9)	++
Sequence	120 NATN	0.6786	(8/9)	+
Sequence	146 NKSW	0.6260	(7/9)	+
Sequence	162 NCTF	0.6223	(8/9)	+
Sequence	231 NITR	0.7616	(9/9)	+++
Sequence	279 NGTI	0.7381	(9/9)	++
Sequence	328 NITN	0.5973	(8/9)	+
Sequence	340 NATR	0.5674	(8/9)	+
Sequence	600 NTSN	0.5786	(6/9)	+
Sequence	613 NCTE	0.7280	(9/9)	++
Sequence	654 NNSY	0.4726	(6/9)	-
Sequence	706 NNSI	0.3551	(8/9)	-
Sequence	714 NFTI	0.6086	(9/9)	++
Sequence	798 NFSQ	0.6149	(8/9)	+
Sequence	1071 NFTT	0.4086	(7/9)	-
Sequence	1095 NGTH	0.5498	(5/9)	+

Sequence	1131	NNTV	0.5802	(6/9)	+
Sequence	1155	NHTS	0.3730	(9/9)	--
Sequence	1170	NASV	0.3999	(8/9)	-
Sequence	1191	NESL	0.6792	(9/9)	++

Variante Beta

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	17	NFTT	0.6073	(7/9) +
Sequence	61	NVTW	0.7821	(9/9) +++
Sequence	74	NGTK	0.7292	(9/9) ++
Sequence	122	NATN	0.6782	(8/9) +
Sequence	149	NKSW	0.6321	(7/9) +
Sequence	165	NCTF	0.6221	(8/9) +
Sequence	234	NITR	0.7596	(9/9) +++
Sequence	279	NGTI	0.7381	(9/9) ++
Sequence	328	NITN	0.5974	(8/9) +
Sequence	340	NATR	0.5674	(8/9) +
Sequence	600	NTSN	0.5786	(6/9) +
Sequence	613	NCTE	0.7281	(9/9) ++
Sequence	654	NNSY	0.4729	(6/9) -
Sequence	706	NNSI	0.3437	(8/9) -
Sequence	714	NFTI	0.6426	(9/9) ++
Sequence	798	NFSQ	0.6149	(8/9) +
Sequence	1071	NFTT	0.4084	(7/9) -
Sequence	1095	NGTH	0.5497	(5/9) +
Sequence	1131	NNTV	0.5803	(6/9) +
Sequence	1155	NHTS	0.3730	(9/9) --
Sequence	1170	NASV	0.3999	(8/9) -
Sequence	1191	NESL	0.6792	(9/9) ++

Variante Gamma

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	17	NFTN	0.6846	(9/9) ++
Sequence	20	NRTQ	0.5781	(6/9) +
Sequence	61	NVTW	0.7820	(9/9) +++
Sequence	74	NGTK	0.7192	(9/9) ++
Sequence	122	NATN	0.6781	(8/9) +
Sequence	149	NKSW	0.6320	(7/9) +
Sequence	165	NCTF	0.6219	(8/9) +
Sequence	188	NLSE	0.5272	(6/9) +
Sequence	234	NITR	0.7613	(9/9) +++
Sequence	282	NGTI	0.7379	(9/9) ++
Sequence	331	NITN	0.5968	(7/9) +
Sequence	343	NATR	0.5671	(8/9) +
Sequence	603	NTSN	0.5783	(6/9) +
Sequence	616	NCTE	0.7279	(9/9) ++

Sequence	657	NNSY	0.5140	(5/9)	+
Sequence	709	NNSI	0.3530	(9/9)	--
Sequence	717	NFTI	0.6426	(9/9)	++
Sequence	801	NFSQ	0.6146	(8/9)	+
Sequence	1074	NFTT	0.4084	(7/9)	-
Sequence	1098	NGTH	0.5496	(5/9)	+
Sequence	1134	NNTV	0.5800	(6/9)	+
Sequence	1158	NHTS	0.3730	(9/9)	--
Sequence	1173	NASF	0.2941	(9/9)	---
Sequence	1194	NESL	0.6792	(9/9)	++

Variante Delta

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result

Sequence	61 NVTW	0.7798	(9/9)	+++
Sequence	72 NGTK	0.6976	(9/9)	++
Sequence	120 NATN	0.6784	(8/9)	+
Sequence	147 NKSW	0.6328	(7/9)	+
Sequence	161 NCTF	0.6447	(8/9)	+
Sequence	230 NITR	0.7617	(9/9)	+++
Sequence	278 NGTI	0.7382	(9/9)	++
Sequence	327 NITN	0.5976	(8/9)	+
Sequence	339 NATR	0.5674	(8/9)	+
Sequence	599 NTSN	0.5786	(6/9)	+
Sequence	612 NCTE	0.7281	(9/9)	++
Sequence	653 NNSY	0.4729	(6/9)	-
Sequence	705 NNSI	0.3534	(8/9)	-
Sequence	713 NFTI	0.6427	(9/9)	++
Sequence	797 NFSQ	0.6150	(8/9)	+
Sequence	1070 NFTT	0.4086	(7/9)	-
Sequence	1094 NGTH	0.5497	(5/9)	+
Sequence	1130 NNTV	0.5802	(6/9)	+
Sequence	1154 NHTS	0.3730	(9/9)	--
Sequence	1169 NASV	0.3999	(8/9)	-
Sequence	1190 NESL	0.6791	(9/9)	++

Variante Omicron

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result

Sequence	17 NLTT	0.6607	(8/9)	+
Sequence	61 NVTW	0.7863	(9/9)	+++
Sequence	72 NGTK	0.7056	(9/9)	++
Sequence	120 NATN	0.6784	(8/9)	+
Sequence	144 NKSW	0.5437	(6/9)	+
Sequence	160 NCTF	0.6226	(8/9)	+
Sequence	231 NITR	0.7616	(9/9)	+++

Sequence	279	NGTI	0.7381	(9/9)	++
Sequence	328	NITN	0.5888	(8/9)	+
Sequence	340	NATR	0.5704	(8/9)	+
Sequence	600	NTSN	0.5787	(6/9)	+
Sequence	613	NCTE	0.7281	(9/9)	++
Sequence	654	NNSY	0.5141	(5/9)	+
Sequence	706	NNSI	0.3533	(8/9)	-
Sequence	714	NFTI	0.6427	(9/9)	++
Sequence	798	NFSQ	0.6246	(9/9)	++
Sequence	1071	NFTT	0.4086	(7/9)	-
Sequence	1095	NGTH	0.5494	(5/9)	+
Sequence	1131	NNTV	0.5800	(6/9)	+
Sequence	1155	NHTS	0.3731	(9/9)	--
Sequence	1170	NASV	0.3996	(8/9)	-
Sequence	1191	NESL	0.6793	(9/9)	++

Los resultados del análisis de las N-glicosilaciones de la proteína S en las envueltas de las variantes mostró que la variante ancestral 614D Wuhan tiene 187 N-glicosilaciones, la variante Alpha contiene 17 N-glicosilaciones, la variante Beta 17 N-glicosilaciones, la variante Gamma 20 N-glicosilaciones, la variante Delta tiene 16 N-glicosilaciones y la variante Omicron 18 N-glicosilaciones.

Se debe tener en cuenta que estos sitios de glicosilación se predicen siempre que ocurra en la secuencia requerida Asn-Xaa-Ser/Thr sin prolina en Xaa, por lo que los sitios de no glicosilación predichos por las redes neuronales no pueden descartarse sin análisis estructural.

Para ello, comprobamos en la investigación de Wanatabe et al., 2020 que los sitios de glicosilación descartados por el programa informático pueden considerarse N-glicosilaciones (ver ilustración 14). El análisis de Watanabe y su equipo mapea la proteína S para resolver las glicosilaciones específicas del sitio a lo largo de la envuelta y visualizar la distribución de glicoformas en la superficie de la proteína mediante espectrofotometría de masas.

Por tanto, podemos concluir que la proteína S de la cepa ancestral 614D Wuhan contiene 22 N-glicosilaciones, Alpha contiene 22 N-glicosilaciones, Beta contiene 21 N-glicosilaciones, Gamma contiene 24 N-glicosilaciones, Delta contiene 21 N-glicosilaciones, y Omicron contiene 22 N-glicosilaciones.

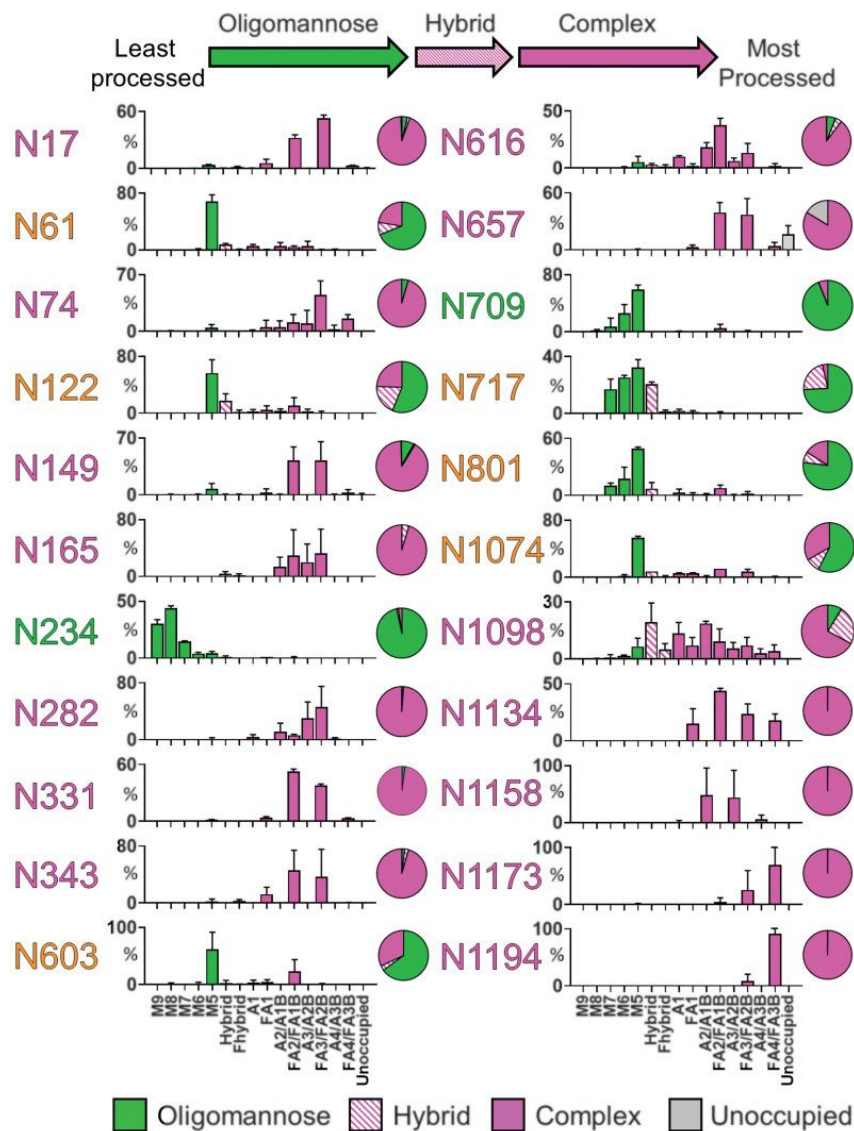


Ilustración 14. N-glicosilación específica del sitio de la proteína S del SARS-CoV-2. La figura muestra el código de colores para los principales tipos de glucanos que pueden surgir a lo largo de la vía de maduración, desde oligomanosa hasta glucanos de tipo híbrido y complejo. Los gráficos resumen el análisis espectrométrico de masas cuantitativo de la población de glucanos presente en los sitios de N-glicosilación. Los sitios de glucanos están coloreados según el contenido de glucanos de tipo oligomanosa, con los sitios de glucanos etiquetados en verde (80 a 100 %), naranja (30 a 79 %) y rosa (0 a 29 %). [Watanabe et al., 2020](#).

