



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Postgrado en Biología Celular
Laboratorio de Enzimología de Parásitos

**Desarrollo de un inmunoensayo de captura para la detección
de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2 en muestras
serológicas**

www.bdigital.ula.ve

*Tesis de grado como requisito para optar al título de Magister Scientiae en
Biología Celular*

Autora: Lic. Rocío del Valle Rondón Mercado

Tutor: Dr. Juan Luis Concepción Curbelo

Mérida, enero de 2024

Reconocimiento

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

La gratitud abre la puerta al poder, a la sabiduría y a la creatividad del Universo. Esta investigación, no hubiese podido llevarse a cabo sin el apoyo, compromiso, esmero, dedicación, paciencia y resiliencia de todas aquellas personas e instituciones que realizaron aportes significativos en el financiamiento, desarrollo intelectual y experimental del mismo. **A Gabriela Jiménez (Myncyt) y al presidente del CODECYT Juan Blanco**, por confiar en el valor intelectual y compromiso de nuestro equipo de trabajo para ejecutar proyectos tan pertinentes para el país en el área de ciencia y tecnología, promoviendo y financiando esta investigación.

A la Universidad de los Andes y al Postgrado en Biología Celular, por mantenerse en pie a pesar de las adversidades y seguir formando profesionales que contribuyen al desarrollo del país, especialmente al profesor **Wilfredo Quiñones** (gran profesional y amigo). **A Héctor Acosta y Luz Castro**, por asumir las riendas de la coordinación de un postgrado que se niega a morir.

Al Dr. Goyo Rivas (IAHULA), al Dr. Gregorio Sánchez (IVIC), Dra. Esperanza Briceño (INHRR) y a FUNDACITE-Mérida, por la donación de los sueros que fueron empleados en este estudio.

A Dios, por su inmensa fidelidad, por no darme la espalda, ni rechazarme aún cuando falle. En ti estoy segura por toda la eternidad.

A mis Padres, Arminda y Jairo; por su infinito amor, apoyo y comprensión. Por hacerme una mujer de bien, cobijarme siempre y alentarme a seguir caminando en contra de toda tempestad.

A mi hijo Emiliano, por ser mi motorcito de aire, mi inspiración, mi alegría, mi calma y mi seguridad. Tus risas y experimentos llenan de goce mi alma.

A mi abuelita Eloina y a mis hermanas Rocire y Rocimar por tanto amor, ayuda e inspiración.

A mi sobrino sebastian, un ser especial que con su amor y especial sensibilidad me enamora cada día. Serás un hombre grande de esos que tanto necesita el mundo.

A Mary Carmen, compañera, amiga y hermana; quién con su ayuda desmedida me apoya de manera especial en mi formación como científico, como madre y mujer de bien. Tu paciencia, trabajo experimental e intelectual contribuyó de manera invaluable en la realización de este trabajo. Gracias infinitas para ti.

A Juan Luis Concepción, por aferrarse a la vida librando siempre hasta las más difíciles batallas. Por ofrecerme la valiosa oportunidad de participar en este proyecto que sin duda alguna representó un inmenso valuarte en mi formación como científico. Por creer en mí pese a las complicaciones y por alentarme

siempre. Por su amor inagotable y compromiso desmedido con el desarrollo de este país.

A Ana Cáceres, una pieza clave en el desarrollo de esta investigación. Por su paciencia e inmensa contribución intelectual y experimental. Por ser ejemplo de inspiración para muchas mujeres que alzan su voz desde la Ciencia, rompiendo los obstáculos, estereotipos, prejuicios y barreras estructurales en este campo duro y a la vez maravilloso.

A todo el equipo del Laboratorio de Enzimología de Parásitos y DIAGEN, por ser parte vital en el trabajo de unos cuantos años. Este trabajo es sin duda el producto mancomunado de todos (Betty, Eli, Marirene, Ana, Juan y Mary y Wilfredo).

A Diego, por ser mi maestro, mi compañero y amigo, sin tu ayuda experimental, intelectual y emocional no hubiese sido posible.

A Elizabeth, por toda su colaboración e infinita paciencia. Por su asesoría y ayuda experimental. Por sus risas, regaños pertinentes y por impulsarme a seguir creciendo.

A Jesús, Janina, Savanna, Paco y Frutis; por abrirme las puertas de su hogar, alimentarme, apoyarme y brindarme siempre una mano a amiga hasta en los momentos más adversos. Sin ustedes este proyecto así como muchos otros de mi vida no fuesen posibles.

A Roberto Rouse; compañero y amigo leal. Por brindarme siempre la mano en los momentos difíciles, por sus bromas siempre prestas a sacarme hasta la más espontánea de mis carcajadas. Gracial mil Micho.!

A los pacientes COVID-19, por representar el corazón y fuente de inspiración para la realización de esta investigación. El fruto del producto desarrollado va dedicado en especial a aquellos que no lograron librar la batalla contra la enfermedad. A Narda Aguilar, en donde quiera que estés, tu último soplo y el de muchos más echaron a andar esta investigación. Tu hija no tuvo descanso.

A todos los que por razones de cansancio y tiempo no nombro pero que de una u otra forma estuvieron siempre siempre apoyandome, mil gracias!

RESUMEN

Numerosos estudios han demostrado que la detección cuantitativa de la proteína N sérica del SARS-CoV-2 en pacientes positivos para COVID-19 tiene un alto valor diagnóstico antes de que aparezcan los anticuerpos y luego de la migración temprana del virus desde la cavidad nasofaríngea, acortando así el periodo ventana de la enfermedad. En este estudio se desarrolló una prueba ELISA tipo sándwich basada en anticuerpos policlonales contra los dominios N1 y N2 de la proteína de la nucleocápside. Las proteínas recombinantes producidas en *E. coli*, fueron usadas en la producción de anticuerpos de captura y detección en cabra y conejo. El pretratamiento fisicoquímico de las muestras séricas con SDS-Tween 20 a 56°C durante 5 minutos permitió incrementar la sensibilidad analítica del ELISA siendo los parámetros de sensibilidad y especificidad, así como el valor de cut-off más alto calculados mediante análisis de curva ROC. Los porcentajes de especificidad y sensibilidad del sistema ELISA- α -N2/N/ α -N obtenidos luego de someter a prueba 36 sueros negativos y 21 sueros positivos previamente clasificados por la prueba estándar de oro RT-PCR en tiempo real, así como por ELISA indirecto para la detección de anticuerpos (DIAGEN) fueron de 97,37% y 59,09% respectivamente. No obstante, el 14% de los sueros negativos (no pre-pandémicos) evaluados fueron detectados como positivos sugiriendo la capacidad que tiene el sistema de detectar pacientes durante las primeras horas de la infección, con una sensibilidad diagnóstica similar a aquellos que emplean anticuerpos monoclonales, además de su producción sencilla y económica también es menos vulnerable a las mutaciones puntuales en el antígeno N.

ABREVIATURAS

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2

Ala: Alanina

AMP: Adenosín monofosfato cíclico

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

ARN+: ARN monocatenario de sentido positivo

ARNdb: ARN doble banda

ARNg: Ácido ribonucleico genómico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNm-sg: Ácido ribonucleico mensajero subgenómico

ARNsb: ARN simple banda

Asn: Asparagina

AUC: Área bajo la curva

BSA: Albumina de suero bovino

CaCl₂: Cloruro de calcio

CLIA: Ensayo de quimioluminiscencia

CoV: Coronavirus

COVID-19: Coronavirus 2019

CTSB: Cistein proteasa catepsina B

CTSL: Cistein proteasa catepsina L

DEAE: Dietilaminoetil-celulosa

DIAGEN: Diagnostico y Genética

DO: Densidad óptica

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

EUA: Autorización de uso de Emergencia

FA: Fosfatasa alcalina

FDA: Federación de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FN: Falso negativo

FP: Falso positivo

www.bdigital.ula.ve

Gly: Glicina
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno
HCl: Ácido clorhídrico
HE: Hemaglutinina esterasa
HRP: Peroxidasa de rábano picante
HVR: Región hipervariable
IAHULA: Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes
IDR: Regiones intrínsecamente desordenadas
iFLASH: Analizador de inmunoquimioluminiscencia
IgG: Inmunoglobulina del isotipo G
IgM: Inmunoglobulina del isotipo M
IMAC: Cromatografía de afinidad a metales
INHRR: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel
IPTG: Isopropil β-D-1- tiogalactosilpiranosido
IRF3: Factor regulador de interferón 3
IVIC: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
K₂HPO₄: Fosfato de potasio dibásico
Kb: Kilobases
KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico
kV: Kilovoltios
LB: Medio Luria Bertani
LEP: Laboratorio de Enzimología de Parásitos
LF-CGIA: Inmunocromatografía de flujo lateral
LKR: Región enlazadora flexible
Lys: Lisina
M: Molar
m7GpppA: 7 metil-guanosina-adenosinatrifosfato
masp2: Serin proteasa 2
MBL: Lectina de unión a manano
MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio
MF-IFA: Inmunofluorescencia de microfluidos

MgCl₂: Cloruro de Magnesio
mM: Milimolar
µg: Microgramo
N: Normal
NaCl: Cloruro de sodio
N-CTD: Dominio C terminal
ng: Nanogramos
nm: Nanómetro
N-NTD: Dominio N terminal
Nsp: Nucleoproteína
NSP: Proteína no estructural
nts: Nucleótidos
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPS: Organización Panamericana de la Salud
OR: Orgánulos de replicación
ORF: Marco abierto de lectura
p/v: Peso/volumen
PBS: tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pg: Picogramos
pH: Potencial hidrógeno
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA: Persulfato de amonio
RE: Retículo endoplasmático
RIG-I: Gen I inducido por ácido retinoico
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RNP: Ribonucleoproteína
ROC: Característica operativa del receptor
rpm: Revoluciones por minuto
RTC: Complejo de replicación y transcripción

www.bdigital.ula.ve

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo

SARS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo

SARS-CoV-2: Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TEMED: Tetrametiletilenodamina

Thr: Treonina

TMB: 3,3',5,5' Tetrametilbencidina

TMPRSS2: Serin proteasa transmembranal 2

TRIM25: Proteína 25 de motivo tripartito

TRS: Secuencia reguladora de la transcripción

Tyr: Tirosina

UTR: Región no traducida

VN: Verdadero negativo

VP: Verdadero positivo

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

ZAP: Dedos de zinc

www.bdigital.ula.ve

CONTENIDO

1. MARCO TEORICO	16
1.1. SARS-CoV-2	19
1.2. Organización del genoma	22
1.3. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2	25
1.4. Proteína de la nucleocapside del SARS-CoV-2	30
1.4.1. Estructura	31
1.4.2. Función de la Proteína N en el ciclo replicativo del SARS-CoV-2	40
1.5. Pruebas diagnósticas para la detección de COVID-19	41
1.5.1. Pruebas diagnóstico basadas en la proteína N	44
2. JUSTIFICACIÓN	48
3. HIPÓTESIS	50
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo General	51
4.2. Objetivos Específicos	51
5. MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.1. Material Biológico	53
5.2. Predicción de epítopes lineales y estructurales de los dominios de la proteína N	53
5.3. Clonaje de las secuencias que codifican para los dominios N1 y N2 de la	54
proteína N del SARS-CoV-2	54
5.3.1. Diseño de Oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos génicos	54
N1 y N2	54
5.3.2. Condiciones de amplificación de los fragmentos génicos N1 y N2	55
5.3.3. Clonamiento de los fragmentos génicos amplificados de N1 y N2 en el vector	55
pGEM-T easy	55
5.3.4. Obtención de transformantes pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2	56
5.3.5. Selección de Transformantes pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2:	58
PCR de Colonias	58
5.3.6. Secuenciamiento de las construcciones pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T	58
Easy-N2	58
5.3.7. Subclonamiento de los fragmentos N1 y N2 en el Vector de expresión	59
pET28a	59
5.4. Expresión y purificación de los dominios NTD- N1 y CTD -N2	61
5.4.1. Verificación de la expresión de los antígenos recombinantes N1 y N2	61
5.4.2. Cultivo de bacterias y ruptura celular	61
5.4.3. Purificación del dominio N1	62
5.4.4. Purificación del dominio N2	62
5.4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	63
5.4.6. Determinación de la Concentración de Proteínas	64

5.5. Producción y purificación de anticuerpos policlonales contra los antígenos recombinantes.....	64
5.5.1. Producción y titulación de anticuerpos policlonales α -N1.....	64
5.5.2. Producción de anticuerpos policlonales α -N2	65
5.5.3. Purificación de Anticuerpos	66
5.6. Ensayos de ELISA.....	66
5.6.1. Sueros.....	66
5.6.2. Detección de IgG e IgM α -N, en sueros de pacientes positivos y negativos para COVID-19.....	68
5.7. Determinación de la combinación de anticuerpos a ser empleada en el desarrollo de un sistema de inmunocaptura de la proteína N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN).....	73
5.8. Curva de calibración para la cuantificación de la proteína N con el sistema de inmunocaptura de antígeno ELISA sándwich indirecto α -N2/N/ α -N.....	74
5.9. Determinación del efecto opsonizante de los anticuerpos IgG α -N de pacientes COVID-19 positivos sobre la proteína N recombinante	75
5.10. Determinación de la concentración de N en muestras de sueros de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivas para SARS-CoV-2	75
5.11. Evaluación de la sensibilidad y la especificidad del sistema de inmunocaptura de la proteína de N en sueros basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN).....	76
5.12. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N en los sueros en base al ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) modificando la composición del diluyente de muestra.	76
6. RESULTADOS	77
6.1. Predicción de epítopes lineales y estructurales de los dominios de la proteína N 77	
6.2. Clonaje de las secuencias que codifican para los dominios N1 y N2 de la proteína N del SARS-CoV-2.....	78
6.3. Expresión y purificación de los dominios NTD-N1 y CTD-N2.....	81
6.3.1. Sobreexpresión de los fragmentos polipeptídicos N1 y N2	81
6.3.2. Purificación del fragmento N1 y N2.....	82
6.3.3. Purificación del fragmento N2.....	83
6.3.4. Purificación de anticuerpos α -N1 y α -N2.....	84
6.4. Determinación de la inmunoreactividad de los polipéptidos N, N1 y N2 frente a sueros de pacientes IgG o IgM positivos para SARS-CoV-2	87
6.4.1. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los polipéptidos N, N1 y N2 mediante análisis de Curvas ROC	88
6.5. Obtención de la combinación de anticuerpos a ser empleada para el desarrollo de un sistema de inmunocaptura de la proteína N en muestras de suero basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN).....	90

6.6.	Curva de calibración de captura de la proteína N por el sistema de ELISA sándwich indirecto α -N2/proteína N/ α -N.....	92
6.7.	Determinación del efecto opsonizante de los anticuerpos IgG α -N de pacientes COVID-19 positivos sobre la proteína N recombinante	94
6.8.	Determinación de la concentración de N en muestras de suero de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivas para SARS-CoV-2.....	95
6.9.	Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN).....	97
6.10.	Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N en muestras de sueros basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) modificando la composición del diluyente de muestra.	99
7.	DISCUSIÓN	101
8.	PERSPECTIVAS	119
9.	BIBLIOGRAFÍA	121

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis filogenético del SARS-CoV-2.....	21
Figura 2. Organización estructural del genoma del SARS-CoV-2.....	24
Figura 3. Ciclo de Infección por SARS-CoV-2.....	27
Figura 4. Organización estructural de la proteína N del SARS-CoV-2.....	32
Figura 5. Descripción estructural del N-NTD del SARS-CoV-2.....	34
Figura 6. Comparación del N-NTD del SARS-CoV-2 con las estructuras del N-NTD de tres coronavirus relacionados.....	36
Figura 7. Estructura del N-CTD del SARS -CoV-2 N.....	38
Figura 8. Comparación estructural entre el N-CTD del SARS-CoV-2 y el N-CTD de otros Coronavirus.....	39
Figura 9. Representación esquemática del nivel analítico que ofrecen las pruebas de detección de ARN viral, anticuerpos IgM e IgG, antígeno N nasofaríngeo y serico en el diagnostico COVID-19 a lo largo de la cinética de infección por SARS-CoV 2.....	43
Figura 10. Mapa genético del vector pGEM®-T Easy	56
Figura 11. Mapa genético del vector de expresión pET28a	60
Figura 12. Diagrama del ordenamiento de los datos obtenidos de la evaluación con el test de referencia y el test de prueba.....	70
Figura 13. Representación gráfica de tres curvas ROC.....	72
Figura 14. Representación esquemática de las regiones polipeptídicas N1 y N2 de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2.....	78
Figura 15. Evaluación por PCR de colonias de los transformantes positivos para las construcciones pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2.....	79
Figura 16. Digestión doble de las construcciones pGEM®-T Easy-N1, pGEM®-T Easy-N2 y el vector de expresión pET28a.	80
Figura 17. Evaluación por PCR de colonias de los transformantes positivos para las construcciones pET28a-N1 y pET28a-N2.....	80
Figura 18. Cinética de inducción con IPTG de las proteínas recombinantes N1 y N2 en cultivos de colonias BL21(DE3)-pET28a-N1 y BL21(DE3)-pET28a-N2.....	82
Figura 19. Purificación del antígeno N1 mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) empleando un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM.....	83
Figura 20. Purificación del antígeno N2 mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) empleando un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM.....	84
Figura 21. Purificación de IgG α -N1 a partir de suero inmune de conejo empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad)	85
Figura 22. Purificación de IgG α -N2 a partir de suero inmune de cabra empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad)..	87
Figura 23. Determinación de la inmunoreactividad de los polipéptidos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para COVID-19 mediante ELISA indirecto (GAMÆlisa® de DIAGEN). S+ : sueros positivos, S-: sueros negativos.	88

Figura 24. Curvas ROC para los antígenos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para SARS-CoV-2 evaluados con la herramienta de diagnóstico GAM/Elisa® de DIAGEN.....	90
Figura 25. Inmuncaptura de N libre en sueros IgM positivos y negativos para COVID-19 a través de ELISA sándwich indirecto empleando diferentes combinaciones de anticuerpo de captura/anticuerpo primario.....	92
Figura 26. Representación esquemática del sistema ELISA tipo sándwich α -N2/N/ α -N...	92
Figura 27. Curva de calibración de N para el sistema de inmuncaptura de antígeno N del SARS-CoV-2 ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N.....	93
Figura 28. Curva estándar de la función opsonizante de los IgG α -N presentes en sueros COVID-19 positivos (línea negra) y negativos (línea azul) sobre la proteína N.....	95
Figura 29. Determinación de la Concentración de N libre (no opsonizada) en el suero de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivos (A) y negativos para SARS-CoV-2 (B)..	96
Figura 30. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmuncaptura de proteína de N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) mediante análisis de curvas ROC. S-: sueros negativos y S+: sueros positivos para IgG, IgM e IgG respectivamente	98
Figura 31. Análisis de curva ROC para la captura de la proteína N en muestras de suero de pacientes con SARS-COV-2, IgM/IgG positivas empleando dos combinaciones de surfactantes.	100

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Número de sueros positivos y negativos para SARS-CoV-2 empleados por ensayo.....	67
Tabla II. Tabla de purificación de de IgG α -N1 a partir de suero inmune de conejo empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad).....	86
Tabla III. Tabla de purificación de de IgG α -N2 a partir de suero inmune de cabra empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad).....	86
Tabla IV. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para los antígenos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para SARS-CoV-2.	90
Tabla V. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para el sistema de inmunocaptura de antígeno N en sueros positivos para SARS-CoV-2 con el ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N, empleando sueros IgM, IgG e IgM/IgG como fuente de antígeno N.	99
Tabla VI. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para el sistema de inmunocaptura de antígeno N del SARS-CoV-2 ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N empleando sueros IgM/IgG como fuente de antígeno N. ..	101

www.bdigital.ula.ve

1. MARCO TEORICO

A principios de diciembre de 2019 en la ciudad central de China, Wuhan (capital de la provincia de Hubei), fue notificado un caso de un paciente adulto con un cuadro de neumonía atípica de etiología desconocida vinculado al mercado de mariscos de Huanan, la cual mostraba similitudes con la neumonía asociada al Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). No obstante, días después fue reportado el primer paciente con sintomatología asociada, que no poseía ningún vínculo epidemiológico con el mercado de mariscos. Ya para el 2 de enero de 2020 se había informado de un grupo de casos de neumonía familiar correspondientes a 41 pacientes admitidos en hospitales, de los cuales seis fallecieron el 22 de enero (Huang y col., 2020; Wang y col., 2020; Wu y col., 2023).

Ya para el 5 de enero del 2020, gracias a los análisis de secuenciación masiva de muestras líquidas del tracto respiratorio inferior, provenientes del lavado bronquio alveolar de los pacientes hospitalizados, el Instituto de Virología de Wuhan, los Centros Chinos para el Control y la Prevención de Enfermedades y el Centro Clínico de Salud Pública de Shanghai de la Universidad de Fudan, lograron completar y depositar en la base de datos de GenBank la secuencia del genoma del agente causante de la neumonía asiática, la cual presentó más del 75 % de homología con el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) (Wu y col, 2020).

El 7 de enero del 2020 se dio a conocer que el nuevo coronavirus causante de esta misteriosa neumonía infecta a las células humanas a través del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y fue denominado por el Comité internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) (Zhou y col., 2020; Wu y col., 2020; ICTV, 2020); posteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la designó enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (Wu y col., 2020).

Debido al movimiento de personas entre provincias cercanas los centros clínicos de Wuhan recibieron centenares de casos de COVID-19, motivo por el cual el 23 de enero de 2020 fue decretada en cuarentena a fin de detener la cadena de transmisión persona a persona. Sin embargo, la rápida diseminación de

la infección por SARS-CoV-2 hacia otras ciudades y países vecinos provocó una pandemia mundial (Huang y col., 2020; Khan y col., 2020).

En Venezuela, fue publicado en Gaceta Oficial Extraordinaria N° 6519, en el Decreto N° 4.160 de la Presidencia de la República, un estado de alarma dirigido a todo el país sobre el manejo y prevención del COVID-19, con la finalidad de atenuar y erradicar los riesgos de epidemia asociados a la infección a manera de garantizar la pertinente y eficaz atención de los casos que se presentaran. Adicionalmente, se creó la Comisión Presidencial para la Prevención y Control de la enfermedad (INAC, 2020). Dichas medidas, fueron adoptadas por el gobierno nacional antes de que se detectara y anunciara el primer caso en el país mostrando así, una preparación previa debido a la veloz propagación de la infección. El 13 de marzo de 2020, la vicepresidenta de la República confirmó dos casos de COVID-19 en Venezuela e informó la suspensión de actividades académicas a nivel nacional a partir del 16 de marzo de 2020 (Hernández y col, 2020).

Durante los meses siguientes al inicio de la pandemia en Venezuela las cifras de infectados y fallecidos continuaban incrementándose, así como los casos de pacientes recuperados. El Gobierno implementó un esquema conocido como el método 7+7, que consistió en 7 días de trabajo continuos en la semana de flexibilización y 7 días de cuarentena radical. En ambas semanas se clasificó la apertura de diversos sectores económicos del país que funcionaron bajo un horario estricto y medidas epidemiológicas de seguridad.

Hasta el 2 de mayo de 2021, el sitio web de referencia Worldometer proporcionó estimaciones de más de 153,37 millones de infecciones por COVID-19, con 3,21 millones de muertes en 219 países y territorios (Brant y col., 2021) que incrementaron exponencialmente hasta el 2022 y disminuyeron paulatinamente hacia el 2023, siendo reportados a comienzos de abril del mismo año un número aproximado de 2,8 millones de casos nuevos y 17.000 muertes correspondientes a una disminución del 30% en comparación con 28 días anteriores. Para el 30 de abril de 2023 se habían reducido hasta 765 millones de

casos confirmados y 6,9 millones de muertes en todo el mundo (Schkolkmann y May, 2023).

En vista de la significativa reducción de casos, el 5 de mayo de 2023, el director general de la OMS, Dr. Tedros Adhanom Gebreyesus, declaró el fin de la emergencia de salud pública por COVID-19 durante la celebración de la decimoquinta reunión del Comité de Emergencias sobre el COVID-19, advirtiendo de manera imperativa que el alza de la cuarentena mundial no significa que el COVID-19 haya dejado de ser considerado una amenaza para la salud mundial, manteniéndose como una prioridad de salud pública global (OPS, 2023). Considerando que debido a la reducción en la realización de pruebas diagnósticas y a la demora en la notificación de casos de muchos países, los reportes actuales son subestimaciones del verdadero número de infecciones y reinfecciones a nivel mundial, tal y como demuestran las encuestas de prevalencia que suman 772 millones de casos confirmados que incluyen 7 millones de muertes para el 8 de noviembre del 2023 (OPS, 2023; WHO, 2023). Hasta el 7 de mayo de 2023 en Venezuela se registró la cifra de 552.695 casos confirmados, 302 casos activos, 5.856 fallecidos y 546.537 pacientes recuperados (Worldometers, 2023). Con estos datos el gobierno nacional anunció el cierre del balance estadístico de COVID-19.

El rápido desarrollo y la autorización de uso de emergencia (EUA) por parte de la Federación de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) de varias vacunas de plataformas novedosas permitió disminuir considerablemente las tasas globales de morbilidad y mortalidad. Desde entonces y hasta el 8 de noviembre del 2023 se han administrado más de 13.534 millones de dosis de vacunas, equivalentes al 70,8 % de la población mundial, de las cuales 5.500 millones se encuentran distribuidas entre personas que han recibido una sola dosis y 8.000 millones en aquellas que han recibido las dosis completas (WHO, 2023; Schkolkmann y May, 2023).

Los esquemas de vacunación han brindado protección a las personas infectadas del desarrollo de un cuadro clínico severo que pudiese requerir de manejo hospitalario y progresar hacia la muerte. En este sentido, diversos

estudios han demostrado que las vacunas lograron prevenir entre el 40% y el 65% de casos sintomáticos. Sin embargo, la efectividad de las vacunas se redujo debido a las mutaciones en la proteína de la espiga (S), lo cual generó variantes del SARS-CoV-2 más virulentas (cepa Delta) y más transmisibles (cepa Omicron) (Andrews y col, 2022; Accorsi y col, 2022). Por otra parte, la implementación de programas de vacunación con refuerzos distanciados por períodos de tiempo relativamente cortos, ha planteado interrogantes acerca de sus implicaciones inmunológicas a largo plazo y ha promovido esfuerzos en cuanto al desarrollo de vacunas con efectos protectores más potentes y duraderos (El-Menyar y col, 2022; Fiolet y col, 2022).

El impacto social y económico global causado por la pandemia del SARS-CoV-2, ha marcado la tercera introducción zoonótica de un coronavirus altamente patógeno en la población humana. A pesar que las epidemias preliminares por coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV (Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio), crearon conciencia sobre la necesidad de contar con protocolos de intervenciones terapéuticas y preventivas. Hasta el momento no se dispone de tratamientos con eficacia probada (Lim, 2023) y la adquisición de pruebas de diagnóstico en nuestro país es limitada. El desarrollo de pruebas para diagnosticar la enfermedad, se basa en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que operan durante las infecciones por coronavirus, lo cual demuestra la importancia de estudiar e identificar blancos virales y del huésped que son esenciales para el establecimiento y progresión de la enfermedad. El esclarecimiento de las similitudes y diferencias entre otros coronavirus y el SARS-CoV-2 brindará la preparación para impulsar estrategias que permitan combatir infecciones futuras por coronavirus.

1.1. SARS-CoV-2

Análisis filogenéticos basados en la secuenciación del genoma posicionan al nuevo coronavirus SARS-CoV-2 como un miembro del orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae* y subfamilia *Orthocoronavirinae*, género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus* dentro del reino *Riboviria* (Cui y col., 2019) (Figura 1).

En general, los coronavirus (CoV) son virus de ARN monocatenario de sentido positivo (ARN+), envueltos y no segmentados, que adquieren una morfología esférica, ovalada o pleomórfica, cuyo diámetro oscila entre 60 y 140 nm y su superficie recrea la apariencia de una corona solar, gracias a la forma en la que se disponen las regiones extra membranales de la proteína espiga del virión (S), siendo esta característica la responsable del nombre de la familia *Coronaviridae*. Adicionalmente, se caracterizan por mostrar una alta susceptibilidad a la mutación y a la recombinación genética lo cual se traduce en su amplia diversidad ecológica, lográndose adaptar a una amplia gama de huéspedes desde aves hasta mamíferos (Cui y col., 2019; Shreen y col., 2020, Kadam y col., 2021).

La mayoría de los coronavirus descritos hasta la fecha son responsables de producir enfermedades respiratorias y entéricas leves en animales domésticos. Sin embargo, desde principios del siglo XXI han encontrado un lugar importante en el listado de patógenos que amenazan gravemente a la población humana, por lo que han sido fuente de arduas investigaciones (Corman y col., 2019). Hasta la fecha se han descrito siete coronavirus que infectan humanos, cuatro de ellos (229E, OC43, NL63 y HKU1) responsables de ocasionar al año al menos 30% de las infecciones leves asociadas al tracto respiratorio superior, tales como la gripe común (Fung y Liu, 2019). Mientras que, los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 pueden causar en muchos de los casos enfermedades respiratorias graves, derivando en tasas de mortalidad bastante altas. Por ejemplo, entre 2002 y 2003 fueron notificados 8.906 casos en todo el mundo de SARS-CoV de los cuales 774 habrían muerto, con una tasa de letalidad de aproximadamente el 10%. Por otra parte, 17 años más tarde (finales 2012), 2500 casos y más de 800 muertes asociadas con el MERS-CoV fueron informados en todo el mundo, siendo estas cifras asociadas a una tasa de letalidad del 34% (WHO, 2020). Y, recientemente a finales de diciembre de 2019 el SARS-CoV-2 fue el responsable del estado de pandemia mundial que ocasionó más de 6 millones de muertes y más de 676 millones de casos confirmados (JHU, 2024).

El SARS-CoV-2, comparte una organización genómica bastante conservada con los miembros pertenecientes al género *Betacoronavirus*, con genes que codifican para proteínas replicasas que anteceden a los genes involucrados en la expresión de proteínas estructurales y accesorias respectivamente, con estos últimos intercalados entre los genes estructurales. Además, de que la expresión genética es llevada a cabo por una combinación de mecanismos bastante distintiva, el cambio de marco ribosómico y expresión mediada por la síntesis previa de un subconjunto de ARNs mensajeros subgenómicos anidados (una sinapomorfía de todos los miembros del orden *Nidovirales*) (Fehr y Perlman, 2015; Wu y col., 2020, Kadam y col., 2021; Brant y col., 2021; Kelly y Woodside, 2021).

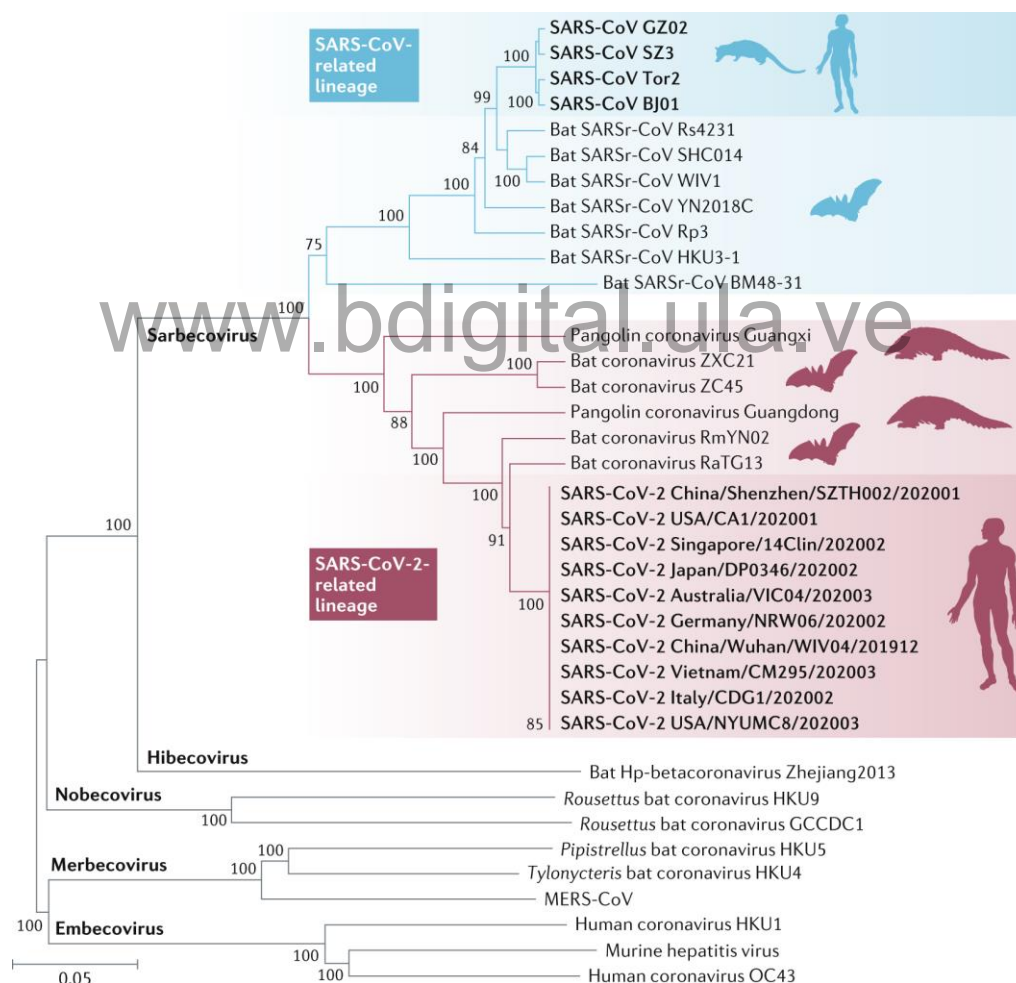


Figura 1. Análisis filogenético del SARS-CoV-2. El árbol fue realizado mediante el método de neighbour joining empleando el programa MEGA 6 con valores Bootstrap de 1000 árboles. Tomado de Hu y col., (2021).

Por otra parte, el posicionamiento del SARS-CoV-2 dentro del subgénero *Sarbecovirus* del género *Betacoronavirus*, lo relaciona con los coronavirus de murciélago ZXC₂₁, ZC45, RmyNO₂ y RATG₁₃, con quien comparte un gran porcentaje de homología de secuencia, así como con el coronavirus del pangolín de Guandong con quien comparte un dominio conservado de unión al receptor de la proteína S. Esta proximidad genética que exhibe el nuevo coronavirus humano con el coronavirus de murciélago plantea un origen en murciélago y la subsecuente transmisión zoonótica a los humanos, empleando como huésped intermediario al pangolín malayo. Pese a las similitudes con estos y otros CoV, la presencia de un sitio polibásico de escisión para furina en el límite de las subunidades S1 Y S2 de la proteína S, ausente en coronavirus de murciélago y pangolines, parece sugerir que esta nueva adquisición se debe a eventos de selección natural que pudieron operar en otro huésped intermediario diferente al pangolín o incluso luego de la transferencia zoonótica en humanos (Hu y col, 2021). Otra hipótesis es que quizá sea el producto de modificaciones realizadas mediante ingeniería genética sobre la secuencia del SARS-CoV en un laboratorio de bioseguridad P4 para ser usado como agente infeccioso en una guerra biológica premeditada ya que, el huésped intermediario aún no ha sido encontrado y probablemente no se llegue a encontrar puesto que, en la adquisición de este tipo de cambios operan mecanismos de selección natural que involucran periodos de tiempo prolongados.

1.2. Organización del genoma

Al igual que otros Coronavirus que infectan humanos (HCoV), el SARS-CoV-2 posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (ARN+) con una longitud aproximada de 30 kilobases (Kb), que lo posiciona como el virus de ARN con el genoma más grande descrito hasta la fecha (Wu y col., 2020; Kelly y Woodside, 2021; Brant y col., 2021).

Su estructura topológica es similar al del ARN mensajero (ARNm) de los eucariotas que se caracteriza por poseer en el extremo terminal 5' una estructura de caperuza m7GpppA (7-metil-guanosina-adenosinatrifosfato) seguida de una secuencia líder de 70 nucleótidos (Viswanathan y col., 2020) y una cola poli-A de

aproximadamente 60 nucleótidos (nts) en el extremo 3'. Esta conformación le confiere un alto grado de estabilidad y le permite inicialmente evadir su digestión por exoribonucleasa (Haniff y col., 2020). Adicionalmente, las regiones codificantes se encuentran flanqueadas por regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' de 265 y 337 nucleótidos respectivamente (Huston y col., 2020).

La UTR 5' que presenta una longitud intermedia en comparación a la de otros coronavirus que infectan humanos como el hCoV-OC43 (209 nts) y hCoV-NL63 (286 nts) contiene varios elementos reguladores en cis de la traducción viral, la síntesis del subgenoma y su empaquetado final en partículas virales, de los cuales el más importante es la secuencia líder (Figura 2). Dicha secuencia posee una arquitectura bastante peculiar en los *Coronaviridae*, albergando en su interior un fragmento integrado por 7 a 10 bases que actúa como una secuencia reguladora central de la transcripción, denominado TRS-L. Esta secuencia particular, junto a otro conjunto de secuencias complementarias a la suya (TRS-B), que se encuentran flanqueando el extremo 5' de cada uno de los ORF actúan regulando el proceso de transcripción discontinua de las plantillas de sentido negativo de los ARNm-sg (Digard y col., 2020; Simmonds, 2020).