Capítulo V

DISCUSSION

Capítulo V: Discusión

Un virus emergente es aquel que por definición es un virus nuevo que no se había detectado hasta entonces el cual aumenta en incidencia o posee potencial de aumentar en incidencia. Desde la pandemia de Influenza en 1918 que mató a más de 50 millones de personas, han ido surgiendo a lo largo de la historia explosiones pandémicas como la del VIH en 1981, la pandemia de SARS-CoV-1 en 2003, la influenza porcina H1N1 en 2009, el coronavirus MERS en 2012, la ocasionada por el virus Zika en 2015 y la aparición epidémica que fue capaz de cruzar fronteras del virus Ébola en 2014. La última, la pandemia de COVID-19 no es más que el último ejemplo de un novedoso virus pandémico inesperado y devastador que ha terminado por hacernos conscientes del hecho de que hemos entrado en una era de pandemia ([Morens & Fauci, 2020](#)). El elevado número de muertes ocasionadas por los virus emergentes pone en evidencia la necesidad de avanzar en el estudio de estrategias de intervención terapéuticas efectivas, pero el desarrollo de estas se basa en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares de las infecciones virales, en las cuales destaca la importancia de las interacciones virus-huésped. En la investigación de dichas interacciones es común la investigación de los receptores celulares, ya que su papel como dianas específicas de los virus los hace elementos indispensables en la entrada celular a través de múltiples mecanismos como la fusión y endocitosis, dando como resultado final la replicación viral en la célula huésped. La importancia de los receptores virales ha sido ampliamente investigada ya que la interacción virus-receptor define el tropismo tisular y es un factor clave para interpretar la patogenia del virus.

En el caso del SARS-CoV-2, la enzima convertidora de angiotensina de tipo 2 (ACE2) una proteína implicada en diferentes funciones cardiovasculares, al igual que en el antecedente conocido del SARS-CoV-1, es el receptor celular principal del virus y por tanto un componente indispensable en su ciclo infeccioso.

En el momento de la emergencia del nuevo betacoronavirus, ante el gran desconocimiento de los mecanismos de infección y diseminación viral utilizados por el mismo, nuestra investigación ha querido estudiar el papel de DC-SIGN, como prototipo de la familia de receptores de lectinas de tipo C en células mieloides, en la vía de entrada del viral y si este podría actuar como un receptor alternativo o secundario a ACE2.

La relevancia biológica de DC-SIGN se validó estudiando su impacto en un modelo de infección celular mediante ensayos de infección directa. Los niveles de expresión de la lectina se midieron mediante citometría de flujo y la capacidad infectiva de los inóculos virales se normalizó mediante su título en ensayos de infección *in cis*.

Los ensayos de infección *in cis* (ver figura 1 de resultados 1.1.) con las células inmortalizadas adherentes 293T y BHK-21 y las líneas celulares Jurkat y Raji, todas con niveles muy bajos o nulos

de ACE2, mostraron ausencia de infección en todas las líneas celulares que expresan DC-SIGN. Esto se confirmó con los sistemas de virus recombinantes que expresan en su superficie la proteína S de SARS-CoV-2 basados en VIH y rVSV, siendo el resultado el mismo en ambos sistemas. Ninguna línea celular que no exprese ACE2 se convierte en susceptible a SARS-CoV-2 por la expresión de DC-SIGN.

Para confirmar estos resultados se utilizó un sistema de infección en células primarias. Para ello se derivaron células dendríticas y macrófagos M2, dos poblaciones con altos niveles de expresión de DC-SIGN, a partir de monocitos de sangre periférica de donantes humanos y se infectaron con virus recombinantes basados en rVSV. Este ensayo mostró una ausencia total de infección en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDC) (ver figura 2 resultados 1.2).

Para corroborar los experimentos realizados con virus recombinantes y validar estos resultados en un modelo más fisiológico, se infectaron células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDC) con el virus SARS-CoV-2 replicativo obtenido de un aislamiento clínico. De la misma manera, se vio una ausencia total de infección confirmando todos los ensayos de infección directa realizados.

La ausencia de expresión de ACE2 en las células linfocitarias Jurkat parentales y células Jurkat DC-SIGN junto con la ausencia de infección en las mismas y en las células primarias MDDC y M2-MDDC, indican que la lectina DC-SIGN no actúa como un receptor alternativo en células no permisivas, sin embargo un trabajo realizado por Amraie y col, señala que DC-SIGN si actúa como receptor alternativo de SARS-CoV-2 en linfocitos T, ([Amraei et al., 2021](#)). Nosotros de una forma muy exhaustiva hemos demostrado mediante virus recombinantes y virus autentico, tanto en células inmortalizadas como en células primarias que SARS-CoV-2 no puede utilizar DC-SIGN para iniciar su ciclo de infección, por lo que nuestros hallazgos confirman que DC-SIGN no actúa como receptor del virus SARS-CoV-2 ya que este no media la entrada viral en la célula y, por tanto, demostramos que la lectina queda descartada en su posible papel como receptor funcional en el mecanismo de entrada del nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

A pesar de demostrar que DC-SIGN no es un receptor directo del nuevo SARS-CoV-2, sabemos que no solo los receptores celulares son los únicos elementos críticos en las vías de entrada virales. En ocasiones la eficacia de estos mismos receptores celulares depende también de los llamados factores de unión. Estos son elementos que en múltiples ocasiones resultan claves, ya que pueden actuar incrementando la densidad de partículas en la superficie celular, aumentando así la adhesión de estas en la misma y permitiendo de esta manera que el virus tenga un mayor acceso a su receptor funcional ([van Kooyk & Geijtenbeek, 2003](#)). También se ha demostrado, que pueden desempeñar un papel a la hora de facilitar la diseminación de las partículas durante la infección viral ([Geijtenbeek et al., 2000](#)). Esta función de receptores de unión por las lectinas tipo C se piensa que

puede ser importante en infecciones por agentes virales como VIH, Ébola o Dengue ([Alvarez et al., 2002](#); [Léger et al., 2016](#); [Tassaneeritthep et al., 2003](#)).

Los factores de unión suelen ser glicolípidos, glucanos ligados a N, glicanos como el heparán-sulfato o receptores inmunes de tipo lectina como los CLR y SIGLEC ([Bermejo-Jambrina et al., 2018](#); [Cagno et al., 2019](#); [Dimitrov, 2004](#); [Perez-Zsolt et al., 2019](#)). Estos no solo permiten aumentar la cantidad de partículas virales en la superficie celular potenciando la infección a través de los receptores funcionales, también se ha demostrado que juegan un papel en los escenarios de diseminación viral.

Un ejemplo claro es el papel de las células dendríticas como protagonistas de la primera línea de defensa inmunológica en el ciclo de infección viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El receptor funcional del VIH es CD4, el cual junto con CCR5 o CXCR4 permitirá la entrada del virus en el linfocito T CD4+ dando lugar al inicio de su ciclo de vida, pero desde el año 2000 se sabe que este no es el único mecanismo de infección que sigue el virus. El DC-SIGN el cual se encuentra presente en la membrana celular de las células dendríticas, reconocía los oligosacáridos ricos en manosa presentes en la proteína gp120 del virus VIH. La unión con la lectina no desencadenaba el proceso de fusión en el virus, por lo que se demostró que DC-SIGN no era un receptor funcional de VIH, pero este sí presentaba un papel como diseminador viral ya que permitía a las células dendríticas capturar el virus en la mucosa genital y transmitirlo a linfocitos T CD4+ las cuales si son células permisibles a la infección vírica, demostrando así la importancia de esta ruta ([Geijtenbeek et al., 2000](#)).

No solo con el VIH se ha demostrado este mecanismo de diseminación viral, también se ha visto que el coronavirus del virus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-1 responsable de la pandemia del año 2002), también usa estos factores de unión en sus ciclos de infección viral. Se ha demostrado que el SARS-CoV-1 se une a la lectina L-SIGN en el proceso de infección en *trans* y que la unión a su homólogo DC-SIGN en células dendríticas, permiten la diseminación del virus ([Yang et al., 2004](#)).

Aunque hemos descartado el papel de DC-SIGN como receptor funcional en el nuevo SARS-CoV-2 en la vía de entrada del virus y su implicación directa en la patogenia, esto no significa que la lectina no juegue ningún papel en los mecanismos de infección y diseminación viral. Para ello nuestra investigación se centra en el estudio del receptor DC-SIGN como factor de unión o co-receptor del coronavirus SARS-CoV-2.

Como hemos mencionado anteriormente, está demostrado que la transinfección facilita la diseminación del virus desde las superficies mucosas hasta su replicación en las células T presentes en los órganos linfoides secundarios mediante la unión de DC-SIGN en las células dendríticas inmaduras. DC-SIGN se expresa en células dendríticas inmaduras de tejidos periféricos y podemos encontrarla en amígdalas, tejidos mucosos, ganglios linfáticos, en DCs derivadas de monocitos y

en células especializadas presentadoras de antígeno (APC) como macrófagos deciduales y macrófagos alveolares de pulmón ([Geijtenbeek, Engering and van Kooyk, 2002](#)), mientras que L-SIGN se expresa en células endoteliales presentes en los sinusoides hepáticos, células alveolares humanas tipo II, células endoteliales de pulmón, tracto gastrointestinal y placenta ([Bashirova et al., 2001](#); [Soilleux et al., 2001](#)).

Conociendo cuales son las células donde se expresa DC-SIGN *in vivo*, utilizamos como modelo celular, células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDC) como línea celular final para la comprobación de los ensayos, ya que estos modelos celulares tienen una aproximación fisiológica mayor. Para los ensayos iniciales utilizamos un modelo celular validado mediante la medición de los niveles de expresión de DC-SIGN en líneas celulares linfocitarias inmortalizadas y el cálculo del título de virus recombinantes utilizados en los ensayos de transinfección. Los primeros experimentos se realizaron con virus recombinantes basados en los sistemas de VIH y rVSV en células inmortalizadas Jurkat DC-SIGN utilizando como diana celular final células Vero E6 y células Calu-3 (ver figura 7 resultados 2.1).

En la infección en trans se utilizaron las secuencias del virus original de 2019 Wuhan SARS-CoV-2 614D (Wuhan-hu-1) y la secuencia de SARS-CoV-2 614G que apareció en la primavera de 2020 y rápidamente se hizo dominante en todo el mundo. En células Jurkat incubadas con los virus recombinantes se observa ausencia de infección transmitida a células Vero E6. Sin embargo, en las células Jurkat DC-SIGN incubadas con los virus recombinantes se muestra una alta interacción de la proteína S con la lectina, ya que 24 horas después de la transinfección puede observarse altos niveles de infección en las células diana Vero E6 (ver figura 3 resultados 2.1). Además, la utilización de manano como control de inhibición de DC-SIGN mostró una reducción en la infección similar en ambos virus. Esto demuestra que la infección en trans es dependiente de DC-SIGN y que por tanto existe una interacción entre el receptor celular y la proteína de la envuelta del nuevo coronavirus.

También observamos un distinto uso del receptor en las variantes Alpha, Beta, Gamma y Delta. La variante Omicron exhibe una transinfección muy similar a la cepa ancestral Wuhan-hu-1, mientras que las variantes Alpha y Gamma hacen un uso menor del receptor a diferencia de las variantes Beta y Delta, pero en todas ellas DC-SIGN es utilizado por SARS-CoV-2 como factor de unión (ver figura 4 resultados 2.1).

Se quiso explorar la diferencia del uso de la lectina por parte de las variantes. Para determinar si entre las distintas envueltas, los valores de RLU/s son iguales o también, dicho de otra forma, son equivalentes, realizamos el cálculo de ratio Jurkat/Jurkat DC-SIGN de las variantes de SARS-CoV-2. Los ratios calculados de los ensayos de transinfección, demuestran que en la cepa de referencia 614G el ratio aumenta a 70,2, en Alpha se reduce hasta 8,8, con la variante Beta el uso del receptor disminuye ligeramente respecto a la cepa de referencia 614G con un ratio de 66,9. Con especial

atención, destacar las variantes Gamma y Delta en el que la interacción con el receptor DC-SIGN disminuye con un ratio de 4,5 y se ve aumentada con un ratio de 73,8 respectivamente en ambas envueltas, por otro lado, la variante Omicron muestra unos niveles de transinfección superiores a la cepa ancestral Wuhan-hu-1 con un ratio de 28,8. (ver figura 5 de resultados 2.1).

Estas diferencias en la interacción con DC-SIGN podrían verse explicadas por la presencia de glicosilaciones en la envuelta vírica. Como anteriormente hemos mencionado, la presencia de azúcares en las proteínas virales puede resultar clave en la interacción con receptores canónicos o factores de unión en el ciclo de infección y diseminación viral, también pueden relacionarse con el escape viral a la respuesta inmune, por lo que deben analizarse detenidamente.

Se analizaron las N-glicosilaciones presentes en la proteína S. Los resultados del análisis mostraron que la cepa ancestral 614D Wuhan contiene 22 N-glicosilaciones, en Alpha existen 22 N-glicosilaciones, Beta contiene 21 N-glicosilaciones, Gamma contiene 24 N-glicosilaciones, Delta contiene 21 N-glicosilaciones, y Omicron contiene 22 N-glicosilaciones. Es necesario destacar que la proteína S de SARS-CoV-2 interacciona con DC-SIGN a través de su dominio NTD, esto pone de manifiesto la importancia de la presencia de N-glicosilaciones en dicha región, ya que un aumento o disminución de los azúcares presentes en dicho dominio podría modificar la unión al receptor. El análisis de las glicosilaciones presentes en el dominio NTD de la proteína S de las distintas variantes no muestran cambios en el número ni la posición de las mismas, a excepción de la variante Gamma que posee las glicosilaciones en las posiciones aminoácidas 20 y 188 a diferencia del resto de variantes. Ambas N-glicosilaciones presentes en la proteína S de la variante Gamma, podrían explicar la caída tan acusada del uso del receptor DC-SIGN de la misma, pero la variante Alpha, la cual posee una disminución en la interacción de cinco veces menos, no contiene esas mismas N-glicosilaciones, por lo que no parece que la presencia de estas mutaciones explique dichas caídas (ver figura 3 y 4 resultados 2.1.).

La correlación de los ratios de transinfección con la patogenicidad o la capacidad de contagio de las variantes podría explicar parcialmente dichas diferencias del uso de DC-SIGN por parte de las variantes, pero no parece que un mayor uso del receptor conlleve una mayor o menor transmisibilidad, y tampoco puede relacionarse con una mayor probabilidad de sufrir COVID-19 de forma más o menos grave. La relevancia biológica de este fenómeno deberá estudiarse en futuras investigaciones.

La importancia y el mecanismo que conlleva los distintos usos del receptor por parte de las variantes SARS-CoV-2, aún debe explorarse y desarrollarse en mayor profundidad dados los datos preliminares obtenidos.

De forma adicional, se quiso comprobar si el homólogo de DC-SIGN, L-SIGN era utilizado por el virus en la transinfección. Los resultados mostraron altos valores de infección en las células diana Vero E6 en la infección en trans con las Jurkat L-SIGN, así como valores disminuidos cuando las

células eran incubadas también con manano. Esto demuestra el uso de la lectina de tipo C L-SIGN por parte del virus SARS-CoV-2 (ver figura 8 resultados 2.1).

Los ensayos con virus recombinantes en células immortalizadas parecen indicar que la lectina DC-SIGN puede actuar como factor de unión de la proteína S de SARS-CoV-2, sin embargo, es necesario realizar dichos ensayos en un modelo con una mayor aproximación fisiológica. Para ello se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) a partir de una muestra de sangre obtenida de cuatro donantes sanos. Los valores de infección en el ensayo en trans con el virus rVSV-SARS-CoV-2 en células dendríticas fueron elevados, demostrando que DC-SIGN promovió una transinfección eficaz por SARS-CoV-2, siendo DC-SIGN presentes en las MDDC de capturar y transmitir las partículas virales a las células Vero E6. El control usado con el anticuerpo anti-DC-SIGN mostró una inhibición del 98%, una reducción sustancial en la infectividad observada siendo $p=0,0506$ confirmando la especificidad de la lectina en el proceso de la infección en trans por el virus SARS-CoV-2 (ver figura 9 resultados 2.2.).

Los ensayos con células immortalizadas y células primarias indican que DC-SIGN es un factor de unión de la proteína S del virus emergente SARS-CoV-2, pero para afirmar este hecho es necesario demostrar de forma última y definitiva que DC-SIGN es utilizada por el nuevo SARS-CoV-2. Para ello utilizamos en los ensayos, el virus replicativo, tanto en células immortalizadas como en su modelo real, las células dendríticas.

Se utilizaron las células immortalizadas Jurkat y Jurkat DC-SIGN para la incubación con el mismo y línea celular respiratoria Calu-3 2B4 la cual se utilizó como línea celular en la confirmación de la transinfección de SARS-CoV-2 dependiente de DC-SIGN ya que dicha línea celular acerca más al ensayo a un escenario más fisiológico. También se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) como línea celular final.

La transinfección mostró que DC-SIGN promovió una infección en trans eficaz en las células Calu-3 2B4 mediada por las células Jurkat DC-SIGN. El control con el anticuerpo humano anti-DC/L-SIGN mostró una reducción ($p<0.0001$) en los valores de infección evidenciando la dependencia de la lectina en la eficacia de la infección en trans (ver figura 11 resultados 3.1). El ensayo realizado con células dendríticas derivados con monocitos también puso en manifiesto el uso de DC-SIGN por parte del virus. El control con el anticuerpo anti-DC/L-SIGN mostró una reducción de la infección indicando también el uso de DC-SIGN en este modelo celular (ver figura 12 resultados 3.2). Todo esto también se ve apoyado por los resultados de los ensayos de ELISA con el trímero de la proteína S soluble (ver figura 16 resultados 4.2), que junto con los ensayos de unión realizados con el trímero de la proteína S soluble analizados mediante citometría de flujo (ver figura 15 resultados 4.1) demuestran la existencia de unión entre la lectina DC-SIGN y la proteína S del SARS-CoV-2.

En conclusión, en la presente tesis doctoral demostramos que las lectinas de tipo C DC-SIGN y L-SIGN son importantes factores de unión que contribuyen a vías alternativas de infección mediadas por la proteína S del nuevo betacoronavirus SARS-CoV-2.

Estos resultados pueden ayudarnos a comprender los posibles mecanismos de inmunidad, patogénesis y diseminación del SARS-CoV-2. La presencia del receptor ACE2 en el tracto respiratorio son variables ya que existe una alta expresión del receptor en el tracto respiratorio superior, que, sin embargo, va disminuyendo según se desciende en el mismo. La variabilidad de expresión del receptor canónico de SARS-CoV-2 ha llevado a plantear la existencia de otros elementos que participen en los mecanismos de infección celular más allá de la vía de entrada dependiente de ACE2. No es descabellado pensar que las lectinas de tipo C (CLR) dependientes de calcio las cuales se expresan en células dendríticas y se caracterizan por su capacidad de reconocer azúcares presentes en las envueltas víricas, podría desempeñar una relevancia biológica importante en este escenario. Como hemos mencionado anteriormente, ya se ha demostrado dicho papel con los receptores DC/L-SIGN en numerosos virus: L-SIGN y DC-SIGN capturan el virus de la hepatitis C (VHC) mediante la unión específica a la glicoproteína E2 de la envuelta vírica transinfectando las células hepáticas adyacentes pudiendo establecer así, las bases de una infección persistente; el virus Ébola (EBOV) transinfecta las células dendríticas DC-SIGN+ presentes en la circulación tras la inoculación intranasal del virus en ratones quiméricos; DC-SIGN y L-SIGN también han demostrado ser receptores de entrada del virus Dengue (DENV) dando lugar a una infección productiva liberando viriones infecciosos capaces de diseminar la infección a células permisivas; y en el caso del VIH, los virus fundadores que inician la infección a través de la mucosa presentan un mayor contenido de carbohidratos con alto contenido de manosa y una mayor unión a las células dendríticas que expresan DC-SIGN ([Cormier et al., 2004](#); [Go et al., 2011](#); [Lüdtke et al., 2017](#); [Parrish et al., 2013](#); [Tassaneetrithep et al., 2003](#)). Hemos demostrado que en el caso de SARS-CoV-2, DC/L-SIGN también actúan como receptores de unión en lugar de receptores de entrada por lo que estas podrían facilitar la infección a través de la vía canónica ACE2.

Durante la vía de diferenciación de las MDDC, la expresión de DC-SIGN es inducida principalmente por la interleuquina IL-4 que ayudada por GM-CSF regulan la expresión de la lectina durante la diferenciación de las MDDC. Al contrario, se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el interferón (IFN), los agentes antiinflamatorios y los inhibidores de la transición monocitos-MDDC han sido identificados como reguladores negativos de la expresión de la lectina ([Relloso et al., 2002](#)). Asimismo, se ha demostrado que la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL12 también se desencadena con la activación de DC-SIGN a través del reconocimiento de ligandos ([Bermejo-Jambrina et al., 2018](#)).

En este contexto, se han identificado en varias cohortes de pacientes de COVID-19, elevados niveles de estas citoquinas proinflamatorias las cuales se correlacionan con la tormenta de

citoquinas, la gravedad de la enfermedad ([Mehta et al., 2020](#)) y el mal pronóstico como la insuficiencia respiratoria y el ingreso en UCI ([Chen et al., 2020](#); [Huang et al., 2020](#)). En este escenario la expresión de DC-SIGN podría verse regulada a la alza ya que, aunque SARS-CoV-2 potencie estas respuestas inmunitarias innatas, también se ha demostrado que es capaz de contrarrestar la producción de interferón IFN-I e IFN-III ([Blanco-Melo et al., 2020](#)).

La demostración de la participación de las células dendríticas en la diseminación temprana de SARS-CoV-2 a través de la lectina de tipo C DC/L-SIGN ayuda abrir nuevas vías para comprender los mecanismos de infección y diseminación del nuevo betacoronavirus así como a entender y tratar la desequilibrada respuesta inmune presente en los pacientes graves con COVID-19.

Por otro lado, el control de la gravedad de la COVID-19 en pacientes infectados ha sido prioritario durante el transcurso de la pandemia. La inhibición de la interacción entre el RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 y el receptor ACE2 en las células diana durante el proceso de infección, es el principal mecanismo de neutralización del virus por parte del sistema inmunitario. La gran mayoría de los anticuerpos terapéuticos desarrollados y utilizados para tratar la COVID-19 son de este tipo, ya que los anticuerpos monoclonales anti-RBD, presentan una eficacia de neutralización viral muy altas ([L. Liu et al., 2020](#); [Noy-Porat et al., 2020](#)) al bloquear directamente la interacción con su receptor e impedir la infección celular.

La evolución del virus SARS-CoV-2 es un proceso donde la deriva antigénica es determinante, ya que las mutaciones aleatorias que se suceden en el virus durante su adaptación a la especie humana determinan la aparición de las distintas variantes genéticas. Muchos de estos cambios pueden otorgar una mayor capacidad de transmisibilidad, de infectividad o letalidad, aunque en la gran mayoría de los casos, estos cambios tienden a acumularse o desaparecer sin suponer cambios relevantes en la biología del virus ([Reina & Fraile-Ribot, 2021](#)). Las mutaciones en el RBD tienden a ser cambios puntuales, pues la conservación del mecanismo de unión y fusión viral resulta crítica para la posterior replicación viral, es por ello por lo que los anticuerpos monoclonales terapéuticos tienen como diana dicha región. En este escenario cambios puntuales en el dominio RBD pueden resultar críticos debido a la presión selectiva ocasionada por los anticuerpos neutralizantes, dando lugar a los llamados mutantes de escape. Estos mutantes de escape surgen cuando una presión evolutiva, en este caso los anticuerpos terapéuticos monoclonales anti-RBD, limitan, pero no eliminan el virus replicativo, dando lugar a poblaciones víricas no eliminadas que mostraran las mutaciones necesarias para evadir la respuesta humoral, siendo este el resultado de la rápida frecuencia de mutación del virus y la presión selectiva impuesta sobre una sola región concreta por un solo anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo específico. Estos mutantes de escape originados en los pacientes que son tratados con anticuerpos terapéuticos monoclonales, pueden llegar a unirse a las poblaciones virales mutantes naturales, determinando cambios en la dinámica de la transmisión de las poblaciones virales. Todo esto hace crítica, la necesidad de explorar otros

anticuerpos monoclonales neutralizantes que vayan dirigidos a otros epítomos. Una buena opción son los anticuerpos dirigidos al NTD de la proteína S del virus. No existen demasiados trabajos que describan el aislamiento de anticuerpos anti-NTD en humanos ([Brouwer et al., 2020](#); [Chi et al., 2020](#); [Jiang et al., 2021](#); [L. Liu et al., 2020](#); [Noy-Porat et al., 2021](#); [Suryadevara et al., 2021](#)) lo que podría indicar una baja presencia de los mismos en los sueros de personas infectados y/o vacunadas, siendo la actividad neutralizante de los mismos menor a la capacidad de neutralización de los anticuerpos anti-RBD. El mecanismo de neutralización de los anticuerpos monoclonales anti-NTD no se ha comprendido aun del todo, pero la aparición de mutantes de escape inclina a plantear la búsqueda de anticuerpos anti-NTD como posible estrategia terapéutica alternativa.