Por otro lado, la UTR 3' alberga al sitio de unión del complejo de replicación y transcripción (RTC) involucrado en los procesos de replicación y transcripción del ARN (-) que sirve como plantilla para la síntesis del genoma viral de sentido positivo. De manera similar que la UTR 5', esta región no traducida contiene elementos reguladores que actúan en cis, un bucle de tallo abultado (BSL) y un pseudonudo, esenciales también para la transcripción y replicación del genoma viral, así como una secuencia de octanucleótidos 5'-GGAAGAGC-3' con función desconocida en la ubicación de ~ 70 a 80 nts del extremo 3' presente en todos los miembros de la familia y una región hipervariable (HVR). Al igual que otros coronavirus, no posee una secuencia señal de poliadenilación canónica AAUAAA (Digard y col., 2020; Simmonds, 2020).

En la arquitectura de la secuencia del ARN genómico (ARNg) del SARS-CoV-2 se distinguen 14 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para un número total de 29 proteínas virales que no incluyen la hemaglutinina esterasa

(HE) presente en los coronavirus humanos hCoV-OC43 y hCoV-HKU1 (Huston y col., 2020).

Aproximadamente los dos primeros tercios 5' del genoma lo abarcan los ORF1a y ORF1b que se encuentran superpuestos y se traducen en dos grandes poliproteínas, pp1a y pp1b, de 4.405 y 7.096 aminoácidos respectivamente que son escindidas en 16 proteínas no estructurales (NSP) por las proteasas virales NSP3 y NSP5.

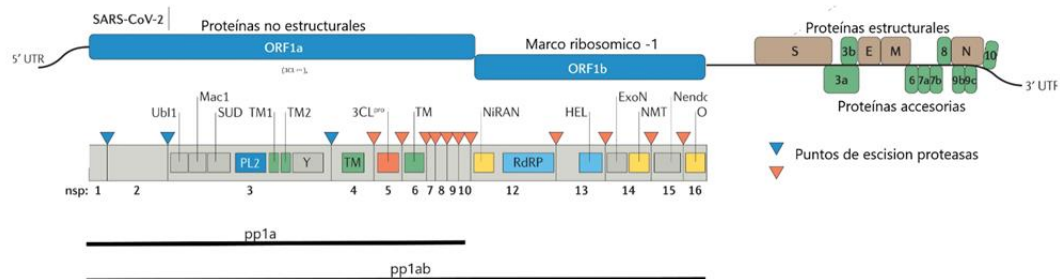


Figura 2. Organización estructural del genoma del SARS-CoV-2. Los dominios funcionales se encuentran mostrados en rectángulos. Los primeros dos ORF se traducen en las poliproteínas pp1a y pp1ab que son escindidas luego de su traducción por las proteasas virales (PL^{pro}) y (3CL^{pro}), dando lugar a las 16 proteínas no estructurales del virus, que forman la maquinaria de replicación y transcripción (nsp). La traducción de pp1ab depende de un cambio de marco -1 entre el ORF1a y el ORF1b. El último tercio del genoma se transcribe en un conjunto de ARNm-sg anidados que se traducen para dar lugar a las cuatro proteínas estructurales: la proteína de pico (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N). ORFs intercalados en esta región codifican para proteínas accesorias. Tomado y modificado de Yang y Rao (2021).

Por otra parte, en el tercio 3' restante del genoma, 4 de los 12 ORF sobrantes codifican un conjunto canónico de proteínas estructurales que incluyen la proteína de la nucleocápside (N), la proteína espiga (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envoltura (E), responsables de la encapsulación del ARN viral, del ensamblaje y liberación del virión al medio extracelular, así como de la intercepción y modulación de la respuesta inmune del huésped (Figura 2). Mientras que, entre ellos se encuentran intercalados otros 8 ORF_s (ORF 3a, ORF 3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF9 y ORF14) codificantes para un conjunto de proteínas accesorias, cuyas funciones han sido principalmente asociadas a la regulación de la infección viral (Bojkova y col., 2020; Huston y col., 2020; Jungreis y col., 2021; Kadam y col., 2021; Malone y col., 2022).

La traducción de la poli proteína pp1b a partir del ORF1b es llevada a cabo mediante un cambio de marco mediante el retroceso del ribosoma un nucleótido aguas arriba del codón de parada del ORF1a, lo cual permite que el proceso de traducción continúe aguas abajo de dicho triplete. Por otro lado, el bloque de proteínas estructurales y accesorias se expresan a partir de un conjunto anidado de ARNs mensajeros subgenómicos (ARNm-sg) de longitud variable que contienen una secuencia líder 5' de 72 nucleótidos de largo derivada del extremo 5' del genoma viral. Los ARNm-sg se originan a través de un escaneo de fugas ribosomal, un mecanismo que consiste en el desplazamiento del ribosoma sobre la secuencia del ARNm en dirección 5' → 3' más allá del codón de iniciación AUG localizado aguas debajo de la UTR 5', comenzando la traducción en otro codón AUG que debería codificar para una metionina dentro de la proteína por lo que el polipéptido resultante es más pequeño que si se iniciara en el codón de inicio original (Sola y col., 2015, Malone y col., 2022).

Por otro lado, el genoma del SARS-CoV-2 exhibe una marcada represión de las islas CpG disponibles en su secuencia. Esto representa un mecanismo de evasión esencial que evita el reconocimiento del ARN viral por parte del huésped vertebrado, quien posee proteínas antivirales provistas de dedos de zinc (ZAP) que median la identificación de los motivos CpG en el genoma viral y los procesa para su degradación. Además, el porcentaje de enriquecimiento del genoma con guaninas y citocinas es bastante bajo en comparación con otros coronavirus (38%), por lo que resulta bastante inestable a altas temperaturas (Digard y col., 2020).

1.3. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2

El inicio de la infección viral del SARS-CoV-2 en células humanas comienza con la inyección del genoma viral al citoplasma. Este evento puede involucrar una de dos vías de acceso, la entrada a través de endosomas o la fusión directa de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped, ambas mediadas por la interacción física entre la proteína espiga (S) y un receptor celular desplegado sobre la membrana plasmática que resulta ser principalmente el receptor para la

enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (Hoffmann y col., 2020a; Xu y col., 2020; Yang y Rao, 2021; V'kovski y col., 2021; Whittaker y col., 2021) (Figura 3).

La proteína espiga, es una glicoproteína de fusión homotrimérica perteneciente a la subfamilia de proteínas membranales de clase I, que consta de dos subunidades, S1 y S2, a las cuales les han sido atribuidas diferentes funciones. La subunidad S1 (RBD) constituye el dominio de unión al receptor de la célula mientras que, la subunidad S2 se encuentra representada por la región transmembrana de la proteína caracterizada por albergar regiones repetidas de heptapéptidos y al péptido de fusión que en última instancia media la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped (Walls y col., 2020; Shang y col., 2020; Letko y col., 2020).

Cualquiera de estas dos vías precisa la escisión inicial de la proteína S en sus subunidades S1 y S2, lo que conduce a un amplio reordenamiento conformacional de su estructura desde un estado de prefusión a un estado de postfusión (Shang y col., 2020; Trougakos y col., 2021). Este evento se ve facilitado por la acción de las proteasas celulares: serín proteasa transmembranal 2 (TMPRSS2) en la superficie celular (Hoffmann y col., 2020a; Shang y col., 2020; Ou y col., 2020; Lan y col., 2020; Trougakos y col., 2021), las cisteín proteasas Catepsina B (CTSB) y Catepsina L (CTSL) en el endosoma (Gierer y col., 2013; Hoffman y col., 2020a; Ou y col., 2021; V'Kovski y col., 2021) y la furina proteasa para la cual la proteína S del SARS-CoV-2 presenta un sitio inusual de escisión multiálcali (PRRAR) en el límite de S1 y S2 no presente en las proteínas S de otros coronavirus (Hoffman y col., 2020b; Menachery y col., 2020; Shang y col., 2020). La susceptibilidad de S a ser clivada por la furina proteasa se relaciona con un incremento de la infectividad y podría explicar la capacidad que tiene este virus de infectar células del sistema nervioso central, empleando como receptor al Receptor Celular de Neuropilina-1 el cual se une a sustratos proteicos escindidos por furina (Cantuti-Castelvetri y col., 2020).

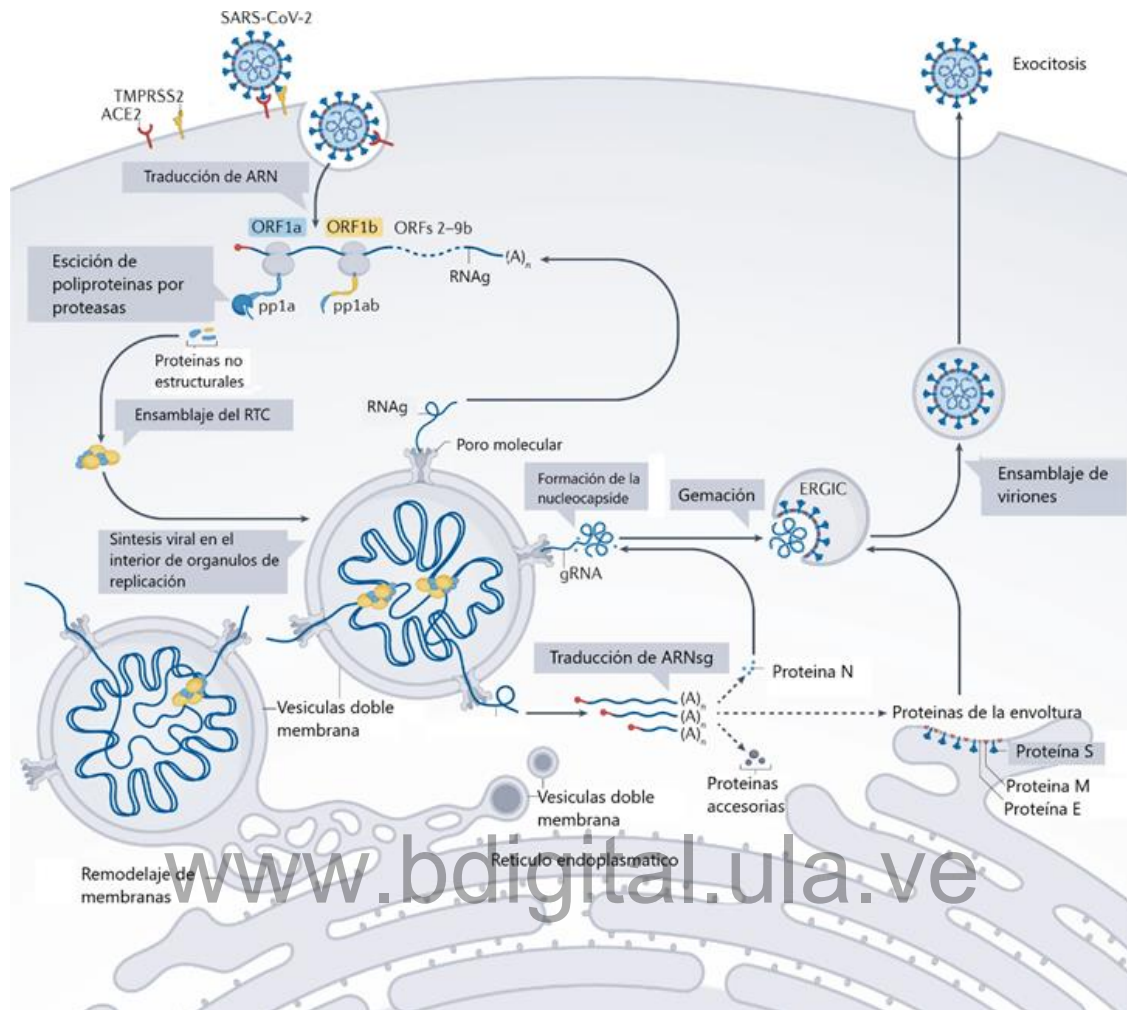


Figura 3. Ciclo de Infección por SARS-CoV-2. Las cajas azules remarcan los diferentes eventos moleculares que ocurren en la célula huésped durante el proceso de infección viral y las flechas negras indican el orden en que estos tienen lugar. Para ingresar a la célula huésped, la proteína S del virus interactúa con el receptor ACE2, siendo al mismo tiempo escindida por proteasas celulares, activándose así su capacidad de fusionarse con la membrana facilitando el ingreso del genoma viral (ARNg) al citoplasma celular. Una vez allí el ARNg es traducido por los ribosomas en dos poliproteínas replicasas, pp1a y pp1ab que son rápidamente escindidas por Nsp3 y Nsp5 en 16 proteínas no estructurales, que se ensamblan en los complejos de replicación y transcripción (RTC). La síntesis posterior del ARNg y ARN-sg que codifican las proteínas estructurales y accesorias ocurre dentro de vesículas de doble membrana que forman parte de los orgánulos membranosos de replicación inducidos por virus. Los ARNg sintetizados se pueden traducirse en Nsp_s adicionales, servir como plantilla para una mayor síntesis de ARN o para empaquetarse en nuevos viriones. El ensamblaje del SARS-CoV-2 comienza con el recubrimiento de los ARNg con proteínas de la nucleocápside, lo que genera estructuras de nucleocápside que brotan del ERGIC, adquiriendo así una bicapa lipídica que contiene las proteínas S, M y E. Tomado y modificado de Malone y col., (2021).

Los genomas de los virus de ARN monocatenario de sentido positivo (ARN +) como el SARS-CoV2 funcionan directamente como ARN mensajero, traduciéndose por los ribosomas citoplasmáticos en poliproteínas, de las cuales se derivan diversas proteínas virales que ejercerán funciones de replicación. Siendo sin duda alguna una de las más importantes la ARN polimerasa dependiente de ARN. La cual participa en la copia del genoma generando plantillas replicativas de ARN doble banda (ARNdb) que son utilizadas para generar más plantillas de ARN + que servirán como molde para la síntesis de más proteínas virales y como genomas de nuevos viriones. Este proceso de replicación viral tiene lugar en el citoplasma, por lo que, tanto el ARN viral infectivo, así como los intermediarios ARNdb se ven expuestos a los mecanismos de inmunidad antiviral de la célula huésped. No obstante, estos virus han logrado desarrollar y perfeccionar poderosas estrategias de evasión inmunológica (Baggen y col., 2021; Mu y col., 2020).

En este sentido, una vez que el SARS-CoV-2 alcanza el citoplasma de la célula huésped, la proteína N se disocia del ARN viral y rápidamente actúa como inhibidor del ARN de interferencia celular, un sistema de defensa inmune antiviral del cual se valen las células para promover la rápida degradación del genoma viral, inhibiendo así su replicación y deteniendo el progreso de la infección (Mu y col., 2020).

Simultáneamente, se da inicio a un complejo programa de expresión y replicación viral altamente regulado que comienza con la traducción de los ORF1a y ORF1b en dos grandes poliproteínas replicasas, pp1a y pp1ab respectivamente. Luego de su síntesis, estas poliproteínas son escindidas en 16 proteínas no estructurales que se ensamblan en complejos de replicación-transcripción (RTC) por las cisteínas proteasas de autoescisión temprana, Nsp3 una proteasa similar a la proteína (PL^{pro}) y Nsp5 una proteasa similar a la quimi tripsina (3CL^{pro}) también conocida como enzima proteolítica principal (M^{pro}). Una de las primeras Nsp en ser escindida, Nsp1; actúa inhibiendo la traducción del ARNm del huésped al mismo tiempo que acelera su degradación, garantizando que toda la maquinaria

de síntesis se concentre exclusivamente en la síntesis viral (Baggen y col., 2021, V'Kovski y col., 2021; Wu y col., 2023).

Por otro lado, las Nsp 2-11 regulan el medio intracelular, preparándolo para la replicación viral, mientras que las Nsp 12-16 representan un pool de enzimas con una función clave en la síntesis de ARN incluyendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (Nsp12). El RTC formado por Nsp 2-16 y la proteína N, participan previamente remodelando las membranas celulares para formar compartimientos subcelulares cerrados de doble membrana (DMV) conectados al retículo endoplasmático en donde posteriormente tendrán lugar los eventos moleculares de replicación (Baggen y col., 2021; Khan y col., 2021; Ugurel y col., 2020; Wu y col., 2023; V'Kovski y col., 2021). A estos compartimientos subcelulares inducidos por virus se les ha sido designado el nombre de orgánulos de replicación (OR) y son también otra de las estrategias de evasión inmune que usan los coronavirus para concentrar las replicasas virales y algunos otros factores del huésped esenciales para la replicación viral en un mismo compartimiento, al mismo tiempo que aíslan componentes del citoplasma capaces de promover la detección y la degradación del ARN viral (Baggen y col., 2021, Roingeard y col., 2022). Por tanto, en los OR DMV también se recluta desde el citoplasma el ARN genómico viral que será usado como plantilla para la producción de ARN (-) de longitud completa y de un conjunto de ARN subgenómicos de sentido negativo que se originan a partir de la región de ARNg localizada aguas abajo de los ORF1a y ORF1b. A diferencia de los ARN (-) que sirven como plantilla para producir ARNg, estos últimos dirigen la síntesis de un grupo anidado de ARNm subgenómicos (ARNmsg) a partir de los cuales serán sintetizadas las cuatro proteínas estructurales del virus, necesarias para el ensamblaje y la salida del virión al medio extracelular y las nueve proteínas accesorias, muchas de ellas con funciones asociadas a la modulación de las respuestas innatas celulares (Finkel y col., 2021; Malone y col., 2022).

A continuación, tanto el ARNg como los ARNsg recién sintetizados abandonan el interior del DMV a través de poros transmembrana para alcanzar los sitios de traducción, encapsidación y ensamblaje de nuevos viriones localizados

entre el retículo endoplasmático (RE) y el compartimiento intermediario RE-Golgi, desde donde finalmente brotan para ser liberados de la célula huésped mediante exocitosis y transporte lisosomal (Ghosh y col., 2020; Baggen y col., 2021; V'Kovski y col., 2021; Malone y col., 2022; Wu y col., 2023) (Figura 3).

1.4. Proteína de la nucleocapside del SARS-CoV-2

De las 4 proteínas estructurales, las 16 Nsp y las 9 proteínas accesorias codificadas por el genoma del SARS-CoV-2, la proteína S se convirtió inicialmente en el centro de estudio de la mayoría de las investigaciones relacionadas con el diagnóstico, el desarrollo de vacunas y de nuevos fármacos, así como en la predicción del origen de nuevas variantes (Zinzula y col., 2021; Ahammad y Lira, 2020; Cubuk y col., 2021). Sin embargo, muchas otras de estas 29 proteínas desempeñan papeles biológicos igualmente críticos en el establecimiento de la infección, entre las cuales; la proteína N destaca como uno de los componentes estructurales más importantes del SARS-CoV-2 así como de muchos otros HCoV, por lo que se ha convertido en un blanco antiviral particularmente atractivo, ya que además de dirigir el empaquetado del ARN viral, es la proteína más abundante en los viriones, actúa como determinante de la virulencia y la patogénesis y es un antígeno de alta inmunogenicidad (Chang y col., 2014; Yasui y col., 2008; Zinzula y col., 2021). Por estas razones, la proteína N ha sido considerada en los últimos años como un blanco potencial para el desarrollo de vacunas y terapias, así como también un importante marcador para el diagnóstico del COVID-19 (Ihling y col., 2020; Gouveia y col., 2020; Supekar y col., 2021).

A continuación, se procederá a realizar una detallada descripción de la proteína N: secuencia, propiedades fisicoquímicas, estructura, función en el ciclo de infección del SARS-CoV-2 y su valor diagnóstico en la detección temprana de la enfermedad.

1.4.1. Estructura

El gen de la proteína N correspondiente al noveno ORF del genoma viral posee una secuencia nucleotídica de 1260 nts, que codifica para un polipéptido de 419 aminoácidos el cual comparte una identidad de secuencia del 90,52% con la secuencia codificante para la proteína N del SARS-CoV, mientras que con las de MERS-CoV y HCoV-OC43 solo un 49 % y 36% respectivamente (Chang y col., 2006; Kang y col., 2020; Bai y col., 2021; Gao y col., 2021), lo que demuestra su importancia funcional.

Esta proteína presenta una organización modular que comprende 2 regiones estructurales y tres regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) (Peng y col., 2020). Las regiones estructurales se encuentran representadas por dos dominios conservados y plegados independientemente, el dominio N-terminal (N-NTD) y dominio C-terminal (N-CTD) (Chang y col., 2014) y las IDR por el brazo-N, la región enlazadora flexible (LKR) y la cola-C. En este sentido en la estructura primaria de la proteína el N-NTD se encuentra flanqueado en su región N-ter por el brazo N y conectado a través de la LKR al N-CTD (Figura 4), que a su vez está flanqueado en su extremo C-ter por la cola C (Cubuk y col., 2021).

Cada una de estas regiones estructurales es responsable de llevar a cabo funciones muy particulares. El NTD media la captura y unión del ARN viral recién sintetizado en el entorno celular mientras que el CTD tiene como función principal mediar la interacción proteína-proteína entre monómeros de N, facilitando así su dimerización y/o oligomerización, además de tener una contribución minoritaria en la unión de ARN viral. Estos mecanismos de oligomerización y de interacción con ácidos nucleicos son regulados por las IDR (Chang y col., 2014, Peng y col., 2020; Cubuk y col., 2021; Wu y col., 2023).

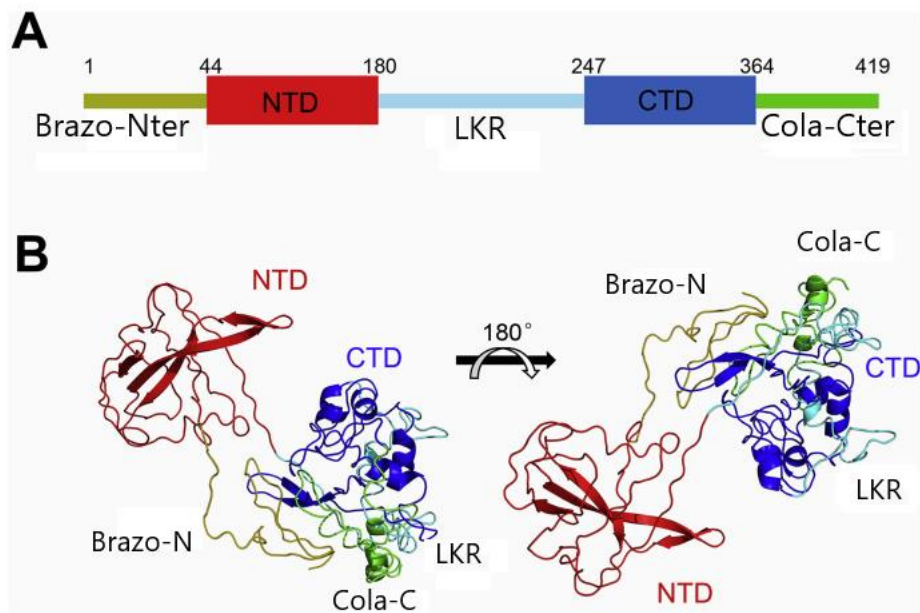


Figura 4. Organización estructural de la proteína N del SARS-CoV-2. (A) Representación esquemática de la estructura primaria N del SARS-CoV-2. El intervalo de aminoácidos que corresponde a cada dominio se muestra en la parte superior y cada dominio se representó con un color diferente. (B) Estructura predicha de la Proteína N del SARS-CoV. El NTD y el CTD se resaltaron en rojo y azul respectivamente. Tomado y modificado de Zeng y col. (2020).

Hasta la fecha, la resolución de las estructuras de los dominios N-NTD y N-CTD de varios coronavirus que infectan humanos incluyendo el SARS-CoV-2 han permitido no solo comprender muchas de las funciones que juega la proteína N en el establecimiento y progreso de la infección causada por este tipo de virus, sino además; conocer las relaciones filogenéticas existentes entre los miembros del grupo (Yu y col., 2006; Chen y col., 2007; Saikatendu y col., 2007; Lin y col., 2014; Papageorgiou y col., 2016; Peng y col., 2020). Sin embargo, la estructura terciaria que adopta la proteína completa continúa siendo un misterio dado el grado de desorden aportado por las IDR y la facilidad que tiene esta proteína para formar una amplia variedad de estados oligoméricos, lo cual constituye una importante barrera para la caracterización estructural convencional (Peng y Col., 2020; Cubuk y col., 2021).

1.4.1.1. Estructura y Función del N-NTD del SARS-CoV 2

La estructura del N-NTD del SARS-CoV-2 ha sido determinada con éxito por varios grupos de investigación y los resultados obtenidos han sido consistentes con que su organización exhibe un alto grado de similitud con el de las proteínas N de muchos otros coronavirus estudiados hasta la fecha (Dinesh y col., 2020., Kang y col., 2020; Peng y col., 2020; Bai y col., 2021).

Su configuración tridimensional adopta la forma de un puño derecho en el que sobresale el dedo pulgar desde el centro de la palma de la mano, que se extiende hasta el comienzo de la muñeca. El centro de la palma, representa un subdominio central constituido por 4 hojas β antiparalelas (Figura 5), localizado entre una hélice anular corta 3_{10} y una región prominente de horquilla β formada por las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$. Estas dos hebras se encuentran interconectadas por una prominente horquilla β que representa el dedo pulgar que sobresale del puño y que se caracteriza por poseer un formidable grado de flexibilidad, (Kang y col., 2020; Peng y col., 2020; Bai y col., 2021) así como por estar casi que exclusivamente constituida por residuos de aminoácidos básicos y aromáticos. Estas características le proporcionan una alta densidad de carga positiva que se correlaciona con la participación de esta región en la capacidad que tiene la proteína N de atraer y unir de manera eficiente al ARN viral (Bai y col., 2021; Peng y col., 2020).

En la región de intersección del dedo y la palma, se recrea una hendidura con un elevado potencial electrostático positivo, que se corresponde con el sitio de unión para ARN presente en las estructuras de N-NTD previamente resueltas de otros coronavirus que infectan humanos (Huang y col., 2004; Fan y col., 2005; Lin y col., 2014; Dinesh y col., 2020., Peng y col., 2020). De hecho, los estudios de modelado atómico llevados a cabo por Dinesh y col (2020), demostraron que este bolsillo une ARNdb y ARNsb (ARN doble banda y simple banda) de manera similar a través de los residuos Arg92, Arg107 y Arg149.

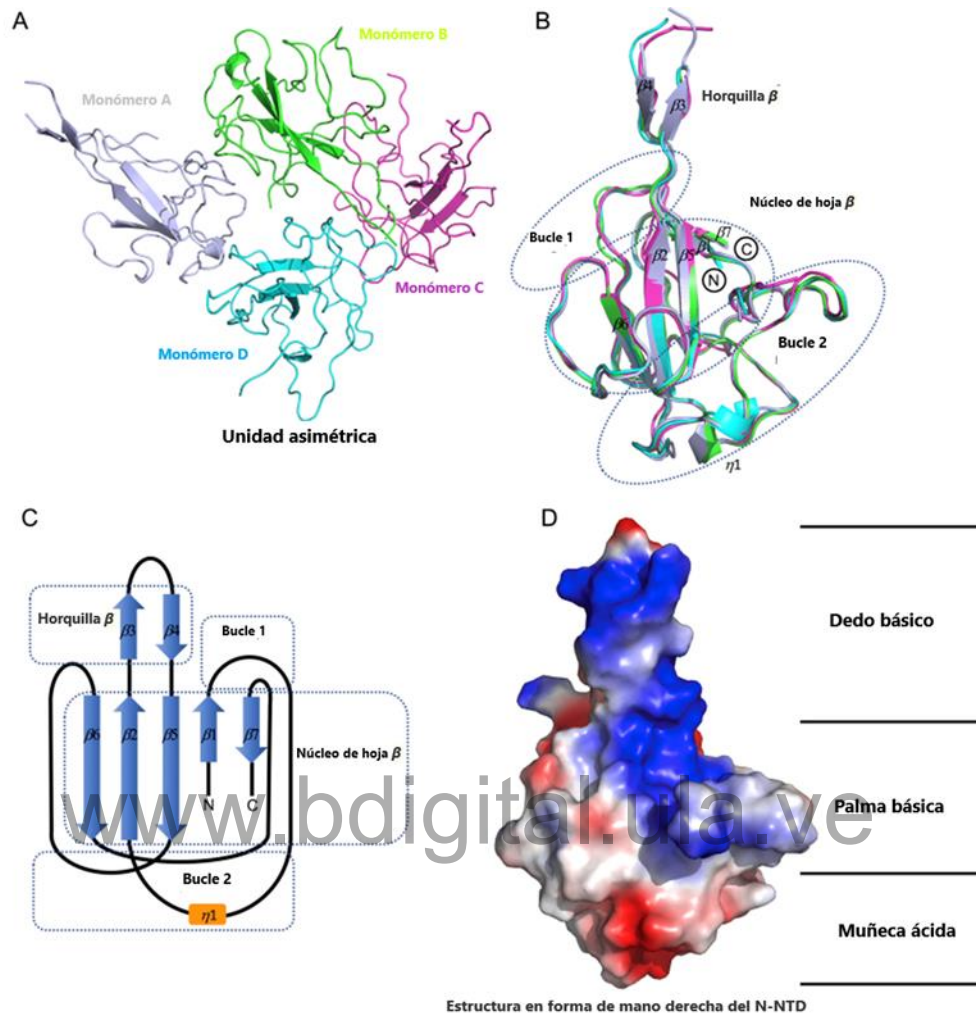


Figura 5. Descripción estructural del N-NTD del SARS-CoV-2. (A) Representación en cinta de un tetramero de N-NTD en una unidad asimétrica. Los cuatro monómeros se encuentran resaltados en gris, verde, violeta y cian. (B) Superposición de la estructura obtenida de los cuatro monómeros en una unidad asimétrica. Los círculos discontinuos indican la estructura intercalada de las diferentes regiones estructurales de cada monómero: el bucle 1, el núcleo de hoja β y el bucle 2. Las hojas β se encuentran enumeradas desde el 1 hasta el 7, y la hélice 3_{10} se encuentra representada como η_1 . (C) Estructura topológica del N-NTD del SARS-CoV-2. (D) Potencial electrostático de la superficie de la estructura del N-NTD del SARS-CoV-2. En azul indica el potencial electrostático positivo, mientras que el rojo representa el potencial electrostático negativo. Tomado y modificado de Kang y col., (2020).

1.4.1.1.1. Diferencias estructurales entre el N-NTD del SARS-CoV-2 y el N-NTD de otros Coronavirus

Hasta ahora se han descrito las semejanzas estructurales que existen entre el N-NTD del SARS-CoV-2 y otros miembros de la familia Coronaviridae, no obstante, se han evidenciado diferencias estructurales significativas en varios de

sus módulos en modelos computarizados de superposición con estructuras relacionadas.

Un modelo comparado de las estructuras del N-NTD del SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV y HCoV-OC43 realizado por Kang y col (2020), reveló que existen diferencias marcadas en la distribución de cargas en la superficie entre las tres estructuras, especialmente en las regiones correspondientes a la zona inferior del subdominio central, el anillo N-terminal y el extremo superior de la región β sobresaliente. Siendo la distribución de cargas referida para el N-NTD del SARS-COV (Huang y col., 2004) la que más se asemeja a la del SARS-CoV-2, lo cual es consistente con el alto porcentaje de identidad de secuencia que comparten (90,52%), con los residuos más conservados en la región básica de la palma que se corresponde con el bolsillo de unión a ARN y los menos conservados en el dedo básico y en la región ácida correspondiente a la muñeca.

Por otra parte, la superposición de estructuras entre los dominios de estos tres representantes de coronavirus revela que existen diferencias en la flexibilidad y disposición espacial de la horquilla β . Encontrándose esta región 2,1 Å desplazada hacia el sitio de unión a nucleótidos respecto al SARS-CoV N-NTD, menos extendida que en el MERS-CoV N-NTD y desplazada 2 Å hacia el sentido opuesto del sitio de unión a nucleótidos cuando se compara la estructura con HCoV-OC43 N-NTD (Kang y col., 2020).

La resolución de la estructura por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), reveló que este dedo básico prominente presenta un alto grado de flexibilidad en comparación con las estructuras de la misma región en el N-NTD del HCoV-OC43 y del HCoV-NL63 (Dinesh y col., 2020; Kang y col., 2020). Adicionalmente, los residuos implicados en la unión del AMP, en la cola N terminal del NTD son diferentes en la proteína N del SARS-CoV-2, aun cuando esta última es bastante similar a sus homologas en el SARS-CoV, el MERS-CoV y el HCoV-OC43 (Figura 6). El grupo hidroxilo fenólico de Tyr124 interactúa a través un puente de hidrogeno con el anillo de adenina del AMP, mientras que la Gly68 lo hace con el grupo monofosfato de este nucleótido también mediante la formación de un enlace de hidrógeno (Peng y col., 2020; Dinesh y col., 2020; Bai y col., 2021; Wu y col.,

2023). En esta misma región estructural, los residuos Asn48, Asn49, Thr50 y Ala51 implicados en la unión de ARN viral se exponen hacia afuera con un mayor grado de libertad que los residuos equivalentes en el N-NTD del HCoV-OC43, gracias a la gran flexibilidad que exhibe esta zona, lo cual facilita una apertura más plástica del sitio de unión para acoplarse a la estructura de grado superior del genoma viral (Kang y col., 2020).

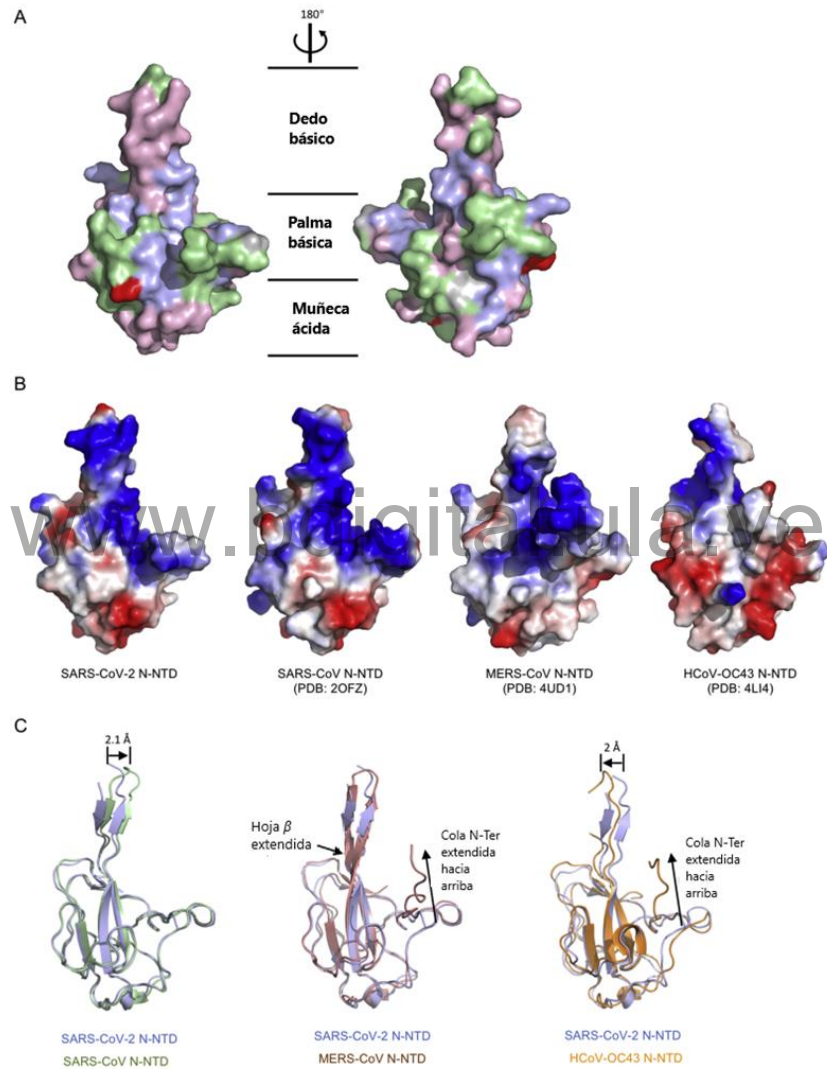


Figura 6. Comparación del N-NTD del SARS-CoV-2 con las estructuras del N-NTD de tres coronavirus relacionados. (A) Mapeo de las regiones conservadas en la superficie entre el N-NTD del SARS-CoV-2 y el de otros cuatro coronavirus. El azul denota los residuos conservados, el verde representa una única variación; el rosa dos variaciones y el rojo tres variaciones. (B) Potencial electrostático de la superficie del NTD de los coronavirus SARS-COV-2, SARS-CoV, MERS-CoV y HCoV-OC43. (C) Representación en cinta de la superposición del N-NTD del SARS-CoV-2 con el NTD de los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y HCoV-OC43. Tomado y modificado de Kang y col., (2020).

1.4.1.2. Estructura y Función del N-CTD del SARS-CoV 2

La estructura cristalina del dominio C-terminal de la Proteína N (N-CTD) del SARS-CoV-2, también ha sido determinada por numerosos equipos de investigación, dada la importancia que tiene este dominio en la oligomerización de la proteína *in vivo* (Peng y col., 2020; Zhou y col., 2020; Zinzula y col., 2021).