Por otra parte, estos anticuerpos anti-NTD inhibirían la interacción de la proteína S con la lectina DC-SIGN. Ya hemos planteado el posible papel que podría tener DC-SIGN en el mecanismo de infección en trans en la patogénesis y la dispersión del virus SARS-CoV-2. La presencia de anticuerpos dirigidos al dominio NTD en sueros de pacientes, podría inhibir la unión de la proteína S al receptor DC-SIGN al bloquear la región de interacción con el mismo. Esto podría tener implicaciones en la capacidad infectante del virus ya que la presencia de un anticuerpo anti-NTD que impidiese la interacción entre la proteína S del virus y DC-SIGN imposibilitaría la adhesión de partículas virales al receptor DC-SIGN, esto no conllevaría al aumento de las mismas en la superficie celular por parte de receptor, dificultándose la infección a través del receptor canónico ACE2. Un anticuerpo anti-NTD que inhibiese la interacción antígeno-receptor podría llevar al esclarecimiento del mecanismo de infección y diseminación vírica del betacoronavirus en su interacción con DC-SIGN.

En la presente tesis se planteó como identificar de manera preliminar, anticuerpos anti-NTD que inhibiesen la interacción DC-SIGN. Para ello se utilizaron, 6 sueros de vacunados convalecientes y vacunados sin infección natural previa a SARS-CoV-2 de del personal sanitario del Hospital Universitario 12 de Octubre pertenecientes al estudio de la OMS (Solidarity II cohort, IRB approval ref CEIm 20/157) bajo consentimiento informado.

Para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos al dominio NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 en los sueros, se realizaron ensayos de unión de la proteína soluble S Hexapro con células Jurkat DC-SIGN en presencia de dichos sueros y se analizaron mediante citometría de flujo. La existencia de anticuerpos anti-NTD en los mismos bloquearía la interacción entre la proteína vírica y la lectina. Se utilizó como referencia la unión de la proteína S con Jurkat DC-SIGN sin suero, en presencia de manano y sueros negativos como control de inhibición específica del mismo (ver figuras 23 y 24 resultados 5.2).

Los resultados del ensayo de unión en presencia de los sueros fueron negativos, ya que la señal PE en el ensayo con los sueros vacunados convalecientes 127 2M y 463 2M fueron de un 61,2%, y un 56,4% respectivamente mientras que con el suero vacunado 406 2M sin infección natural previa

fue de un 61% (ver figuras 25, 26 y 27 resultados 5.2). Las señales de unión antígeno-receptor en presencia de estos sueros son similares a la señal de unión de un 51,8% de la proteína soluble S Hexapro con el receptor DC-SIGN (ver figura 21 resultados 5.2).

En el caso del ensayo de unión de la proteína soluble trimérica S Hexapro al receptor DC-SIGN expresada en la línea celular Jurkat DC-SIGN gfp en presencia de los sueros convalecientes vacunados tras un mes y medio después de la administración de la tercera dosis revelaron unas señales de PE en los sueros 127 3D y 463 3D de un 60,8% y un 70,8% respectivamente, mientras que en el suero vacunal sin infección natural previa 406 3D fue de un 54,2% (ver figuras 28, 29 y 30 resultados 5.2). Estos experimentos no pueden demostrar la presencia de anticuerpos que inhiban la interacción con DC-SIGN, y por tanto no encontramos anticuerpos anti-NTD en los sueros de pacientes infectados y/o vacunados, debiéndose, la búsqueda de dichos anticuerpos ampliarse a mayor cantidad de muestras.

Por otro lado, ya hemos planteado la importancia que puede tener DC-SIGN en el contexto de infección por SARS-CoV-2. El papel que desempeñaría como factor de unión podría, no solo tener relevancia en el mecanismo de diseminación viral, también podría influir en su patogénesis. En este contexto, DC-SIGN podría actuar aumentando la densidad de las partículas virales de SARS-CoV-2 en las superficies celulares debido a la adhesión de las mismas y, por tanto, potenciando el acceso a su receptor real, en este caso ACE2.

Una investigación dirigida por Lempp y col, demostraron que en ensayos de neutralización donde utilizaban células diana que expresan ACE2 y células diana que expresaban DC-SIGN, los anticuerpos monoclonales anti-RBM (S2E12, S2D106, S2X58 y S2M11) neutralizaron potentemente la infección en las células que expresaban ACE2, mientras que los anticuerpos monoclonales anti-RBD S309 dirigido al sitio conservado de proteoglicano IV/clase 3 distal de RBM y S2X333 dirigido al sitio NTD, no lograron hacerlo. Sin embargo, cuando se probaron en células que expresaban niveles bajos de ACE2 junto DC-SIGN, S309 y S2X333 mostraron una actividad neutralizante mejorada, este trabajo reveló que la neutralización en células que expresan DC-SIGN se ve aumentada en presencia de anticuerpos anti-NTD, debido a la restricción de DC-SIGN como factor de unión al no poder aumentar partículas virales en la superficie y facilitando el acceso a su receptor real ([Lempp et al., 2021](#)).

Se quiso comprobar la existencia de anticuerpos anti-NTD que pudieran modular la actividad neutralizante en sueros de pacientes. Para ello se utilizó como modelo celular 293T ACE2 y 293T-DC-SIGN. La presencia de los anticuerpos anteriormente mencionados debería potenciar la neutralización en el modelo celular que expresa la lectina.

Se utilizó el suero vacunal 408 sin infección natural previa. En este la actividad neutralizante en presencia del suero, tanto en células diana 293T ACE2 como en las células 293T DC-SIGN, es

similar, siendo la dilución inhibitoria del 50% de 1/1786 en el sistema 293T ACE2 y 1/1480 en el sistema de 293T DC-SIGN (ver figura 17 resultados 5.1).

También se probó el suero del paciente vacunado 311 que tampoco había tenido contacto previamente con el virus auténtico. Los resultados del ensayo de infección en presencia del mismo, muestra una curva de la actividad neutralizante del suero en la línea celular 293T-ACE2 similar a la curva de la actividad neutralizante en las células 293T-DC-SIGN no existiendo entre ellas diferencias significativas, siendo la IC_{50} de 1/620 en la línea celular 293T ACE2 y 1/495 en la línea celular 293T DC-SIGN (ver figura 18 resultados 5.1)

Para comprobar si la presencia de los anticuerpos anti-NTD de la proteína S en los sueros de los pacientes, es parcialmente dependiente de una infección natural al virus autentico, probamos un suero convaleciente vacunal, el suero 105. Los resultados de la actividad de dicho suero muestran que la actividad neutralizante en presencia del suero también es similar en ambos sistemas, siendo la IC_{50} de 1/1929 en las células 293T ACE2 y 1/2380 en las células 293T DC-SIGN (ver figura 19 resultados 5.1).

Los ensayos de neutralización no muestran presencia de anticuerpos anti-NTD de la proteína S que modulen la actividad neutralizante en los sueros de los pacientes vacunados y del paciente convaleciente vacunado, ya que la actividad neutralizante en el sistema de las células que expresan DC-SIGN, no se ve potenciada. Aunque estos resultados preliminares no han detectado anticuerpos anti-NTD que interaccionen con la unión a DC-SIGN, sería necesario ampliar el estudio a un mayor número de muestras clínicas.

Finalmente, de manera adicional, se quiso comprobar si el papel como receptor de unión de DC-SIGN podría ser compartido con otros coronavirus. Por ello, se estudió si el coronavirus del síndrome de respiratorio de oriente medio (MERS-CoV), cuyo receptor canónico es la proteína dipeptidil peptidasa-4 (DPP4), podría tener también alternativamente DC-SIGN como receptor auxiliar de unión.

Un estudio de Chu et al., 2014, demostró la infección productiva por MERS en células dendríticas. Los pacientes que se infectaron con MERS-CoV, clínicamente, desarrollaron coagulopatía, disfunción multiorgánica, linfopenia, neutrofilia y trombocitopenia. Cabe destacar, que el virus no solo se detecta en el tracto respiratorio, sino también en orina, sangre y heces de las personas infectadas, lo que respaldaría una diseminación sistémica del virus. Es por ello por lo que en las personas infectadas con MERS-CoV, los macrófagos derivados de monocitos y las células dendríticas podrían actuar como potenciales vehículos de diseminación facilitando la dispersión del virus a los ganglios linfáticos, donde al interactuar con las células T, potenciarían la tormenta de citoquinas y/o quimioquinas, imitando el escenario en el SARS-CoV-1, agravando el cuadro clínico del infectado. En dicho estudio, demuestran que existe una infección productiva en células dendríticas por parte del MERS-CoV, la cual no se produce en SARS-CoV-1 ([Chu et al., 2014](#)).

En la presente tesis doctoral se quiso explorar si MERS-CoV puede hacer uso de DC-SIGN como receptor directo explicando parcialmente de esta forma la infección productiva demostrada en las células dendríticas en la infección directa del virus, o si puede actuar también, al igual que en SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2, como factor de unión o receptor auxiliar y su posible papel en la diseminación vírica del mismo.

Para ello se realizaron ensayos de infección directa y transinfección con los virus recombinantes rVSV-SARS-CoV-1 y rVSV-MERS-CoV en líneas celulares Jurkat DC-SIGN y células dendríticas inmaduras.

Los resultados de infección directa en las células Jurkat y Jurkat DC-SIGN, son virus recombinantes basados en rVSV mostraron una ausencia de infección con el virus SARS-CoV-1 e infección dependiente de la expresión de DC-SIGN con MERS-CoV (ver figura 1 resultados 1.1). Estos ensayos sugieren que MERS-CoV si utiliza DC-SIGN como receptor directo en su ciclo de infección viral. Para confirmar dicho resultado se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos. Se utilizaron los virus recombinantes basados en rVSV MERS-CoV, SARS-CoV-1, EBOV y VSV-G. El ensayo de infección directa mostró infección en las células dendríticas por parte del virus MERS-CoV, sin embargo, la elevada infección con el anticuerpo control anti-DC-SIGN demostró que dicha infección no es dependiente de DC-SIGN. Por otra parte, el control SARS-CoV-1 no mostró una infección directa en DC, debido a la ausencia de su receptor ACE2 en las mismas, en cambio el control de entrada de DC-SIGN EBOV mostró una infección dependiente de la lectina, así como los niveles de RLU/s con el virus de entrada independiente VSV-G mostraron que el anticuerpo anti-DC-SIGN no suprimía la infección (ver figura 2 resultados 1.2).

Lo resultados con virus recombinantes entre las células Jurkat y Jurkat DC-SIGN donde la infección es dependiente de la lectina, y los ensayos con células dendríticas donde la infección no fue suprimida por el anticuerpo anti-DC-SIGN, podría indicar que hay otros receptores en la superficie de las células primarias, como DPP4 que son las responsables de la infección en las mismas, siendo el papel de DC-SIGN en dicho escenario, mínimo.

Por otro lado, los ensayos de en células dendríticas (ver figura 10 resultados 2.2) mostraron un aumento en los valores de infección en las células diana Vero E6 y una disminución en presencia del el anticuerpo anti-DC-SIGN, lo que demuestra que MERS-CoV presenta una transinfección promovida por DC-SIGN y, por tanto, la lectina es un transreceptor para MERS-CoV. Que DC-SIGN sea un factor de unión de MERS-CoV apoyaría la hipótesis de Chu et al., 2014 de que las células dendríticas pueden actuar como un potencial vehículo de diseminación, facilitando la dispersión del virus a los ganglios linfáticos agravando la tormenta de citoquinas y/o quimioquinas. El control de SARS-CoV-1 como transreceptor de DC-SIGN mostró tanto en células inmortalizadas como células dendríticas una transinfección eficaz en las células diana Vero E6, inhibida en presencia del anticuerpo anti-DC-SIGN.

La importancia y el papel que desempeña DC/L-SIGN en el conjunto general de la patogénesis y diseminación viral de los coronavirus SARS-CoV-2 y MERS-CoV deben explorarse más a fondo.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

Capítulo VI: Conclusiones

- Las lectinas DC/L-SIGN actúan como factores de unión para el virus SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 y MERS-CoV.
- Las lectinas de tipo C DC/L-SIGN no son receptores funcionales del virus SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1.
- Las células dendríticas DC-SIGN + son capaces de capturar los virus SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 y MERS-CoV y transmitirlos a células susceptibles.
- DC-SIGN es un transreceptor de los virus SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 y MERS-CoV habiéndose demostrado con líneas celulares y células primarias tanto con virus recombinantes como con virus autentico.
- Otras lectinas como L-SIGN presentes en otras poblaciones celulares podrían jugar papel similar.
- La utilización de DC-SIGN en transinfección demuestran diferencias entre las variantes, sin embargo, la relevancia biológica de este fenómeno no está completamente claro.
- La unión demostrada en la presente tesis doctoral entre las lectinas DC/L-SIGN con la proteína S de SARS-CoV-2 y su capacidad para transmitir los virus a células permisibles podrían facilitar la unión y la diseminación del virus, arrojando luz sobre los mecanismos de infección y diseminación viral del nuevo betacoronavirus.
- La lectina de tipo C DC-SIGN es capaz de unir las envueltas de los virus MERS-CoV y SARS-CoV, facilitando la diseminación vírica.
- Aunque se ha señalado el papel de los anticuerpos dirigidos a la proteína S (NTD) en la interferencia con el reconocimiento de DC-SIGN, en nuestro trabajo no hemos podido confirmarlo, haciendo necesaria la ampliación del estudio a un mayor número de muestras clínicas.

RESUMEN

SUMMARY

Resumen

La lectina de tipo C DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), también llamada CD209 o molécula de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina (ICAM-3) específica de células dendríticas (DC), es una proteína transmembrana dependiente de Ca^{+} que reconoce estructuras con un alto contenido en manosa como las glicosilaciones presentes en los receptores de superficie de la envuelta de multitud de virus, mediante un dominio lectina C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (CDR). El reconocimiento de DC-SIGN de patrones específicos de carbohidratos presentes en las envueltas víricas resulta de gran importancia para el estudio de los mecanismos de infección y diseminación viral de los mismos. DC-SIGN se expresa concretamente en células dendríticas inmaduras de tejidos periféricos y podemos localizarla en diversos lugares como amígdalas, tejidos mucosos, ganglios linfáticos y bazo. Las células dendríticas (DCs) forman parte de un sistema de vigilancia especializado contra las infecciones formado por las llamadas células presentadoras de antígeno (APC), las cuales resultan cruciales en el reconocimiento de antígenos ya que su funcionalidad determina el tipo de célula T efectora que mediará la respuesta inmune. Las DCs son una de las primeras líneas de defensa ante la invasión patógena siendo fundamentales en la regulación de la respuesta inmune capturando, procesando y presentando antígenos a linfocitos T para generar respuestas inmune específicas, es por ello por lo que las DCs actúan como nexo entre la inmunidad innata y adaptativa.

Las DCs inmaduras expresan en su superficie una gran variedad de receptores, entre ellos la lectina de tipo C DC-SIGN. Se ha demostrado en multitud de virus el importante papel que tiene DC-SIGN en las células dendríticas donde se expresa en los mecanismos de entrada y diseminación viral. Tal vez el ejemplo más conocido sea el del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Cuando el virus infecta al huésped, este inicia la infección uniéndose a su receptor CD4 que junto a CCR5 o CXCR4 entrará en el linfocito T CD4⁺ iniciando su ciclo de vida. En el año 2000 se describió por primera vez una vía alternativa en la cual DC-SIGN presente en las células dendríticas reconocía los oligosacáridos con alto contenido en manosa presentes en la proteína gp120 de la envuelta del VIH, demostrándose que, a pesar de que DC-SIGN no era un receptor del virus VIH ya que no mediaba directamente la entrada viral en la célula, si confería a las DCs la capacidad de capturar las partículas virales y transmitir las a células susceptibles que expresan los receptores necesarios para la entrada vírica, este mecanismo, denominado infección en trans, se ha demostrado como una ruta importante para la diseminación de multitud de virus.

En el estado actual de la pandemia de COVID-19, el estudio de receptores capaces de reconocer y unir envueltas víricas cobra viral importancia. El esclarecimiento de los mecanismos de infección y diseminación viral del nuevo betacoronavirus ha sido una carrera a contrarreloj, donde la

comprensión de los actores implicados en el ciclo infeccioso del SARS-CoV-2 ha conllevado un titánico esfuerzo por parte de la comunidad científica en un intento de caracterizar las células y receptores implicados en el ciclo de vida del virus. Este es un virus zoonótico, capaz de provocar neumonía bilateral grave, transmitido por vía aérea. El virus comienza su ciclo de infección en las células humanas tras la unión de la proteína S (Spike) que se expresa en la superficie de la envuelta viral, a su receptor principal, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La proteína S se divide en dos subunidades, la subunidad S1 y la subunidad S2, en la primera existen dos dominios o regiones, el dominio N-terminal y el dominio de unión al receptor (RBD), en este último el virus interacciona con el receptor ACE2 desencadenándose a un cambio conformacional de la proteína que desestabiliza el trímero previo a la fusión e inicia el ciclo infectivo en la célula huésped. La expresión de su receptor canónico ACE2 varía a lo largo del tracto respiratorio ya que se expresa altamente en el tracto respiratorio superior, y disminuye según se desciende en el mismo. La expresión de DC-SIGN en células presentes a lo largo de dicho tracto respiratorio, unida a la evidencia de que DC-SIGN puede actuar como un factor de unión en la infección viral como en el virus Ébola o SARS-CoV, llevan a pensar que DC-SIGN pueda estar implicado en los mecanismos de infección y diseminación celular del virus SARS-CoV-2.

Para esclarecer si la lectina DC-SIGN juega algún papel como receptor o receptor auxiliar en el ciclo infeccioso del virus SARS-CoV-2 nos hemos marcado como primer objetivo de nuestra investigación, el análisis como receptor directo del virus mediante ensayos de infección directa, así como estudiar su posible papel como receptor facilitador de la transmisión de la infección mediante ensayos de transinfección del virus mediada por DC-SIGN. De forma adicional también se quiso explorar el papel de DC-SIGN en los mecanismos de infección y diseminación viral de los coronavirus SARS-CoV-1 y MERS-CoV.

Para el estudio de DC-SIGN en su papel como receptor del nuevo betacoronavirus humano se han utilizado modelos celulares de distintas líneas celulares, así como células dendríticas derivadas de monocitos en ensayos de infección directa y transinfección con virus recombinantes y SARS-CoV-2 auténtico. También se ha querido estudiar su capacidad de unión a DC-SIGN mediante la puesta a punto de técnicas de ELISA y ensayos de unión con la proteína trimérica soluble S y células Jurkat que expresan DC-SIGN mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos con virus recombinantes y virus replicativo en células inmortalizadas y células primarias en los ensayos de infección directa e infección en trans demostraron que DC-SIGN no es un receptor directo del virus SARS-CoV-2 pero si es capaz de promover una transinfección efectiva a células permisivas donde se expresa su receptor canónico ACE2. Los ensayos de ELISA, así como los ensayos de unión de la proteína S soluble con células Jurkat y Jurkat DC-SIGN mediante citometría de flujo demostraron que DC-SIGN es un factor de unión del

virus SARS-CoV-2. Además, los ensayos de infección directa en Jurkat y Jurkat DC-SIGN mostraron que MERS-CoV a diferencia de SARS-CoV-1, es capaz de utilizar DC-SIGN como receptor directo ya que los resultados mostraron infección en las células Jurkat DC-SIGN, que disminuía en presencia del anticuerpo anti-DC-SIGN, sin embargo, los ensayos de infección directa en células primarias revelaron que la infección de MERS-CoV era similar en presencia del anticuerpo anti-DC-SIGN. Esto sugiere la existencia de otros receptores celulares presentes en las mismas como DPP4 que MERS-CoV utiliza de manera predominante, por lo que es posible que el papel de DC-SIGN sea mínimo. Así mismo, los ensayos de infección en trans con virus recombinantes en células inmortalizadas y primarias demostraron que MERS-CoV y SARS-CoV-1 son capaces de capturar partículas virales y transmitirlas a células susceptibles, por lo que DC-SIGN es un factor de unión para los coronavirus MERS-CoV y SARS-CoV-1.

Por otra parte, durante el transcurso de la pandemia, se intentó aclarar los mecanismos de infección y diseminación viral con el fin de controlar la enfermedad en los pacientes graves de COVID-19, siendo la terapia con anticuerpos una de las herramientas utilizadas. Concretamente se han utilizado con éxito, anticuerpos monoclonales cuya diana es el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus SARS-CoV-2 ya que han demostrado una gran capacidad para bloquear la infección al neutralizar las partículas virales controlando así la enfermedad. El uso de estos anticuerpos monoclonales puede actuar como una fuerza de selección evolutiva, por lo que un uso continuado de los mismos hace posible la aparición de mutantes de escape virales que son capaces de evadir la acción de los anticuerpos dirigidos a RBD. Estos mutantes de escape podría mezclarse con las poblaciones virales que circulan entre la población, cambiando las dinámicas de transmisión. Este hecho expone la necesidad de contar con anticuerpos cuya diana vaya dirigida a otros dominios de la proteína viral, siendo en este escenario, de especial interés los anticuerpos dirigidos al dominio N-terminal (NTD) de la proteína S del virus. La identificación y posterior aislamiento de anticuerpos dirigidos al dominio NTD en sueros de pacientes, podría resultar de una herramienta terapéutica alternativa para el tratamiento de pacientes graves de COVID-19, posiblemente en combinación con anticuerpos anti-RBD. Además, la identificación de estos anticuerpos podría llevar a comprender parcialmente la patogénesis viral, ya que la interacción entre el dominio NTD de la proteína S del virus y DC-SIGN podría ser inhibida por la presencia de estos anticuerpos dirigidos al dominio NTD en sueros de pacientes, anulando el papel de la lectina DC-SIGN como factor de unión, disminuyendo la capacidad infectiva de SARS-CoV-2, ya que la lectina no podría unir ni aumentar en la superficie celular mediante adhesión las partículas virales y por tanto, no sería capaz de facilitar el acceso del virus a su receptor ACE2. Es por tanto que, como siguiente objetivo de la presente tesis doctoral, se estableció la búsqueda de anticuerpos dirigidos al dominio NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 en sueros de donantes vacunados y sueros de pacientes convalecientes vacunados, ya que la identificación de nuevos anticuerpos anti-NTD de la

proteína S en dichos sueros que fuesen capaces de inhibir la interacción antígeno-receptor descrita en la presente tesis, podría mejorar parcialmente el entendimiento del mecanismo de patogénesis del virus SARS-CoV-2, así mismo, la identificación y el posterior aislamiento de dichos anticuerpos, podría resultar una herramienta terapéutica alternativa para el control de la COVID-19 en los pacientes más graves. Los resultados preliminares con los ensayos de neutralización, la detección de anticuerpos anti-NTD de la proteína S en células 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN, así como los ensayos de unión mediante citometría de flujo, no detectaron la presencia de anticuerpos dirigidos al dominio NTD de la proteína S de SARS-CoV-2 en los sueros de los donantes convalecientes vacunados y vacunados sin infección natural previa. El reducido número de muestras clínicas analizadas hace necesario ampliar el estudio a un mayor número de sueros con el fin de poder identificar anticuerpos anti-NTD y comprender así, la patogénesis de la COVID-19.