Los resultados de la estructura cristalina obtenidas concuerdan en que dos monómeros de N-CTD se combinan, dando lugar a un homodímero (estructura cuaternaria más estable de N) bastante compacto que adquiere la forma de una teja rectangular. Cada uno de los protómeros exhibe una estructura topológica cóncava que se asemeja a una letra C y se encuentra compuesto por 5 α hélices, dos hélices 3_{10} y dos hebras β , que dan lugar a la formación de una horquilla β (Zhou y col., 2020; Zinzula y col., 2021).

La inserción de la horquilla β de uno de los protómeros en la cavidad del otro protómero, resulta en la formación de una lámina β antiparalela de cuatro hebras posicionada en la interfaz del homodímero y que a su vez se constituye como una de sus caras, mientras que la cara opuesta la conforman el grupo de hélices α y bucles (Peng y col., 2020). La interacción mediada por numerosos puentes de hidrógeno entre las horquillas β de ambos monómeros, así como; la fuerte interacción entre los residuos hidrofóbicos dispuestos sobre la lámina β y las α hélices hacen posible que el evento de dimerización proporcione una estructura altamente estable (Peng y col., 2020; Zinzula y col., 2021) (Figura 7).

La superficie de la cara helicoidal del dímero N-CTD del SARS-CoV-2, presenta un alto potencial electrostático positivo, en el que los residuos Arg319, Thr334 y Ala336 han sido identificados como claves en la interacción de este dominio con el ARN viral (Wu y col., 2023), lo cual es consistente con la idea de que la proteína N promueve el empaquetamiento del ARN viral a lo largo de toda su extensión (Takeda y col., 2008). En este sentido, el análisis del potencial electrostático muestra que los residuos cargados positivamente (Lys256, Lys257, Lys261 y Arg262) en estas posiciones se disponen juntos en el borde del surco básico, extendiéndose lateralmente con respecto a la interfaz del dímero (Figura

7). Además, según el modelo del complejo de ribonucleoproteína propuesto para el coronavirus, presenta un núcleo en espiral a través del cual el ARNs del genoma forma un canal integrado por siete bases que se encuentra rodeado por los surcos básicos del CTD (Peng y col., 2020; Bai y col., 2021; Zinzula y col., 2021).

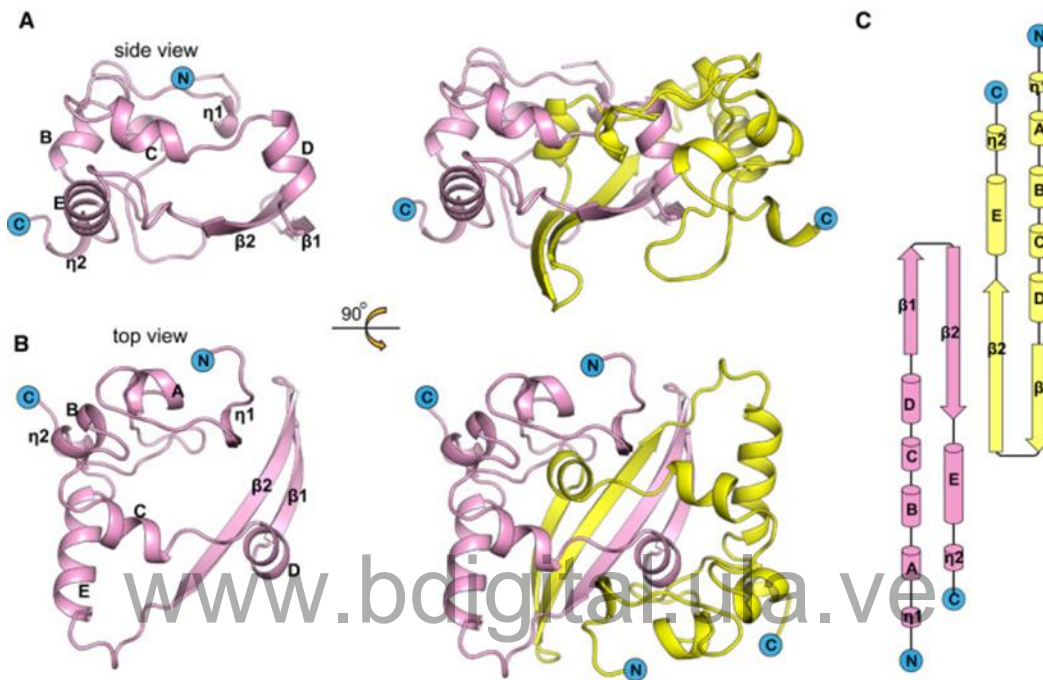


Figura 7. Estructura del N-CTD del SARS -CoV-2 N. (A) Representación en cintas de la estructura del monómero (Izquierda) y del dímero (derecha) del N-CTD. En el dímero uno de los monómeros esta coloreado en rosa y el otro en amarillo. (B) Vista superior del monómero y el dímero mediante rotación en 90° de la estructura a lo largo del eje. (C) Diagrama topológico de la estructura del N-CTD del SARS-CoV-2. Las hélices α se encuentran señaladas por las letras A, B y C, η representa la hélice 3_{10} y β representa la hoja β , de acuerdo con la regla de numeración de elementos estructurales N-CTD del SARS propuesta por Yu y col., (2006). Tomado de Peng y col., (2020).

Se ha demostrado adicionalmente, que si bien, en solución el CTD existe como un dímero, dependiendo de la concentración de proteínas en la misma puede experimentar eventos de interacción proteína-proteína que generan dímeros, trímeros, tetrámeros y octámeros y que a su vez los dímeros pueden interactuar entre sí formando oligómeros de orden superior (Bai y col., 2021; Zinzula y col., 2021). En este sentido, los análisis de dispersión de la luz estática y reticulación química del CTD del SARS-CoV-2 han mostrado que el dímero presenta una alta estabilidad en solución y que por ende el autoensamblaje de

este dominio cumple un papel fundamental en la estabilidad general de la proteína N (Zeng y col., 2020).

1.4.1.2.1. Diferencias estructurales entre el N-CTD del SARS-CoV-2 y el N-CTD de otros Coronavirus

Al comparar la estructura del N-CTD del SARS-CoV-2 con las estructuras previamente reportadas para el mismo dominio de las proteínas de la nucleocápside del SARS-CoV, MERS-CoV y HCoV-NL63, se encontró que todas ellas exhiben una arquitectura estructural bastante similar, con un surco conservado cargado positivamente en la cara helicoidal de la estructura dimérica, por lo que se presume que esta región participa activamente en la unión del ácido nucleico viral. Sin embargo, la cara constituida por la lámina β presenta patrones de potencial electrostático distintos (Figura 8).

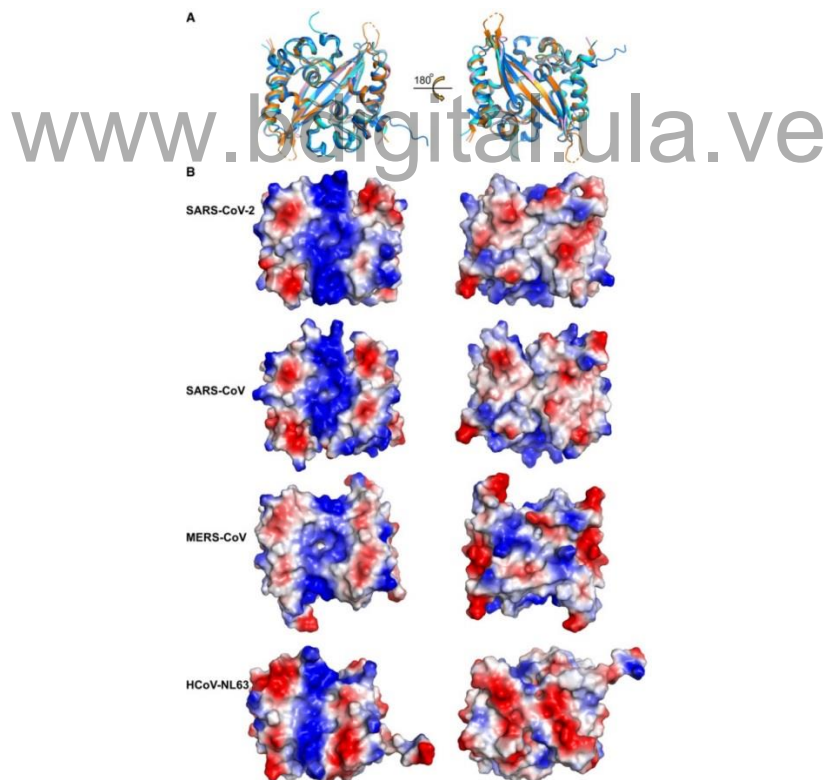


Figura 8. Comparación estructural entre el N-CTD del SARS-CoV-2 y el N-CTD de otros Coronavirus. (A) Representación en cinta de las estructuras superpuestas de coronavirus SARS-CoV-2 (Rosa), SARS-CoV (Cian), MERS-CoV (naranja) y HCoV-NL63 (azul). (B) Vistas del potencial electrostático superficial del N-CTD de los coronavirus SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV y HCoV-NL63. Los colores rojo y azul representan las zonas donde el potencial electrostático es negativo y positivo respectivamente. Tomado de Peng y col., (2020).

En el SARS-CoV-2 N-CTD esta región presenta una alta carga negativa, que coincide con la misma distribución e intensidad en el SARS-CoV y en el HCoV-NL63 mientras que, en el MERS-CoV se encuentra cargada positivamente. Estos patrones de distribución diferencial de las cargas en esta zona pueden afectar en gran medida la forma en la que se une el ARN (Chen y col., 2007; Takeda y col., 2008; Nguyen y col., 2019; Peng y col., 2020; Zinzula y col., 2021; Bai y col., 2021).

1.4.2. Función de la Proteína N en el ciclo replicativo del SARS-CoV-2

La proteína N, identifica y envuelve el ARN del virus en una estructura simétrica helicoidal y se une al ARN genómico del virus para formar un complejo de ribonucleoproteína (RNP). Esta proteína desempeña un papel multifuncional en el ciclo de vida del SARS-CoV2, ya que además del ensamblaje participa en la transcripción y replicación del ARNm viral, el tejido citoesquelético y la regulación inmune (Chang y col., 2014; Peng y col., 2020; Cong y col., 2020). Se ha determinado que N interactúa con la proteína de membrana (M) para promover la formación de agregados de proteína N, la fijación de partículas de ribonucleoproteína en la membrana del virus y el reconocimiento del ARN viral (Lu y col., 2021). Adicionalmente, se ha establecido que la proteína N neutraliza las respuestas antivirales mediadas por ARNi (ARN de interferencia) del huésped a través de su actividad de unión al ARN, actuando como un inhibidor viral del silenciamiento del ARN (Mu y col., 2020).

Khan y col., 2021; encontraron que la proteína N del SARS-CoV-2 se une a la serin proteasa 2 (masp2) asociada a la lectina de unión a manosa (MBL) y conduce a la sobreactivación del complemento y al agravamiento de la lesión pulmonar inflamatoria. La sobreexpresión de la proteína N estimula la producción de interferón mediada por el receptor similar al gen I inducido por el ácido retinoico (RIG-I) y genera una reducción en la expresión génica inducida por el interferón. La proteína N inhibe la interacción entre la proteína 25 de motivo tripartito TRIM25 y RIG-I. Además, inhibe la transducción de señales de interferón mediada por poliinosínicos: policitidílicos al nivel de la proteína de unión a tirosina quinasa

TnK1 (quinasa de unión a Tank1, TBK1), que interfiere con la unión de TnK1 al factor regulador de interferón 3 (IRF3), evitando así la translocación nuclear de IRF3 (Oh y Shin., 2021). Otro estudio demostró que el activador del proteosoma 11s (PA28γ) puede regular la abundancia intracelular de la proteína N (V'Kovski y col., 2021). La inmunoprecipitación se ha empleado para demostrar que el activador del proteosoma PA28γ es una proteína de unión a la nucleocápside, por lo que la unión de PA28γ juega un papel importante en la regulación de la actividad del proteosoma 20s, que a su vez regula el nivel de la proteína de la nucleocápside clave del SARS-CoV-2 (Zhang y col, 2020).

Por otra parte, la proteína N además de dirigir el empaquetado del ARN viral y de actuar como modulador de las respuestas inmunitarias innatas es la proteína más abundante en los viriones, actúa como determinante de la virulencia y la patogénesis y es un antígeno de alta inmunogenicidad capaz de inducir una fuerte respuesta humoral y celular tras la infección (Chang y col., 2014; Yasui y col., 2014; Peng y col, 2020, Zinzula y col., 2021, Xiang y col, 2021; Wu y col, 2023). Por estas razones, la proteína N ha sido considerada en los últimos años como un blanco potencial para el desarrollo de vacunas y terapias, así como también un importante biomarcador para el diagnóstico del COVID-19 (Ihling y col., 2020; Gouveia y col., 2020 Supekar y col., 2021).

1.5. Pruebas diagnósticas para la detección de COVID-19

Actualmente en la práctica clínica el diagnóstico de la infección por SARS-CoV2 se basa en la detección de ácido nucleico del virus (en hisopados nasofaríngeos o esputo), de anticuerpos séricos y de captura de proteínas virales (Yüce y col, 2021). La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR), posee una alta sensibilidad y especificidad y es la prueba gold standard (estándar de oro para la detección). Sin embargo, es una prueba de muy alto costo (hasta para los países desarrollados) por la infraestructura utilizada y por el personal especializado que se requiere. Además, las muestras (hisopados) se colectan y envían a los centros especializados para el diagnóstico, acumulándose antes de ser evaluadas mientras el paciente

evoluciona con la enfermedad y hasta fallece sin que haya recibido un diagnóstico oportuno (Li y col, 2020). La sensibilidad de este método suele depender de la carga viral (cantidad de ARN en cada muestra), de manera que los pacientes que se encuentran en los primeros días de la infección pueden no ser clasificados como positivos (falso negativo) debido a la baja carga viral presente en el hisopado. También pueden darse los casos en los que al tomar la muestra el virus, ya no se encuentra en las vías aéreas altas (nasofaringe) sino que ha migrado a órganos provocando una infección sistémica. De manera que el número de resultados positivos y negativos inconsistentes es alto, lo que causa una gran confusión durante el diagnóstico clínico (Cheng y col, 2020; Abduljalil y col, 2020).

Diversos estudios han demostrado que la proteína S recombinante es útil como antígeno para la detección de IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 en muestras de suero (Zhang y col, 2020; Li y col, 2020), sin embargo; S es una proteína altamente glicosilada, su plegamiento requiere de la formación de puentes disulfuro (Li y col, 2020) y la tasa de expresión en células de mamíferos es muy limitada para ser usada como antígeno de forma masiva en los kits, además de que los precios serían muy elevados por las razones mencionadas y porque la sobreexpresión en células eucariota es sumamente costosa. En cambio, la proteína N es la más abundante del virus, es la más inmunogénica, puede ser fácilmente sobreexpresada en *E. coli*, está altamente conservada entre las diferentes variantes del virus dada su baja susceptibilidad a acumular mutaciones (no existiendo proteínas homólogas en el humano) y adicionalmente, es una proteína de expresión temprana, lo que la convierte en un biomarcador ideal para el diagnóstico serológico precoz del SARS-CoV-2 (Li y col, 2022).

El período de incubación del SARS-CoV-2 suele ser de 3 a 7 días y los anticuerpos IgM se producen en el plazo de una semana, lo que sugiere una infección reciente, mientras que los anticuerpos IgG aparecen una o dos semanas más tarde. Debido a que los anticuerpos IgG pueden permanecer en el organismo durante mucho tiempo, su detección puede distinguir las infecciones agudas de las previas (Paces, 2020; Anka y col, 2021). Una vez que el paciente genera anticuerpos, se pueden utilizar métodos de detección inmunológica, por ejemplo;

en el mercado se encuentran kits de detección de anticuerpos IgM e IgG basados en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y también de pruebas rápidas (cromatografías de flujo lateral).

No obstante, debido al tiempo que tardan en generarse los anticuerpos (7 días después de la infección) y que los mismos puedan ser detectados, resulta complicado diagnosticar la infección en una etapa temprana, lo que a su vez dificulta la posibilidad de prevenir y controlar la propagación de la enfermedad (Sun y col, 2022). Ante este panorama, se han desarrollado nuevos kits que han sido aprobados para su comercialización y que se basan principalmente en la detección de la proteína N (Martin y col, 2021; Sun y col, 2022), permitiendo que durante el período ventana; en el cual el paciente no ha desarrollado síntomas asociados a la infección y donde su sistema inmune no ha generado anticuerpos o los títulos son considerablemente bajos (generando falso negativo), la proteína N puede ser detectada (en un verdadero positivo) lo que permite aislar al paciente y evitar así la propagación de la infección en la población.

www.bdigital.ula.ve

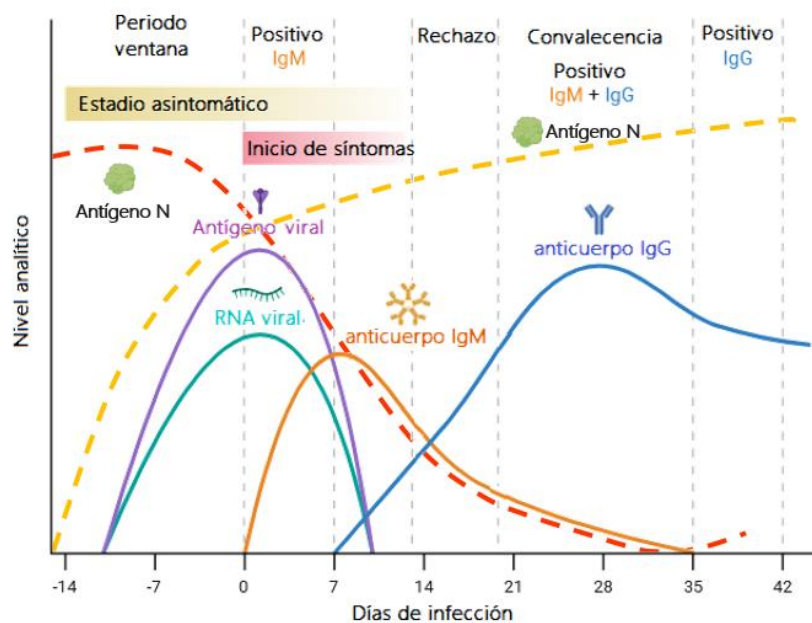


Figura 9. Representación esquemática del nivel analítico que ofrecen las pruebas de detección de ARN viral, anticuerpos IgM e IgG, antígeno N nasofaríngeo y serico en el diagnóstico COVID-19 a lo largo de la cinética de infección por SARS-CoV 2

1.5.1. Pruebas diagnóstico basadas en la proteína N

El desarrollo de kit's para el diagnóstico que no requieran de personal especializado, ni de laboratorios con infraestructuras de alto costo es de gran importancia, en especial en los países subdesarrollados. Las pruebas de captura de antígenos son útiles y necesarias, además son un complemento confiable para los sistemas actuales basados en RT-PCR, contribuyendo con un mayor número de procesamiento de muestras en tiempo real. Hasta finales de marzo de 2022, más de 48 kits de pruebas diagnóstico para la detección del antígeno N han sido desarrolladas y aprobadas por la FDA para su uso de emergencia (Li y col, 2022). Los métodos más empleados en los kit's aprobados y en los cuales se detecta en antígeno N del SARS-CoV2 son los de inmunocromatografía de flujo lateral (LF-CGIA), la inmunofluorescencia de flujo lateral (LF-IFA), el ensayo de quimioluminiscencia (CLIA) y el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

1.5.1.1. Inmunocromatografía de flujo lateral (LF-CGIA)

La LF-CGIA es un método cualitativo basado en la detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo. El cassette de prueba emplea anticuerpos monoclonales anti-SARS-CoV-2 en la línea test (T); y anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgY de pollo en la línea control (C) los cuales se inmovilizan sobre una membrana de nitrocelulosa. Sobre una almohadilla (pocillo de ensayo) se encuentra el anticuerpo monoclonal anti-SARSCoV-2 conjugado a oro coloidal y la IgY de pollo conjugada a oro coloidal. Cuando se agrega la muestra y una solución tampón al pocillo de ensayo, el antígeno SARSCoV-2 (si está presente), se unirá al anticuerpo monoclonal anti-SARS-CoV-2 conjugado a oro coloidal y se formará el complejo antígeno-anticuerpo; este complejo migra a través de la membrana de nitrocelulosa hacia la línea T, donde es capturado por el anticuerpo inmovilizado (anti-SARS-CoV-2) este complejo quedará atrapado formando una línea de color purpura el cual evidencia un resultado reactivo de la prueba. Independientemente de la presencia

del antígeno N en la muestra, se deberá formar una línea púrpura en el área de control (C), lo cual permite validar la prueba realizada (Martin y col, 2021).

El LF-CGIA tiene una sensibilidad del 64,2% para las muestras provenientes de personas sintomáticas y del 35,8% en el caso de las asintomáticas, con un 100% de especificidad en muestras de ambos grupos (Prince-Guerra y col, 2020). Las desventajas de esta prueba rápida es que al ser cualitativa no puede determinarse la concentración de N en la muestra, no pudiéndose así establecer una correlación entre esta última, con la carga viral del paciente durante la toma de la muestra así como, con la sintomatología que podría experimentar dada su participación en el establecimiento de respuestas inflamatorias exacerbadas asociadas con cuadros clínicos severos, dificultando así el manejo clínico apropiado. También, puede producirse un resultado falso negativo si la concentración del antígeno está por debajo del límite de detección de la prueba o si se ha obtenido una muestra de mala calidad. Adicionalmente, pueden producirse resultados falsos negativos si el hisopado se toma en un tiempo mayor a 7 días, ya que la carga viral disminuye sensiblemente debido a que migra a otros órganos y sistemas. En este caso lo más recomendable no es repetir la evaluación del paciente haciendo uso de una prueba más sensible como la RT-PCR (ya que la carga viral ha disminuido en la región nasofaríngea) sino la detección de IgM o IgG anti-N de SARS-CoV-2 en muestras de suero o plasma.

1.5.1.2. Inmunofluorescencia de flujo lateral (LF-IFA)

El fundamento de la LF-IFA es similar al de LF-CGIA a excepción de los anticuerpos anti-proteína N los cuales están marcados con fluoresceína en lugar de oro coloidal. En este caso, los resultados son procesados por un dispositivo analizador de intensidad de fluorescencia. Los métodos mejorados de LF-IFA, como el ensayo de inmunofluorescencia de microfluidos (MF-IFA), utilizan un biochip que puede controlar con precisión el flujo uniforme y ordenado del microfluido. Un resultado positivo o negativo se indica mediante una señal fluorescente en la zona de prueba (Beck y col., 2021).

LF-IFA tiene una sensibilidad del 41,2% y una especificidad del 98,4% en hisopados de pacientes asintomáticos, mientras que en los sintomáticos la

sensibilidad y la especificidad de la prueba mejoran a un 80,0% y 98,9% respectivamente (Pray y col, 2021).

1.5.1.3. Ensayo de quimioluminiscencia (CLIA)

CLIA es un método que permite la determinación cualitativa o cuantitativa de la proteína N del SARS-CoV-2. En ella, se utilizan anticuerpos policlonales/monoclonales específicos contra la proteína N, enlazados a nanopartículas paramagnéticas. Durante la primera incubación, la proteína N presente en las muestras nasofaríngeas se une al anticuerpo anti-N en las partículas paramagnéticas y en la segunda incubación, el anticuerpo conjugado a una enzima como HRP (peroxidasa de rábano picante) o FA (fosfatasa alcalina) reacciona con la proteína N, ya unido a las partículas paramagnéticas como fase sólida. Después de la segunda incubación, el material no unido se elimina mediante lavado. Posteriormente, se añaden los reactivos iniciadores y de este modo, se induce una reacción de quimioluminiscencia instantánea. La señal luminosa que refleja la cantidad de proteína N se mide mediante un fotomultiplicador en unidades relativas de luz la sensibilidad de la prueba es de 93.8% y la especificidad del 93.7% (Salvagno y col, 2021), aunque la sensibilidad en estos casos depende en que días fueron tomadas las muestras post-infección.

1.5.1.4. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ELISA es un método cuantitativo para la determinación de la proteína N del SARS-CoV-2 en muestras de suero o plasma. Por lo general, el anticuerpo de captura anti-proteína N recubre la superficie de los micropocillos, luego la muestra se incuba durante un tiempo que puede variar entre 30 y 60 min, posteriormente luego de lavar los pocillos se adiciona el anticuerpo de detección (dirigido contra una región del antígeno diferente a la reconocida por el anticuerpo de captura) y finalmente se incuba con un anticuerpo conjugado a una enzima que en presencia de un sustrato/cromógeno genera color producto de una reacción de oxidoreducción que puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente. La concentración de proteína N se correlaciona positivamente con la intensidad del color (absorbancia), haciendo uso de una

curva de calibración. Diversos estudios han demostrado que el límite de detección del ELISA sándwich alcanza niveles que van desde nanogramos (ng) hasta picogramos (pg), donde la detección depende mucho del sistema que usen los kit's; dando como resultado una alta sensibilidad (Martin y col, 2021; Sun y col, 2022). Por otro lado, los ensayos son fáciles de ejecutar y se obtienen resultados en un corto tiempo, por lo que puede ser aplicado a gran escala.

www.bdigital.ula.ve

2. JUSTIFICACIÓN

La pandemia por coronavirus 2019 (COVID-19) estableció una emergencia de salud pública sin precedentes, por lo que la detección temprana de una persona infectada y la interrupción de la vía de transmisión son claves para controlar esta importante amenaza en todo el mundo. El método de detección más confiable es una prueba de RT-PCR en tiempo real, la cual se realiza con una muestra de hisopado nasofaríngeo en los laboratorios autorizados (Centros de Diagnóstico, Tipo P3). No obstante, los RT-PCR pueden dar falsos negativos, si hay un mal procesamiento de las muestras y también si las muestras fueron tomadas en tiempos post-infección > a 7 días, ya que la sensibilidad va disminuyendo con el tiempo. Esta contradicción entre la historia clínica y el diagnóstico molecular genera confusión en los centros de salud. Por otra parte, la prueba de anticuerpos séricos específicos contra el SARS-COV-2 que ha sido ampliamente usada como evidencia serológica de diagnóstico de COVID-19, no es útil para el diagnóstico temprano de la infección (período ventana, aproximadamente 5 a 7 días), debido a que los anticuerpos IgM anti-N en los pacientes infectados con SARS-CoV-2 comienzan a tener títulos detectables en los sueros post-infección a tiempos > 5 días (“el periodo ventana”).

El no poder detectar con facilidad la infección en una etapa temprana, puede tener consecuencias e implicaciones graves para los pacientes y para las personas que entran en contacto directo con el contagiado, ya que; al no tener una prueba diagnóstica certera al inicio de la infección, implica que las personas no reciben los tratamientos adecuados y su cuadro clínico dependerá de la evolución de la enfermedad. Además, si las personas con COVID-19 son remitidas a sus casas con un diagnóstico negativo, suponen un riesgo de contagio para toda su familia y contactos cotidianos. En vista de esta situación y de que la proteína de la nucleocápside además de ser la más abundante del SARS-CoV-2 con alto valor inmunogénico, se secreta abundantemente por células infectadas enriqueciendo sus niveles libres en los sueros de los pacientes una vez que se contrae la

infección, su detección serológica ha proporcionado un nuevo y alentador biomarcador para la detección temprana del COVID-19.

Si bien, previamente han sido desarrollados sistemas de diagnóstico basados en ELISA sándwich para la captura del antígeno N en suero disponibles comercialmente, la situación país entre ellos la económica reduce la capacidad de importación a corto plazo para lograr un diagnóstico oportuno. Es por ello, que en este estudio se pretende evaluar el valor diagnóstico de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas con dos anticuerpos (sándwich) en la detección de la proteína N en sueros de pacientes a diferentes tiempos de la infección, incluyendo las primeras etapas, con el fin de proporcionar un nuevo indicador diagnóstico para su posterior desarrollo en el país.

www.bdigital.ula.ve

3. HIPÓTESIS

Los dominios C-terminal y N-terminal de la proteína N del SARS-CoV-2 son inmunogénicos, por lo tanto; la producción de anticuerpos policlonales contra ambos dominios recombinantes permitirá desarrollar un sistema de inmunocaptura para la proteína N viral en muestras de suero y/o plasma de los pacientes con COVID-19 en la etapa temprana de la infección.

www.bdigital.ula.ve

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Desarrollar un sistema de ELISA Sándwich para la captura de la proteína N en muestras de suero y/o plasma como un biomarcador cuantitativo para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en pacientes que cursan la fase temprana de la enfermedad (periodo ventana).

4.2. Objetivos Específicos

1. Predecir teóricamente la localización de epítopes estructurales y lineales de mayor inmunogenicidad sobre la secuencia polipeptídica de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2.
2. Clonar y sobre-expresar en *E. coli* las secuencias correspondientes a los dominios N-terminal (N1) y C-terminal (N2) de la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2.
3. Purificar a homogeneidad los polipéptidos recombinantes N1 y N2 mediante cromatografía de afinidad a metales.
4. Producir y purificar a homogeneidad anticuerpos policlonales contra los antígenos recombinantes (α -N1 y α -N2).
5. Calcular el rendimiento en la purificación de anticuerpos para ser aplicados a la producción de placas de ELISA para el diagnóstico de SARS-CoV-2.
6. Comprobar el valor diagnóstico de los antígenos N1 Y N2 en la detección de anticuerpos séricos IgM e IgG en suero de pacientes positivos para COVID-19 mediante ELISA indirecto y análisis de curvas ROC.
7. Determinar la combinación de anticuerpos a ser empleada en el desarrollo del sistema de inmunocaptura del antígeno N basado en ELISA sándwich indirecto desde suero de pacientes positivos para COVID-19.
8. Comprobar el efecto opsonizante de los anticuerpos IgG α -N de pacientes COVID-19 positivos proteína N recombinante .

9. Determinar la concentración de la proteína N en muestras séricas de pacientes IgM, IgG, IgM/IgG positivas para SARS-CoV-2.
10. Evaluar el desempeño de la prueba diagnóstico diseñada mediante análisis de Curvas ROC.

www.bdigital.ula.ve

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

Para la clonación y expresión de los fragmentos antigénicos N-terminal (N1) y C-terminal (N2) de la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2, cepas de *Escherichia coli* **XL1-Blue** (*endA1 gyrA96(na1R) thi-1 recA1 re1A1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)*), **BL21 (DE3)** (*F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])*) y **BL21-Gold(DE3)** (*F- dcm+ Hte ompT hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3) endA Tet^r*) fueron cultivadas axenicamente a 37°C con agitación constante en medios Luria Bertani (LBM) (NaCl 1% (p/v); extracto de levadura 0,5% (p/v) y peptona 1% (p/v)) y Terrific Broth (TB) (Tryptona 2%, extracto de levadura 2,4%, glicerol 0,4%, KH₂PO₄ 1,13mM, K₂HPO₄ 3,6 mM) y colectadas para su uso una vez alcanzada la fase estacionaria a una densidad optica a 600 nm de 1,2 y 4 respectivamente.

5.2. Predicción de epítopes lineales y estructurales de los dominios de la proteína N

Para este fin se utilizó el predictor ElliPro, el cual utiliza un método de predicción de epítopes lineales y cónicos basado en la estructura tridimensional de la proteína. También se utilizaron varios trabajos publicados recientemente que determinaron experimentalmente los epítopes más antigénicos en el progreso temporal de la respuesta humoral desencadenada, así como el nivel de ruido de fondo (reacciones cruzadas) de las diferentes regiones estructurales de la superficie de la proteína N.

El análisis de bioinformática permite determinar las secuencias más antigénicas (lineales como estructurales) sobre la conservación y especificidad de la proteína N del SARS-CoV-2 respecto a otros coronavirus, así como la predicción de epítopes dominantes de N en células B y las diferencias en los niveles de anticuerpos específicos IgM e IgG para estos epítopes (Shen y col, 2021).

5.3. Clonaje de las secuencias que codifican para los dominios N1 y N2 de la proteína N del SARS-CoV-2

Con base en los análisis previos de la estructura y antigenicidad de la proteína N del SARS-CoV-2 (aislado Wuhan), dos regiones del gen N que se extiende 1200 pares de bases (GenBank: YP_009724397.2) fueron delimitadas para llevar a cabo eventos de clonaje y expresión independientes. Estas regiones comprenden los primeros 522 y los últimos 867 pares de bases de nucleótidos del gen con un área de solapamiento entre ellas de 123 pb, las cuales codifican para los dominios NTD y CTD y parte de la región intrínsecamente desordenada LKR de la proteína, a quienes por razones prácticas les fue designada la nomenclatura de N1 y N2 respectivamente.

5.3.1. Diseño de Oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos génicos N1 y N2

Para la amplificación por separado de ambos dominios (N1 y N2), fueron diseñados dos pares independientes de oligonucleótidos sentido y antisentido, cuyas secuencias se muestran a continuación:

Dominio N1:

Sentido 5'- GGCTTATCACCGATTATGGCGCGCA-3'

Antisentido 5'- GGGCATGCTAAGGCTTCCGCATAATTGCCTT-3'

Dominio N2:

Sentido 5'-GGCATAAG CCAACGGTAGGTGGATTGAA-3'

Antisentido 5'- GG GGATGCTAAGTCGTGTGGCTGCGTAC-3'

Cada oligonucleótido fue diseñado añadiendo un sitio de corte para una endonucleasa, que precede a la secuencia de alineamiento. Los cebadores sentido incluyen un sitio de corte para *NdeI*, mientras que los antisentido lo poseen para *BamHI*. Estos sitios de corte se muestran subrayados y resaltados en negrita. La

síntesis de ambos pares de cebadores fue llevada a cabo por Macrogen en Corea del Sur.

5.3.2. Condiciones de amplificación de los fragmentos génicos N1 y N2

Ambos fragmentos génicos fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, 1986). La reacción fue llevada a cabo en una mezcla de 100 μ L de volumen total que contenía: oligonucleótidos (sentido y antisentido) 0,2 μ M, una mezcla en proporciones iguales de deoxinucleótidos trifosfato a una concentración de 0,2 mM, 2,5 U de GoTaq ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2.5 mM, tampón 5X Green GoTaq 1X y 1ug de ADN molde pET28-Proteína N de SARS-CoV-2, una construcción previamente sintetizada en DIAGEN para el diseño de un kit de diagnóstico basado en la detección de anticuerpos específicos para la proteína N mediante ELISA indirecto en pacientes COVID-19 positivos. Controles negativos también fueron llevados a cabo siguiendo el mismo protocolo de reacción en ausencia de ADN molde. Los ciclos de temperaturas mantenidos y tiempos utilizados para la amplificación consistieron en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, seguido de 1 minuto de alineamiento a 62°C, 1 minuto de elongación a 72°C, finalizando con 15 minutos a 72 °C, empleando un termociclador 2720 thermal cycler, Applied Biosystems. Finalmente, los amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 0,8% (p/v) y purificados de los mismos con el Kit *Wizard SV gel and PCR clean-up System* (Promega™) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

5.3.3. Clonamiento de los fragmentos génicos amplificados de N1 y N2 en el vector pGEM-T easy

Los amplificados purificados fueron ligados al vector de clonaje pGEM-T easy vector (Promega™) (Figura 10), siguiendo el protocolo de la casa comercial. La mezcla de ligación vector-inserto fue preparada con las siguientes proporciones: 10 μ L 1X de 2X *Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase*, 50 ng de pGEM®-T Easy Vector, 150 ng del producto de PCR purificado (N1 o N2) y 3U de *T4 DNA Ligase* y subsecuentemente incubada 12 horas a 4°C para incrementar la

probabilidad de obtener un gran número de colonias portadoras de plásmidos recombinantes después de la transformación.

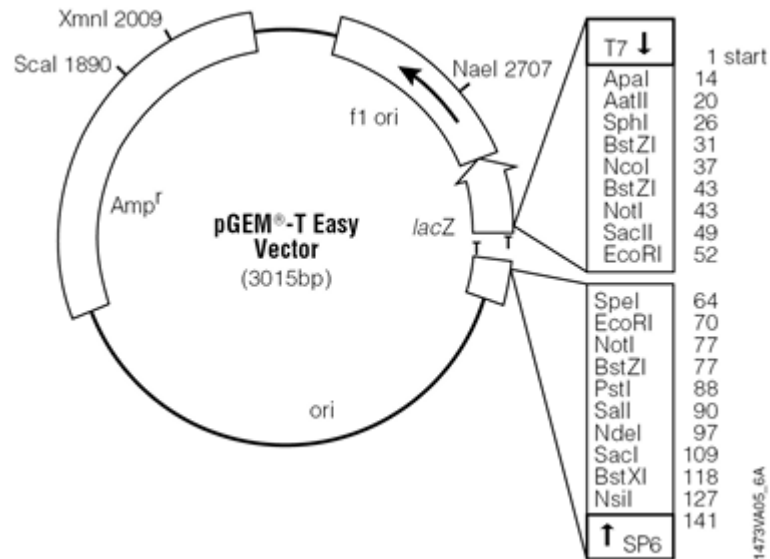


Figura 10. Mapa genético del vector pGEM®-T Easy

El vector pGEM®-T Easy brinda un sistema conveniente para clonar productos de PCR portadores de un residuo de deoxiadenosina en los extremos 3' mediante el apareamiento complementario entre estas últimas y los residuos deoxitimina libres en los extremos 3' del vector prelinearizado. El sitio de clonación múltiple de este vector enmarcado en el interior de la región codificante para el péptido α de la enzima β -galactosidasa se encuentra flanqueado por los promotores T7 de la ARN polimerasa y SP6. La interrupción del marco abierto de lectura del péptido α mediada por la inserción de los amplificadores de PCR a clonar facilita la identificación de los clones recombinantes de aquellos portadores de plásmidos vacíos, mediante la variación de la coloración azul blanca respectivamente en colonias crecidas en placas suplementadas con IPTG y X-GAL.

5.3.4. Obtención de transformantes pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2

Con el objetivo de obtener colonias bacterianas portadoras de ambas construcciones, las mezclas de ligación preparadas para ambos fragmentos (N1 y

N2) se usaron para transformar la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* mediante dos métodos: Químico de competencia y físico de electroporación.

5.3.4.1. Transformación en células competentes de *E. coli*.

Para la obtención de transformantes portadores del constructo pGEM®-T Easy-N1 se empleó el método de cloruro de calcio descrito por Cohen y col, (1972). Células de *E. coli* XL1-Blue provenientes de un cultivo de 50 mL en fase exponencial e incubado durante media hora a 4°C, fueron transferidas a tubos de propileno de 50 µL previamente esterilizados y enfriados y colectadas por centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos y a 4°C. Seguidamente el sedimento celular fue resuspendido cuidadosamente en 10 mL de solución fría de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM; glicerol 15% (v/v) en buffer PIPES 10 mM pH: 7) y lavado por centrifugación a 3000 xg por diez minutos a 4°C. Transcurrido esto, el sedimento resultante fue suspendido en 4mL de la misma solución y posteriormente alicuotado en volúmenes de 400 uL para su posterior uso en los ensayos de transformación siguiendo el protocolo de Sambrook y Russell, (2001) con algunas modificaciones.

En este sentido, 100 µL de células competentes fueron cuidadosamente mezcladas con 10 µL del producto de ligación pGEM®-T Easy-N1 e incubadas sobre hielo por 30 minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla de transformación fue sometida a un choque térmico de 1 minuto a 42°C, seguido de un minuto sobre hielo y ulteriormente resuspendida en 900 µL de medio LB e incubada por 1 hora a 37°C con agitación. Culminada esta fase de recuperación, las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en 100 µL de medio LB y rastrilladas sobre placas de medio LB agarizado suplementado con 0,1mg/mL de X-Gal, 40 µg/mL de IPTG, 100 µg/mL de ampicilina y 12,5 µg/mL de tetraciclina.

5.3.4.2. Transformación Bacteriana por Electroporación

Para la obtención de transformantes portadores de la construcción pGEM®-T Easy-N2 fue empleado el método físico de electroporación. Células de *E. coli* XL1-Blue provenientes de un cultivo de 50 mL en fase exponencial fueron incubadas durante media hora sobre hielo y posteriormente colectadas por centrifugación a 3000xg por 20 minutos a 4°C. El sedimento resultante fue lavado

por centrifugación con 50 mL de agua mQ fría tres veces en esquemas de 20 minutos. El sedimento celular resuspendido en 2 mL en agua mQ se utilizó para preparar reacciones de electroporación en una relación de 390 μ L de células por cada 10 μ L de mezcla de ligación pGEM®-T Easy-N2 que subsiguientemente fueron electroporadas aplicando pulsos de 2,5 KV en un electroporador Eppendorf electroporator 2510. Una vez culminado el choque eléctrico las células fueron rápidamente transferidas a tubos falcon contenientes de 1 mL de de medio LB e incubadas durante 1 hora a 37°C y agitación constante a 180 rpm a fin de favorecer su recuperación. Finalmente, las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en 100 μ L de medio LB y rastrilladas sobre placas de medio LB agarizado suplementado con 0,1mg/mL de X-Gal, 40 μ g/ml de IPTG, 100 μ g/mL de ampicilina y 12,5 μ g/mL de tetraciclina.

5.3.5. Selección de Transformantes pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2: PCR de Colonias

La evaluación de colonias transformantes positivas para pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2 (blancas) fue llevada a cabo mediante PCR de colonias. Una pequeña cantidad de las colonias a ser evaluadas fue resuspendida por separado en 20 μ L de agua mQ estéril y posteriormente sometidas a calentamiento durante 5 minutos a 100°C a fin de favorecer la liberación del ADN. Transcurrido este tiempo las muestras fueron enfriadas sobre hielo durante 5 minutos y posteriormente centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante (portador de ADN plasmídico) usado como ADN molde para las reacciones de amplificación por PCR. Los amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 0,8% (p/v) y las colonias con mayor intensidad de señal fueron seleccionadas como punto de partida para realizar los ulteriores ensayos de subclonamiento en el vector de expresión.

5.3.6. Secuenciamiento de las construcciones pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2

A fin de verificar la longitud y secuencia correcta de los fragmentos clonados, ADN plasmídico purificado a partir de las colonias positivas seleccionadas mediante PCR de colonias usando el kit de purificación "Wizard®

Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) fueron enviadas a secuenciar en los laboratorios de Macrogen Korea. Para ello, la concentración de ADN plasmídico en ambos casos fue determinada espectrofotométricamente y el volumen correspondiente a 2 µg de cada constructo fue alicuotado en tubos eppendorff y posteriormente sometidos a deshidratación en un rotaevaporador *Concentrator 5301* (Eppendorf).

5.3.7. Subclonamiento de los fragmentos N1 y N2 en el Vector de expresión pET28a

Las colonias positivas para las construcciones para pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2 fueron crecidas en medio LB suplementado con los antibióticos de selección, ampicilina (100 µg/mL) y tetraciclina (12,5 µg/mL) y el ADN plasmídico fue purificado con el Kit *Wizard plus SV miniprep* de Promega™ siguiendo las indicaciones de la casa comercial y subsecuentemente cuantificado por medición espectrofotométrica. Conocida la concentración de los plásmidos purificados, se procedió a realizar el subclonamiento de los fragmentos génicos N1 y N2 en el vector de expresión pET28a de Novagen. Para ello, ambos fragmentos fueron liberados del vector pGEM®-T Easy a través de digestión enzimática de 1 µg total de plásmido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* de Promega, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. A la par, el vector de expresión fue linearizado empleando las mismas enzimas de restricción y finalmente purificado junto con los fragmentos previamente digeridos a partir de un gel preparativo de agarosa al 0,8% (p/v) con el kit *Wizard SV gel and PCR clean-up System* (Promega™).

Una vez purificados vector de expresión y fragmentos génicos, las mezclas de ligación inserto-vector fueron preparadas para un volumen final de 10 µL bajo las mismas condiciones arriba descritas para la ligación de los fragmentos en el vector de clonamiento pGEM®-T Easy. Las mezclas de ligación resultantes fueron empleadas para transformar células competentes de la cepa XL1-Blue de *E. coli*, como fue descrito anteriormente y las colonias transformantes fueron evaluadas por PCR de colonias, a fin de seleccionar aquellas portadoras de las

construcciones pET28-N1 y pET28-N2. Las colonias positivas para ambos constructos fueron crecidas en 5 mL de medio LB suplementado con 12,5 µg/mL de Tetraciclina y 33 µg/mL de Kanamicina como antibióticos de selección y colectadas por centrifugación como material de partida para la purificación de ADN plasmídico que fue finalmente usado para transformar células de la cepa de expresión BL21 DE3 de *E. coli*.

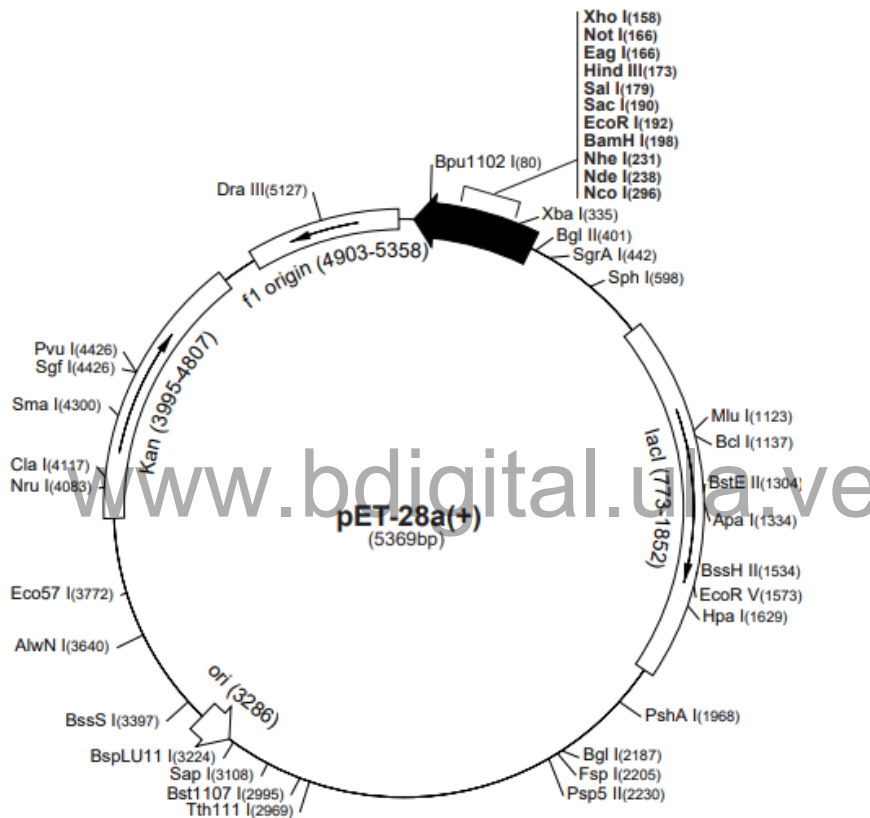


Figura 11. Mapa genético del vector de expresión pET28a

El vector pET28a (Figura 11), es uno de los plásmidos ampliamente usados en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, que utiliza el promotor del fago T7 regulado por la región operadora del operón lac para promover una expresión génica controlada e inducida por lactosa o IPTG. Adicionalmente este sistema permite expresar proteínas con una etiqueta de polihistidinas N-terminal, lo cual facilita su purificación a través de cromatografía de afinidad a metales (IMAC). La selección de transformantes es facilitada por la presencia en este vector de un gen de resistencia a kanamicina.

5.4. Expresión y purificación de los dominios NTD- N1 y CTD -N2

5.4.1. Verificación de la expresión de los antígenos recombinantes N1 y N2

A fin de verificar la correcta expresión de ambos antígenos recombinantes, NTD-N1 y CTD-N2, una cinética de inducción fue realizada como se describe a continuación. Inóculos de 10 mL de las cepas BL21(DE3)-pET28a-N1 y BL21(DE3)-pET28a-N2 fueron preparados en medio LB suplementado con 33 µg/mL de kanamicina respetando una dilución 1/100 pre-inóculo/medio e incubados a 37°C con agitación constante (180rpm) hasta alcanzar una DO (600nm) de 0,6 correspondiente a la fase exponencial. En este punto, la inducción de la expresión fue llevada a cabo mediante la adición de isopropil-d-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 200 µM. Una vez realizada la inducción, la cinética fue llevada a cabo tomando alícuotas de 1mL del cultivo cada hora durante 3 horas. Posteriormente, sedimentos celulares de ambos cultivos fueron obtenidos por centrifugación a 13400 rpm durante 5 minutos y subsecuentemente resuspendidos en 100 µL de Buffer Sampler. El ADN de todas las muestras fue fragmentado mecánicamente y la inducción se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (p/v) bajo condiciones desnaturalizantes.

5.4.2. Cultivo de bacterias y ruptura celular

Un inóculo de 250 mL BL21(DE3)-pET28a-N1 y/o BL21(DE3)-pET28a-N2 preparado a partir de una dilución 1/100 de un preinóculo realizado con una colonia en medio LB suplementado con 33 µg de kanamicina y crecido hasta una DO a 600nm de 0,8 fue inducido con IPTG a una concentración final de 200 µg e incubado por 16 horas a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de inducción, el cultivo fue dividido en volúmenes de 50 µL y posteriormente las células fueron cosechadas por centrifugación durante 15 minutos a 7500 rpm.

El sedimento celular resultante fue lavado 2 veces con un volumen de 30 mL de tampón PBS 20 mM pH 7,6, resuspendido en 40 mL de tampón de lisis/lavado-N1 (Tris-HCl 25 mM pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol) o

tampón de lisis-N2 (Tris-HCl 25 mM pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol), según fuera el caso, suplementado con 1 μ M de inhibidores de proteasas, 1 mM de PMSF y 20 mg totales de lisozima y almacenado a -20 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo la mezcla de lisis fue descongelada, suplementada con 2,4 μ g totales de DNasa y RNasa e incubada 30 minutos sobre hielo. La ruptura celular fue culminada por sonicación en frío empleando 8 pulsos de 20 segundos espaciados entre ellos por un tiempo de 2 minutos. Subsecuentemente, el lisado resultante fue clarificado por centrifugación durante 15 minutos a 7500 xg y el sobrenadante filtrado a través de un filtro de 0,22 μ m. Alícuotas del lisado sin clarificar, clarificado (sobrenadante filtrado) y pellet fueron reservadas para su posterior visualización en geles de poliacrilamida al 12,5 %.

5.4.3. Purificación del dominio N1

La purificación del dominio N-terminal de la Proteína N1 recombinante se hizo mediante cromatografía de afinidad a metales columna HiTrap™ IMAC de 1mL (Merk) en un equipo Biologic Duo Flow (BIO-RAD). El sobrenadante clarificado fue cargado en la columna previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de lisis/incubación (Tris-HCl 25 mM pH 8, 500 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol. Posteriormente, fueron realizados lavados de la resina con 10 volúmenes de tampón de lisis/incubación-N1 suplementado con 10 mM de imidazol, 50 mM de imidazol en tampón de lavado 2 (Tris-HCL 25 mM, pH 7.4), y 250 mM de imidazol en tampón de lavado 3 (Tris-HCL 25 mM, pH 7.4,) respectivamente. Finalmente, la elución fue llevada a cabo mediante un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM en tampón de elución (Tris-HCL 25 Mm, pH 7.4). 20 fracciones de 2mL fueron colectadas y posteriormente visualizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%.

5.4.4. Purificación del dominio N2

La purificación del dominio (N2) recombinante fue llevada a cabo también mediante cromatografía de afinidad a metales IMAC empleando una columna HiTrap™ IMAC de 5mL (Merk) en un equipo Biologic Duo Flow (Biorad) siguiendo

las indicaciones de la casa comercial con algunas modificaciones adaptadas a las características fisicoquímicas de este dominio. El lisado clarificado fue cargado en la columna previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de unión-N2 (Tris-HCl 25 mM pH 8, 200 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol) y re-circularizado a través de ella dos veces más a fin de favorecer la unión de la proteína recombinante a la resina. Culminada esta fase de interacción un lavado con 10 volúmenes de tampón de lavado-N2 (Tris-HCl 25 mM pH 8, 200 mM de NaCl) fue realizado. Culminado el lavado, la elución del fragmento peptídico fue llevada a cabo con tampón de elución-N2 (Tris-HCl 25 mM pH 8, 200 mM de NaCl) a través de un gradiente lineal de imidazol entre 200 y 500 mM en un Duo-flow (BioRad) a una velocidad de corrida de 4mL/minuto. 75 fracciones de 2mL fueron colectadas y posteriormente visualizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%. Todos los tampones utilizados en la purificación fueron suplementados en frío con 1mM de β -Me y PMSF.

5.4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

A fin de verificar la pureza de los antígenos recombinantes las muestras fueron cargadas y corridas en una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12,5 % y/o al 15% siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). El gel concentrador fue preparado a una concentración de 5% de acrilamida, a partir de una solución stock de acrilamida al 30% (p/v) en tampón para gel concentrador y agua destilada para un volumen final de 5mL, suplementado con 0,1% (p/v) de persulfato de amonio (PSA). Al mismo tiempo, El gel de resolución fue también preparado usando una solución de acrilamida preparada al 30% (p/v), respetando una relación 29:1 (acrilamida:bisacrilamida), en tampón para gel de resolución y agua destilada suplementado con 0,1% de PSA para un volumen final de 5mL. En ambos casos la polimerización fue inducida con 0,16% (v/v) de TEMED. Por otra parte, las muestras a ser analizadas mediante esta técnica fueron previamente mezcladas con tampón de carga en una relación 1:2 muestra: tampón de carga,

desnaturalizadas por calor durante 5 minutos a temperatura de ebullición y posteriormente centrifugadas durante 30 segundos a máxima velocidad en una centrifuga Eppendorf (miniSpin). Culminado este procedimiento las muestras fueron cargadas en los geles y la separación electroforética fue subsecuentemente realizada en tampón de corrida a 20 mAmp/gel y voltaje libre empleando el sistema para mini geles Hoeffer. Finalmente, los geles fueron teñidos con solución colorante para geles de poliacrilamida durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Los geles fueron decolorados con solución decolorante para geles de poliacrilamida durante el tiempo necesario para observar un resultado nítido.

5.4.6. Determinación de la Concentración de Proteínas

La concentración de proteínas en los pools de las proteínas purificadas fue determinada mediante dos métodos diferentes, Lowry (Lowry, 1951) y Bradford (Bradford, 1976), realizando una curva de calibración estándar con una solución 1mg/mL de albumina de suero bovino (BSA).

www.bdigital.ula.ve

5.5. Producción y purificación de anticuerpos policlonales contra los antígenos recombinantes

5.5.1. Producción y titulación de anticuerpos policlonales α -N1

Anticuerpos policlonales contra el dominio N-terminal (α -N1) fueron producidos por inmunización de un conejo macho de 4 meses con el antígeno N1 recombinante purificado a homogeneidad. El esquema de sensibilización consistió de 11 inoculaciones intradérmicas de 150 μ g totales por vez distanciadas una de otra de 10 a 12 días. En cada inoculación fueron mezclados volúmenes de proteína recombinante diluida en tampón fosfato salino (PBS), hasta completar 1mL total, con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund con la ayuda de dos inyectadoras conectadas por un puente, excepto la primera inoculación que fue realizada con adyuvante completo de Freund y la última inoculación con la proteína diluida en PBS en ausencia de adyuvante.

Luego de transcurrida la tercera inmunización muestras de sangre fueron tomadas por escisión de la vena del pabellón auditivo del conejo cada 10 o 12 días a fin de llevar a cabo la titulación de los anticuerpos generados por el animal. Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos, a fin de obtener los sueros. En los subsiguientes ensayos de titulación los sueros preinmune e inmunes fueron diluidos de forma seriada y evaluados a través de ELISA indirecto en placas previamente sensibilizadas con 200ng/pozo del antígeno N1. Cuando se obtuvo un buen título, 150 mL de sangre fueron obtenidos por un número de 4 punciones cardiacas del conejo y el suero obtenido fue fraccionado y almacenado a -20°C para su posterior uso en los ensayos de inmunocaptura del antígeno N en suero humano.

5.5.2. Producción de anticuerpos policlonales α -N2

La producción de anticuerpos policlonales contra el dominio C-terminal (α -N2) fue realizada por inmunización de una cabra hembra de 6 meses de edad con la proteína N2 purificada a homogeneidad como antígeno. En este caso el esquema de inmunización requirió de 5 inoculaciones subcutáneas de 350 μ g totales del antígeno recombinante, realizadas de manera repartida sobre la región escapular del animal. La preparación del antígeno a inocular fue realizada tal y como se describió para el antígeno N1, siendo la primera inoculación llevada a cabo en presencia de adyuvante completo de Freund, la segunda, tercera y cuarta inoculación con adyuvante incompleto de Freund y la quinta en ausencia de adyuvante y con PBS. De la misma forma, una vez transcurrida la tercera inmunización se tomaron muestras de sangre de 1mL por escisión de las venas del pabellón auditivo de la cabra para la obtención de los sueros inmunes tal y como fue descrito anteriormente. La titulación de los sueros también fue llevada a cabo mediante ELISA indirecto en placas sensibilizadas con 200 ng/pozo del antígeno N2.

Luego de obtener buenos títulos durante la cuarta y quinta sensibilización, se procedieron a realizar 4 extracciones de 60 mL de sangre mediante punción de

la yugular, que rindieron un volumen de suero total α -N2 de 180 mL y se fraccionó y almacenó a -20°C para su posterior uso.

5.5.3. Purificación de Anticuerpos

La purificación de ambos anticuerpos, α -N1 y α -N2 se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (*BIO-RAD*), el cual consiste en una resina PD10 que permite la rápida desalinización de las muestras séricas y una columna DEAE Affi-Gel®blue que permite la purificación a homogeneidad de IgG de otras proteínas séricas y plasminógeno.

En ambos casos la preparación de la muestra fue llevada a cabo utilizando columnas Econo-Pac 10DG, empleando como material de partida 2,5 y 3,5 mL de suero policlonal de α -N1 y α -N2 respectivamente, previamente descongelados en frío y centrifugados durante 5 minutos a 13400 rpm. Posteriormente las muestras fueron cargadas en las columnas previamente equilibradas con 80 mL de tampón de aplicación (Tris-HCl pH 8, NaCl 0,028 M), el volumen muerto colectado y la elución del suero desalinizado fue realizada con 3,5 mL y 4mL del mismo buffer respectivamente.

Al culminar el proceso de desalinización, se procedió a cargar las muestras en la columna DEAE Affi-Gel®blue previamente equilibrada con tampón de aplicación (Tris-HCl pH 8, NaCl 0,028 M). Una vez colectado el volumen muerto 18 y 22 fracciones de 2 mL cada una fueron colectadas empleando para la elución el mismo tampón. Posteriormente las muestras purificadas fueron visualizadas mediante SDS-PAGE al 12,5% y la concentración de proteínas determinada por el método de Lowry.

5.6. Ensayos de ELISA

5.6.1. Sueros

La tabla I, muestra un resumen de la naturaleza y el número de sueros empleados en cada uno de los ensayos llevados a cabo en este trabajo. Para llevar a cabo los ensayos de caracterización antigénica de los dominios N1 y N2,

así como aquellos correspondientes al diseño del ensayo de inmunocaptura de proteína N sérica basado en la técnica de ELISA Sándwich indirecto, fueron empleadas muestras de suero negativas y positivas para SARS-CoV-2.

Tabla I. Número de sueros positivos y negativos para SARS-CoV-2 empleados por ensayo.

	N°. Sueros POSITIVOS* para SARS-CoV-2			N°. Sueros NEGATIVOS*** para SARS-CoV-2
	IgM**	IgM e IgG**	IgG**	IgM e IgG
Sensibilidad y Especificidad de N, N1 y N2, frente a sueros (+) y (-) para SARS-CoV-2	- 23 -	- - 23	23 - -	17 17 17
Detección de IgG anti (N, N1 y N2)	-	-	41	43
Detección de IgM anti (N, N1 y N2)	23	-	-	17
Captura de en N en sueros (+) para IgM	21	-	-	36
Captura de en N en sueros (+) para IgM e IgG	-	21	-	36
Captura de en N en sueros (+) para IgG	-	-	21	36
Captura de N en presencia de T20, SDS y CHAPS	23	-	-	36

* Sueros positivos para SARS-CoV-2 previamente evaluados mediante RT-PCR en tiempo real en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR).

** Sueros positivos por RT-PCR en tiempo real, posteriormente evaluados IgM, IgG e IgG/IgM con los Kit's COVID-19 iFlash y GAMA-ELISA IgM e IgG.

*** Los sueros evaluados con los Kit's COVID-19 iFlash y GAMA-ELISA IgM e IgG.

Las muestras de suero negativo incluyeron muestras prepandémicas disponibles en nuestro laboratorio (LEP), recolectadas antes del año 2020. Mientras que, las muestras séricas positivas (previamente evaluadas por RT-PCR en tiempo real), fueron donadas por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), por el Dr. Gregorio Rivas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes-IAHULA y por el Complejo tecnológico Farmacéutico del Estado Venezolano QUIMBIOTEC (IVIC) (muestras evaluadas con el kit COVID-19 iFlash). Todas las muestras donadas fueron reevaluadas mediante ELISA indirecto haciendo uso de los kits GAMÆlisa® (IgM, IgM e IgG y IgG).

Es de hacer notar que todos los sueros positivos para COVID-19 empleados durante este trabajo fueron colectados desde inicio del 20 de enero de 2021 hasta mediados del año 2023, por tanto representan una muestra heterogénea de las variantes de preocupación (VOC) y variantes de interés (VOI) de SARS-CoV-2 que circularon en Venezuela durante ese período. VOC: Gamma (primera detección 21-01-2021, última detección 29-11-2021), Alpha (primera detección 18-03-2021, última detección 03-10-2021), Delta (primera detección 24-06-2021, última detección 15-03-2022) y Ómicron y sus subvariantes BA.1-BA.5 (primera detección 09-12-2021 y última detección 2023). VOI: Lambda (primera detección 05-03-2021, última detección 11-18-2021) y Mu (primera detección 08-05-2021, última detección 17-12-2021) (Jaspe y col, 2023).

5.6.2. Detección de IgG e IgM α -N, en sueros de pacientes positivos y negativos para COVID-19

Para la detección de anticuerpos séricos de los isotipos IgM e IgG en sueros negativos y positivos para SARS-CoV-2, fueron empleados los Kits SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG y SARS-CoV-2 (COVID-19) IgM de GAMÆlisa® siguiendo las indicaciones sugeridas por la casa comercial. Muestras séricas previamente fraccionadas y almacenadas a -20°C fueron descongeladas en frío y los componentes del estuche llevados a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su utilización. Transcurrido esto, cada suero fue diluido en diluyente de muestra DIAGEN (1/100) en un volumen final de 100 μL . Subsecuentemente, las muestras diluidas fueron depositadas cuidadosamente en los pozos de microplacas de ELISA (Thermo 6506 High Binding Protein 2 strip of 8 wells) previamente sensibilizadas con 200 ng de los antígenos recombinantes N (producida previamente en DIAGEN), N1 y N2 según fuese el caso, incluyendo el blanco (diluyente de muestra) y el control negativo (suero negativo en diluyente de muestra). Los pozos fueron recubiertos con film plástico (envoplast) e incubados a 37°C durante 30 minutos. A continuación, los pozos fueron lavados 5 veces con 250 μL de solución de lavado. Finalizado el último lavado, el líquido residual fue eliminado invirtiendo la microplaca y golpeándola varias veces sobre papel

absorbente. A los pozos lavados se les continuó el procedimiento agregando 100 μL de $\alpha\text{-IgM}$ humano/HRP (Jackson ImmunoResearch) (diluida 1/5.000) o $\alpha\text{-IgG}$ humano/HRP (Jackson ImmunoResearch) (diluida 1/10.000) en diluyente de conjugado (DIAGEN) en cada pozo y agitando cuidadosamente la microplaca durante 10 segundos antes de llevar a incubar durante 30 minutos a 37°C . Terminada la incubación, los pozos fueron lavados con 250 μL de solución de lavado, drenando el líquido residual mediante inversión sobre papel absorbente y se continuo agregando en cada pozo un volumen de 100 μL de solución cromógeno/sustrato (DIAGEN) (3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). La reacción de revelado fue entonces incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente y se detuvo agregando a cada pozo 100 μL de la solución de parada DIAGEN (ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N). Finalmente, el registro de la absorbancia a 450nm se realizó usando un lector de placas de ELISA Multiscan Thermofisher.

5.6.2.1. Estimación de la sensibilidad, especificidad y punto de corte o cut-off de los polipéptidos N, N1 y N2 mediante analisis de curvas ROC

La sensibilidad es un parámetro que expresa la proporción de muestras positivas que son correctamente identificadas como reactivas por el estuche de diagnóstico con las que son evaluadas, mientras que la especificidad define la proporción de muestras negativas que son correctamente identificadas como no reactivas con la herramienta de diagnóstico (Cura y Wendel, 1994; Vizcaíno-Salazar, 2017; Trevethan, 2017). Las muestras reactivas y no reactivas con el estuche de diagnóstico de prueba requieren haber sido evaluadas por otro estuche de diagnóstico confiable o de referencia a fin de contrastar el desempeño de la herramienta de diagnóstico en prueba. Ambos parámetros están definidos matemáticamente como:

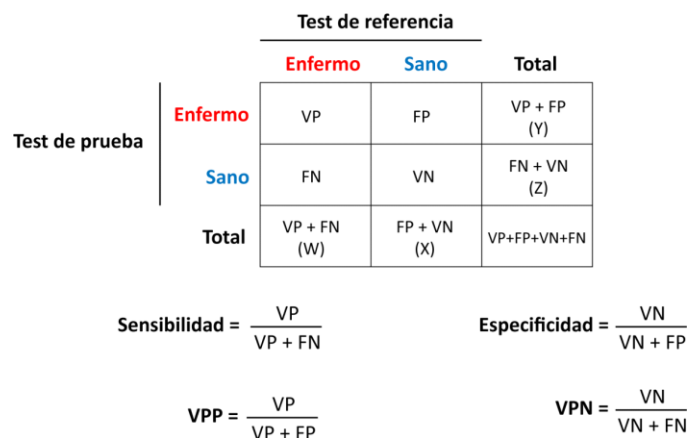


Figura 12. Diagrama del ordenamiento de los datos obtenidos de la evaluación con el test de referencia y el test de prueba. Las fórmulas para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) están indicadas. VP: verdadero positivo; VN; verdadero negativo; FP: falso positivo; FN: Falso negativo. El total es la suma de VP+VN+FP+FN=N.

El valor predictivo de una prueba diagnóstica, es un parámetro que define la probabilidad de estar infectado cuando la evaluación con la herramienta de diagnóstico en cuestión ha resultado positiva (valor predictivo positivo) o la probabilidad de carecer de la condición o enfermedad cuando la evaluación con la herramienta de diagnóstico en cuestión ha resultado negativa (valor predictivo negativo) (Cura y Wendel, 1994; Vizcaíno-Salazar, 2017; Trevethan, 2017) (Figura 12).

Las curvas ROC (Receiving Operating Characteristic curve, por sus siglas en inglés), son un método estadístico útil para determinar la exactitud y desempeño de las pruebas de diagnóstico que generan resultados de relevancia clínica. Esta metodología fue desarrollada en los años 50 específicamente para el análisis de ondas de radar, sin embargo, en la actualidad son ampliamente usadas en el ámbito de las ciencias médicas (Kumar y Indrayan, 2011; Vizcaíno-Salazar, 2017). Las curvas ROC facilitan la determinación de los parámetros de sensibilidad y especificidad, los cuales son necesarios para evaluar la validez de una herramienta de diagnóstico; además del punto de corte más apropiado en el que los valores de sensibilidad y especificidad son óptimos para discriminar entre pacientes sanos y enfermos.

Una curva ROC es la representación gráfica de la sensibilidad vs 1-especificidad como se muestra en la Figura 13. La curva resultante está contenida

en un cuadro de área 1 en el que también se representa una línea diagonal que divide el espacio en dos mitades. Dicha línea, representa un área de 0.5 o el 50% del área total. Mientras mayor o más cercana a 1 sea el área bajo la curva (AUC), mejor será el desempeño de la prueba de diagnóstico (Cerdea y Cifuentes, 2012). Visto desde otro ángulo, una prueba experimental que describa una curva cercana a la línea diagonal, será indicativo de que la prueba en cuestión no ofrece ninguna discriminación o diferencia entre personas sanas y enfermas. Por el contrario, mientras la curva experimental tenga una mayor aproximación al punto 1 en el eje Y (sensibilidad), el poder de la prueba como herramienta de diagnóstico incrementa (Cerdea y Cifuentes, 2012; Vizcaíno-Salazar, 2017).

En la figura 13 se muestran tres curvas que describen un excelente, aceptable y pobre desempeño en un sistema de diagnóstico hipotético. Con esta metodología también es posible comparar entre métodos de diagnóstico basados en el mismo principio comparando el valor del AUC de cada curva. Cuando se determina el valor de corte o cutoff usando las curvas ROC, la selección de un valor puntual no define necesariamente los valores de sensibilidad y especificidad más altos. Escoger un punto de corte donde ambos parámetros sean altos se puede realizar mediante el índice de Youden, el cual establece el cutoff donde la sensibilidad y la especificidad son las más óptimas. Finalmente, la selección de ese punto de corte también dependerá del objetivo del diagnóstico, es decir, si se desea favorecer la sensibilidad sobre la especificidad o viceversa.

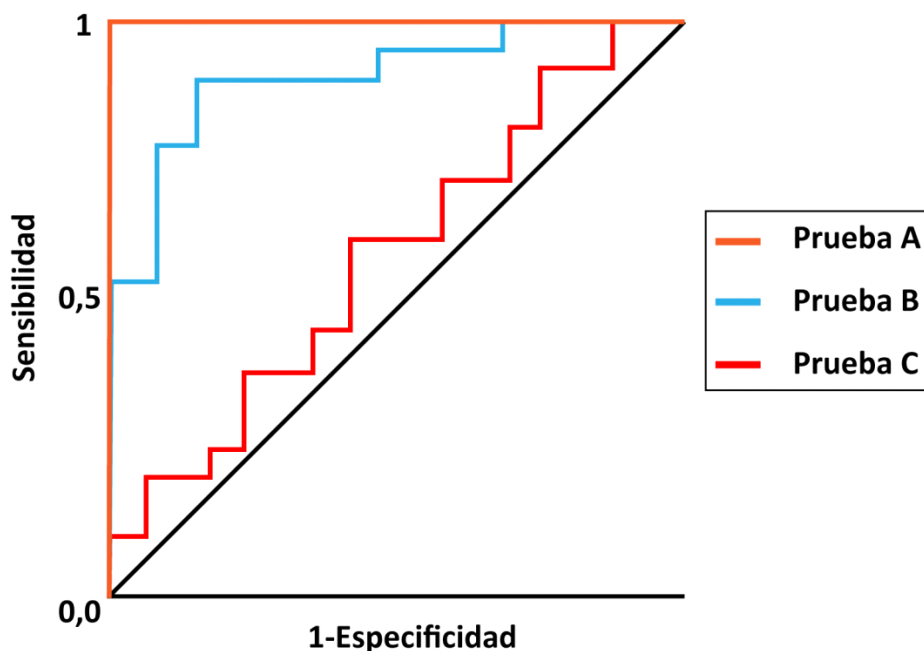


Figura 13. Representación gráfica de tres curvas ROC. Las curvas cercanas al punto 1 en el segmento superior izquierdo (pruebas A y B) describen una mayor precisión y desempeño de los sistemas diagnósticos. La prueba C, más cercana a la diagonal, es ejemplo de una prueba de diagnóstico deficiente que no ofrece discriminación entre grupos.

Los valores de absorbancia obtenidos en la detección de los isotipos de anticuerpos IgG e IgM específicos para N, N1 y N2, en sueros de pacientes positivos y negativos para COVID-19, fueron representados en gráficos de dispersión de puntos mientras que los análisis de la sensibilidad, especificidad y el valor de corte o cutoff se realizaron con la metodología de las curvas ROC. Todos los gráficos fueron elaborados con GraPhpad Prism 7.

El cut-off es un valor referencial que puede estar expresado como un valor de absorbancia o de concentración dependiendo del caso. Dicho valor delimita y establece la posición de aquellas muestras que son negativas o no reactivas ($D.O < \text{cut-off}$) de aquellas que son positivas o reactivas ($D.O > \text{cut-off}$). El incremento del número de desviaciones dependerá de que tan dispersos son los datos de absorbancia de los sueros negativos respecto de su valor promedio; es decir, mientras mayor sea la dispersión, se incrementará el número de desviaciones que se suman al promedio para obtener el punto de corte. Este valor de corte no es estático, sino que puede modificarse a criterio del evaluador con el fin de favorecer

un equilibrio entre los parámetros de especificidad y sensibilidad (Cura y Wendel, 1994). El punto de corte se calculó como el promedio de una muestra de sueros negativos sumando tres desviaciones estándar y también mediante el análisis de las curvas ROC (mejor valor de cut-off).

5.7. Determinación de la combinación de anticuerpos a ser empleada en el desarrollo de un sistema de inmunocaptura de la proteína N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN)

Resultados previos han sugerido que la proteína N de los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV2 puede ser detectada por ELISA en muestras de sueros de pacientes positivos durante el periodo ventana de la infección, fungiendo como un interesante biomarcador para el diagnóstico temprano del COVID-19. Dado que la caracterización antigénica realizada en este trabajo permitió corroborar el valor diagnóstico de los antígenos recombinantes producidos en nuestro laboratorio (N, N1 y N2), el siguiente paso fue estandarizar el sistema de inmunocaptura del antígeno N basado en un ELISA sándwich indirecto. Para ello, se procedió a determinar la mejor combinación de anticuerpos captura/primario que permitiese capturar el antígeno con un mayor grado de sensibilidad en el rango de 10-500 pg/mL, el cual corresponde al rango de las concentraciones de proteína N que se han logrado detectar en suero de pacientes en estados convalecientes y severos.

Los anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización en conejo contra las proteínas N completa (DIAGEN) y N1, así como en cabra contra el dominio N2 purificados y estabilizados en solución 4.3 (DIAGEN) fueron empleados para la realización de las siguientes combinaciones anticuerpo de captura/anticuerpo primario: α -N/ α -N2, α -N2/ α -N, α -N2/ α -N1 y α -N1/ α -N2 siguiendo la metodología descrita a continuación. Los pozos de las placas de ELISA fueron sensibilizados durante toda la noche a 4 °C de manera independiente con 200 ng de los anticuerpos α -N, α -N1 o α -N2 en tampón de unión Tris-HCl 10 mM a pH 8,5 en lugar del tampón de unión del estuche GAMÆlisa® (tampón carbonato pH 9,6), a fin de garantizar la estabilidad estructural y funcional de los anticuerpos.