Summary

DC-SIGN type C lectin (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), also known as CD209 or intracellular adhesion molecule 3 non associated to integrin (ICAM-3) specific to dendritic cells (DC), is a transmembrane protein dependent on Ca^{+} that recognizes structures with a high content of mannose, like glycosylations present in multitude of viral envelope surface receptors, through a C-terminal lectin carbohydrate domain recognition (CDR). Recognition of DC-SIGN carbohydrate specific patterns present in the viral envelopes is of great importance for the study of infection mechanisms and viral dissemination. DC-SIGN is revealed concretely in immature dendritic cells of peripheral tissues and we can locate it in various places like the tonsils, mucous tissues, lymph nodes, and the spleen. Dendritic cells (DCs) are part of a vigilance system specialized against infections, made up by the so-called antigen presenting cells (APC), which are crucial in the recognition of antigens due to its functionality defining the effector T cell type that will mediate the immune response. DCs are one of the main lines of defence against pathogen invasion, being essential in the regulation of the immune response by capturing, processing and presenting antigens to T lymphocytes to generate specific immune responses, it is because of this that DCs act as a nexus between innate and adaptative immunity.

Immature DCs express in its surface a great variety of receptors, among them DC-SIGN type C lectin. It has been demonstrated in a multitude of virus the important role that DC-SIGN plays in dendritic cells, where it expresses itself in entry mechanisms and viral dissemination. Maybe the most known example is that of the human immunodeficiency virus (HIV). When the virus infects the host, it initiates the infection by binding its CD4 receptor which, together with CCR5 or CXCR4, will enter the T lymphocyte CD4+, initiating its life cycle. In the year 2000 an alternative way was described for the first time, by which DC-SIGN present in dendritic cells recognized the oligosaccharides with high mannose content present in the gp120 protein of the VIH envelope, demonstrating that, in spite of DC-SIGN not being a VIH virus receptor, for it did not mediate directly in the viral entry of the cell, it did confer to DCs the capacity to capture viral particles and transfer them to susceptible cells that express the necessary receptors for the viral entry, this mechanism, denominated trans-infection, has been demonstrated as an important route for the dissemination of multitude of virus.

In the actual state of the COVID-19 pandemic, the study of receptors able to recognize and bind viral envelopes take on a viral importance. The clarification of infection mechanisms and viral dissemination of the new betacoronavirus has been a race against time, where the understanding of the actors involved in the SARS-CoV-2 infection cycle has entailed a titanic effort by the scientific community in an attempt to characterise the cells and receptors implicated in the life cycle of the virus. This is a zoonotic virus, able to cause severe bilateral pneumonia, transmitted via air. The

virus begins its infection in human cells after the binding of the S protein (Spike) expressed in the surface of the viral envelope, its main receptor, the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). Protein S is divided in two subunits, subunit S1 and subunit S2, in the first one two domains or regions exist, N-terminal domain and receptor binding domain (RBD), in the latter the virus interacts with the ACE2 receptor, unleashing a conformational change of the protein that destabilizes the previous trimer to the fusion and initiates the infective cycle in the host cell. The expression of its canonical ACE receptor varies through the respiratory tract as it highly expresses itself in the upper respiratory tract and diminishes as it descends along the tract. The expression of DC-SIGN in present cells through the respiratory tract, joined by the evidence of DC-SIGN being able to act as an attachment factor in the viral infection like in the Ebola virus or SARS-CoV, bring us to think that DC-SIGN may be implicated in the infection mechanisms and cellular dissemination of the SARS-CoV-2 virus.

To clarify if the DC-SIGN lectin plays any role as receptor or auxiliary receptor in the infection cycle of the SARS-CoV-2 virus we have mark as the first objective of our investigation its analysis as a direct receptor of the virus by way of direct infection assays, as well as study its possible role as a facilitating receptor for the transmission of the infection by means assays of the virus trans-infection mediated by DC-SIGN. In addition, we also wanted to explore the role of DC-SIGN in the infection mechanisms and viral dissemination of SARS-CoV-1 and MERS-CoV coronavirus.

For the study of DC-SIGN in its role as a receptor of the new human betacoronavirus we have used cellular models of different cellular lines, as well as monocyte-derived dendritic cells in assays of direct infection and trans-infection with recombinant virus and authentic SARS-CoV-2. We also wanted to study its capacity to bind a DC-SIGN by optimized techniques such as ELISA and binding assays with trimeric soluble S protein and Jurkat cells that express DC-SIGN through flow cytometry.

The results obtained with recombinant viruses and replicative virus in immortalized cells and primary cells in direct infection and trans-infection assays showed that DC-SIGN is not a direct receptor for the SARS-CoV-2 virus but is capable of promoting an effective trans-infection to permissive cells where its canonical ACE2 receptor is expressed. The ELISA assays, as well as soluble protein S binding assays with Jurkat and Jurkat DC-SIGN cells by flow cytometry demonstrated that DC-SIGN is an attachment factor of the SARS-CoV-2 virus. Moreover, direct trans-infection assays in Jurkat and Jurkat DC-SIGN showed that MERS-CoV, unlike SARS-CoV-1, is able to use DC-SIGN as a direct receptor as the results showed infection in Jurkat DC-SIGN cells, which diminished in the presence of the anti-DC-SIGN antibody, however, direct infection assays in primary cells revealed that MERS-CoV infection was similar in the presence of the anti-DC-SIGN antibody. This suggests the existence of other cellular receptors present in these cells,

like DPP4, which MERS-CoV uses predominantly, so it is possible that the role played by DC-SIGN could be minimal. In the same way, trans-infection assays with recombinant virus in immortalized and primary cells showed that MERS-CoV and SARS-CoV-1 are able to capture viral particles and transmit them to susceptible cells, so DC-SIGN is an attachment factor for SARS-CoV-1 and MERS-CoV coronavirus.

On the other hand, during the course of the pandemic, attempts were made to clarify the mechanisms of viral infection and dissemination in order to control the disease in severe COVID-19 patients, with antibody therapy being one of the tools used. Specifically, monoclonal antibodies whose target is the receptor binding domain (RBD) of the S protein of the SARS-CoV-2 virus have been used successfully, since they have shown a great capacity to block the infection by neutralizing the viral particles, thus controlling the illness. The use of these monoclonal antibodies can act as a force of evolutive selection, so the continuous use of these antibodies makes possible the apparition of viral escape mutants that are capable of evade the RBD directed antibodies action. These escape mutants could mix with viral population that move among the population, changing the dynamics of transmission. This fact explains the necessity to rely on antibodies whose target is aimed to other domains of the viral protein, being in this scenery of special interest the antibodies directed to N-terminal domain (NTD) of the virus S protein. The identification and subsequent isolation of antibodies directed to the NTD domain in patient serums could be a result of an alternative therapeutic tool for the treatment of severe COVID-19 patients, possibly in combination with anti-RBD antibodies. Furthermore, the identification of these antibodies could lead to the partial understanding of the viral pathogenesis, as the interaction between the NTD domain of the S protein of the virus and DC-SIGN could be inhibited by the presence of these antibodies directed to the NTD domain of the serum of patients, nullifying the role of the DC-SIGN lectin as an attachment factor, diminishing the infectious capacity of SARS-CoV-2, as the lectin could not bind nor increase in the cellular surface through the adhesion of viral particles, and thus it could not be able to facilitate the access of the virus to its ACE2 receptor. It is therefore that, as the next objective of this doctoral thesis, it was established the search of antibodies directed to the NTD domain of the S protein of SARS-CoV-2 in the serum of vaccinated donors and the serum in convalescent vaccinated patients, so the identification of new anti-NTD antibodies of the S protein in said serums that were capable of inhibit the antigen-receptor interaction described in the present thesis could partially improve the understanding of the pathogenesis mechanism of the SARS-CoV-2 virus, moreover, the identification and subsequent isolation of these antibodies could become an alternative therapeutic tool for the control of the COVID-19 in the most severe patients. The preliminary results in the neutralization assays, the detection of anti-NTD antibodies of the S protein in 293T-ACE2 and 293T-DC-SIGN cells, along with the flow cytometry binding assays, did not detect the presence of antibodies directed to the NTD domain of the S protein of the SARS-CoV-2

virus in the serums of convalescent vaccinated donors and those vaccinated without a previous natural infection. The limited number of analysed clinical samples makes necessary to increase the study to a larger number of serums in order to identify anti-NTD antibodies and thus understand the COVID-19 pathogenesis.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abbas, A. K. (2019). Harnessing the immune response: basic principles and therapeutic applications. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 130, 24–32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31516161>

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Al-Tawfiq, J. A. (2013). Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection: an overview. *Journal of Infection and Public Health*, 6(5), 319–322. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.06.001>

Al Awaidey, S. T., & Khamis, F. (2019). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Oman: Current Situation and Going Forward. In *Oman medical journal* (Vol. 34, Issue 3, pp. 181–183). <https://doi.org/10.5001/omj.2019.36>

Almahboub, S. A., Algaissi, A., Alfaleh, M. A., ElAssouli, M.-Z., & Hashem, A. M. (2020). Evaluation of Neutralizing Antibodies Against Highly Pathogenic Coronaviruses: A Detailed Protocol for a Rapid Evaluation of Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudovirus-Based Assay. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02020>

Almeida, J., Berry, D., Cunningham, C., Hamre, D., Hofstad, M., Mallucci, L., McIntosh, K., & Yrrel, T. (1968). Virology: Coronaviruses. *Nature*, 220(5168), 650. <https://doi.org/10.1038/220650b0>

Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muñiz, O., Corbí, A. L., & Delgado, R. (2002). C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. 76(13), 6841–6844. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.13.6841>

Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczyszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydililo, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoeve, J., Liu, S. T. H., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>

Amraei, R., Yin, W., Napoleon, M. A., Suder, E. L., Berrigan, J., Zhao, Q., Olejnik, J., Chandler, K. B., Xia, C., Feldman, J., Hauser, B. M., Caradonna, T. M., Schmidt, A. G., Gummuluru, S., Muhlberger, E., Chitalia, V., Costello, C. E., & Rahimi, N. (2021). CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2. In *bioRxiv : the preprint server for biology*.