Los pozos fueron lavados tres veces con 250 μL de solución de lavado GAMÆlisa® y bloqueadas con solución de bloqueo durante dos horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo la solución de bloqueo fue eliminada mediante tres lavados con el mismo volumen de solución de lavado. Seguidamente, los pozos fueron incubados durante una hora a 37 °C con 50 μL de suero IgM positivo o negativo para COVID-19 como fuente de proteína N natural (libre en suero) diluidos en diluyente de muestra hasta completar un volumen final de 150 μL por pozo. Culminado este tiempo los pozos fueron lavados nuevamente y se incubaron una hora a 37 °C con los anticuerpos primarios diluidos 1/100 en diluyente de muestra (DIAGEN), respetando el esquema de combinaciones señalado anteriormente. La incubación con los conjugados fue realizada según fuese el caso con α -IgG de conejo (producido en cabra)/HRP o α -IgG de cabra (producido en conejo)/(HRP) a una dilución 1/10.000 en diluyente conjugado (DIAGEN) por media hora a 37 °C. El revelado fue llevado a cabo añadiendo a cada pozo 100 μL de TMB/H₂O₂ (DIAGEN) y la reacción se detuvo después de treinta minutos con 100 μL de solución de parada (DIAGEN). Finalmente, las placas se midieron a 450 nm en un lector para placas de ELISA.

En todos los ensayos realizados se incluyó un blanco (diluyente de muestra), control negativo (suero negativo, sin anticuerpo primario) y control positivo (5 ng de proteína N recombinante).

5.8. Curva de calibración para la cuantificación de la proteína N con el sistema de inmunocaptura de antígeno ELISA sándwich indirecto α -N2/N/ α -N

La curva estándar de N para el sistema de inmunocaptura de antígeno ELISA sándwich indirecto fue realizada utilizando la combinación de anticuerpos captura/primario (α -N2/ α -N), ya que esta combinación permitió capturar de manera eficiente la proteína N en muestras de suero en comparación con el resto de las combinaciones evaluadas. Dicha curva fue construida empleando concentraciones crecientes de la proteína N recombinante purificada a homogeneidad (DIAGEN) en

un rango entre 5.000 y 32.000 pg/mL, preparadas por diluciones seriadas a partir de un stock en tampón de incubación (PBS ELISA pH 7,2). El rango de concentraciones fue elegido por debajo de las concentraciones de saturación, a fin de garantizar la linealidad de los resultados obtenidos.

Cada una de las diluciones de la proteína N recombinante fue realizada por triplicado y utilizadas en los ensayos de inmunocaptura siguiendo el protocolo de ELISA sándwich indirecto N2/N/ α -N descrito anteriormente, en presencia de 50 μ L de un suero negativo prepandemia. Finalmente, los promedios de los valores de absorbancia obtenidos para cada dilución fueron graficado vs la concentración de proteína N recombinante (pg/mL), con la desviación estándar.

5.9. Determinación del efecto opsonizante de los anticuerpos IgG α -N de pacientes COVID-19 positivos sobre la proteína N recombinante

A fin de determinar la competencia existente entre los anticuerpos IgG opsonizantes presentes en sueros positivos para COVID-19 y los anticuerpos de captura α -N2 (fijados en los pozos de las placas de ELISA) se procedió a realizar un ensayo de inhibición por ELISA bajo las condiciones de inmunocaptura previamente descritas. Pozos de ELISA sensibilizados con 200 ng de anticuerpo policlonal α -N2, lavados y bloqueados fueron incubados durante 1 hora a 37°C con una mezcla previamente incubada de 5 ng de proteína N recombinante y volúmenes crecientes de suero de un paciente IgG positivo para COVID-19 (5-25 μ l) en diluyente de muestra, hasta completar un volumen final de 100 μ L/pozo, realizando como control el mismo procedimiento con un suero IgG negativo. Culminado el tiempo de incubación, las muestras fueron cuidadosamente retiradas, los pozos lavados y subsiguientemente incubados con anticuerpo primario α -N durante 1 hora a 37°C. A continuación, las reacciones de revelado fueron llevadas a cabo durante un tiempo de incubación de 30 minutos.

5.10. Determinación de la concentración de N en muestras de sueros de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivas para SARS-CoV-2

La concentración de proteína N natural presente en las muestras de sueros de los pacientes IgM, IgG e IgM/IgG positivos para SARS-CoV-2 fue llevada a cabo sustituyendo los valores de absorbancia obtenidos durante el ensayo de inmunocaptura para cada uno de los sueros evaluados (Y), así como los de la pendiente (m) y de corte con el eje Y (b_0), generados por la curva estándar de N, realizada previamente sobre la ecuación de la recta $X = Y - b_0 / m$. En donde X corresponde al valor de la concentración.

5.11. Evaluación de la sensibilidad y la especificidad del sistema de inmunocaptura de la proteína de N en sueros basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN)

El desempeño del sistema diagnóstico desarrollado fue evaluado para tres categorías independientes de sueros: IgG, IgM e IgM/IgG positivos y sueros negativos como control para COVID 19. Los valores de absorbancia obtenidos fueron analizados a partir de las curvas ROC (% sensibilidad vs 100%-especificidad) obtenidas con GraphPad prism 7.0. De la misma forma descrita anteriormente, la caracterización del valor diagnóstico de los antígenos se realizó empleando los parámetros de sensibilidad y especificidad del RT-PCR en tiempo real como el método diagnóstico gold estándar de comparación. En la determinación fueron empleados los valores de absorbancias derivados como verdaderos positivos y negativos, así como falsos positivos y negativos por el sistema de diagnóstico de inmunocaptura de N, (realizado para un número de 21 sueros positivos y 36 sueros negativos para cada una de las modalidades características de los sueros evaluados).

5.12. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N en los sueros en base al ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) modificando la composición del diluyente de muestra.

A fin de monitorear el efecto que tiene la adición de agentes tensoactivos al diluyente de muestra sobre la eficiencia en la captura de antígeno N en los sueros, el tampón diluyente de muestra previamente estandarizado (PBS-ELISA, pH 7,2)

fue suplementado con dos combinaciones diferentes de detergentes neutro e ionico. En este ensayo se usaron 21 sueros de pacientes IgM/IgG positivos y 36 negativos para COVID-19. Los demás pasos del protocolo fueron iguales a los descritos anteriormente para la inmunocaptura estandarizada.

6. RESULTADOS

6.1. Predicción de epítopes lineales y estructurales de los dominios de la proteína N

Los análisis de especificidad demostraron que la secuencia polipeptídica de la proteína N del SARS-CoV-2 difería significativamente de la de los coronavirus comunes HCoV-229E y HCoV-OC43 y de la del MERS-CoV, mostrando así una alta especificidad. Aun cuando la proteína de la nucleocápside (N) de SARS-CoV comparte motivos antigénicos, principalmente en la región N-terminal con la proteína N de SARS-CoV-2, esta última ha sido y es aún el antígeno más usado para el diagnóstico de SAR-CoV-2. En el caso de la población venezolana, no se ha detectado hasta ahora ningún caso de SARS-CoV, por lo tanto; no hay posibilidad alguna de reacciones cruzadas.

Por otro lado, el análisis de secuencias de la proteína N implicó la predicción bioinformática de epítopes lineales y conformacionales sobre las estructuras primaria, secundaria y terciaria reportadas para la variante de Wuhan. Encontrándose que, la mayor densidad de epítopes inmunogénicos de la proteína se encuentran distribuidos en el extremo C-Terminal, posicionando a este dominio como inmunodominante frente al N-terminal. Esto se traduce en la generación de respuestas inmunológicas fuertes y moderadas cuando sean usados para la producción experimental de anticuerpos IgG e IgM (Li y col., 2003; Shen y col., 2021).

Estos análisis bioinformáticos más los resultados experimentales de Shen y col (2021), sobre la especificidad y antigenicidad permitieron la selección de dos regiones polipeptídicas de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV 2 con un moderado y alto valor de índice de antigenicidad. La primera de estas regiones

corresponde a un polipéptido de 175 aminoácidos que comprenden el dominio NTD y 41 aminoácidos del enlazador central intrínsecamente desordenado LKR (N1) y la segunda a un polipéptido de 289 aminoácidos que incluyen los mismos 41 aminoácidos del LKR y 248 aminoácidos del dominio CTD (N2) (Figura 14). Estas regiones fueron seleccionadas a fin de generar anticuerpos policlonales para cada una de ellas en animales de distinto origen con el objeto de ser utilizados en el diseño de un sistema de inmunocaptura basado en ELISA sándwich indirecto.

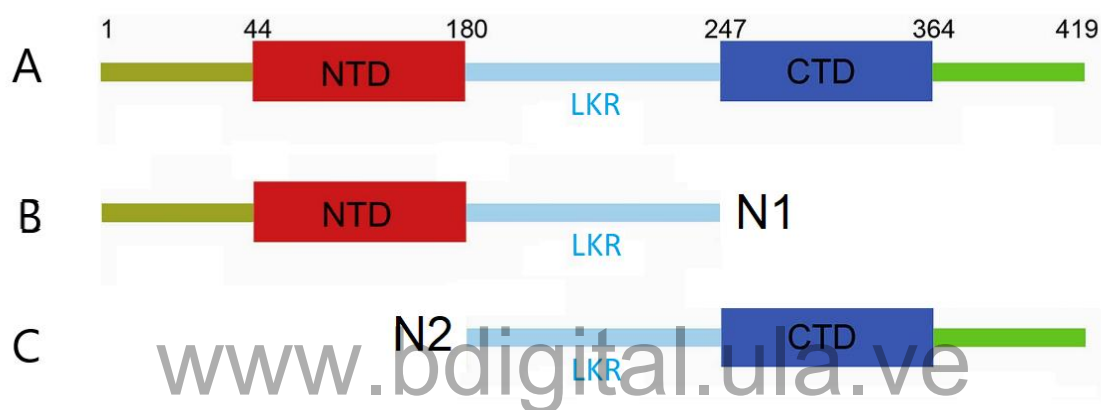


Figura 14. Representación esquemática de las regiones polipeptídicas N1 y N2 de la proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2. (A) Representación esquemática de los dominios estructurales de la proteína N del SARS-CoV-2 de longitud completa. Los límites de los dominios se encuentran representados en verde y los dominios NTD Y CTD así como el enlazador central (LKR) en rojo, azul y cian respectivamente. (B) Representación esquemática de las regiones que componen en polipéptido N1. (C) Representación esquemática del polipéptido N2.

6.2. Clonaje de las secuencias que codifican para los dominios N1 y N2 de la proteína N del SARS-CoV-2

La amplificación por PCR de las regiones génicas N1 y N2 a partir de la construcción PET28a+-N dio lugar a la obtención de dos amplificados cuyas bandas migraron levemente por encima de los marcadores de 500 pb y 750 pb, lo cual coincide con las longitudes 522 y 827 pb esperadas para los fragmentos N1 y N2 respectivamente (Figura no mostrada).

Posteriormente los amplificados de ambas regiones fueron purificados a partir de geles preparativos de agarosa y ligados de manera independiente al vector de clonamiento pGEM®-T Easy. Culminados los eventos de ligación, las

construcciones pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2 fueron utilizadas para transformar la cepa XL1-Blue de *E. coli* y las colonias transformantes positivas (blancas) fueron subsiguientemente evaluadas mediante PCR de colonias a fin de verificar la presencia de los insertos en los plásmidos. La Figura 15, exhibe los resultados para ambos fragmentos N1 y N2, pudiéndose observar que para ambos casos se encontraron clones cuyos amplificados coinciden con las longitudes moleculares esperadas, sin embargo; fueron seleccionados para los ensayos posteriores de sub-clonaje aquellas en las que se observó mayor intensidad de señal (8 y 12 para N1 y 4 y 8 para N2).

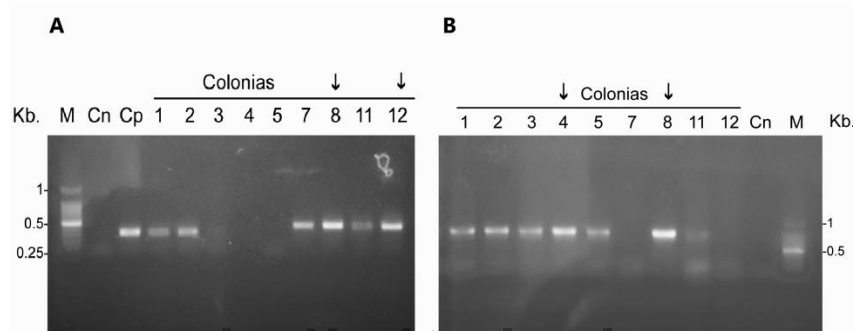


Figura 15. Evaluación por PCR de colonias de los transformantes positivos para las construcciones pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2. (A) Amplificación por PCR de colonias de los transformantes seleccionados pGEM®-T Easy-N1. (B) Amplificación por PCR de colonias de los transformantes seleccionados pGEM®-T Easy-N2. En ambas figuras las siglas representan: Cn: control negativo, Cp: control positivo, M: marcadores de peso molecular y las flechas negras los clones seleccionados para los ensayos de subclonaje en el vector pET28a.

Una vez verificadas las secuencias clonadas en ambas construcciones, se procedió a subclonar los fragmentos génicos en el vector de expresión pET28a. Para ello, se procedió a digerir los plásmidos pGEM®-T Easy-N1 y pGEM®-T Easy-N2 y pET28a con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I. La figura 16 resume los resultados obtenidos de la corrida electroforética en geles de agarosa preparativos al 0,8% de ambas digestiones. Nótese que en ambos casos se pone en evidencia la liberación de los insertos por la presencia de dos bandas que se corresponden con la longitud esperada para los insertos (522 y 827pb) y para el pGEM®-T Easy (3000 pb). En el lado derecho de ambos geles se observa una banda al nivel de los marcadores de 5 y 6 Kb que corresponde al plásmido pET28a totalmente linealizado, lo cual concuerda con su longitud de 5369pb (Figura 16).

Los insertos y los vectores de expresión linealizados extraídos de los geles de agarosa y subsecuentemente purificados fueron sometidos a un ensayo de ligación durante toda la noche a 4°C y las construcciones pET28-N1 y pET28-N2 resultantes fueron usadas para transformar nuevamente a la cepa XL1-Blue de *E. coli*. Posteriormente, los transformantes obtenidos fueron evaluados mediante PCR de colonias a fin de verificar la existencia del inserto en el vector de expresión resultando solo 2 colonias positivas para la construcción pET28-N2 (colonias 15 y 25) y 12 para para la construcción pET28-N1 de las cuales se usaron aquellas con mayor intensidad de señal (Figura 17).

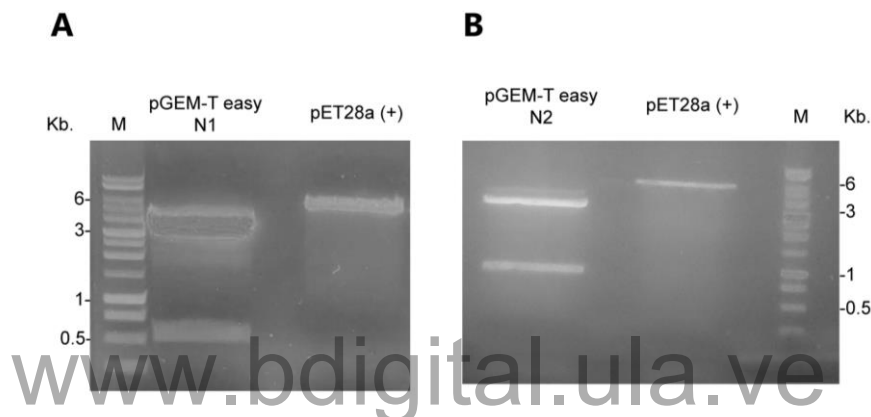


Figura 16. Digestión doble de las construcciones pGEM®-T Easy-N1, pGEM®-T Easy-N2 y el vector de expresión pET28a. (A) Ensayo de restricción doble de la construcción pGEM®-T Easy-N1 con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. (B) Ensayo de digestión doble de la construcción pGEM®-T Easy-N2 con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. En (A) y (B) los marcadores de peso molecular se encuentran representados como (M).

Finalmente, se purificaron ambas construcciones para transformar a la cepa BL21(DE3) de *E. coli* a fin de expresar ambos fragmentos antigénicos.

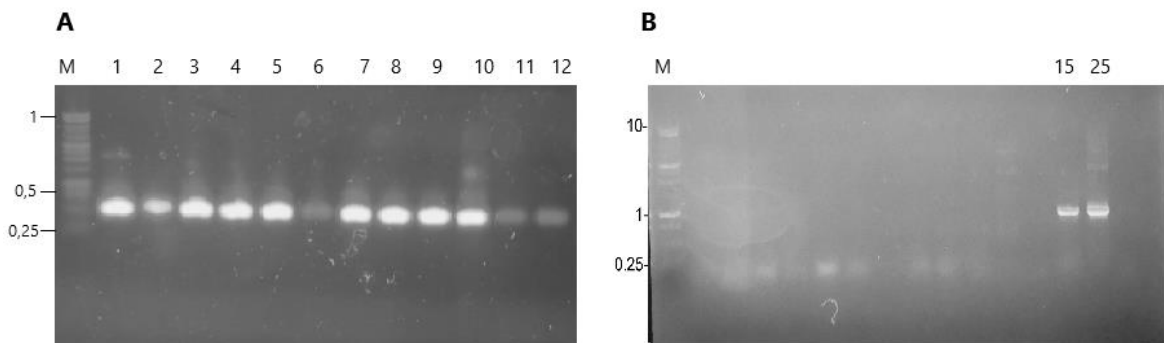


Figura 17. Evaluación por PCR de colonias de los transformantes positivos para las construcciones pET28a-N1 y pET28a-N2. (A) Amplificación por PCR de colonias de los transformantes seleccionados pET28a-N1. (B) Amplificación por PCR de colonias de los transformantes seleccionados pET28a-N2. En ambas los números ubicados en la parte superior indica la colonia evaluada y la letra M representa los marcadores de peso molecular.

6.3. Expresión y purificación de los dominios NTD-N1 y CTD-N2

Para poder emplear los polipéptidos recombinantes en la producción de anticuerpos policlonales resulta necesario que esta se exprese de manera soluble. Es por ello, que deben optimizarse las condiciones de cultivo de las bacterias portadoras de las construcciones de expresión recombinantes que permitan obtener los mejores resultados.

6.3.1. Sobreexpresión de los fragmentos polipeptídicos N1 y N2

Dos colonias transformantes para cada construcción (pET28-N1 y pET28-N2), seleccionadas mediante evaluación de PCR de colonias, fueron crecidas en medio LB tal y como se describió anteriormente. Una vez alcanzada la fase exponencial la inducción fue realizada por la adición de 0,5 mM de IPTG y alícuotas de los cultivos fueron tomadas antes y 1, 2 y 3 horas después de agregar el inductor. La figura 18 muestra la cinética de inducción con IPTG de las proteínas recombinantes N1 y N2 en la cepa BL21 (DE3). En el panel A las bandas que se observan desde el primer tiempo luego de la sobreexpresión de ambas colonias migran levemente por encima del marcador de 20 kDa lo cual se corresponde con el peso molecular predicho teóricamente de esta proteína con la cola de polihistidina de 19,85587 kDa en el servidor ProtParam de ExPASy sobre la secuencia nucleotídica traducida a aminoácidos, la cual además posee un punto isoeléctrico teórico de 9,93. Mientras que, en el panel B correspondiente a la cinética de inducción de la proteína N2 se observan bandas que migran entre los marcadores de 30 y 45 kDa; resultado que se muestra consistente con el peso molecular predicho de esta proteína con la cola de polihistidina de 32,13684 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 9,93. Por tanto, ambas cinéticas dejan demostrada la sobreexpresión evidente de ambos polipéptidos. Análisis posteriores de solubilidad lograron comprobar que la inducción con IPTG de ambas proteínas bajo las condiciones ensayadas permite obtener proteínas recombinantes completamente solubles.

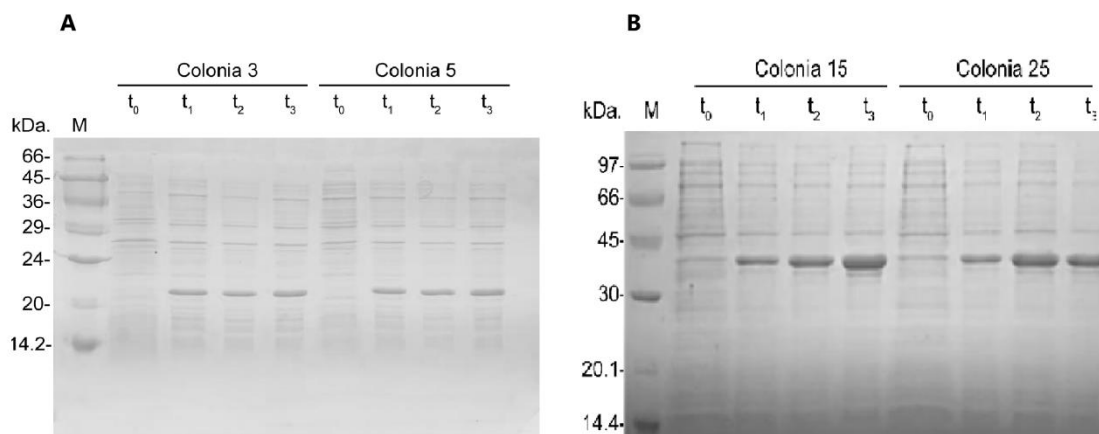


Figura 18. Cinética de inducción con IPTG de las proteínas recombinantes N1 y N2 en cultivos de colonias BL21(DE3)-pET28a-N1 y BL21(DE3)-pET28a-N2. (A) Evaluación de la expresión del polipéptido N1 en dos colonias positivas para BL21(DE3)-pET28a-N1 en SDS-PAGE al 15% (B) Evaluación de la expresión del polipéptido N2 en dos colonias positivas para BL21(DE3)-pET28a-N2 en SDS-PAGE al 12,5%. En ambos geles la sigla M representa los marcadores de peso molecular y la letra t (1-3) el tiempo de inducción en horas.

6.3.2. Purificación del fragmento N1 y N2

Luego de verificada la expresión del antígeno N1 recombinante, la purificación de la proteína fue realizada mediante cromatografía de afinidad a metales empleando una columna HiTrap™ IMAC (Merk) en un equipo Biologic Duo Flow (*Biorad*) a partir del lisado clarificado de un cultivo de BL21 (DE3) /pET28a-N1 inducido con 0,5 mM de IPTG. La elución fue llevada a cabo empleando un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM.

Gracias a que la clonación en el vector de expresión pET28a permite la expresión de la proteína fusionada a una cola de seis histidinas que forman enlaces de coordinación con iones Ni⁺² inmovilizados sobre la resina, la purificación se logró de manera exitosa en un solo paso. Los resultados obtenidos del protocolo de purificación se muestran en la figura 19.

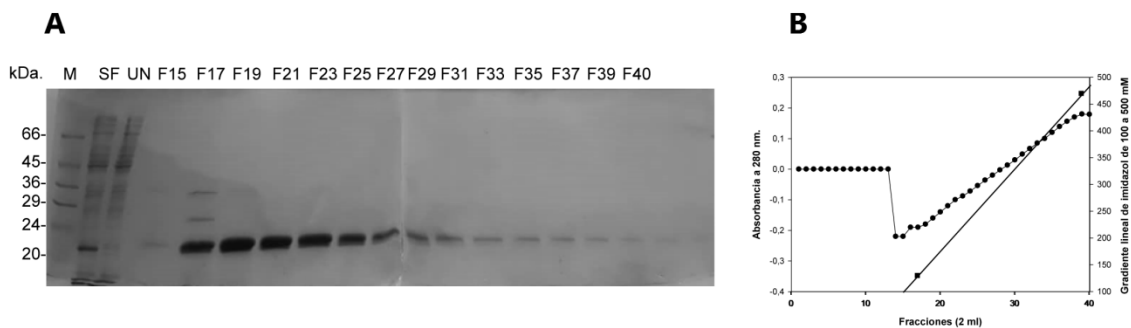


Figura 19. Purificación del antígeno N1 mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) empleando un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM. (A) Visualización de las fracciones obtenidas mediante análisis de SDS-PAGE al 15%. M: marcadores de peso molecular, SF: sobrenadante filtrado, UN: proteínas que no se unieron a la resina, F(15-40):fracciones eluidas del gradiente lineal de imidazol. (B) Cromatograma de la purificación de N1 en gradiente lineal de imidazol.

El análisis de SDS-PAGE al 15% muestra que la proteína de 19,9 kDa logró ser purificada a homogeneidad a partir de la fracción soluble del lisado clarificado (Figura 19 A), comenzando a eluir a una concentración de 200 mM de imidazol y con un pico de mayor elución comprendido entre las fracciones 17 y 25 correspondientes a los lavados de elución entre 250 y 300 mM de imidazol del gradiente lineal (Figura 19 B). Las proteínas contaminantes fueron eliminadas entre la fracción que no se unió a la resina y en el lavado con 200 mM de imidazol. El rendimiento obtenido fue de 7,4 mg totales por litro de cultivo.

6.3.3. Purificación del fragmento N2

La purificación del fragmento N2 recombinante fue llevada a cabo también mediante cromatografía de afinidad a metales en una columna HiTrap™ IMAC (Merk) a partir de la fracción soluble clarificada del lisado de un cultivo de BL21 (DE3)/pET28a-N2 inducido con 0,5 mM de IPTG. La figura 20 muestra los resultados del protocolo de purificación llevado a cabo expresados en un análisis de SDS-PAGE al 12,5% y el cromatograma recreado con los datos de absorbancia de las fracciones colectadas durante el programa de purificación.

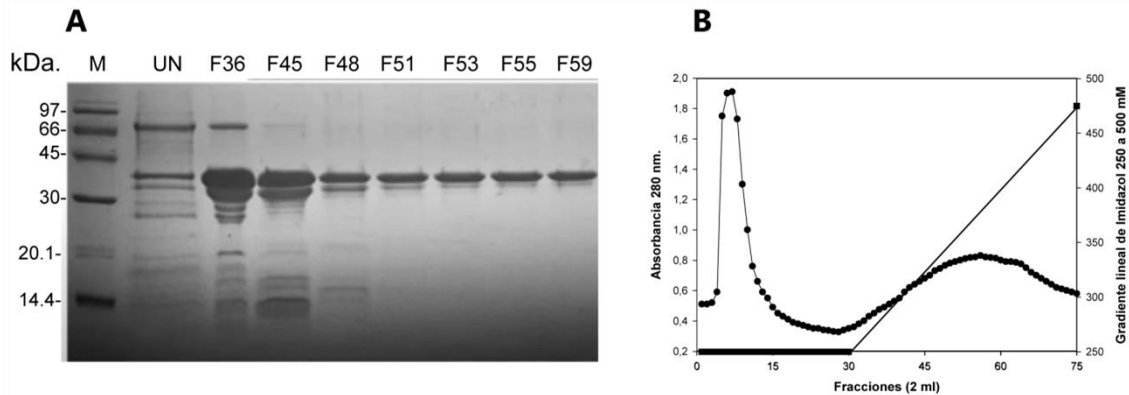


Figura 20. Purificación del antígeno N2 mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) empleando un gradiente lineal de imidazol entre 250 y 500 mM. (A) Visualización de las fracciones obtenidas mediante análisis de SDS-PAGE al 15%. M: marcadores de peso molecular, UN: proteínas que no se unieron a la resina, F (36-59): fracciones eluidas con el gradiente lineal de imidazol. (B) Cromatograma de la purificación de N2 en gradiente lineal de imidazol.

El análisis de SDS-PAGE permitió corroborar que la proteína fue purificada a homogeneidad (Figura 20 A), comenzando a eluir pura desde la fracción 51 a una concentración aproximada de 320 mM de imidazol tal y como se visualiza en el cromatograma contenido en el panel B. Adicionalmente, las condiciones de purificación empleadas permitieron obtener la proteína con un alto rendimiento que corresponde a 15 mg totales de N2 por litro de cultivo.

6.3.4. Purificación de anticuerpos α -N1 y α -N2

6.3.4.1. Purificación de anticuerpos α -N1

La purificación de los anticuerpos α -N1 se realizó con algunas modificaciones sobre el protocolo sugerido por la casa comercial (Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (BIO-RAD)) tales como la disminución del volumen de suero a emplear (de 3,5 mL a 2,5 mL) y la adición de un segundo paso de purificación por la cibacron. Estos cambios fueron motivados a que el volumen sugerido sobrepasaba la capacidad de unión de la resina y la fracción final de inmunoglobulinas mostraba una fuerte contaminación con albúmina en un solo paso de purificación.

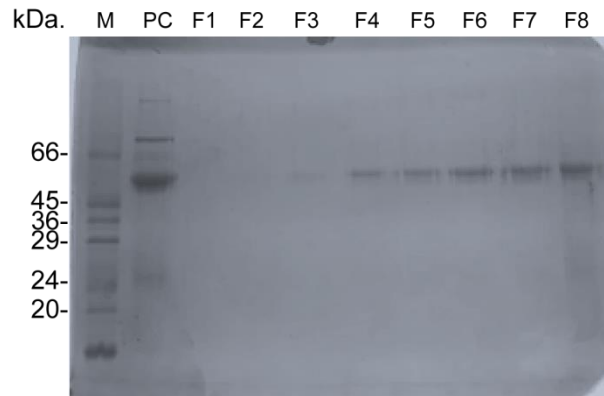


Figura 21. Purificación de IgG α -N1 a partir de suero inmune de conejo empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad). Visualización de la purificación mediante análisis SDS-PAGE al 12,5%. M: marcadores de peso molecular, PC: primer paso por la resina DEAE Affi-Gel®blue, F (1-8): fracciones eluidas.

El análisis de SDS-PAGE al 12,5% contenido en la figura 21 muestra los resultados de la purificación. En el pozo 2 del gel que corresponde al primer paso de purificación por la resina DEAE Affi-Gel®blue (PC) se puede observar que, aunque durante este primer paso fueron eliminados la mayor parte de los contaminantes séricos, la fracción purificada aún tenía contaminantes de alto peso molecular. Estos contaminantes fueron eliminados eficientemente en las fracciones colectadas en el segundo paso de purificación por la resina permitiendo obtener los anticuerpos policlonales completamente puros a homogeneidad.

La concentración de proteínas en el suero desalinizado así como en las fracciones relativas al primer y segundo paso por la resina DEAE Affi-Gel®blue fue determinada por el método de Lowry, empleando una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA.

En la Tabla II, se muestran los valores en mg de IgG (totales) purificados a homogeneidad a partir del suero de un conejo hiperinmunizado con N1. En las purificaciones de IgG se espera que el porcentaje purificado este entre 4 a 10 %, de las proteínas totales, lo cual depende del animal que se haya obtenido el suero y también de los métodos de purificación. En nuestro caso como se muestra en la Tabla II, se obtuvieron 10,2 mg de IgG pura a partir de 448,7 mg totales de proteínas, lo que representa 2,23% respecto a las proteínas totales, mientras que

respecto a IgG totales (10% de las proteínas totales corresponden a IgG), por tanto, el rendimiento de IgG purificada fue de 22.73 %.

Tabla II. Tabla de purificación de de IgG α -N1 a partir de suero inmune de conejo empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad).

Fracción	Volumen de la fracción	Concentración de proteínas	Proteínas totales
<i>Suero desalinizado</i>	3,5 mL	128,2 mg/mL	448,7 mg
<i>1er paso por la DEAE Affi-Gel®blue</i>	20 mL	1,22 mg/mL	24,4 mg
<i>2do paso por la DEAE Affi-Gel®blue</i>	12 mL	0,85 mg/mL	10,2 mg

6.3.4.2. Purificación de anticuerpos α -N2

La obtención de anticuerpos α -N2 fue realizada por inmunización de una cabra joven. Los sueros obtenidos mostraron altos títulos de anticuerpos contra la proteína N2 y su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (*Biorad*) dio como resultado anticuerpos altamente purificados y con un buen rendimiento lográndose recuperar 20,1 mg totales a partir de 3,5 mL de suero en un solo paso de purificación (Tabla III).

Tabla III. Tabla de purificación de de IgG α -N2 a partir de suero inmune de cabra empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad).

Fracción	Volumen de la fracción	Concentración de proteínas	Proteína s totales
<i>Suero desalinizado</i>	3,5 mL	74,97 mg/mL	262,4mg
<i>1er paso por la DEAE Affi-Gel®blue</i>	15 mL	1,34 mg/mL	20,1 mg

La Figura 22 muestra el análisis de SDS-PAGE al 12,5% en el que se observa que, durante el esquema de purificación, si bien no se obtuvo la inmunoglobulina completamente pura a homogeneidad, la gran mayoría de contaminantes séricos incluyendo la albúmina fueron eliminados. En este caso el rendimiento de IgG

purificada respecto a proteínas totales fue de 7,66%, mientras que respecto a IgG totales fue de 76,6%.

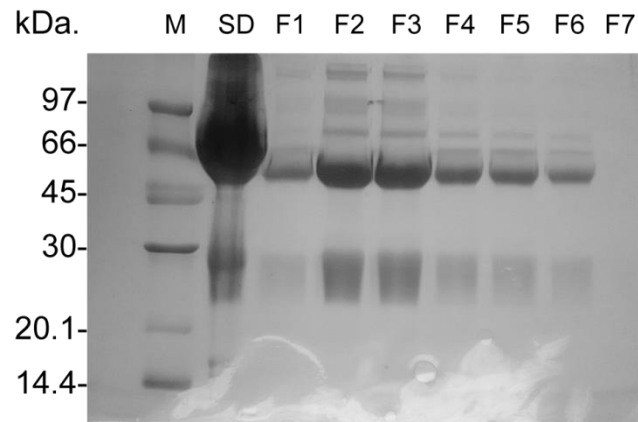


Figura 22. Purificación de IgG α -N2 a partir de suero inmune de cabra empleando el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (Biorad). Visualización de la purificación mediante análisis SDS-PAGE al 12,5%. M: marcadores de peso molecular, SD:suero desalinizado,, F (1-8): fracciones eluidas de la resina DEAE Affi-Gel®blue.

6.4. Determinación de la inmunoreactividad de los polipéptidos N, N1 y N2 frente a sueros de pacientes IgG o IgM positivos para SARS-CoV-2

El dominio N-Terminal (N1) y el C-terminal (N2) recombinantes de la proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV 2, se usaron como antígenos para realizar los ensayos de evaluación de inmunoreactividad de ambos dominios frente a sueros de pacientes IgM e IgG positivos y negativos para COVID-19, previamente clasificados por la prueba estándar de oro RT-PCR en tiempo real así como, por ensayo de quimioluminiscencia IFLASH y por ELISA indirecto para detección de anticuerpos (GAMÆlisa® IgM e IgG), a fin de determinar el valor inmunogénico de cada uno, empleando la proteína N recombinante (completa) como control.

En la figura 23 A y B se muestran los resultados de la prueba de detección de anticuerpos IgG e IgM a través de un ELISA indirecto en placas previamente sensibilizadas con 200 ng/pozo de las proteínas N, N1 y N2. Para la evaluación de IgG se emplearon 41 y 43 sueros positivos y negativos respectivamente, mientras que para la detección del isotipo IgM se usaron 23 sueros positivos y 17 sueros negativos. Estos resultados muestran que tanto en la detección de IgG como de

IgM el polipéptido N2 resultó ser más inmunorreactivo que el polipéptido N1, siendo los títulos de anticuerpos detectados para ambos isotipos 2,6 veces mayores que el de este último e inclusive similares a los obtenidos cuando se utiliza como antígeno la proteína N completa, logrando una buena discriminación entre sueros positivos y negativos con una diferencia de medias de 2,3 unidades de absorbancia entre ambos. Entre tanto, el péptido N1 no logra una buena discriminación entre los sueros negativos y positivos con una diferencia de medias entre ellos de tan solo 0,4 valores de absorbancia, como muestra clara de su baja inmunogenicidad.

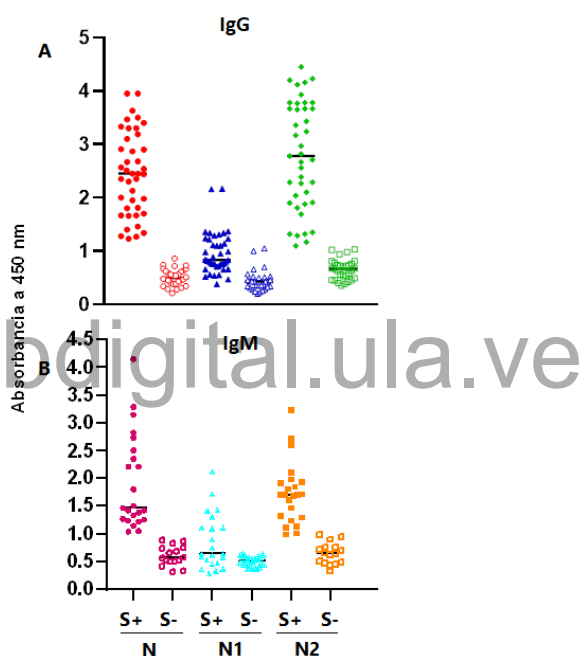


Figura 23. Determinación de la inmunoreactividad de los polipéptidos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para COVID-19 mediante ELISA indirecto (GAM/Elisa® de DIAGEN). S+ : sueros positivos, S-: sueros negativos.