<https://doi.org/10.1101/2020.06.22.165803>

Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. In *Nature medicine* (Vol. 26, Issue 4, pp. 450–452). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>

Baker, A. N., Richards, S.-J., Guy, C. S., Congdon, T. R., Hasan, M., Zwetsloot, A. J., Gallo, A., Lewandowski, J. R., Stansfeld, P. J., Straube, A., Walker, M., Chessa, S., Pergolizzi, G., Dedola, S., Field, R. A., & Gibson, M. I. (2020). The SARS-COV-2 Spike Protein Binds Sialic Acids and Enables Rapid Detection in a Lateral Flow Point of Care Diagnostic Device. *ACS Central Science*, 6(11), 2046–2052. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00855>

Barde, I., Salmon, P., & Trono, D. (2010). Production and titration of lentiviral vectors. *Current Protocols in Neuroscience, Chapter 4*, Unit 4.21. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0421s53>

Bashirova, A. A., Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Eilering, J. B., Martin, M. P., Wu, L., Martin, T. D., Viebig, N., Knolle, P. A., KewalRamani, V. N., van Kooyk, Y., & Carrington, M. (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(6), 671–678. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.671>

Belz, G., Mount, A., & Masson, F. (2009). Dendritic Cells in Viral Infections. In G. Lombardi & Y. Riffó-Vasquez (Eds.), *Dendritic Cells* (pp. 51–77). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71029-5_3

Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L. C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B. M., Stunnenberg, M., & Geijtenbeek, T. B. H. (2018). C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape. *Frontiers in Immunology*, 9, 590. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00590>

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>

Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>

Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T.-Y., Perry, B. W., Castoe, T. A., Rambaut, A., & Robertson, D. L. (2020). Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible

for the COVID-19 pandemic. *Nature Microbiology*, 5(11), 1408–1417. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>

Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N. M. A., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A. E. H., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooi, A., van Schooten, J., ... van Gils, M. J. (2020). Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 643–650. <https://doi.org/10.1126/science.abc5902>

Butler, D. L., & Gildersleeve, J. C. (2020). Abnormal antibodies to self-carbohydrates in SARS-CoV-2 infected patients. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.15.341479>

Cagno, V., Tseligka, E. D., Jones, S. T., & Tapparel, C. (2019). Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/v11070596>

Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., McLellan, J. S., Fadda, E., & Amaro, R. E. (2020). Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Central Science*, 6(10), 1722–1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>

CDC. (2021). *SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions*. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>

Chan, J. F.-W., Yuan, S., Kok, K.-H., To, K. K.-W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C.-Y., Poon, R. W.-S., Tsoi, H.-W., Lo, S. K.-F., Chan, K.-H., Poon, V. K.-M., Chan, W.-M., Ip, J. D., Cai, J.-P., Cheng, V. C.-C., Chen, H., ... Yuen, K.-Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)

Chan, V. S. F., Chan, K. Y. K., Chen, Y., Poon, L. L. M., Cheung, A. N. Y., Zheng, B., Chan, K., Mak, W., Ngan, H. Y. S., Xu, X., Screaton, G., Tam, P. K. H., Austyn, J. M., Chan, L., Yip, S., Peiris, M., Khoo, U., & Lin, C. S. (2006). *Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection*. 38(1), 38–46. <https://doi.org/10.1038/ng1698>

Chang, C., Lo, S.-C., Wang, Y.-S., & Hou, M.-H. (2016). Recent insights into the development of therapeutics against coronavirus diseases by targeting N protein. *Drug Discovery Today*, 21(4),

562–572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.015>

Chen, X., Zhao, B., Qu, Y., Chen, Y., Xiong, J., Feng, Y., Men, D., Huang, Q., Liu, Y., Yang, B., Ding, J., & Li, F. (2020). Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(8), 1937–1942. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa449>

Cheng, V. C. C., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 660–694. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-07>

Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Hao, M., Zhang, Z., Fan, P., Dong, Y., Yang, Y., Chen, Z., Guo, Y., Zhang, J., Li, Y., Song, X., Chen, Y., Xia, L., Fu, L., Hou, L., ... Chen, W. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 650–655. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>

Chu, H., Zhou, J., Wong, B. H.-Y., Li, C., Cheng, Z.-S., Lin, X., Poon, V. K.-M., Sun, T., Lau, C. C.-Y., Chan, J. F.-W., To, K. K.-W., Chan, K.-H., Lu, L., Zheng, B.-J., & Yuen, K.-Y. (2014). Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. *Virology*, 454–455, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.018>

Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P., & Dragic, T. (2004). *transinfection of liver cells by hepatitis C virus*.

CSMW. (2019, December). *Comisión de Salud Municipal de Wuhan*. <http://wjw.wuhan.gov.cn/>

Cui, J. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(March), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2005). Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 64, 165–230. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64006-7)

DeDiego, M. L., Enrique, A., Almaza, F., Rejas, T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W., Zaki, S. R., Subbarao, K., & Enjuanes, L. (2007). A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo □. 81(4), 1701–1713.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01467-06>

Deng, S.-Q., & Peng, H.-J. (2020). Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jcm9020575>

Dimitrov, D. S. (2004). Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 109–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro817>

do Vale, B., Lopes, A. P., Fontes, M. da C., Silvestre, M., Cardoso, L., & Coelho, A. C. (2021). Bats, pangolins, minks and other animals - villains or victims of SARS-CoV-2? *Veterinary Research Communications*, 45(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09787-2>

Doores, K. J. (2015). The HIV glycan shield as a target for broadly neutralizing antibodies. *The FEBS Journal*, 282(24), 4679–4691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.13530>

Engering, A., Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., & van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(5), 2118–2126. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2118>

Erbacher, A., Gieseke, F., Handgretinger, R., & Müller, I. (2009). Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Human Immunology*, 70(5), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.02.005>

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). *Chapter 1 Coronaviruses : An Overview of Their Replication and Pathogenesis*. 1282(1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7>

Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., & Moss, B. (1986). Eukaryotic Transient-Expression System Based on Recombinant Vaccinia Virus that Synthesizes Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8122–8126. <http://www.jstor.org/stable/28537>

Funatsu, O., Sato, T., Kotovuori, P., Gahmberg, C. G., Ikekita, M., & Furukawa, K. (2001). Structural study of N-linked oligosaccharides of human intercellular adhesion molecule-3 (CD50). *European Journal of Biochemistry*, 268(4), 1020–1029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01960.x>

Furuhashi, M., Moniwa, N., Takizawa, H., Ura, N., & Shimamoto, K. (2020). Potential differential effects of renin-angiotensin system inhibitors on SARS-CoV-2 infection and lung injury in

COVID-19. In *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* (Vol. 43, Issue 8, pp. 837–840). <https://doi.org/10.1038/s41440-020-0478-1>

Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>

Gao, C., Zeng, J., Jia, N., Stavenhagen, K., Matsumoto, Y., Zhang, H., Li, J., Hume, A. J., Mühlberger, E., van Die, I., Kwan, J., Tantisira, K., Emili, A., & Cummings, R. D. (2020). SARS-CoV-2 Spike Protein Interacts with Multiple Innate Immune Receptors. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.29.227462>

Geijtenbeek, T. B. H., Engering, A., & van Kooyk, Y. (2002). DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(6), 921–931. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.71.6.921>

Geijtenbeek, T. B. H., Kwon, D. S., Torensma, R., Vliet, S. J. Van, Duijnhoven, G. C. F. Van, Middel, J., Cornelissen, I. L. M. H. A., Nottet, H. S. L. M., Kewalramani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., & Kooyk, Y. Van. (2000). *DC-SIGN , a Dendritic Cell – Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans -Infection of T Cells*. 100, 587–597.

Go, E. P., Hewawasam, G., Liao, H.-X., Chen, H., Ping, L.-H., Anderson, J. A., Hua, D. C., Haynes, B. F., & Desaire, H. (2011). Characterization of glycosylation profiles of HIV-1 transmitted/founder envelopes by mass spectrometry. *Journal of Virology*, 85(16), 8270–8284. <https://doi.org/10.1128/JVI.05053-11>

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1), 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

Graham, F. L., & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52(2), 456–467. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3)

Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/v12020135>

Grant, O. C., Montgomery, D., Ito, K., & Woods, R. J. (2020). Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Scientific Reports*, 10(1), 14991.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71748-7>

Grasselli, G., Zangrillo, A., Zanella, A., Antonelli, M., Cabrini, L., Castelli, A., Cereda, D., Coluccello, A., Foti, G., Fumagalli, R., Iotti, G., Latronico, N., Lorini, L., Merler, S., Natalini, G., Piatti, A., Ranieri, M. V., Scandroglio, A. M., Storti, E., ... Pesenti, A. (2020). Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*, 323(16), 1574–1581. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.5394>

Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D. A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M. E., Weis, W. I., & Drickamer, K. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(7), 591–598. <https://doi.org/10.1038/nsmb784>

Gupta, R. K., & Gupta, G. S. (2012). 36 36.1. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2>

Hang, H. C., & Bertozzi, C. R. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5021–5034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.085>

Hatmal, M. M., Alshaer, W., Al-Hatamleh, M. A. I., Hatmal, M., Smadi, O., Taha, M. O., Oweida, A. J., Boer, J. C., Mohamud, R., & Plebanski, M. (2020). Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122638>

Hossain, K., & Wall, K. A. (2019). *Use of Dendritic Cell Receptors as Targets for Enhancing Anti-Cancer Immune Responses*. <https://doi.org/10.3390/cancers11030418>

Hsieh, C.-L., Goldsmith, J. A., Schaub, J. M., DiVenere, A. M., Kuo, H.-C., Javanmardi, K., Le, K. C., Wrapp, D., Lee, A. G., Liu, Y., Chou, C.-W., Byrne, P. O., Hjorth, C. K., Johnson, N. V., Ludes-Meyers, J., Nguyen, A. W., Park, J., Wang, N., Amengor, D., ... McLellan, J. S. (2020). Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science*, 369(6510), 1501–1505. <https://doi.org/10.1126/science.abd0826>

Hu, B. (2019). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, December. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

ICTV. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

Jiang, S., Zhang, X., & Du, L. (2021). Therapeutic antibodies and fusion inhibitors targeting the spike protein of SARS-CoV-2. In *Expert opinion on therapeutic targets* (Vol. 25, Issue 6, pp. 415–421). <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1820482>

Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., ... Xu, J. (2005). Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *Journal of Virology*, 79(18), 11892–11900. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11892-11900.2005>

Kappler, K., & Hennet, T. (2020). Emergence and significance of carbohydrate-specific antibodies. *Genes & Immunity*, 21(4), 224–239. <https://doi.org/10.1038/s41435-020-0105-9>

Khoo, U.-S., Chan, K. Y. K., Chan, V. S. F., & Lin, C. L. S. (2008). DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(8), 861–874. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0350-2>

Kooyk, Y. Van, Vliet, S. J. Van, & Garcı́, J. J. (2008). *Dendritic cells and C-type lectin receptors : coupling innate to adaptive immune responses*. August, 580–587. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.55>

Léger, P., Tetard, M., Youness, B., Cordes, N., Rouxel, R. N., Flamand, M., & Lozach, P.-Y. (2016). Differential Use of the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis. *Traffic*, 17(6), 639–656. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tra.12393>

Lempp, F. A., Soriaga, L., Montiel-ruiz, M., Benigni, F., Noack, J., Park, Y., Bianchi, S., Walls, A. C., Bowen, J. E., Zhou, J., Kaiser, H., Joshi, A., Agostini, M., Meury, M., Jr, E. D., Jaconi, S., Herbert, W. V., Lanzavecchia, A., Veesler, D., ... Telenti, A. (2021). *Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03925-1>

Lennemann, N. J., Rhein, B. A., Ndungo, E., Chandran, K., Qiu, X., & Maury, W. (2014). Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1. *MBio*, 5(1), e00862-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00862-13>

Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting

enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>

Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F.-W., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K.-Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., ... Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>

Liu, S., Chan, T.-C., Chu, Y.-T., Wu, J. T.-S., Geng, X., Zhao, N., Cheng, W., Chen, E., & King, C.-C. (2016). Comparative Epidemiology of Human Infections with Middle East Respiratory Syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses among Healthcare Personnel. *PloS One*, 11(3), e0149988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149988>

López, C. B., Molledo, B., Alexopoulou, L., Bonifaz, L., Flavell, R. A., & Moran, T. M. (2004). TLR-Independent Induction of Dendritic Cell Maturation and Adaptive Immunity by Negative-Strand RNA Viruses. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6882 LP – 6889. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6882>

Lozach, P., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J., Arenzana-seisdedos, F., & Lavalette, D. L. De. (2004). C-type Lectins L-SIGN and DC-SIGN Capture and Transmit Infectious Hepatitis C Virus Pseudotype Particles *. 279(31), 32035–32045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402296200>

Lüdtke, A., Ruibal, P., Wozniak, D. M., Pallasch, E., Wurr, S., Bockholt, S., Gómez-Medina, S., Qiu, X., Kobinger, G. P., Rodríguez, E., Günther, S., Krasemann, S., Idoyaga, J., Oestereich, L., & Muñoz-Fontela, C. (2017). Ebola virus infection kinetics in chimeric mice reveal a key role of T cells as barriers for virus dissemination. *Scientific Reports*, 7, 43776. <https://doi.org/10.1038/srep43776>

Lundberg, K., & Rydner, F. (2014). Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. 279–288. <https://doi.org/10.1111/imm.12252>

Martín-moreno, A., & Muñoz-fernández, M. A. (2019). Dendritic Cells , the Double Agent in the War Against HIV-1. 10(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02485>

Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)

Medina-Enríquez, M. M., Lopez-León, S., Carlos-Escalante, J. A., Aponte-Torres, Z., Cuapio, A., & Wegman-Ostrosky, T. (2020). ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. *Cell &*

Bioscience, 10(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00519-8>

Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. In *Lancet (London, England)* (Vol. 395, Issue 10229, pp. 1033–1034). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)

Memish, Z. A., Cotten, M., Meyer, B., Watson, S. J., Alsahafi, A. J., Al Rabeeah, A. A., Corman, V. M., Sieberg, A., Makhdoom, H. Q., Assiri, A., Al Masri, M., Aldabbagh, S., Bosch, B.-J., Beer, M., Müller, M. A., Kellam, P., & Drosten, C. (2014). Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1012–1015. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140402>

Millet, J. K., & Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>

Moreno, C. (2003). *ARTÍCULOS DE REVISIÓN Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario*. 3, 29–33.

Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*, 182(5), 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>

Nafea, S., & Fahad, A. (2021). Journal of King Saud University – Science Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101335. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101335>

Ni, W., Yang, X., Yang, D., Bao, J., Li, R., Xiao, Y., Hou, C., Wang, H., Liu, J., Yang, D., Xu, Y., Cao, Z., & Gao, Z. (2020). Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Critical Care*, 24(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>

Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Verdiá-Báguena, C., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V. M., & Enjuanes, L. (2014). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. *PLOS Pathogens*, 10(5), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>

Noy-Porat, T., Makdasi, E., Alcalay, R., Mechaly, A., Levy, Y., Bercovich-Kinori, A., Zauberman, A., Tamir, H., Yahalom-Ronen, Y., Israeli, M., Epstein, E., Achdout, H., Melamed, S., Chitlaru, T., Weiss, S., Peretz, E., Rosen, O., Paran, N., Yitzhaki, S., ... Rosenfeld, R. (2020). A panel of human

neutralizing mAbs targeting SARS-CoV-2 spike at multiple epitopes. *Nature Communications*, 11(1), 4303. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18159-4>

Noy-Porat, T., Mechaly, A., Levy, Y., Makdasi, E., Alcalay, R., Gur, D., Aftalion, M., Falach, R., Leviatan Ben-Arye, S., Lazar, S., Zauberman, A., Epstein, E., Chitlaru, T., Weiss, S., Achdout, H., Edgeworth, J. D., Kikkeri, R., Yu, H., Chen, X., ... Rosenfeld, R. (2021). Therapeutic antibodies, targeting the SARS-CoV-2 spike N-terminal domain, protect lethally infected K18-hACE2 mice. *IScience*, 24(5), 102479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102479>

Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>

Omrani, A. S., Al-Tawfiq, J. A., & Memish, Z. A. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): animal to human interaction. *Pathogens and Global Health*, 109(8), 354–362. <https://doi.org/10.1080/20477724.2015.1122852>

Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update*. 2(3). <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>

Pallesen, J., Wang, N., Corbett, K. S., Wrapp, D., Kirchdoerfer, R. N., Turner, H. L., Cottrell, C. A., Becker, M. M., Wang, L., Shi, W., Kong, W.-P., Andres, E. L., Kettenbach, A. N., Denison, M. R., Chappell, J. D., Graham, B. S., Ward, A. B., & McLellan, J. S. (2017). Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), E7348 LP-E7357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707304114>

Paola, T. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)

Parrish, N. F., Gao, F., Li, H., Giorgi, E. E., Barbian, H. J., Parrish, E. H., Zajic, L., Iyer, S. S., Decker, J. M., Kumar, A., Hora, B., Berg, A., Cai, F., Hopper, J., Denny, T. N., Ding, H., Ochsenbauer, C., Kappes, J. C., Galimidi, R. P., ... Hahn, B. H. (2013). Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6626–6633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304288110>

Perez-Zsolt, D., Erkizia, I., Pino, M., García-Gallo, M., Martin, M. T., Benet, S., Chojnacki, J., Fernández-Figueras, M. T., Guerrero, D., Urrea, V., Muñiz-Trabudua, X., Kremer, L., Martinez-Picado, J., & Izquierdo-Useros, N. (2019). Anti-Siglec-1 antibodies block Ebola viral uptake and decrease cytoplasmic viral entry. *Nature Microbiology*, 4(9), 1558–1570. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0453-2>

- Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D. H., Petrosillo, N., Castelli, F., Storgaard, M., Al Khalili, S., & Simonsen, L. (2020). Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(9), e238–e244. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9)
- Pinto, D., Park, Y.-J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., Peter, A., Guarino, B., Spreafico, R., Cameroni, E., Case, J. B., Chen, R. E., Havenar-Daughton, C., Snell, G., Telenti, A., ... Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, 583(7815), 290–295. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>
- Pulvertaft, J. V. (1965). A study of malignant tumours in nigeria by short-term tissue culture. *Journal of Clinical Pathology*, 18(3), 261–273. <https://doi.org/10.1136/jcp.18.3.261>
- Rabi, F. A., Al Zoubi, M. S., Kasasbeh, G. A., Salameh, D. M., & Al-Nasser, A. D. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
- Rahimi, N. (2020). C-type Lectin CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN: Cell Adhesion Molecules Turned to Pathogen Recognition Receptors. *Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biology10010001>
- Ramírez Hernández, E., Hernández-Zimbrón, L. F., Martínez Zúñiga, N., Leal-García, J. J., Ignacio Hernández, V., Ucharima-Corona, L. E., Pérez Campos, E., & Zenteno, E. (2021). The Role of the SARS-CoV-2 S-Protein Glycosylation in the Interaction of SARS-CoV-2/ACE2 and Immunological Responses. *Viral Immunology*, 34(3), 165–173. <https://doi.org/10.1089/vim.2020.0174>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Reina, J., & Fraile-Ribot, P. (2021). [Impact of spike genetic variants in vaccines against SARS-CoV-2]. *Vacunas*, 22(2), 59–61. <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2021.04.001>
- Relloso, M., Puig-Kröger, A., Pello, O. M., Rodríguez-Fernández, J. L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M. A., Sánchez-Mateos, P., & Corbí, A. L. (2002). DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- β , and Anti-Inflammatory Agents. *The Journal of Immunology*, 168(6), 2634 LP – 2643. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2634>

- Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., LeibundGut-Landmann, S., & Sousa, C. R. e. (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature Immunology*, 7(12), 1258–1265. <https://doi.org/10.1038/ni1417>
- Robson, B. (2020). Bioinformatics studies on a function of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein as the binding of host sialic acid glycans. *Computers in Biology and Medicine*, 122, 103849. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103849>
- Rouse, B. T., & Sehrawat, S. (2010). Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 514–526. <https://doi.org/10.1038/nri2802>
- Sariol, A., & Perlman, S. (2020). Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity*, 53(2), 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.005>
- Schneider, U., Schwenk, H. U., & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5), 621–626. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*, 16(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Shi, Z., & Wang, L.-F. (2017). Evolution of SARS Coronavirus and the Relevance of Modern Molecular Epidemiology. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (pp. 601–619). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00026-3>
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Lee, B., Pöhlmann, S., Trowsdale, J., Doms, R. W., & Coleman, N. (2001). Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *The Journal of Pathology*, 195(5), 586–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.1026>
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L. J., Doms, R. W., Weissman, D., Coleman, N., & Lee, B. (2002). Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(3), 445–457.
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R–56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>
- Stadlbauer, D., Amanat, F., Chromikova, V., Jiang, K., Strohmeier, S., Arunkumar, G. A., Tan, J., Bhavsar, D., Capuano, C., Kirkpatrick, E., Meade, P., Brito, R. N., Teo, C., McMahon, M., Simon,

V., & Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. *Current Protocols in Microbiology*, 57(1), e100. <https://doi.org/10.1002/cpmc.100>

Stoker, M., & Macpherson, I. A. N. (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and its Derivatives. *Nature*, 203(4952), 1355–1357. <https://doi.org/10.1038/2031355a0>

Sungnak, W., Huang, N., Bécavin, C., Berg, M., Queen, R., Litvinukova, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Sampaziotis, F., Worlock, K. B., Yoshida, M., & Barnes, J. L. (2020). SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine*, 26(5), 681–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>

Suresh, R., Mosser, D. M., Suresh, R., & Mosser, D. M. (2014). *Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology* *Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology*. 284–291. <https://doi.org/10.1152/advan.00058.2013>

Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L. A., Binshtein, E., Zost, S. J., Nargi, R. S., Sutton, R. E., Winkler, E. S., Chen, E. C., Fouch, M. E., Davidson, E., Doranz, B. J., Chen, R. E., Shi, P.-Y., Carnahan, R. H., Thackray, L. B., Diamond, M. S., & Crowe, J. E. J. (2021). Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell*, 184(9), 2316–2331.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.029>

Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., & Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular Signalling*, 22(10), 1397–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.018>

Swärd, P., Edsfeldt, A., Reepalu, A., Jelpsson, L., Rosengren, B. E., & Karlsson, M. K. (2020). Age and sex differences in soluble ACE2 may give insights for COVID-19. *Critical Care*, 24(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02942-2>

Tassaneetrithep, B., Burgess, T. H., Granelli-piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., & Marovich, M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of. 197(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>

Team, E. E. (2020). Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 25(5).

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e>

Thépaut, M., Luczkowiak, J., Vivès, C., Labiod, N., Bally, I., Lasala, F., Grimoire, Y., Fenel, D., Sattin, S., Thielens, N., Schoehn, G., Bernardi, A., Delgado, R., & Fieschi, F. (2021). DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLOS Pathogens*, 17(5), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009576>

Thompson, L. (2013). Inicio de una nueva epidemia, SARS. *Revista Medica Herediana*, 14(2 se-editorial). <https://doi.org/10.20453/rmh.v14i2.753>

Tooze, J., Tooze, S., & Warren, G. (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *European Journal of Cell Biology*, 33(2), 281–293.

Tortorici, M. A., Walls, A. C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., Koerhuis, D., Boons, G.-J., Bosch, B.-J., Rey, F. A., de Groot, R. J., & Veesler, D. (2019). Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(6), 481–489. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0233-y>

Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 155–170). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. H. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nri1182>

van Vliet, S. J., Saeland, E., & van Kooyk, Y. (2008). Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends in Immunology*, 29(2), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.10.010>

Venkatagopalan, P., Daskalova, S. M., Lopez, L. A., Dolezal, K. A., & Hogue, B. G. (2015). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*, 478, 75–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.005>

Vigerust, D. J., & Shepherd, V. L. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*, 15(5), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.03.003>

- Wang, B., Wang, Y., Frabutt, D. A., Zhang, X., Yao, X., Hu, D., Zhang, Z., Liu, C., Zheng, S., Xiang, S.-H., & Zheng, Y.-H. (2017). Mechanistic understanding of N-glycosylation in Ebola virus glycoprotein maturation and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 5860–5870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768168>
- Wang, J., Zhang, Y., Wei, J., Zhang, X., Zhang, B., Zhu, Z., Zou, W., Wang, Y., Mou, Z., Ni, B., & Wu, Y. (2007). Lewis X oligosaccharides targeting to DC-SIGN enhanced antigen-specific immune response. *Immunology*, 121(2), 174–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02554.x>
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Watanabe, Y., Bowden, T. A., Wilson, I. A., & Crispin, M. (2019). Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(10), 1480–1497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.05.012>
- Whitt, M. A. (2010). Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *Journal of Virological Methods*, 169(2), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.006>
- WHO. (2021). *Weekly epidemiological update on COVID-19 - 26 October 2021*. Weekly Epidemiological Update on COVID-19. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---26-october-2021>
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y. c, & Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*, 11(1), 223–232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90333-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90333-6)
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Yang, Z., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W., Schwartz, O., Subbarao, K., & Nabel, G. J. (2004). *pH-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Is Mediated by the Spike Glycoprotein and Enhanced by Dendritic Cell Transfer through DC-SIGN*. 78(11), 5642–5650. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5642>
- Yasumura, Y., & Kawakita, Y. (1963). Studies on SV40 in tissue culture-preliminary step for cancer

research in vitro. *Nihon Rinsho*, 21, 1201–1215.

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>

Zhao, X., Chen, H., & Wang, H. (2021). Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 53. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.629873>

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>