6.4.1. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los polipéptidos N, N1 y N2 mediante análisis de Curvas ROC

Una vez conocida la capacidad de los dominios N1 y N2 de ser reconocidos por los anticuerpos de los isotipos IgG e IgM presentes en los sueros de pacientes positivos para COVID-19, se procedió a hacer un análisis más exhaustivo de su valor diagnóstico, determinando la sensibilidad y especificidad a la hora de ser utilizados como antígenos en pruebas serológicas para la detección de

anticuerpos basadas en ELISA indirecto. Para ello, de todos los sueros de referencia disponibles en nuestro laboratorio solo fueron seleccionados los sueros positivos y negativos que habían sido confirmados por la prueba estándar de oro (RT-PCR en tiempo real), los cuales corresponden a un número total de 23 sueros IgM positivos, 23 IgG positivos y 17 sueros negativos para ambos isotipos.

Para este análisis, los valores de las absorbancias obtenidas de los sueros seleccionados como negativos y positivos evaluados con el sistema GAMÆlisa® IgM e IgG de DIAGEN, se depositaron en la matriz del software Graphpad Prism versión 7.04, incluyendo dentro de cada grupo, tanto los valores falsos negativos como los falsos positivos, detectados durante la evaluación con el objeto de obtener las curvas ROC correspondientes a fin de establecer que tan bueno es el desempeño de cada antígeno como herramienta de diagnóstico en el ELISA indirecto en comparación con los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real y también confirmados por la prueba de quimioluminiscencia iFLASH.

La Figura 24 muestra los resultados que se obtuvieron de los antígenos evaluados por ELISA indirecto para cada uno de los isotipos de inmunoglobulinas. Las curvas ROC obtenidas confirman los resultados previamente mostrados en la caracterización inmunológica de los antígenos, siendo N2 quien brinda un mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad cuando es usado en la detección de anticuerpos IgM e IgG, con valores de sensibilidad de 100 y 93,33 % respectivamente, además de brindar una especificidad del 97,56 para IgG y 93,75% para IgM. Estos datos son similares a los obtenidos para la proteína N (completa) la cual ofrece 100% de sensibilidad tanto para IgG como para IgM, así como 97,56 y 95,65% de especificidad para ambos isotipos, con áreas bajo la curva que presentan valores iguales a 1 en ambos antígenos para las dos situaciones evaluadas (Tabla II).

No obstante, para el caso del polipéptido N1 los valores de sensibilidad fueron de 70 y 93,75 % para IgG e IgM, siendo la especificidad de 97,23 y 59,09% respectivamente. Dichos resultados junto con el intervalo de confianza con el que son predichos, así como los mejores valores de cut-off arrojados por el programa se resumen en la Tabla IV.

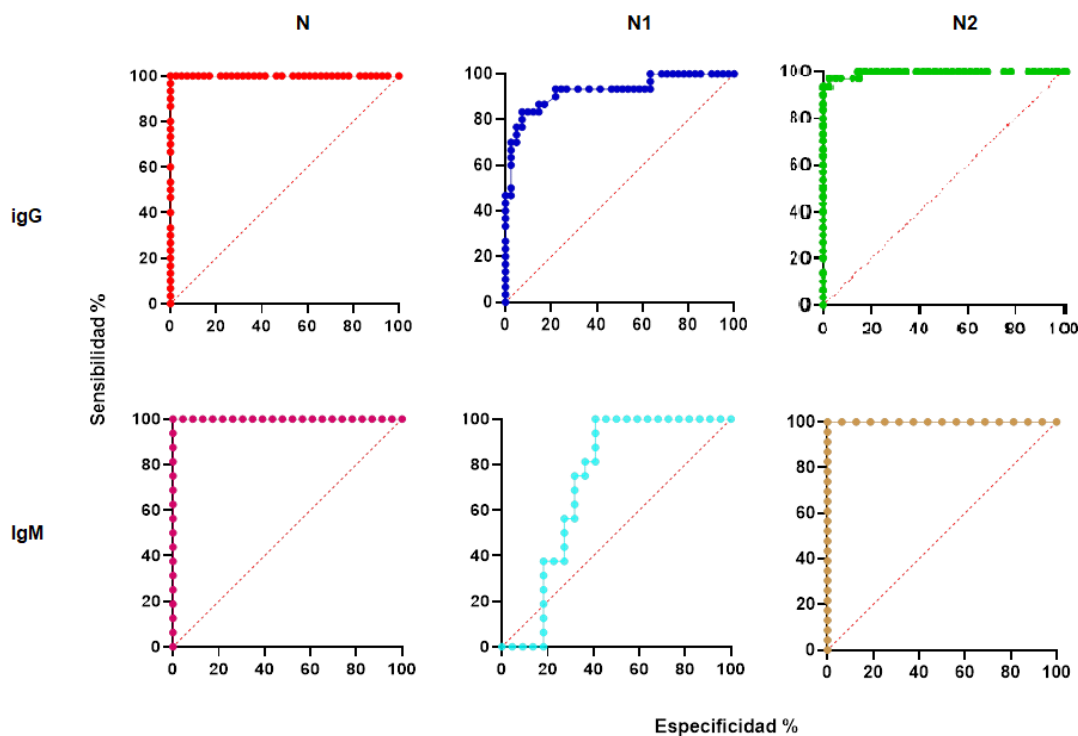


Figura 24. Curvas ROC para los antígenos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para SARS-CoV-2 evaluados con la herramienta de diagnóstico GAM/Elisa® de DIAGEN.

Tabla IV. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para los antígenos N, N1 y N2 frente a sueros IgG e IgM positivos y negativos para SARS-CoV-2.

Antígeno	Isotipo	% Sensibilidad	IC 95%	% Especificidad	IC 95%	UCA	Cut-off
N	IgG	100,0	88,65 - 100,0	97,56	87,40 - 99,87	1,00	1,250
	IgM	100,0	80,64 - 100,0	97,65	79,01 - 99	1,00	1,052
N1	IgG	70,0	52,12 - 83,34	97,23	87,40 - 99,87	0,9252	0,4640
	IgM	93,75	71,67 - 99,68	59,09	38,73 - 76,74	0,7216	0,6179
N2	IgG	93,33	78,68 - 98,82	97,56	87,40 - 99,87	0,9943	1,080
	IgM	100,0	85,69 - 100,0	93,75	71,75 - 99,68	1,00	0,9667

6.5. Obtención de la combinación de anticuerpos a ser empleada para el desarrollo de un sistema de inmunocaptura de la proteína N en muestras de suero basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN)

Los resultados obtenidos en este análisis son resumidos en un gráfico de densidad en espejo, también conocido como gráfico de violín el cual es empleado

para el análisis de datos de variables que presentan una distribución multimodal en relación a diferentes categorías. En este caso, la eficacia en la captura de N interpretada como la distribución de los valores de absorbancia en relación a las diferentes combinaciones de anticuerpos de captura/primario evaluadas en este ensayo.

Como se observa en la Figura 25, la combinación de anticuerpos de captura/anticuerpo primario α -N2/ α -N resultó ser la más idónea, ya que no solo permitió capturar la proteína N libre en el suero de pacientes COVID-19 positivos con un rango de valores de absorbancia más amplio (0,2-1,2) sino que además, permite discriminar de manera más eficiente entre sueros negativos y positivos ya que los valores de absorbancia obtenidos para sueros IgM negativos para COVID-19, que también fueron evaluados bajo esta misma combinación de anticuerpos se distribuyeron modalmente muy por debajo del límite inferior de absorbancias encontrado para los sueros positivos (0,1).

Estos hallazgos, también permitieron descartar el uso del anticuerpo α -N1 como integrante del par de anticuerpos que formarían parte del sándwich ya que, en ninguna de las combinaciones evaluadas se capturo eficientemente la proteína N natural. Hecho que se vio reflejado en la mayoría de los sueros positivos evaluados, ya que los valores de absorbancia obtenidos fueron muy bajos e inclusive similares a los obtenidos para los sueros negativos evitando así una clara o evidente discriminación entre ellos.

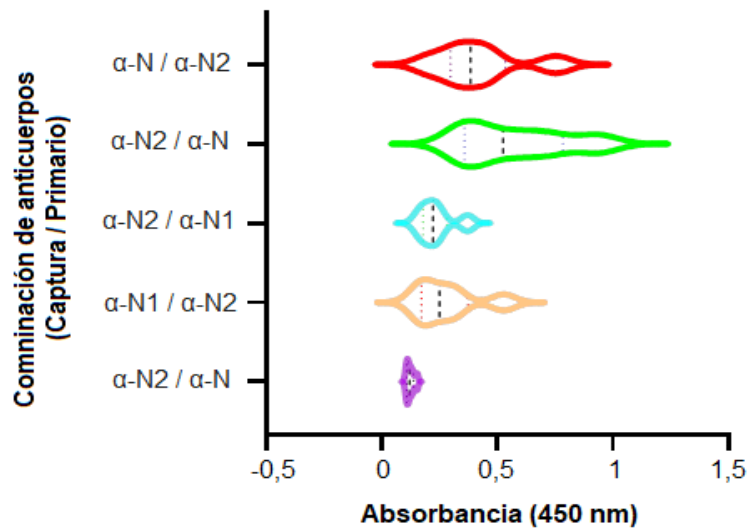


Figura 25. Inmuncaptura de N libre en sueros IgM positivos y negativos para COVID-19 a través de ELISA sándwich indirecto empleando diferentes combinaciones de anticuerpo de captura/anticuerpo primario.

www.bdigital.ula.ve

La Figura 26 muestra una representación esquemática del sistema inmuncaptura ELISA tipo sándwich estandarizado para la combinación de anticuerpo de captura/ anticuerpo de detección seleccionada (α -N2/N/ α -N)

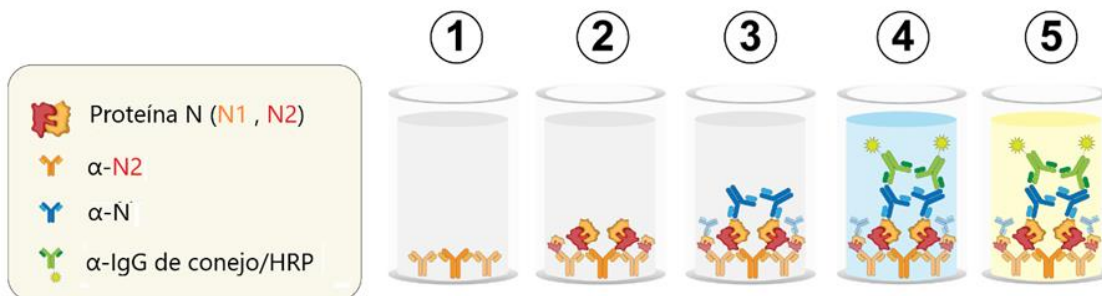


Figura 26. Representación esquemática del sistema ELISA tipo sándwich α -N2/N/ α -N.

6.6. Curva de calibración de captura de la proteína N por el sistema de ELISA sándwich indirecto α -N2/proteína N/ α -N

En vista de la necesidad de poder determinar con exactitud la concentración de proteína N natural que el sistema puede capturar en muestras séricas de pacientes positivos para SARS-CoV 2, la elaboración de una curva estándar para el ligando N bajo las condiciones de inmunocaptura previamente estandarizadas representó por tanto un paso crítico para la obtención de datos cuantitativos precisos. La cuantificación de N en sangre, permite relacionar el grado de antigenemia N (presencia de antígeno en sangre) y viremia (presencia de virus en la sangre) en pacientes COVID-19 en el momento de la realización de la prueba, ya que resultados previos han demostrado que la carga viral de SARS-CoV2 se corresponde con altos niveles de antígeno N en suero y viceversa (Hingrat y col., 2020).

Los resultados obtenidos para la curva de calibración fueron el producto de tres experimentos independientes. La proteína N recombinante purificada a homogeneidad fue diluida de forma decreciente (seriada) en un rango de concentraciones entre 500 y 32.000 pg/mL. Los valores promedios de absorbancia de las tres mediciones independientes fueron graficados versus la concentración de proteína/mL y se encontró que la curva obtenida muestra una proporcionalidad casi perfecta entre los valores de absorbancia y la concentración de proteína N presentes en las muestras, con R^2 de 0,9964 (Figura 27).

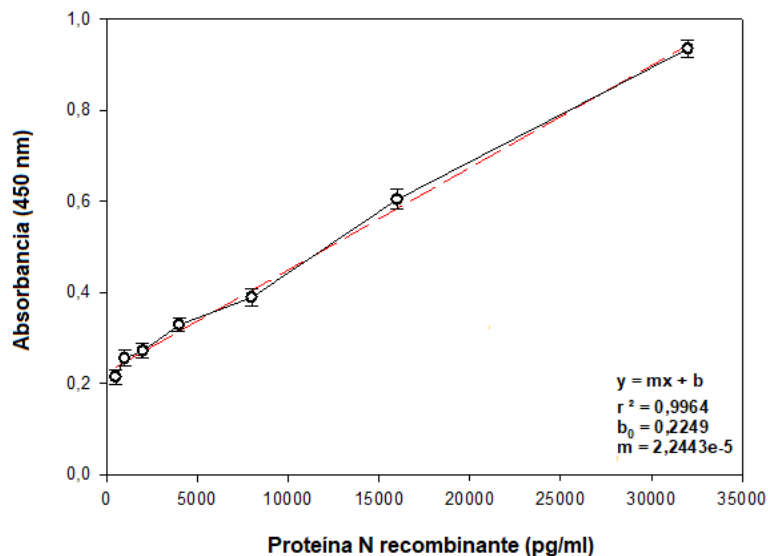


Figura 27. Curva de calibración de N para el sistema de inmunocaptura de antígeno N del SARS-CoV-2 ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N.

En la parte inferior de la figura se muestran los valores del punto corte con el eje Y ($b_0 = 0,2249$) así como el de la pendiente ($m = 2,2443 \times 10^{-5}$) que serán empleados en la determinación de la concentración del antígeno N en una muestra sérica problema mediante sustitución en la ecuación de la recta ($Y = mX + b_0$) despejando el valor de X. Por tanto, la concentración de la muestra estaría determinada matemáticamente de la siguiente manera: $X = (Y - b_0) / m$.

6.7. Determinación del efecto opsonizante de los anticuerpos IgG α -N de pacientes COVID-19 positivos sobre la proteína N recombinante

Si bien, los dos isotipos de inmunoglobulinas séricas (IgM , IgG), son generados durante las infecciones por SARS-CoV-2 como parte de la respuesta inmunológica adaptativa, se ha encontrado que la IgG posee un mayor efecto neutralizante tanto para la proteína S como para la proteína N (Reinig y Shih, 2023). Esto resulta en algunos de los casos favorable en la defensa natural contra el virus durante el curso de la infección. Sin embargo, la presencia de anticuerpos IgG opsonizantes para la proteína N en el suero de pacientes positivos para COVID-19 representaría un problema a la hora del diagnóstico con la herramienta ELISA desarrollada en este trabajo. Puesto que, en sueros positivos con elevados títulos de IgG α -N, la gran mayoría de la proteína N sérica estaría opsonizada y por ende podría no ser capturada eficientemente, incrementando de esta manera la probabilidad de obtener falsos negativos cuando el paciente a ser evaluado se encuentre en fases avanzadas de la infección y posea una baja carga viral.

Es por esta razón, que se decidió determinar el volumen de suero que es necesario para opsonizar 5 nanogramos de proteína N. Para ello, se realizó una curva estándar de opsonización de N recombinante en presencia de volúmenes variables de un suero con altos títulos de IgG α -N, empleando como control un suero negativo, encontrándose que un incremento lineal del volumen de suero IgG positivo potencia la opsonización de la proteína N libre impidiendo así su captura por el sistema. Esto se pone en evidencia por la obtención de una función lineal decreciente en donde los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las concentraciones evaluadas se ajustan a la ecuación de la recta $Y = -mX + b$ con

un valor de $r^2 = 0,993$, en contraste con el comportamiento observado para los resultados obtenidos con el mismo ensayo realizado con un suero IgG negativo como control, en el que la proteína N presente en las muestras fue capturada por completo de manera independiente del volumen de suero empleado, donde cada valor de absorbancia es una función constante del volumen de suero ($f(X) = K$), donde K es igual 2,7 (Figura 28).

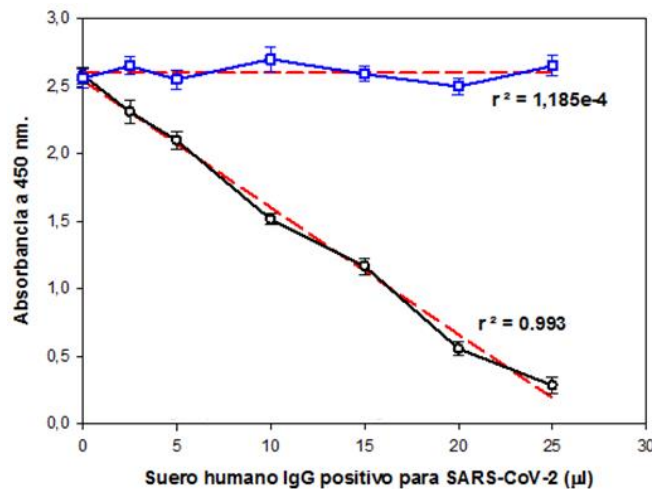


Figura 28. Curva estándar de la función opsonizante de los IgG α -N presentes en sueros COVID-19 positivos (línea negra) y negativos (línea azul) sobre la proteína N.

6.8. Determinación de la concentración de N en muestras de suero de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivas para SARS-CoV-2

Una vez determinado el potente efecto neutralizante que tienen los anticuerpos IgG α -N sobre la proteína N recombinante, se procedió a evaluar la concentración de N natural presente en el suero de pacientes positivos para SARS-CoV-2. Para ello se emplearon 63 muestras de suero clasificadas en grupos de 21 sueros como positivas para IgG, IgM e IgG/IgM mediante prueba de anticuerpos GAMÆlisa®, empleando como control 36 muestras de sueros negativos para ambos isotipos, confirmados todos como positivos o negativos por RT-PCR en tiempo real, ensayo de quimiluminiscencia iFLASH y prueba de detección de anticuerpos GAMÆlisa®. La concentración de N presente en cada una de los sueros fue obtenida con la curva estándar de N.

La figura 29A, resume los resultados con las medias obtenidas para cada una de las tres categorías evaluadas, observándose que la concentración

promedio de N libre (no opsonizada) en sueros de pacientes IgM positivos (fase aguda de la enfermedad), resultó ser 5,7 veces superior a la encontrada en sueros de pacientes en plena seroconversión (IgG/IgM positivos) y 3,7 veces superior en aquellos en los que el Isotipo IgM, ya había desaparecido (IgG positivo). Este resultado pone en evidencia una vez más el efecto de la función neutralizante de los anticuerpos IgG en la inhibición de la captura de N por el sistema sándwich ELISA indirecto. Sin embargo, se logró capturar N libre en muestras de pacientes con elevados títulos de IgG.

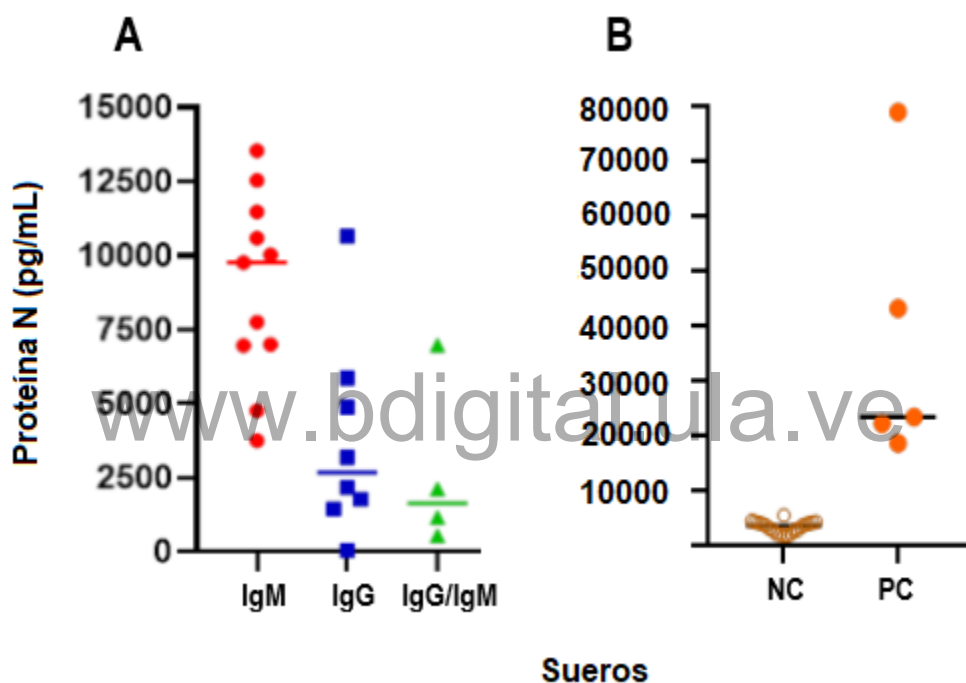


Figura 29. Determinación de la Concentración de N libre (no opsonizada) en el suero de pacientes IgG, IgM e IgM/IgG positivos (A) y negativos para SARS-CoV-2 (B). NC: negativos por el sistema de captura y PC: positivos por el sistema de captura.

Se obtuvo que el 86% de los sueros negativos evaluados, previamente confirmados como negativos por tres pruebas de diagnóstico independientes, incluyendo la prueba estándar de oro, fueron detectados por el sistema de captura como verdaderos negativos (NC), mientras que el 14% remanente fue detectado como positivo (PC). Este resultado fue inesperado, ya que estaría indicando falsos negativos para las otras tres pruebas, probablemente porque la infección estaría

en las primeras horas. En la figura 29B, se observa que la concentración promedio de N libre en los sueros fue de 23000 pg/mL.

6.9. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN)

Ya conocida la concentración de proteína N promedio que el sistema de inmunocaptura de N puede capturar empleando 50 μ L de sueros (IgG, IgM e IgG/IgM) positivos, se procedió a realizar una evaluación del desempeño del sistema de diagnóstico desarrollado a través de un análisis de curva ROC, empleando como método diagnóstico de comparación, la prueba estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19 (RT-PCR en tiempo real). Para ello, los valores de absorbancia obtenidos por la prueba de inmunocaptura de N sérica en los sueros basada en ELISA sándwich indirecto, tanto para 36 sueros negativos como 21 positivos fueron depositados en la matriz del software Graphpad Prism versión 7.04. Dentro de cada grupo se incluyeron los valores de absorbancia de los falsos negativos y los falsos positivos detectados durante la evaluación.

La figura 30 resume los datos obtenidos de sueros negativos y positivos como el análisis de curvas ROC realizado para cada una de las tres categorías de sueros evaluados de manera independiente, IgG, IgM e IgG/IgM. Estos resultados indican que la prueba ofrece el mismo porcentaje de especificidad (97,37%) para cada una de las categorías de sueros evaluadas (IgG, IgM e IgG/IgM), con un intervalo de confianza (86,51%-99,87%), no viéndose afectado el valor promedio de corte en el que se obtiene mayor sensibilidad y especificidad (Cut-off) en ninguna de las tres pruebas independientes, (el cual fue de 0,185) (tabla V). No obstante, el porcentaje de sensibilidad de la prueba disminuyó hasta el 20% en el diagnóstico de pacientes en plena fase de seroconversión, es decir con ambos isotipos de inmunoglobulinas circulantes en sangre, con respecto a aquellos que se encontraban en la fase inicial de la respuesta humoral (IgM) y ya habían experimentado el cambio de Isotipo (IgG), cuyos porcentajes de sensibilidad obtenidos se mostraron similares, siendo de 52,38% y 55% respectivamente. Estas

variaciones en el porcentaje de sensibilidad se vieron reflejadas en el valor del área bajo la curva de las pruebas realizadas con sueros IgM, IgG e IgM/IgG como fuente de antígeno N, con magnitudes de 0,8566, 0,7901 y 0,5013 respectivamente (Tabla III).

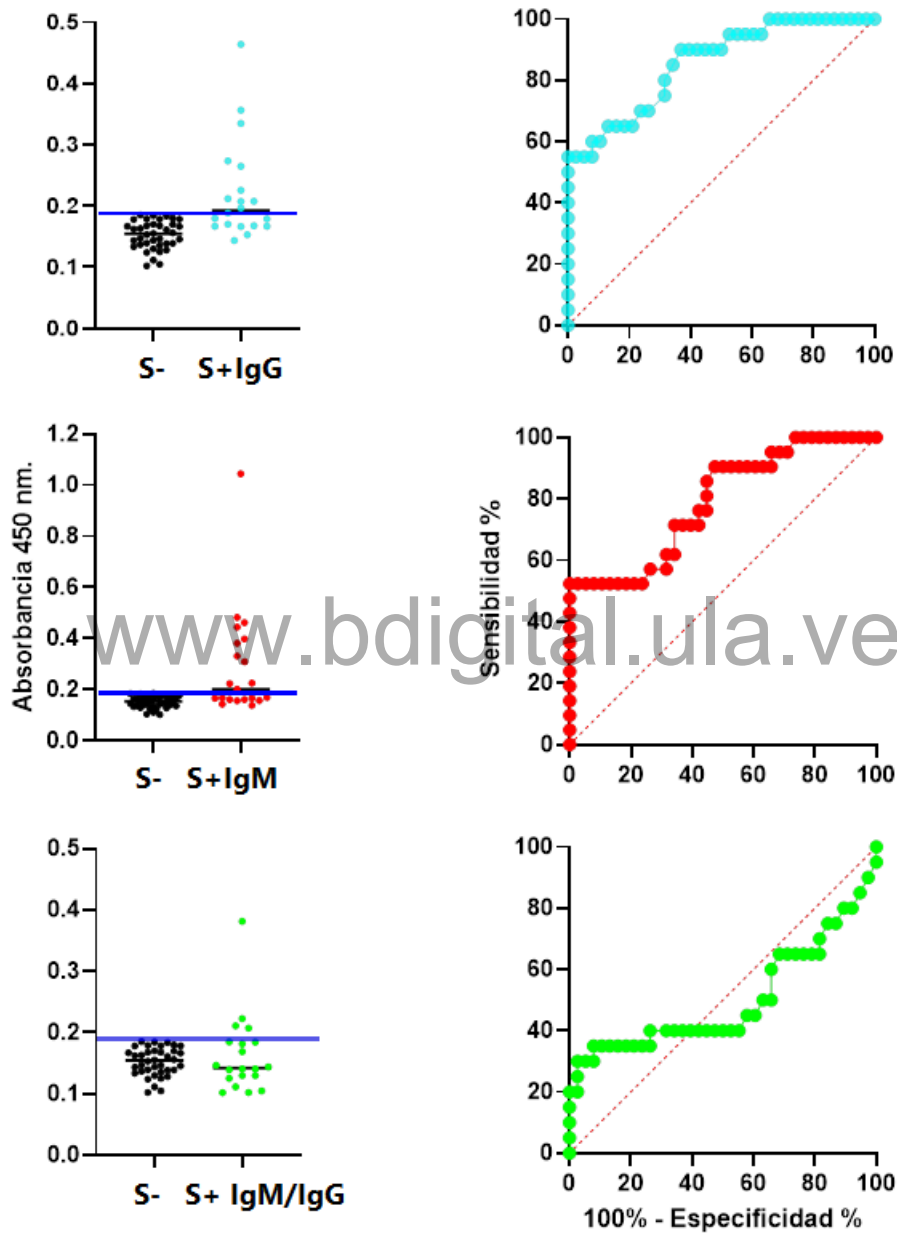


Figura 30. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N sérica basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) mediante análisis de curvas ROC. S-: sueros negativos y S+: sueros positivos para IgG, IgM e IgG respectivamente

Tabla V. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para el sistema de inmunocaptura de antígeno N en sueros positivos para SARS-CoV-2 con el ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N, empleando sueros IgM, IgG e IgM/IgG como fuente de antígeno N.

Isotipo	% Sensibilidad	IC 95%	% Especificidad	IC 95%	UCA	Cut-off
IgG	55,0	34,21 - 74,18	97,37	86,51 – 99,87	0,8566	0,1849
IgM	52,38	32,37 - 71,66	97,37	86,51 -99,87	0,7901	0,185
IgG/IgM	20,0	8,066 – 41,60	97,37	86,51 -99,87	0,5013	0,1851

6.10. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema de inmunocaptura de proteína de N en muestras de sueros basado en ELISA sándwich indirecto (DIAGEN) modificando la composición del diluyente de muestra.

Dado que el desempeño de la prueba diagnóstico se encontró afectado por la disminución del porcentaje de sensibilidad en las tres modalidades evaluadas de manera independiente, especialmente durante la inmunocaptura de antígeno N desde sueros de pacientes con títulos concomitantes de IgM e IgG en el que el porcentaje de sensibilidad predicho fue de 20%, se decidió efectuar algunas modificaciones en la metodología empleada anteriormente a fin de ver si había un incremento en los valores de dicho parámetro. Se intuyó que la disminuida capacidad de capturar eficientemente el antígeno N sérico en los sueros, pudiese estar relacionado además de la opsonización (ya evidenciada de la proteína por los anticuerpos neutralizantes α -N presentes en los sueros sometidos a evaluación), con un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas de la misma que pudiesen limitar su interacción eficiente con los anticuerpos de captura α -N2 inmovilizados sobre los pozos de las placas de ELISA. Es por esta razón que se decidió variar las condiciones de la solución de incubación (diluyente de muestra), sometiendo a prueba el efecto de suplementar esta solución con componentes tensoactivos sobre los niveles de captura de proteína N libre en el suero de pacientes positivos para SARS-CoV-2.

Para ello, 23 sueros positivos tanto para IgG como para IgM y 36 sueros negativos fueron evaluados siguiendo el protocolo previamente estandarizado para la inmunocaptura de N desde suero con la única variación que el tampón diluyente

de muestra fue suplementado con dos combinaciones diferentes de detergentes: a) SDS y Tween 20; b) SDS, Tween 20 y CHAPS. Se encontró que ambas combinaciones de surfactantes incrementaron la captura de N con respecto a la condición anterior. Es por esta razón que se decidió elegir la primera combinación para la realización de experimentos posteriores, ya que es de menor costo. (Figura 31A).

Los parámetros de sensibilidad y especificidad, así como el valor de cut-off más alto fueron calculados por un análisis de curva ROC (Figura 31B) y los resultados obtenidos demostraron que el porcentaje de sensibilidad se vio incrementado en un factor de 3 con respecto a las pruebas realizadas con los mismos sueros en ausencia de surfactantes en el tampón de incubación, mejorando de esta manera el desempeño de la prueba con un área bajo la curva que se acerca más al valor de 0,8206. Los valores de especificidad y cut-off se mantuvieron sin alteraciones con respecto a lo obtenidos con las condiciones anteriores (Figura 31 y Tabla VI).

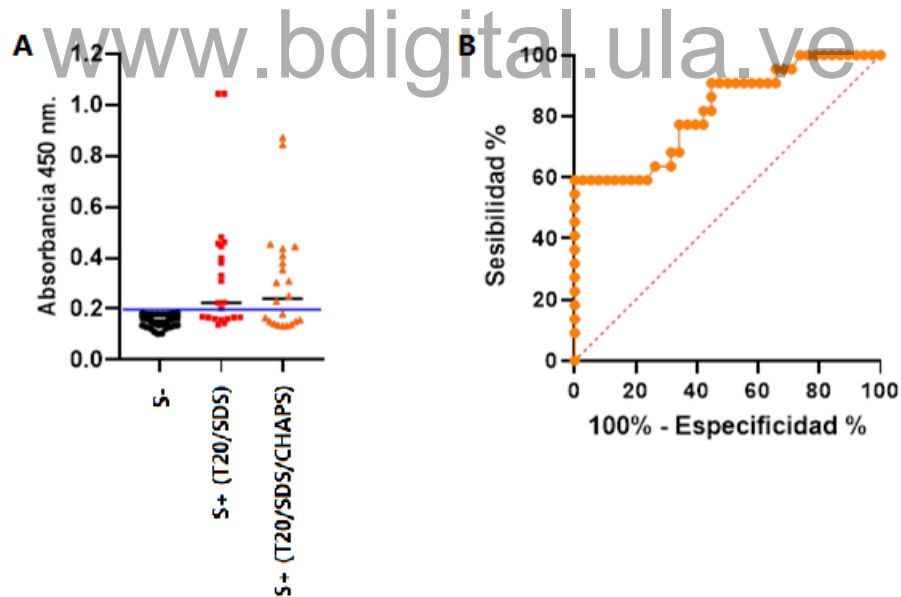


Figura 31. Análisis de curva ROC para la captura de la proteína N en muestras de suero de pacientes con SARS-COV-2, IgM/IgG positivas empleando dos combinaciones de surfactantes. (A) Captura de proteína N en presencia de diferentes detergentes desde sueros de pacientes IgM/IgG positivos para COVID-19. (B) Curva ROC para la captura de proteína N en muestras de pacientes positivos para IgM/IgG contra SARS-COV-2 en presencia de diluyente de muestra suplementado con SDS y Tween20. S-: sueros negativos y S+: sueros positivos para IgG/IgM respectivamente.

Tabla VI. Parámetros diagnóstico obtenidos del análisis de curvas ROC para el sistema de inmunocaptura de antígeno N del SARS-CoV-2 ELISA Sándwich indirecto α -N2/N/ α -N empleando sueros IgM/IgG como fuente de antígeno N.

Isotipo	% Sensibilidad	IC 95%	% Especificidad	IC 95%	UCA	Cut-off
IgM/IgG	59,09	38,73 – 76,74	97,37	86,51 – 99,87	0,8206	0,1849

IC: Índice de confianza; UCA: área bajo la curva.

7. DISCUSIÓN

La pandemia por COVID-19, tuvo un importante impacto en las sociedades de todo el mundo; representando un desafío ante los cambios sin precedentes que se generaron en los sistemas de salud, educativo y de transporte que sin lugar a duda repercutieron de manera negativa en el normal desenvolvimiento de la vida cotidiana y la economía a nivel mundial. Ante este escenario lleno de incertidumbre e interrogantes pero sobre todo carente de herramientas necesarias para enfrentar una repentina guerra contra un enemigo desconocido; científicos, médicos y enfermeros mantuvieron el combate desde laboratorios en la veloz identificación del agente causal, predicción de modelos de control epidemiológico así como; en la identificación de blancos óptimos para el rápido desarrollo de vacunas, fármacos y pruebas de diagnóstico o atendiendo a los pacientes infectados en los centros asistenciales de salud (Walker y col, 2020); los cuales para la fecha habían colapsado y los reportes de número de personas fallecidas era abrumador.

Con el apoyo de los científicos alrededor del mundo, la identificación del virus causante de esta pandemia denominado SARS-CoV-2, así como la secuenciación de su genoma se logró apenas un mes después del brote inicial de la enfermedad y una semana después de la caracterización de su genoma, ya se había logrado desarrollar una prueba de diagnóstico basada en el RT-PCR en tiempo real para detectar el virus en muestras de hisopado nasofaríngeo y esputo de pacientes sospechosos (Subramanya y col, 2020; Stephen y col, 2020). Estos rápidos avances permitieron conocer a una velocidad impresionante la estructura básica del virus, su origen biológico y epidemiológico, así como la evolución que experimentó desde el brote inicial y algunos de sus “talones de Aquiles” para

combatirlo desde el punto de vista inmunológico y farmacológico (Wang y col, 2020; Pillai y col, 2023).

Desde la notificación del primer caso de COVID-19 se ha publicado una enorme cantidad de estudios que han dilucidado las principales incógnitas acerca de la sintomatología, pruebas de detección, medidas de prevención y tratamiento de esta nueva enfermedad (Ochani y col, 2021; Carabelli y col, 2023). Sin embargo, el primer problema inmediato al cual se enfrentó la comunidad científica fue la avalancha de artículos publicados y preprints así como la necesidad que estos fuesen accesibles, siendo una de las respuestas colectivas por parte de las editoriales el acceso abierto a todas las publicaciones generadas sobre COVID-19 (Mandal, 2020; NCBI, 2020).

En medio del bombardeo informativo sobre el nuevo coronavirus, se generó un ambiente de confusión respecto a la aplicación de la prueba molecular PCR (estándar de oro) y los test rápidos, sobre todo cuando los resultados obtenidos parecían ser "contradictorios". A medida que se comprendió que el virus no posee un tropismo específico (vías respiratorias), sino una distribución sistémica en órganos conforme evoluciona la infección, se desarrollaron en muy corto tiempo una amplia gama de métodos de diagnóstico basados en diferentes enfoques: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa en tiempo real (RT-PCR), inmunocromatografía de flujo lateral (LF-CGIA), inmunofluorescencia de flujo lateral (LF-IFA), ensayo de quimioluminiscencia (CLIA), Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA). En paralelo, se fueron descubriendo las vías de transmisión del SARS-CoV-2, estrategias de control, medidas preventivas, los cuadros clínicos, su fisiopatología, los mecanismos de evasión inmune por parte del virus, la respuesta inmune humoral y celular generada por las personas infectadas, estrategias de reposicionamiento de fármacos y desarrollo de nuevos retrovirales.

El desarrollo histórico de vacunas contra el SARS-CoV-2 en tiempo récord a partir de diferentes plataformas tecnológicas incluidos viriones completos inactivados, virus vivos atenuados, ácidos nucleicos, vectores de virus, proteína S recombinante (Ndwandwe y Wiysonge, 2021; Joshi y col, 2021; Kalinke y col,

2022) y nanopartículas lipídicas de ARNm (Polack y col, 2020; Baden y col, 2021) fue posible gracias al conocimiento previo adquirido durante las epidemias de SARS-CoV y MERS-CoV, cuando se inició el desarrollo de la vacuna, pero se detuvo debido al fin de las epidemias (Excler y col, 2021). La plataforma de ARNm ya se estaba utilizando para ensayos clínicos y la plataforma de vector de adenovirus se utilizó para la vacuna comercializada contra el Ébola (Excler y col, 2021). Adicionalmente, la aceleración del proceso de desarrollo y aprobación de vacunas por parte de los organismos competentes, permitió la producción y distribución de millones de dosis de vacunas en todo el mundo, lográndose una vacunación masiva de la población que ayudó a disminuir el número de muertes provocadas.

Pese a que actualmente la disminución de los casos de COVID-19 como producto de la inmunidad colectiva que ha sido respaldada por los programas de vacunación a nivel mundial ha llevado al cese de la alarma epidemiológica decretado por la OMS, la enfermedad por SARS-CoV-2 no ha dejado de representar un importante problema global de salud pública. Las experiencias clínicas, publicadas en varias revistas médicas de alto impacto han confirmado que el virus es capaz de generar toda una serie de manifestaciones patológicas atípicas que pueden afectar de manera sistémica o independiente casi todos los órganos de las personas que contraen la infección, generando así alteraciones, cardiovasculares, gastrointestinales, pancreáticas, renales, hepáticas, endocrinas, nerviosas y autoinmunes (Munjal y col., 2020; Mahajan y col., 2020; Ramos-Casals y col., 2021, Peng y col., 2023; Beltrami y col., 2023, Martín Sánchez y col., 2023). Es por esta razón que los trabajadores de salud deben estar especialmente atentos y abordar a todos los pacientes con un alto índice de sospecha, incluyendo las pruebas de diagnóstico para el descarte de la enfermedad de modo rutinario sobre todo porque no existe hasta los momentos una terapia viral eficaz comprobada y el aislamiento de los casos sospechosos y el rastreo de contactos son los únicos medios disponibles para el control epidemiológico de esta infección.

La aplicación de pruebas de diagnóstico rápidas y precisas para la identificación a tiempo de los casos cobra entonces especial relevancia, más aún

cuando las pruebas que han sido desarrolladas hasta la fecha presentan índices aceptables de sensibilidad y especificidad, sin embargo; no son del todo eficaces en la detección temprana de la infección. La prueba estándar de oro para la detección de ARN viral resulta sensible sólo durante los primeros días de la infección, depende de la carga viral, es costosa, requiere de personal especializado en el diagnóstico molecular e infraestructuras de seguridad como un laboratorio tipo P3, mientras que las pruebas de detección de anticuerpos brindan resultados luego de transcurridos 7 a 28 días después de la aparición de los síntomas, no siendo las más idóneas para garantizar el pronto tratamiento y control (Li y col, 2022, Hingrat y col., 2021).

La detección de antígenos virales en muestras de suero ha sido una vía importante para el diagnóstico de captura de antígenos de varios virus, tales como: p24 (VIH), HBsAg/HBeAg (VHB), antígeno central (VHC), antígeno tardío pp65 (citomegalovirus) y antígeno de la nucleocápside (SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2), mediante ensayos inmunoenzimáticos, la cual se ha sido utilizada con éxito en el diagnóstico y seguimiento del virus (Cano y col., 2003; Clement y col., 2002; Icardi y col., 200; Mourton y col., 1992; St George y col, 2000, Sutthent y col., 2003; Weber y col., 2003; Che y col., 2004; Chen y col., 2015). Es por ello, que se han hecho múltiples esfuerzos en el desarrollo de pruebas de diagnóstico basadas en la detección de antígenos circulantes altamente conservados del SARS-CoV-2 (Favresse y col., 2022).

A medida que el virus se propaga, muta constantemente originando nuevas variantes (Lauring y Hodcroft; 2021). Diversos estudios han reportado los tipos de mutaciones más comunes del SARS-CoV-2, demostrando que la mayoría de estos sitios mutados están en el gen estructural S. Sin embargo; el gen N muta con menos frecuencia, lo que indica que la proteína de la nucleocápside es más conservada entre las diferentes variantes. Adicionalmente, es altamente inmunogénica, de expresión temprana y la de más abundante producción en células infectadas, lo cual se relaciona con la generación de altos niveles de antigenemia de N en las dos primeras semanas después del inicio de la infección, por lo que tiene el potencial de ser un interesante biomarcador para el diagnóstico

precoz de la infección (Bai y col, 2021; Deng y col., 2021; Toptan y col, 2021; Li y col, 2022)

En este sentido, las pruebas basadas en la detección del antígeno N en suero están desempeñando un papel importante en el diagnóstico de pacientes con COVID-19 ya que, además se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de antigenemia de N con la carga viral, la fase temprana de la enfermedad y por ende con la transmisibilidad viral, permitiendo identificar rápidamente a las personas infectadas durante el periodo ventana, garantizando de esta manera el tratamiento a tiempo y estrategias adecuadas de control epidemiológico (Diao y col, 2021; Li y col, 2022, Hingrat y col., 2021).

Con base a estas premisas las pruebas basadas en la producción de anticuerpos específicos para la detección del antígeno N del SARS-CoV-2 podrían complementar las pruebas de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico confiable de la enfermedad en la etapa temprana, reduciendo así las tasas de falsos negativos. En este trabajo se diseñó un sistema de inmunocaptura tipo ELISA sándwich para la detección del antígeno N del SARS-CoV-2 que se basó en la producción de anticuerpos policlonales dirigidos a reconocer dos regiones estructuralmente diferentes de la proteína. Estas regiones fueron seleccionadas con base a análisis bioinformáticos de especificidad y antigenicidad realizados sobre la secuencia nucleotídica traducida de la proteína N (GenBank: YP_009724397.2) y se restringen al NTD-LKR (N1) y al CTD-LKR (N2). Si bien en este estudio no se trabajó con los pequeños péptidos que han sido predichos como regiones de alta especificidad para la proteína N del SARS-CoV-2 (N18–39, N183–197, N249–266, N276–299 y N365–391) (Yu y col., 2022), la especificidad de las regiones seleccionadas (N1 y N2), se encuentra garantizada dado que la secuencia de esta proteína difiere significativamente de la de los coronavirus comunes HCoV-229E y HCoV-OC43 aunado a la carencia de una variante circulante del SARS-CoV en Venezuela (con quien comparte un 90,52% de homología de secuencia).

Por otra parte, la expresión independiente de los dominios NTD y CTD con los 48 aminoácidos correspondientes al LKR podría garantizar el plegamiento

natural de los mismos, favoreciendo la exposición de epítopes antigénicos a las células B en sus conformaciones nativas tal y como ocurre durante el proceso de infección viral natural. Siendo esto congruente con el hecho de que la estructura secundaria de un buen epítope debe ser flexible, altamente hidrófila y antigénica, así como mostrar un buen grado de accesibilidad en la superficie del antígeno. En este sentido la estructura terciaria de estos debe contener loops que exhiban las regiones peptídicas a las inmunoglobulinas presentes en las Células B y todas las regiones predichas por Yu y col. (2022), que se encuentran expresadas en la superficie de ambos dominios están dispuestas en estructuras de bucle aleatoria que consiguen su mejor conformación en el plegamiento terciario de la proteína.

Aunque se han puesto a disposición numerosos ensayos basados en la detección de antígenos del SARS-CoV-2, su costo relativamente alto en particular durante el primer año de la pandemia impidió que muchos laboratorios; especialmente en los países subdesarrollados los adquirieran. Esto se debe a que el desarrollo de pruebas de diagnóstico requiere de la producción en gran cantidad de antígenos de alta pureza, lo cual resulta bastante costoso sobre todo cuando se trata de antígenos que requieren su expresión obligada en sistemas eucariotas, como el caso del antígeno S, cuyo correcto plegado depende de modificaciones postraduccionales como la formación de puentes disulfuro y patrones de glicosilación. La proteína N fosforilada regula muchísimos procesos en la infección viral y se ha demostrado que la proteína de la nucleocápside recombinante carente de fosforilación no disminuye su antigenicidad, de hecho; la proteína N liberada durante la lisis de las células parece no estar fosforilada (Jayaram, y col., 2005; Hogue y col., 1995), por lo tanto, su expresión en *E. coli* no planteó ningún problema (Li y col., 2021; Chura-Chambi y col., 2022; Tien y col., 2022).

En este trabajo se lograron expresar de manera soluble, con un buen rendimiento y bajo costo, los antígenos recombinantes N1 y N2 en *E. coli*, un sistema heterólogo idóneo para la producción de antígenos recombinantes, puesto que es un organismo de crecimiento rápido, en medios de cultivo económicos, rindiendo además una alta densidad celular. Cabe destacar, que en la mayoría de los trabajos en los que han expresado la proteína N completa en *E. coli*, la

obtienen insoluble (cuerpos de inclusión) lo que implica la purificación, empleando condiciones desnaturalizantes (Li y col., 2021; Chura-Chambi y col., 2022).

Las estrategias de purificación empleadas permitieron obtener los dominios N1 y N2 puros a homogeneidad eluyendo entre 250 y 300 mM y a 320 mM de Imidazol respectivamente, evidenciándose en la electroforesis en SDS-PAGE (Figuras 19 y 20) en donde se observa una banda única correspondiente al peso molecular esperado. Cabe destacar que estos protocolos permitieron no solo eliminar las proteínas contaminantes de *E. coli* sino que además permitió obtener los fragmentos libres de ARN unido en un proceso simple, conveniente y de bajo costo, lo que resultó propicio para la producción a gran escala de estos antígenos requeridos para la obtención de los anticuerpos policlonales de captura y detección. Con un rendimiento de 7,38 mg y 15 mg totales por litro de cultivo para N1 y N2 respectivamente que equivalen al antígeno necesario para inmunizar 5 conejos y 9 cabras con una sola purificación siguiendo el esquema de inmunización realizado.

Una vez purificadas las proteínas recombinantes N1 y N2, el valor inmunogénico de cada una fue evaluado de manera independiente y usando la proteína N completa como antígeno de referencia esto a fin de poder tener una idea previa sobre la inmunogenicidad (títulos de IgG e IgM) natural de los pacientes con SARS-CoV-2 y también con el fin de conocer qué tan efectivas podrían ser estas regiones en la obtención de anticuerpos policlonales de captura y detección. Para ello, la inmunoreactividad de ambos antígenos frente a sueros de pacientes IgM e IgG previamente clasificados como positivos y negativos para COVID-19 fue determinada por ELISA indirecto, encontrándose que el polipéptido N2 presentó una inmunoreactividad frente a ambos isotipos de inmunoglobulinas prácticamente igual al de la proteína N y 2,6 veces superior a la encontrada para el péptido N1. No obstante, resulta importante destacar que, aunque fue usada la misma cantidad (200ng/pozo), el número de moles/pozo de cada antígeno resultó diferente respetando una relación molar N: N1: N2 de 1: 3: 2, siendo notable que en pozos sensibilizados con N1 en donde el número de moléculas de este dominio es superior a aquellas contenidas en placas sensibilizadas con la proteína N2 y la

proteína completa los títulos de anticuerpos detectados por este antígeno fueron 2,6 veces menores que a los detectados por el antígeno N2 (Figura 23). Esto pone en evidencia la baja capacidad inmunogénica de esta región, siendo entonces la región N2 la más inmunodominante de la proteína completa y por ende la de mayor valor inmunogénico, lo que coincide con resultados previamente reportados donde se sugiere que los anticuerpos α -N2 podrían ser empleados como anticuerpos de captura (Yu y col, 2022).

Adicionalmente, los resultados obtenidos mostraron que el péptido N2 logró una buena discriminación entre sueros positivos y negativos con una diferencia de medias de 2,3 unidades de absorbancia entre ambos. Entre tanto, el péptido N1 no logra una buena discriminación entre los sueros negativos y positivos con una diferencia de medias entre ellos de tan solo 0,4 valores de absorbancia, como muestra clara de su baja inmunogenicidad (Figura 23). Estos resultados también permiten proponer al antígeno N2 como un buen candidato para el desarrollo de pruebas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos IgM e IgG en muestras de suero y plasma.

Esto último se demostró con el análisis independiente de curvas ROC para cada uno de los antígenos (Figura 24), siendo N2 quien brinda un mayor porcentaje de sensibilidad y especificidad cuando es usado en la detección de anticuerpos IgM e IgG, con valores de sensibilidad de 100 y 93,33 % respectivamente. Es decir que permite identificar como positivos el 100% y el 93 % del conjunto de muestras evaluadas. Además, de brindar una especificidad del 93,75% y 97,56% respectivamente, lo cual sugiere que del número total de sueros negativos evaluados el 93,75 y 97,56% fueron determinados como personas negativas para anticuerpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 respectivamente. Estos resultados de sensibilidad y especificidad demuestran de forma concluyente que el polipéptido N2 es un dominio altamente inmunogénico y también un antígeno capaz de brindar alta sensibilidad, además de tener una baja probabilidad de generar reacciones cruzadas (falsos positivos). Además, es notable resaltar que de manera concordante con los resultados anteriormente este antígeno muestra un comportamiento similar a la proteína N, la cual exhibió 100% de sensibilidad

para ambos isotipos, así como 97,56 y 97,65 % de especificidad tanto para IgG como para IgM. Lo cual se ve reflejado en un valor de igual a 1 del área bajo la curva tanto para N y N2 (Tabla II).

No obstante, los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos para el polipéptido N1, lo posicionan como un antígeno con bajo valor diagnóstico para la detección serológica de SARS-CoV-2 tanto en fase aguda como una vez culminada la seroconversión, con valores de sensibilidad y especificidad de 70 y 97,23% en la detección de IgG y de 93,75% y 59,09% en la detección de IgM. Esto sugiere que si bien durante el diagnóstico en los primeros días de la infección permitiría detectar como verdaderos positivos el 93,75% de las muestras positivas evaluadas, solo el 59,09% de las muestras negativas evaluadas serían detectadas como individuos sanos, resultando de esta manera un 40% de los individuos diagnosticados como falsos positivos. De la misma manera, en el diagnóstico realizado en una etapa posterior a la seroconversión el 30% de los pacientes positivos serán diagnosticados como falsos negativos aun cuando brinda un buen valor de especificidad, siendo el 97,23 de las muestras negativas evaluadas detectadas como verdaderos negativos. Estos resultados se ven bien ilustrados en el comportamiento del gráfico (Figura 24), con valores de área bajo la curva más bajos que los encontrados para N y N2, de 0,9252 y 0,7216 para la detección de IgG e IgM respectivamente (Tabla IV).

Una vez conocido el valor inmunogénico y diagnóstico de ambos antígenos, la producción de anticuerpos contra cada uno de ellos fue un paso preponderante, ya que estas proteínas constituyen el eje central de los sistemas de detección de antígeno como el que fue desarrollado en este trabajo. La mayoría de las pruebas antigénicas disponibles comercialmente para el SARS-CoV-2 se basan en anticuerpos monoclonales anti-N (Yang y col, 2023; Yadegari y col, 2023), ya que al ser diseñados contra un solo epítipo brindan alta especificidad minimizando así la reactividad cruzada, no obstante; su producción y/o adquisición es de alto costo, lo cual se ve reflejado en el precio de la prueba diagnóstico. Los monoclonales garantizan alta especificidad, sin embargo; son muy vulnerables a las mutaciones que puedan ocurrir en ese epítipo de selección del monoclonal. Las limitaciones

impuestas por la infraestructura de nuestro laboratorio aunado al bloqueo en las relaciones comerciales con las empresas internacionales comercializadoras de reactivos biológicos, así como la urgente necesidad de generar una prueba diagnóstica de bajo costo disponible en los centros asistenciales venezolanos, fueron algunas de las razones de peso que llevaron a la producción y utilización de anticuerpos policlonales en este estudio. Además, los anticuerpos policlonales repercuten positivamente en la sensibilidad de las pruebas dado que pueden reconocer múltiples epítopes sobre el antígeno con el cual fueron producidos, lo cual resulta importante a la hora de detectar proteínas que se encuentran en muy bajas concentraciones y tienen mayor tolerancia a ligeras diferencias en la estructura del antígeno y su producción a gran escala requiere de menos tiempo y costo (Mladenovic Stokanic y col, 2023).

En este sentido, el suero α -N1 obtenido del conejo inmunizado presentó bajos títulos de anticuerpos, manteniéndose prácticamente constantes durante todo el esquema de inmunización realizado, que consistió de 11 inoculaciones intradérmicas del antígeno espaciadas entre ellas por periodos cortos de 1 sola semana, lo cual difiere de los esquemas tradicionalmente realizados en los que la estimulación es llevada a cabo cada dos semanas. Esto pone en evidencia la baja capacidad que tiene el N-NTD en la estimulación de células B, probablemente debido a que es el dominio más conservado entre las proteínas de la nucleocápside dada su función vital en el reclutamiento y unión al ARN (Peng y col., 2020; Bai y col., 2021). No obstante, se observó un estado proinflamatorio exacerbado en el conejo durante el periodo de sensibilización, evidente en fuertes lesiones dérmicas en las zonas de inoculación, comportamiento que no fue observado en las inmunizaciones realizadas con el dominio N-CTD en cabra. Resultados estos que parecen indicar que el N-NTD si bien tiene un índice de antigenicidad bajo podría ser la región de la proteína N responsable de generar los fuertes cuadros inflamatorios que han sido atribuidos al antígeno N intracelular y extracelular (sérico) del SARS-CoV 2. El cual tiene un papel clave comprobado en la producción de citoquinas proinflamatorias, la activación y formación aumentada del inflamosoma, el daño tisular, la coagulación y la gravedad de la enfermedad de

un paciente con COVID-19 (Toldo y col., 2021; Rodrigues y col., 2021; Pan y col., 2021; Olea y col., 2022; Favresse y col., 2022; Yu y col., 2023).

En contraste, los títulos de anticuerpos obtenidos en cabra contra la región N2 fueron altos, sin respuesta inflamatoria asociada, dejando clara la fuerte capacidad de este dominio de estimular la respuesta inmune humoral, lo cual se muestra consistente con resultados previos realizados en este trabajo así como en otras investigaciones que demuestran que este dominio tiene la mayor cantidad de epítopes antigénicos de la proteína, fungiendo, así como la región inmunodominante (Yu y col., 2022).

La purificación de α -N1 y α -N2 llevada a cabo con el sistema Econo-Pac®Serum IgG Purification Kit (*Biorad*), permitió obtener ambos anticuerpos policlonales altamente purificados con un rendimiento de 23,18% y 76% con respecto a las inmunoglobulinas totales presentes en los sueros inmunes, equivalente a 10,2 y 20,1 mg totales respectivamente (Figuras 21 y 22, Tablas II y III). Una cantidad suficiente para sensibilizar con 200ng de anticuerpos α -N1 51.000 pozos que corresponden a 531 placas de ELISA y 100.500 pozos que se traducen en 1047 placas de ELISA con la misma cantidad de nanogramos del anticuerpo α -N2 partiendo de tan solo 2,5 y 3,5 mL de suero respectivamente y en un solo paso de purificación.

El siguiente paso consistió en determinar la combinación de anticuerpos captura/primario (detección) más propicia para llevar a cabo la eficiente captura del antígeno N desde el suero de pacientes positivos para COVID-19. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar la combinación α -N2/ α -N para ser usada en el sistema de inmunocaptura puesto que además de capturar la proteína N libre en suero discriminó de forma eficiente valores de absorbancia de sueros positivos y negativos, en contraste a lo sucedido al utilizar la combinación α -N2/ α -N1 (Figura 25). Esto se debe a que cuando se utiliza la combinación α -N2/ α -N el anticuerpo de captura α -N2 reconoce los epítopes antigénicos del dominio N2 de la proteína N, pero hay epítopes de este dominio N1 que quedan disponibles y son reconocidos por el anticuerpo de detección α -N, además, la proteína N natural debe estar formando un homodímero y por tanto también quedaría al menos un

dominio N2 libre. En el caso de la combinación α -N2/ α -N1, se observaron muy bajos valores de absorbancia lo que indica que a pesar que el anticuerpo de captura α -N2 está logrando capturar a la proteína N sérica, la interacción antígeno-anticuerpo α -N1 es tan limitada que se ve reflejada en una disminución de la sensibilidad, esto podría explicarse a que aunado al hecho de que la densidad comprobada de epítopes antigénicos en este dominio es bastante baja, la interacción entre los anticuerpos de captura α -N2 con el antígeno inducen cambios conformacionales en este último que genera el ocultamiento de los epítopes reconocidos por los determinantes antigénicos del anticuerpo α -N1. En vista de que cuando estos últimos son usados como anticuerpos de captura los valores de absorbancia son mayores. No obstante, el hecho de que el sistema se mostrara eficiente para capturar N empleando como anticuerpos de detección los policlonales producidos contra la proteína completa fue bastante alentador, más aún cuando la eliminación de anticuerpos contra la región N1 significó un incremento de la especificidad del sistema, ya que por tener esta región una función viral crucial, se encuentra más conservada entre los diferentes coronavirus que infectan a los humanos, incluyendo a los coronavirus causantes del resfriado común, muy frecuentes en la población (Zeng y col., 2020; Dinesh y col., 2020; Kang y col., 2020; Peng y col., 2020; Bai y col., 2021). De hecho, Tan y col., (2004) lograron incrementar los valores de especificidad en el diagnóstico de SARS-CoV eliminando la reactividad cruzada al emplear un antígeno N recombinante que carecía de los primeros 119 residuos de aminoácidos que corresponden a este dominio.

Dado que la presencia de anticuerpos opsonizantes para la proteína N en el suero pacientes positivos para COVID-19 podría impedir la captura de este antígeno por inhibición de la interacción entre los anticuerpos de captura α -N2 y sus respectivos epítopes, causando una disminución de los valores de absorbancia y por ende de la sensibilidad del sistema aumentando la probabilidad de tener falsos negativos, se decidió determinar el volumen de suero que es necesario para opsonizar 5ng de proteína N recombinante, una cantidad que supera la concentración de N promedio reportada para pacientes clínicamente severos y con

alto grado de antigenemia para N (Hingrat y col., 2020). Para ello, se realizó una curva estándar de opsonización de N recombinante en presencia de volúmenes variables de un suero con altos títulos de IgG α -N empleando como control un suero negativo. Encontrando que un volumen de 25 μ L de suero IgG positivo fue suficiente para opsonizar completamente 5 ng de proteína N recombinante. En este sentido, y teniendo en cuenta que el volumen de sueros con el cual se estandarizó el sistema de inmunocaptura es el doble del volumen máximo empleado en esta curva (50 μ L), los pacientes IgG positivos que logren ser detectados tendrían una concentración de N libre en suero superior a 5 ng (5000pg). Por lo tanto, esta concentración podría ser considerada como un cut-off teórico para la captura de N por nuestro sistema, cuando hay IgG α -N en las muestras de sueros (Figura 28).

Este efecto de la función opsonizante de los anticuerpos IgG en la inhibición de la captura de N por el sistema sándwich ELISA indirecto fue también puesto en evidencia en experimentos posteriores que pretendían cuantificar la concentración promedio del antígeno N en sueros de pacientes con diferente estatus inmunológico (positivos para IgM, IgG y IgM/IgG), ya que la concentración promedio de N no opsonizada en sueros IgM positivos fue evidentemente superior a aquellos en los que habían anticuerpos IgG con capacidad opsonizante. Siendo la concentración promedio de N libre en suero de 9768 pg/mL, un valor 5,7 veces mayor a la encontrada en pacientes que estaban experimentando la seroconversión (1895 pg/mL) y 3,7 veces superior en pacientes IgG positivos (2653 pg/mL) (Figura 29A), relacionándose esto con un efecto de apantallamiento en la captura del antígeno. Sin embargo, se detectaron casos de pacientes en los que a pesar de poseer altos títulos de IgG se logró detectar grandes cantidades de proteína N y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en ensayos anteriores demostraron que las IgG presentes en elevados títulos en el suero de pacientes positivos eran capaces de opsonizar completamente 5000 pg (Figura 29A), se puede inferir que la concentración de la proteína total sobrepasa este valor en pg, superando de esta manera el efecto de apantallamiento inducido por la IgG.

Este comportamiento resulta similar al encontrado por Zhang y col., 2021, quienes al realizar cinéticas de correlación entre las concentraciones de antígeno N séricos y los títulos de anticuerpos IgM e IgG reportan una disminución significativa en la detección del antígeno N sérico en pacientes COVID-19 positivos para ambos anticuerpos. Si bien, las inmunoglobulinas IgM no son eficaces para neutralizar el antígeno, la disminución notable en la captura de N en sueros de pacientes IgM/IgG positivos (Figura 29A) podría estar relacionado a un efecto sinérgico de estas inmunoglobulinas en la eliminación del antígeno sérico por neutralización o a la carga viral del paciente en el momento de la toma de muestra. Por otra parte resulta importante mencionar que la concentración de antígeno N circulante aumenta significativamente a medida que transcurre la infección activa y este aumento exponencial se encuentra directamente relacionado con la gravedad de los síntomas, dado a que es capaz de interactuar con numerosos factores inmunitarios del huésped promoviendo entre muchas cosas, la hiperactivación del complemento y del epitelio de células pulmonares y arteriales, la estimulación de la secreción de citocinas proinflamatorias por macrófagos activados (Hingrat y col., 2020; Ali y col., 2021; Freda y col., 2021; Quian y col., 2021; Xia y col., 2021; Zhang y col., 2021; Olea y col., 2022; Gao y col., Kao y col; 2022; 2022; Nakayama y col., 2022) . La participación de N en estos eventos podría también estar relacionada a la disminución de la concentración de antígeno libre (secuestro) dada su necesaria interacción con las proteínas involucradas en promover estas respuestas inmunitarias innatas.

Por otra parte, del 100% de los sueros negativos seleccionados que habían sido previamente evaluados por RT-PCR en tiempo real, iFLASH y ELISA indirecto, el 86% fue detectado por el sistema de captura como verdaderos negativos (NC) y el 14% restante como positivos (PC), lo que demuestra que se trata de falsos negativos que escaparon a las pruebas de detección de ARN viral y de anticuerpos. Lo que indica que estos pacientes se encontraban cursando los primeros días de infección posteriores a la migración del virus de cavidad nasofaríngea y previos a la activación de la inmunidad adaptativa humoral, es decir se encontraban en el periodo ventana de la enfermedad (Figura 29B). Es de

hacer notar que la concentración promedio de antígeno libre en el periodo ventana se encuentre subestimada dado el n relativamente bajo de la muestra.

El último paso de este estudio fue la evaluación del desempeño del sistema diagnóstico desarrollado en la captura del antígeno N desde sueros IgM, IgG, e IgM/IgG positivos para COVID-19. Como se muestra en la tabla V, la prueba ofrece el mismo porcentaje de especificidad para cada una de las categorías de sueros evaluados (97,37%) no viéndose afectado el valor de punto de corte o cut off (0,185). Sin embargo, el porcentaje de sensibilidad se mostró similar tanto en sueros IgG como IgM positivos siendo de 55 y de 52,38% respectivamente y disminuyó al 20% en sueros IgG/IgM positivos. Este hecho fue consistente con los valores del área bajo la curva (Figura 30).

No obstante, dado el bajo valor de sensibilidad obtenido al evaluar las tres categorías de sueros empleados, especialmente para sueros con títulos concomitantes de IgG e IgM, se intuyó que la disminuida capacidad de capturar eficientemente el antígeno N sérico en los sueros, pudiese estar relacionada además de la opsonización ya demostrada, con un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas de la misma que pudiesen limitar su interacción eficiente con los anticuerpos de captura α -N2 así como con la presencia del antígeno en el interior de exosomas celulares. Es por esta razón que se decidió cambiar las condiciones de la solución de incubación (diluyente de muestra), al someter a prueba el efecto de suplementar esta solución con componentes tensoactivos sobre los niveles de captura de proteína N libre en el suero de pacientes positivos para SARS-CoV-2 en presencia de calor.

Como se observa en la Figura 31 y en la tabla VI, la adición de surfactantes permitió incrementar el porcentaje de sensibilidad de la prueba realizada con sueros IgM/IgG positivos desde 20 a 59,09%, con valores de especificidad y cut-off inalterados con respecto a las pruebas realizadas sin pretratamiento químico, mejorando así el desempeño de la prueba diagnóstico con un área bajo la curva más cercana al valor de 1 (0,8206). Estos resultados pueden deberse a la acción sinérgica entre el calor y los detergentes en pretratamiento termoquímico de las muestras (SDS-Tween-20 en diluyente de muestra a 56°C durante 5 minutos)

sobre la disrupción de las interacciones antígeno N-anticuerpos opsonizantes, lo que permite disminuir el efecto de apantallamiento de estos últimos sobre la proteína N, permitiendo así su interacción con los anticuerpos de captura. Por otra parte, la interacción de las colas hidrofóbicas de los detergentes con los parches hidrofóbicos de la proteína podría estar induciendo pequeños cambios conformacionales en la proteína favoreciendo así la exposición en la superficie de determinantes antigénicos inicialmente escondidos y un mejor reconocimiento de estos por los anticuerpos. La solubilización de exosomas inducida por detergentes incrementaría adicionalmente la concentración de antígeno libre disponible en las muestras.

Pretratamientos termoquímicos similares de muestras nasofaríngeas también fueron llevados a cabo por Maldenovic Stokanic y col. (2023) en el diseño de una prueba ELISA tipo sándwich, basada en anticuerpos policlonales hechos en ratón y conejo para la cuantificación de la proteína N del SARS-CoV-2. No obstante, ellos logran un incremento en la captura del antígeno al incubar este último en tampón diluyente de muestra suplementado con el detergente no iónico Tritón x-100. Este resultado, difirió de los ensayos de estandarización de las condiciones de incubación llevados a cabo inicialmente en este trabajo, en los que la utilización de Tritón X-100 anuló por completo la captura del antígeno (datos no mostrados), sin embargo, estas variaciones en los resultados pueden ser atribuidas a diferencias en la naturaleza de las muestras.

Por otra parte, el prolongado tratamiento térmico a 56°C realizado por estos investigadores influyo negativamente en la sensibilidad del ensayo, siendo esto diferente a lo encontrado en este estudio en el que los valores de absorbancia se vieron significativamente aumentados con el corto precalentamiento de las muestras a la misma temperatura con respecto a los obtenidos durante las incubaciones a temperatura ambiente. De manera que, el calentamiento moderado no induce cambios tan drásticos en su conformación estructural que puedan ver afectada la configuración estructural de los determinantes antigénicos que pudiesen impedir su reconocimiento. Pese a estas ligeras diferencias en ambos diseños, la prueba de diagnóstico de Maldenovic Stokanic y col. (2023) para la

detección de N en muestras nasofaríngeas tiene valores de sensibilidad y especificidad (52,94% y 100%) similares a los encontrados para nuestro sistema, aun cuando emplearon anticuerpos de detección conjugados a biotina/estreptavidina-HRP, un sistema reportero que permite una mayor amplificación de la señal que el basado en la conjugación de una anti-IgG/HRP. Otra de las diferencias entre ambos trabajos que representa sin duda alguna el principal punto a favor de nuestra prueba es el elevado valor diagnóstico que aporta el suero como muestra clínica de detección del antígeno N, puesto que como ya se ha mencionado anteriormente el virus permanece alojado en la cavidad nasofaríngea un tiempo corto y la eficiencia de esta muestra depende significativamente de la carga viral, mientras que la presencia del antígeno N circulante en sangre se hace evidente tanto en el periodo ventana como después de este y a concentraciones elevadas que se relacionan tanto con la carga viral como con la gravedad del paciente, incluyendo los pacientes asintomáticos. Sin embargo, ambas investigaciones resultan igualmente significativas al momento de crear un precedente en el diseño de plataformas de diagnóstico de bajo costo basadas en el uso de anticuerpos policlonales.

En esta comparación, resulta valioso resaltar que la mayoría de las pruebas basadas en la detección del antígeno N a través de anticuerpos monoclonales presentan valores de sensibilidad iguales o similares a los obtenidos con esta prueba, que rondan entre el 52 y el 75% (Yamaoka y col, 2021; Humbert y col, 2022; Adnan y col, 2022) incluyendo aquellos que emplean potentes mecanismos de amplificación de la señal como el ensayo de electroquimioluminiscencia R-PLEX convencional y S-PLEX ultrasensible mejorado, que poseen una sensibilidad 51 y 68% respectivamente. Y, a favor de la prueba de Maldenovic Stokanick y col. (2023) basada en policlonales, el ELISA sándwich para la detección de N en muestras nasofaríngeas de Humber y col (2022) presenta una sensibilidad ligeramente mayor de 58,6%. Este resultado resulta bastante sorprendente, ya que con el dispositivo de prueba desarrollado se está capturando antígeno N con concentraciones muy limitadas del anticuerpo de captura. Esto debido a que los 200 ng empleados de este anticuerpo no representaban una

población de IgG específica para el antígeno N2, ya que representan una muestra de la población de IgG totales purificados a partir del suero de cabra. Por lo tanto, considerando que en animales hiperinmunizados con un antígeno solo el 10% de las IgG totales corresponden a IgG específicos para este, entonces de los 200 ng totales empleados en la sensibilización solo 20 ng corresponden a anticuerpos α -N2, de los cuales sólo un tercio (7ng) quedan unidos con la orientación correcta sobre la superficie de los pozos, implicando así una pérdida en la sensibilidad. Por lo tanto, la sensibilidad de la prueba podría verse substancialmente incrementada mediante la purificación de los anticuerpos específicos mediante cromatografía de afinidad específica para el antígeno N2.

Otra de las grandes ventajas que ofrece un sistema de detección viral basado en anticuerpos policlonales frente aquellos que usan monoclonales, es la capacidad que tienen estos anticuerpos de interactuar con el antígeno a través de múltiples regiones mientras que los anticuerpos monoclonales si bien pueden brindar elevados porcentajes de especificidad, pueden ver comprometida en un buen grado la sensibilidad, ya que la capacidad de mutación aumentada en los organismos que se replican velozmente como el SARS-CoV-2, la probabilidad de que se acumulen cambios en los determinantes antigénicos seleccionados para su producción es bastante alta, afectando así la interacción de estas regiones antigénicas con los anticuerpos de captura, pudiendo así generar también un efecto de fuga en el diagnóstico de nuevas variantes. De hecho, las muestras séricas empleadas en la valoración del dispositivo de diagnóstico fueron colectadas entre los comienzos del año 2021 y mediados del año 2023, por lo que representan una muestra heterogénea de las variantes de preocupación (Alpha, Gamma, Delta, y Ómicron) y las variantes de interés (Lambda y Mu) que han circulado en Venezuela a lo largo de este periodo de tiempo.

Adicionalmente, otro de los atributos de nuestro sistema es que permite detectar eficientemente proteína N sérica con la mitad del volumen de suero empleado por la mayoría de los kits comerciales que es de 100 μ L, es decir; desde muestras que tienen una menor concentración del antígeno N, lo que sugiere una

alta afinidad de los anticuerpos obtenidos por el antígeno, así como un buen índice de estabilidad.

En conclusión, la detección sensible del antígeno N del SARS-CoV-2 a través del ELISA sándwich diseñado en este trabajo como uno más de los productos biotecnológicos de DIAGEN proporciona un prototipo valioso para el diagnóstico temprano de COVID-19 en Venezuela, que solo requiere de una muestra de sangre, es de bajo costo y es escalable en todos los laboratorios clínicos del país. Además, su desarrollo ha contribuido a la generación de un sin fin de conocimientos moleculares, bioquímicos y biotecnológicos que podrán ser aplicados en futuras investigaciones que persigan el desarrollo de pruebas de diagnóstico basado en la plataforma ELISA sándwich indirecto para detectar antígenos virales en sangre empleando anticuerpos policlonales.

www.bdigital.ula.ve

8. PERSPECTIVAS

- .- Purificar los anticuerpos de captura α -N2 a través de una cromatografía de afinidad específica para N2.
- .- Emplear como anticuerpo secundario α -IgG de conejo conjugado a biotina/estreptavidina-HRP para amplificar la señal y así aumentar la sensibilidad del sistema.
- .- Aumentar el número de muestras de suero (negativos y positivos) a fin de tener un cálculo más representativo de sensibilidad y especificidad.
- .- Realizar ensayos de detección de antígeno N en sueros de pacientes positivos previamente clasificados según la variante de SARS-CoV-2.
- .- Evaluar un mayor número de sueros de pacientes negativos tanto para la presencia de ARN viral como de anticuerpos, en los que se sospeche algún síntoma o cuadro clínico asociado a la infección por SARS-CoV-2.
- .- Estandarizar las condiciones de estabilización de los anticuerpos de captura (α -N2) y detección (α -N) empleados, a fin de utilizarlos en el ensamblaje de un kit de diagnóstico para la detección temprana de SARS-CoV-2.

www.bdigital.ula.ve

9. BIBLIOGRAFÍA

- .- Abduljalil JM. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.* 36:100713.
- .- Accorsi EK, Britton A, Fleming-Dutra KE, Smith ZR, Shang N, Derado G, Miller J, Schrag SJ, Verani JR. (2022). Association between 3 doses of mRNA COVID-19 vaccine and symptomatic infection caused by the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants. *JAMA.* 327(7):639-651.
- .- Adnan N, Khandker SS, Haq A, Chaity MA, Khalek A, Nazim AQ, Kaitsuka T, Tomizawa K, Mie M, Kobatake E, Ahmed S, Ali NAA, Khondoker MU, Haque M, Jamiruddin MR. (2022). Detection of SARS-CoV-2 by antigen ELISA test is highly swayed by viral load and sample storage condition. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 20(3):473-481.
- .- Ahammad I, Lira SS. (2020). Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: An immunoinformatics approach. *Int J Biol Macromol.* 162:820-837.
- .- Ali YM, Ferrari M, Lynch NJ, Yaseen S, Dudler T, Gragerov S, Demopoulos G, Heeney JL, Schwaeble WJ. (2021). Lectin Pathway Mediates Complement Activation by SARS-CoV-2 Proteins. *Front Immunol.* 12:714511.
- .- Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, Gower C, Kall M, Groves N, O'Connell AM, Simons D, Blomquist PB, Zaidi A, Nash S, Iwani Binti Abdul Aziz N, Thelwall S, Dabrera G, Myers, R, Amirthalingam G, Gharbia S, Barrett JC, Elson R, Ladhani SN, Ferguson N, Zambon M, Campbell CNJ, Brown K, Hopkins S, Chand M, Ramsay M, Lopez Bernal J. (2022). Covid-19 Vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant. *N Engl J Med.* 386(16):1532-1546.
- .- Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, Sabzevari A, Azizi G. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol.* 93(4):12998.
- .- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, ... COVE Study Group

(2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 384(5):403-416.

.- Baggen J, Vanstreels E, Jansen S, Daelemans D. (2021). Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol.* 6(10):1219-1232.

.- Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. (2021). The SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses,* 13(6):1115.

.- Beck ET, Paar W, Fojut L, Serwe J, Jahnke RR. (2021). Comparison of the Quidel Sofia SARS FIA Test to the Hologic Aptima SARS-CoV-2 TMA Test for Diagnosis of COVID-19 in Symptomatic Outpatients. *J Clin Microbiol.* 59(2):e02727-20.

.- Beltrami S, Rizzo S, Caccuri F, Rizzo R, Bortolotti D, Schiuma G. (2023). SARS-CoV-2 Systemic Effects: New Clues. *Microorganisms.* 11(5):1209.

.- Bojkova D, Klann K, Koch B, Widera M, Krause D, Ciesek S, Cinatl J, Münch C. (2020). Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature.* 583(7816):469-472.

.- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

.- Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci.* 11(1):136.

.- Cano H, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V. (2003). Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. *Transfus Med.* 13(5): 259-266.

.- Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, van der Meer F, Kallio K, Kaya T, Anastasina M, Smura T, Levanov L, Szirovicza L., Tobi A, Kallio-Kokko H, Österlund P, Joensuu M, Meunier FA, Butcher SJ, Winkler MS, Mollenhauer B, Helenius A, Gokce O, Teesalu T, Hepojoki J, Vapalahti O, Stadelmann C, Balistreri G, Simons M. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science.* 370(6518):856-860.

- .- Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, COVID-19 Genomics UK Consortium, Peacock SJ, Barclay WS, de Silva TI, Towers GJ, Robertson DL. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol.* 21(3):162-177.
- .- Cerda J, Cifuentes L. (2012). Using ROC curves in clinical investigation: theoretical and practical issues. *Rev Chilena Infectol.* 29(2):138-141.
- .- Chang CK, Sue SC, Yu TH, Hsieh CM, Tsai CK, Chiang YC, Lee SJ, Hsiao HH, Wu WJ, Chang WL, Lin CH, Huang TH. (2006). Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J Biomed Sci.* 13(1): 59-72.
- .- Chang CK, Hou MH, Chang CF, Hsiao CD, Huang TH. (2014). The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions. *Antiviral Res.* 103: 39-50.
- .- Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, Wang YD, Liao ZY, Hua X, Cheng VC, Yuen KY. (2004). Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol.* 42(6):2629-2635.
- .- Chen CY, Chang CK, Chang YW, Sue SC, Bai HI, Riang L, Hsiao CD, Huang TH. (2007). Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *J Mol Biol.* 368(4):1075-1086.
- .- Chen Y, Chan KH, Kang Y, Chen H, Luk HK, Poon RW, Chan JF, Yuen KY, Xia N, Lau SK, Woo PC. (2015). A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerging Microbes Infect.* 4(4):e26.
- .- Cheng Z, Lu Y, Cao Q, Qin L, Pan Z, Yan F, Yang W. (2020). Clinical Features and Chest CT Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Single-Center Study in Shanghai, China. *AJR. AJR Am J Roentgenol.* 215(1):121-126.
- .- Chura-Chambi RM, Prieto-da-Silva ARB, Di Lela MM, Oliveira JE, Abreu PEA, Meireles LR, de Andrade Junior HF, Morganti L (2022). High level SARS-CoV-2 nucleocapsid refolding using mild condition for inclusion bodies solubilization: Application of high pressure at pH 9.0. *Plos One.* 17(2):e0262591.

- .- Clement F, Dewint P, Leroux-Roels G. (2002). Evaluation of a new rapid test for the combined detection of hepatitis B virus surface antigen and hepatitis B virus e antigen. *J Clin Microbiol.* 40(12):4603-4606.
- .- Cohen SN, Chang AC, Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69(8):2110-2114.
- .- Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthe M, V'kovski P, Kriegenburg F, Thiel V, de Haan CAM, Reggiori F. (2020). Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *J Virol.* 94(4):e01925-19.
- .- Corman VM, Lienau J, Witzentrath M. (2019). Coronaviruses as the cause of respiratory infections. *Der Internist.* 60(11):1136-1145.
- .- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 5(4):536-544.
- .- Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, Singh S, Stuchell-Brereton MD, Ward MD, Zimmerman MI, Vithani N, Griffith D, Wagoner JA, Bowman GR, Hall KB, Soranno A, Holehouse AS. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nature Commun.* 12(1):1936.
- .- Cui J, Li F, Shi ZL. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 17(3):181-192.
- .- Cura E, Wendel S. (1994). Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. PAHO. Pp. 13-21.
- .- Deng Q, Ye G, Pan Y, Xie W, Yang G, Li Z, Li Y. (2021). High Performance of SARS-Cov-2N Protein Antigen Chemiluminescence Immunoassay as Frontline Testing for Acute Phase COVID-19 Diagnosis: A Retrospective Cohort Study. *Frontiers in medicine,* 8, 676560.
- .- Diao B, Wen K, Zhang J, Chen J, Han C, Chen Y, Wang S, Deng G, Zhou H, Wu Y. (2021). Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect.* 27(2):289.e1-289.e4.

- .- Digard P, Lee HM, Sharp C, Grey F, Gaunt E. (2020). Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 6(2):veaa057.
- .- Dinesh DC, Chalupska D, Silhan J, Koutna E, Nencka R, Veverka V, Boura E. (2020). Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. *PLoS Pathog.* 16(12):e1009100.
- .- El-Menyar A, Khan NA, Mekkodathil A, Rizoli S, Consunji R, Elmenyar E, Galwankar S, Al-Thani H. (2022). A quick scoping review of the first year of vaccination against the COVID-19 pandemic: Do we need more shots or time?. *Medicine.* 101(37):e30609.
- .- Excler JL, Saville M, Berkley S, Kim JH. (2021). Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nat Med.* 27(4):591-600.
- .- Fan H, Ooi A, Tan YW, Wang S, Fang S, Liu DX, Lescar J. (2005). The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure.* 13(12):1859-1868.
- .- Favresse J, Bayart JL, David C, Dogné JM, Douxfils J. (2022). Nucleocapsid serum antigen determination in SARS-CoV-2 infected patients using the single molecule array technology and prediction of disease severity. *J Infect.* 84(4):e4-e6.
- .- Fehr AR, Perlman S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 1282:123.
- .- Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Achdout H, Stein D, Israeli O, Beth-Din A, Melamed S, Weiss S, Israely T, Paran N, Schwartz M, Stern-Ginossar, N (2021). The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature.* 589(7840):125-130.
- .- Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. (2022). Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect.* 28(2):202-221.
- .- Freda CT, Yin W, Ghebrehiwet B, Rubenstein DA. (2021). SARS-CoV-2 proteins regulate inflammatory, thrombotic and diabetic responses in human arterial fibroblasts. *Clin Immunol.* 227:108733.

- .- Fung TS, Liu DX. (2019). Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol.* 8(73):529-557.
- .- Gao T, Gao Y, Liu X, Nie Z, Sun H, Lin K, Peng H, Wang S. (2021). Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. *BMC Microbiol.* 21(1):58.
- .- Gao T, Zhu L, Liu H, Zhang X, Wang T, Fu Y, Li H, Dong Q, Hu Y, Zhang Z, Jin J, Liu Z, Yang W, Liu Y, Jin Y, Li K, Xiao Y, Liu J, Zhao H, Liu Y, ... Cao C. (2022). Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct Target Ther.* 7(1):318.
- .- Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, Takvorian PM, Bleck C, Hsu VW, Fehr AR, Perlman S, Achar SR, Straus MR, Whittaker GR, de Haan CAM, Kehrl J, Altan-Bonnet G, Altan-Bonnet N. (2020). β -Coronaviruses use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell.* 183(6):1520-1535.e14.
- .- Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Krämer-Kühl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, Dittmer U, von Hahn T, Simmons G, Hofmann H, Pöhlmann S. (2013). The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol.* 87(10):5502-5511.
- .- Gouveia D, Miotello G, Gallais F, Gaillard JC, Debroas S, Bellanger L, Lavigne JP, Sotto A, Grenga L, Pible O, Armengaud J. (2020). Proteotyping SARS-CoV-2 Virus from Nasopharyngeal Swabs: A Proof-of-Concept Focused on a 3 Min Mass Spectrometry Window. *J Proteome Res.* 19(11):4407-4416.
- .- Haniff HS, Tong Y, Liu X, Chen JL, Suresh BM, Andrews RJ, Peterson JM, O'Leary CA, Benhamou RI, Moss WN, Disney MD. (2020). Targeting the SARS-CoV-2 RNA Genome with Small Molecule Binders and Ribonuclease Targeting Chimera (RIBOTAC) Degradable. *ACS Cent Sci.* 6(10):1713-1721.
- .- Hernández C, Garcés MF, Hernández E. (2020). Pandemia de COVID-19 en Venezuela: Segunda cuarentena. *Acta Científica De La Sociedad Venezolana De Bioanalistas Especialistas.* 23(1).

- .- Hingrat QL, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, Duval X, Burdet C, Ichou H, Damond F, Bertine M, Benmalek N, Choquet C, Timsit JF, Ghosn J, Charpentier C, Descamps D, Houhou-Fidouh N, French COVID cohort management committee, CoV-CONTACT study group, members of the French-COVID cohort study group (by alphabetical order), ... Genetic (2020). Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clin Microbiol Infect.* 27(5): 789.e1-789.e5.
- .- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. (2020a). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 181(2):271-280.e8.
- .- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. (2020b). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell.* 78(4):779-784.e5.
- .- Hogue BG. Bovine coronavirus nucleocapsid protein processing and assembly. *Adv Exp Med Biol.* 1995(380):259-63.
- .- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 19(3):141-154.
- .- Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, Hajduk P, Mack J, Fesik SW, Olejniczak ET. (2004). Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry.* 43(20):6059-6063.
- .- 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, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 395(10223):497-506.
- .- Humbert MV, Oporum PC, Brendish NJ, Poole S, He P, Katis I, Quaye J, Bediako Y, Duriez PJ, Eason RW, Sones C, Quaye O, Awandare GA, Christodoulides M, Clark TW, Quashie PK, McCormick CJ. (2022). A SARS-CoV-2

nucleocapsid ELISA represents a low-cost alternative to lateral flow testing for community screening in LMI countries. *J Infect.* 84(1):48-55.

.- Huston NC, Wan H, de Cesaris Araujo Tavares R, Wilen C, Pyle AM. (2020). Comprehensive in-vivo secondary structure of the SARS-CoV-2 genome reveals novel regulatory motifs and mechanisms. *bioRxiv.* 2020.07.10.197079.

.- Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Luigi C, Crovari P. (2001). Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol.* 39(9):3110-3114.

.- Ihling C, Tänzler D, Hagemann S, Kehlen A, Hüttelmaier S, Arlt C, Sinz A. (2020). Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients. *J Proteome Res.* 19(11): 4389-4392.

.- INAC (2020). “Decreto No 4.198, Estado de Alarma para atender la Emergencia Sanitaria del Coronavirus (COVID-19)”. Disponible en <http://www.inac.gob.ve/wp-content/uploads/2020/08/GOE6535.pdf> Consultado en Internet el 21/12/2020.

.- Jayaram J, Youn S, Collisson EW. (2005). The virion N protein of infectious bronchitis virus is more phosphorylated than the N protein from infected cell lysates. *Virology.* 339(1):127-135.

.- Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. COVID-19 dashboard. [JHUhttps://coronavirus.jhu.edu/map.html](https://coronavirus.jhu.edu/map.html) (2021). Acceso: 3 Diciembre, 2021.

.- Joshi G, Borah P, Thakur S, Sharma P, Mayank & Poduri R. (2021). Exploring the COVID-19 vaccine candidates against SARS-CoV-2 and its variants: where do we stand and where do we go?. *Hum Vaccin Immunother.* 17(12):4714-4740.

.- Jungreis, I., Sealfon, R., & Kellis, M. (2021). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 Sarbecovirus genomes. *Nat Commun.* 12(1):2642.

.- Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 61(3):180-202.

- .- Kalinke U, Barouch DH, Rizzi R, Lagkadinou E, Türeci Ö, Pather S, Neels P. (2022). Clinical development and approval of COVID-19 vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 21(5):609-619.
- .- Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, He S, Zhou Z, Zhou Z, Chen Q, Yan Y, Zhang C, Shan H, Chen S. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B*. 10(7):1228-1238.
- .- Kao MS, Yang JH, Balasubramaniam A, Traisaeng S, Jackson Yang A, Yang JJ, Salamon BP, Herr DR, Huang CM. (2022). Colonization of nasal cavities by *Staphylococcus epidermidis* mitigates SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein-induced interleukin (IL)-6 in the lung. *Microb Biotechnol*. 15(7):1984-1994.
- .- Kelly JA, Woodside MT, Dinman JD. (2021). Programmed -1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target. *Virology*, 554:75-82.
- .- Khan M, Adil SF, Alkathlan HZ, Tahir MN, Saif S, Khan M, Khan ST. (2020). COVID-19: A Global Challenge with Old History, *Epidemiology and Progress So Far*. *Molecules*. 26(1):39.
- .- Khan MT, Irfan M, Ahsan H, Ahmed A, Kaushik AC, Khan AS, Chinnasamy S, Ali A, Wei DQ. (2021). Structures of SARS-CoV-2 RNA-Binding Proteins and Therapeutic Targets. *Intervirology*. 64(2):55-68.
- .- Kumar R, Indrayan A. (2011). Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr*. 48(4):277-287.
- .- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- .- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 581(7807):215-220.
- .- Luring AS, Hodcroft EB. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean?. *JAMA*. 325(6):529-531.
- .- Letko M, Marzi A, Munster V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 5(4):562-569.

- .- Li S, Lin L, Wang H, Yin J, Ren Y, Zhao Z, Wen J, Zhou C, Zhang X, Li X, Wang J, Zhou Z, Liu J, Shao J, Lei T, Fang J, Xu N, Liu S. (2003). The epitope study on the SARS-CoV nucleocapsid protein. *Genomics proteomics bioinformatics*. 1(3):198-206.
- .- Li G, Li W, Fang X, Song X, Teng S, Ren Z, Hu D, Zhou S, Wu G, Li K. (2021). Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. *Purificación Expr De Proteínas*. 186:105908.
- .- Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, Fan J, Song L, Tong Y, Fan H. (2022). COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 7(1):146.
- .- Li X, Xiong M, Deng Q, Guo X, Li Y. The utility of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in laboratory diagnosis. *J Clin Lab Anal*. 2022 Jul;36(7):e24534.
- .- Li YD, Chi WY, Su JH, Ferrall L, Hung CF, Wu TC. (2020). Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. *J Biomed Sci*. 27(1):104.
- .- Lim SP. (2023). Targeting SARS-CoV-2 and host cell receptor interactions. *Antiviral Res*. 210:105514.
- .- Lin MH, Chuang SJ, Chen CC, Cheng SC, Cheng KW, Lin CH, Sun CY, Chou CY. (2014). Structural and functional characterization of MERS coronavirus papain-like protease. *J Biomed Sci*. 21(1):54.
- .- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1):265-275.
- .- Lu S, Xie XX, Zhao L, Wang B, Zhu J, Yang TR, Yang GW, Ji M, Lv CP, Xue J, Dai EH, Fu XM, Liu DQ, Zhang L, Hou SJ, Yu XL, Wang YL, Gao HX, Shi XH, Ke CW, Ke BX, Jiang CG, Liu RT. (2021). The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2. *Cell Rep*. 34(4):108666.
- .- Mahajan RK, Paul G, Mahajan R, Gautam PL, Paul B. (2020). Systemic manifestations of COVID-19. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 36(4):435-442.
- .- Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. (2022). Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23(1):21-39.

- .- Mandal H. (2020). Mobilizing the research ecosystem for scientific advances towards positive impact in the context of the COVID-19 Turk J Med Sci. 50(SI-1):485-488.
- .- Martín J, Tena N, Asuero AG. (2021). Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. Microchem J. 167:106305.
- .- Martín Sánchez FJ, Martínez-Sellés M, Molero García JM, Moreno Guillén S, Rodríguez-Artalejo FJ, Ruiz-Galiana J, Cantón R, De Lucas Ramos P, García-Botella A, García-Lledó A, Hernández-Sampelayo T, Gómez-Pavón J, González Del Castillo J, Martín-Delgado MC, Bouza E. (2023). Insights for COVID-19 in 2023. Rev Esp Quimioter. 36(2):114-124.
- .- Menachery VD, Dinnon KH, Yount BL, McAnarney ET, Gralinski LE, Hale A, Graham RL, Scobey T, Anthony SJ, Wang L, Graham B, Randell SH, Lipkin WI, Baric RS. (2020). Trypsin Treatment Unlocks Barrier for Zoonotic Bat Coronavirus Infection. J Virol. 94(5):e01774-1819.
- .- Mladenovic Stokanic M, Simovic A, Jovanovic V, Radomirovic M, Udovicki B, Krstic Ristivojevic M, Djukic T, Vasovic T, Acimovic J, Sabljic L, Lukic I, Kovacevic A, Cujic D, Gnjatovic M, Smiljanic K, Stojadinovic M, Radosavljevic J, Stanic-Vucinic D, Stojanovic M, Rajkovic A... Cirkovic Velickovic T. (2023). Sandwich ELISA for the Quantification of Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2 Based on Polyclonal Antibodies from Two Different Species. Int J Mol Sci. 25(1):333.
- .- Mourton C, Romestand B, de Kinkelin P, Jeffroy J, Le Gouvello R, Pau B. (1992). Highly sensitive immunoassay for direct diagnosis of viral hemorrhagic septicemia which uses antinucleocapsid monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 30(9):2338-2345.
- .- Mu J, Xu J, Zhang L, Shu T, Wu D, Huang M, Ren Y, Li X, Geng Q, Xu Y, Qiu Y, Zhou X. (2020). SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. Science China. Sci China Life Sci. 63(9): 1413-1416.

- .- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1:263-273.
- .- Munjal M, Das S, Chatterjee N, Setra, AE, Govil D. (2020). Systemic Involvement of Novel Coronavirus (COVID-19): A Review of Literature. Indian J Crit Care Med. 24(7):565-569.
- .- Nakayama EE, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Suzuki K, Uno K, Shimizu J, Okamoto T, Matsumoto H, Matsuura H, Hashimoto S, Tanaka T, Harada H, Tomita M, Kaneko M, Yoshizaki K, Shioda T. (2022). Anti-nucleocapsid antibodies enhance the production of IL-6 induced by SARS-CoV-2 N protein. Sci Rep. 12(1):8108.
- .- NCBI (National Center for Biotechnology Information) y NLM (National Library of Medicine). 2020. Public Health Emergency COVID-19 Initiative. Fecha de consulta: 18 de diciembre de 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/covid-19/?cmp=1>
- .- Ndwandwe D, Wiysonge CS. (2021). COVID-19 vaccines. Curr Opin Immunol. 71:111-116
- .- Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, Sohail MR, Mahmood SF, Ochani R, Hussham Arshad M, Kumar A, Surani S. (2021). COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. Infez Med. 29(1):20-36.
- .- Oh SJ, Shin OS. (2021). SARS-CoV-2 nucleocapsid protein targets RIG-I-Like receptor pathways to Inhibit the induction of interferon response. Cells. 10(3):530.
- .- Olea B, Albert E, Torres I, Gozalbo-Rovira R, Carbonell N, Ferreres J, Poujois S, Costa R, Colomina J, Rodríguez-Díaz J, Blasco ML, Navarro D. (2022). SARS-CoV-2 N-antigenemia in critically ill adult COVID-19 patients: Frequency and association with inflammatory and tissue-damage biomarkers. J Med Virol. 94(1):222-228.
- .- Olea B, Albert E, Torres I, Gozalbo-Rovira R, Carbonell N, Ferreres J, Poujois S, Costa R, Colomina J, Rodríguez-Díaz J, Blasco ML, Navarro D. (2022). SARS-

CoV-2 N-antigenemia in critically ill adult COVID-19 patients: Frequency and association with inflammatory and tissue-damage biomarkers. *J Med Virol.* 94(1):222-228.

.- Organizacion Panamericana de la Salud. La COVID-19 es ahora un problema de salud establecido y persistente. <https://www.paho.org/es/noticias/8-5-2023-covid-19-es-ahora-problema-salud-establecido-persistente>. Acceso: 8 de Mayo, 2023.

.- Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z. (2020). Author Correction: Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 12(1):2144.

.- Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. (2020). COVID-19 and the immune system. *Physiol Res.* 69(3):379-388.

.- Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, Xiao F, Wang Z, Wang J, Jia Y, Wang W, Wan P, Zhang J, Chen W, Lei Z, Chen X, Luo Z, Zhang Q, Xu M, Li G,... Wu J. (2021). SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun.* 12(1):4664.

.- Papageorgiou N, Lichièrè J, Baklouti A, Ferron F, Sévajol M, Canard B, Coutard B. (2016). Structural characterization of the N-terminal part of the MERS-CoV nucleocapsid by X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering. *Acta crystallographica. Acta Crystallogr D Struct Biol.* 72(Pt 2):192-202.

.- Peiris, JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, Yuen KY, HKU/UCH SARS Study Group (2003). Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* 361(9371):1767-1772.

.- Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, Gao GF, Song H. (2020). Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *The EMBO J.* 39(20):e105938.

.- Peng, K, Li X, Yang D, Chan SCW, Zhou J, Wan EYF, Chui CSL, Lai FTT, Wong CKH, Chan EWY, Leung WK, Lau CS, Wong ICK. (2023). Risk of autoimmune

diseases following COVID-19 and the potential protective effect from vaccination: a population-based cohort study. *EClinicalMedicine*. 63:102154.

.- Pillai S. (2023). Does the SARS-CoV-2 spike really have an Achilles heel?. *J Clin Invest*. 133(8):e168080.

.- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez J. L, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina WV, Cooper D, Frenck RW, Jr Hammitt LL, Türeci Ö,... C4591001 Clinical Trial Group (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 383(27):2603-2615.

.- Pollock NR, Savage TJ, Wardell H, Lee RA, Mathew A, Stengelin M, Sigal GB. (2021). Correlation of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen and RNA Concentrations in Nasopharyngeal Samples from Children and Adults Using an Ultrasensitive and Quantitative Antigen Assay. *J Clin Microbiol*. 59(4):e03077-20.

.- Pray IW, Kocharian A, Mason J, Westergaard R, Meiman J. (2021). Trends in Outbreak-Associated Cases of COVID-19 - Wisconsin, March-November 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70(4):114-117.

.- Prince-Guerra JL, Almendares O, Nolen LD, Gunn JKL, Dale AP, Buono SA, Deutsch-Feldman M, Suppiah S, Hao L, Zeng Y, Stevens VA, Knipe K, Pompey J, Atherstone C, Bui DP, Powell T, Tamin A, Harcourt JL, Shewmaker PL, Medrzycki M, Wong P, Jain S, Tejada-Strop A, Rogers S, Emery B, Wang H, Petway M, Bohannon C, Folster JM, MacNeil A, Salerno R, Kuhnert-Tallman W, Tate JE, Thornburg NJ, Kirking HL, Sheiban K, Kudrna J, Cullen T, Komatsu KK, Villanueva JL, Rose DA, Neatherlin JC, Anderson M, Rota PA, Honein MA, Bower WA. (2021). Evaluation of Abbott BinaxNOW rapid antigen test for SARS-CoV-2 infection at two community-based testing sites-Pima County, Arizona, November 3-17, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 70(3):100-105.

.- Qian Y, Lei T, Patel PS, Lee CH, Monaghan-Nichols P, Xin HB, Qiu J, Fu M. (2021). Direct Activation of Endothelial Cells by SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Is Blocked by Simvastatin. *J Virol*. 95(23):e0139621.

.- Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Mariette X. (2021). Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. *Nat Rev Rheumatol*. 17(6): 315-332.

- Reinig S, Shih SR. (2023). Non-neutralizing functions in anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies. *Biomed J.* 47(1):100666.
- Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, Gonçalves AV, Perucello DB, Andrade WA, Castro R, Veras FP, Toller-Kawahisa JE, Nascimento DC, de Lima MHF, Silva CMS, Caetite DB, Martins RB, Castro IA, Pontelli MC, de Barros FC... Zamboni DS. (2021). Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med.* 218(3):e20201707.
- Roingard P, Eymieux S, Burlaud-Gaillard J, Hourieux C, Patient R, Blanchard E. (2022). The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. *Cell Mol Life Sci.* 79(8):425.
- Saikatendu KS, Joseph JS, Subramanian V, Neuman BW, Buchmeier MJ, Stevens RC, Kuhn P. (2007). Ribonucleocapsid formation of severe acute respiratory syndrome coronavirus through molecular action of the N-terminal domain of N protein. *J Virol.* 81(8):3913-3921.
- Salvagno GL, Henry BM, Lippi G. (2021). Lower nasopharyngeal viral load in young SARS-CoV-2-positive subjects. *Infect Dis Now.* 51(8):686-688.
- Sanda M, Morrison L, Goldman R. (2021). N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Anal Chem.* 93(4): 2003-2009.
- Scholkmann F, May CA. (2023). COVID-19, post-acute COVID-19 syndrome (PACS, "long COVID") and post-COVID-19 vaccination syndrome (PCVS, "post-COVIDvac-syndrome"): Similarities and differences. *Pathol Res Pract.* 246:154497.
- Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 117(21):11727-11734.
- Shen H, Forgacs D, Chapla D, Moremen KW, Wells L, Hamer SA, Tompkins SM, Ross TM, Roupheal N, Edupuganti S, Collins MH, Tarleton RL. (2021). A flexible, pan-species, multi-antigen platform for the detection and monitoring of SARS-CoV-2-specific antibody responses. *medRxiv.* 2021.01.20.21249279.

- .- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 16(24):91-98.
- .- Simmonds P. (2020). Pervasive RNA Secondary Structure in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses. *mBio.* 11(6): e01661-20.
- .- Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. (2015). Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol.* 2(1): 265-288.
- .- St George K, Boyd MJ, Lipson SM, Ferguson D, Cartmell GF, Falk LH, Rinaldo CR, Landry ML. (2000). A multisite trial comparing two cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia test kits, biotest CMV brite and Bartels/Argene CMV antigenemia. *J Clin Microbiol.* 38(4): 1430-1433.
- .- Stephen S, Issac A, Jacob J, Vijay VR, Radhakrishnan RV, Krishnan N. (2020). COVID-19: Weighing the Endeavors of Nations, with Time to Event Analysis. *Osong Public Health Res Perspect.* 11(4):149-157.
- .- Subramanya SH, Lama B, Acharya KP. (2020). Impact of COVID-19 pandemic on the scientific community. *Qatar Med J.* 2020(1):21.
- .- Sun M, Han M, Xu S, Yan K, Nigal G, Zhang T, Song, B. (2022). Paper-based microfluidic chip for rapid detection of SARS-CoV-2 N protein. *Bioengineered.* 13(1):876-883.
- .- Supekar NT, Shajahan A, Gleinich AS, Rouhani DS, Heiss C, Chapla DG, Moremen KW, Azadi P. (2021). Variable posttranslational modifications of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleocapsid protein. *Glycobiology.* 31(9):1080-1092.
- .- Sutthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, Tanliang N, Kanoksinsombath C, Chaisilwatana P. (2003). p24 Antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol.* 41(3):1016-1022.
- .- Szelazek B, Kabala W, Kus K, Zdzalik M, Twarda-Clapa A, Golik P, Burmistrz M, Florek D, Wladyka B, Pyrc K, Dubin G. (2017). Structural Characterization of Human Coronavirus NL63 N Protein. *J Virology.* 91(11):e02503-16.

- .- Takeda M, Chang CK, Ikeya T, Güntert P, Chang YH, Hsu YL, Huang TH, Kainosho M. (2008). Solution structure of the c-terminal dimerization domain of SARS coronavirus nucleocapsid protein solved by the SAIL-NMR method. *J Mol Biol.* 380(4):608-622.
- .- Tien CF, Tsai WT, Chen CH, Chou HJ, Zhang MM, Lin JJ, Lin EJ, Dai SS, Ping, YH, Yu CY, Kuo YP, Tsai WH, Chen HW, Yu GY. (2022). Glycosylation and S-palmitoylation regulate SARS-CoV-2 spike protein intracellular trafficking. *iScience.* 25(8):104709.
- .- Toldo S, Bussani R, Nuzzi V, Bonaventura A, Mauro AG, Cannatà A, Pillappa R, Sinagra G, Nana-Sinkam P, Sime P, Abbate A. (2021). Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. *Inflamm Res.* 70(1): 7-10.
- .- Toptan T, Eckermann L, Pfeiffer AE, Hoehl S, Ciesek S, Drosten C, Corman VM. (2021). Evaluation of a SARS-CoV-2 rapid antigen test: Potential to help reduce community spread?. *J Clin Virol.* 135:104713.
- .- Trevethan R. (2017). Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilitys, and pitfalls in research and practice. *Front Public Health.* 5:307.
- .- Trougakos IP, Stamatelopoulos K, Terpos E, Tsitsilonis OE, Aivalioti E, Paraskevis D, Kastritis E, Pavlakis GN, Dimopoulos MA. (2021). Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of biomedical science.* 28(1):9.
- .- Ugurel OM, Mutlu O, Sariyer E, Kocer S, Ugurel E, Inci TG, Ata O, Turgut-Balik D. (2020). Evaluation of the potency of FDA-approved drugs on wild type and mutant SARS-CoV-2 helicase (Nsp13). *Int J Biol Macromol.* 163:1687-1696.
- .- Vashisht K, Goyal B, Pasupureddy R, Na BK, Shin HJ, Sahu D, De S, Chakraborti S, Pandey KC. (2023). Exploring the Immunodominant Epitopes of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein as Exposure Biomarker. *Cureus.* 15(2):e34827.
- .- Venezuela COVID-Coronavirus Statistic-Worldometer. www.worldometers.info.
- .- Viswanathan T, Arya S, Chan SH, Qi S, Dai N, Misra A, Park JG, Oladunni F, Kovalsky D, Hromas RA, Martinez-Sobrido L, Gupta YK. (2020). Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat Commun.* 11(1):3718.

- .- Vizcaíno-Salazar GJ. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Med y Lab*. 26: 365-386.
- .- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 19(3):155-170.
- .- Walker PGT, Whittaker C, Watson OJ, Baguelin M, Winskill P, Hamlet A, Djafaara BA, Cucunubá Z, Olivera Mesa D, Green W, Thompson H, Nayagam S, Ainslie KEC, Bhatia S, Bhatt S, Boonyasiri A, Boyd O, Brazeau NF, Cattarino L, Cuomo-Dannenburg G,... Ghani AC. (2020). The impact of COVID-19 and strategies for mitigation and suppression in low- and middle-income countries. *Science*. 369(6502):413-422.
- .- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 181(2):281-292.e6.
- .- Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 395(10223):470-473.
- .- Wang Z, Li S, Huang B. (2022). Alveolar macrophages: Achilles' heel of SARS-CoV-2 infection. *Signal Transduct Target Ther*. 7(1):242.
- .- Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. (2003). Evaluation of two new automated assays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *J Clin Microbiol*. 41(1):135-143.
- .- Whittaker GR, Daniel S, Millet JK. (2021). Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2. *Curr Opin Virol*. 47:113-120.
- .- World Health Organization. COVID-19 Situation report -51. Available from: <https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situationreports/20200311sitrep-51-covid19.pdf?sfvrsn=1ba62e5710>. Accessed: July 11, 2020.
- .- World Health Organization. COVID-19 vaccinations shift to regular immunization as COVAX draws to a close. Available from: <https://www.who.int/news/item/19-12-2023-covid-19-vaccinations-shift-to-regular-immunization-as-covax-draws-to-a-close>. Accessed: December 19, 2023.

- .- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 579(7798):265-269.
- .- Wu W, Cheng Y, Zhou H, Sun C, Zhang S. (2023). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Viol J*. 20(1):6.
- .- Xia J, Tang W, Wang J, Lai D, Xu Q, Huang R, Hu Y, Gong X, Fan J, Shu Q, Xu J. (2021). SARS-CoV-2 N Protein Induces Acute Lung Injury in Mice via NF- κ B Activation. *Front Immunol*. 12:791753.
- .- Xiang Y, Wang M, Chen H, Chen L. (2021). Potential therapeutic approaches for the early entry of SARS-CoV-2 by interrupting the interaction between the spike protein on SARS-CoV-2 and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *Biochem Pharmacol*. 192:114724.
- .- Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 12(1):8.
- .- Yadegari H, Mohammadi M, Maghsood F, Ghorbani A, Bahadori T, Golsaz-Shirazi F, Zarnani AH, Salimi V, Jeddi-Tehrani M, Amiri MM, Shokri F. (2023). Diagnostic performance of a novel antigen-capture ELISA for the detection of SARS-CoV-2. *Bioquímica anal*. 666:115079.
- .- Yamaoka Y, Miyakawa K, Jeremiah SS, Funabashi R, Okudela K, Kikuchi S, Katada J, Wada A, Takei T, Nishi M, Shimizu K, Ozawa H, Usuku S, Kawakami C, Tanaka N, Morita T, Hayash H, Mitsui H, Suzuki K, Aizawa D, ... Ryo A. (2021). Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests. *Cell Rep Med*. 2(6):100311.
- .- Yang H, Rao Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 19(11):685-700.

- .- Yang J, Phan VM, Heo CK, Nguyen HV, Lim WH, Cho EW, Poo H, Seo TS. (2023). Development of nucleocapsid-specific monoclonal antibodies for SARS-CoV-2 and their ELISA diagnostics on an automatic microfluidic device. *Actuadores Sens B Chem.* 380:133331.
- .- Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. (2008). Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol.* 181(9):6337-6348.
- .- Yu H, Guan F, Miller H, Lei J, Liu C. (2023). The role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in antiviral immunity and vaccine development. *Emerg Microbes Infect.* 12(1):e2164219.
- .- Yu IM, Oldham ML, Zhang J, Chen J. (2006). Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein dimerization domain reveals evolutionary linkage between corona and arteriviridae. *J Biol Chem.* 281(25):17134-17139.
- .- Yu J, Qin Z, Liu X, He X, Yao J, Zhou X, Wen K, Yu N, Wu Q, Xiao W, Zhu L, Wan C, Zhang B, Zhao W. (2022). High-specificity targets in SARS-CoV-2 N protein for serological detection and distinction from SARS-CoV. *Comput Biol Med.* 143: 105272.
- .- Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. (2021). COVID-19 diagnosis-A review of current methods. *Biosens Bioelectron.* 172:112752.
- .- Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, Mohammed, A, Zhao C, Yang Y, Xie J, Ding C, Ma X, Weng J, Gao Y, He H, Jin T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 527(3):618-623.
- .- Zhang P, Wang T, Xie SX. (2020). Meta-analysis of several epidemic characteristics of COVID-19. *J Data Sci.* 18(3):536-549.

.- Zhang Y, Ong CM, Yun C, Mo W, Whitman JD, Lynch KL, Wu AHB. (2021). Diagnostic Value of Nucleocapsid Protein in Blood for SARS-CoV-2 Infection. Clin Chem. 68(1). 240-248.

.- Zhou R, Zeng R, von Brunn A, Lei J. (2020). Structural characterization of the C-terminal domain of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. Mol biomed. 1(1):2.

.- Zinzula L, Basquin J, Bohn S, Beck F, Klumpe S, Pfeifer G, Nagy I, Bracher A, Hartl FU, Baumeister W. (2021). High-resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the Covid-19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Biochem Biophys Res Commun. 538:54-62.

www.bdigital.ula.ve