



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA



“PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DEL DOMINIO RBD DE LA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-COV-2 COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LOS METABOLITOS SECUNDARIOS H7R Y F7G”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

MARÍA ISABEL CAMPOS CASTILLO

Matricula: 2233801415

campos.isabel70@gmail.com

Director de Tesis:

DR. ARMANDO MEJÍA ÁLVAREZ

ASESORA: DRA. FERNANDA JOCELY CALDERÓN DE LA SANCHA

Jurado

PRESIDENTE: DR. JAVIER BARRIOS GONZÁLEZ

SECRETARIO: DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL: DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO

VOCAL: DORIS MARÍA ARELLANO QUINTANILLA

Iztapalapa, Ciudad de México a 12 de noviembre de 2025

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la SECIHTI (Becario: 1332216) en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios e Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Armando Mejía Álvarez.



A mi familia, por siempre estar.

“Acepta las cosas que no puedes cambiar, ten el valor para cambiar las cosas que puedes, y la sabiduría para reconocer la diferencia.” (Reinhold Niebuhr)

Agradecimientos

Al Dr. Armando Mejía Álvarez, por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, por motivarme a realizar mis estudios de maestría, por atender a mis llamados, por sus conocimientos, paciencia y confianza para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ulises Carrasco Navarro, por asesorar paso a paso este proyecto; por sus conocimientos, consejos y ayuda para lograr concluirlo; por su tiempo para revisarlo, por las risas y por hacerme saber que la ciencia se disfruta.

A la Dra. Fernanda Jocely Calderón de la Sancha, por su constancia y paciencia para asesorar este trabajo; por compartir conmigo cada tropiezo y logro durante este par de años; por estar presente, por las charlas, los consejos, las risas, la confianza y el café. Muchas gracias.

Al la Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado, al Dr. Javier Barrios Gonzáles y a la M.S. Doris María Arellano Quintanilla por aceptar revisar este trabajo a pesar de la premura.

A la Dra. María Fernanda Cerón Moreno, por siempre atender mis dudas, por la paciencia en la enseñanza de técnicas de biología molecular, por compartirme sus conocimientos, por motivarme a seguir a pesar de lo duro que parezca, por la confianza, las risas, las lágrimas y los abrazos.

A Shawa, mi querida cosa 1 admiro mucho tu manera tan liviana y divertida de afrontar las situaciones, gracias por tu amistad que hizo clic con mi humor; gracias por las risas, la confianza y por estar durante este proceso de mi vida académica y personal; A Adrián G., Erick, Ilse, Liz y Andrea por su amistad, por las risas escandalosas, la confianza, los momentos que salían de la rutina y por compartir su comida conmigo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ramón, Emma, Made, Montse, Pame, Anay, Diana, Fercho, Diego, Leni y Héctor, por las charlas, las risas, por siempre prestarme material y hacerme parte de un equipo.

A mi madre, a quien amo y a la que le debo tanto, admiro la mujer tan fuerte que eres; gracias por tu amor, tus abrazos, por mantenerme a flote y estar siempre al pendiente de mí. Mamá este logro también es tuyo y has hecho un trabajo excepcional.

A mamaisol, por cada conocimiento de vida que me has dado, por ser mi segunda mamá y enseñarme a no parar de hacer cosas.

A mis hermanos Cristian y Jorge, que, aunque somos cada uno diferentes y hemos tomado caminos distintos, siempre nos unen nuestras raíces y nuestro amor de hermanos, gracias por ser ese ejemplo de superación inalcanzable, por todo lo que me han enseñado y por estar atentos a mí. Sé que siempre podré contar con ustedes.

A Yubia, que fortuna tenerte ahora como parte de la familia; gracias por estar al pendiente de mi salud desde mis dos años, por cuidar de nuestra familia, por la confianza y por todos los conocimientos que me compartes,

A mi sobrino Axel, por enseñarme un amor distinto al convencional y por motivarme a ser ese adulto que necesite cuando era niña.

A Adrián B., quien es mi mejor amigo y compañero de aventuras, gracias infinitas por tu amor y por ayudarme en mis cotidianas crisis. El camino no es sencillo, pero enfrentarlo contigo de la mano lo hará siempre divertido, liviano, retador y feliz. Te amo.

A mis amigos de vida, Aline, Rous, Uriel, Tamara, Regina, Iván y Alejandro por ser esa parte divertida e incondicional que me acompaña en esta vida.

Retomar la vida académica fue todo un reto para mí, pero disfrute cada paso y cada tropiezo de esta etapa. Estoy agradecida con el Universo por todo lo que ahora poseo y espero con paciencia y fe un futuro lleno de nuevas aventuras.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Generalidades	5
2.1. COVID	5
2.2. Long-COVID	5
2.3. SARS-CoV-2.....	6
2.4. Proteína Spike (S).....	9
2.5. Dominio de Unión al Receptor (RBD)	10
2.6. Variantes	11
2.7. Compuestos de interés terapéutico	12
2.7.1. Flavonoides	12
2.7.2. Nanopartículas funcionalizadas	13
2.8. Flavonoides adsorbidos en nanopartículas funcionalizadas de TiO ₂	14
2.9. Expresión heteróloga de proteínas.	16
2.9.1. Técnica de clonación por enzimas de restricción.	17
2.9.2. <i>Escherichia coli</i>	17
3. Antecedentes.....	18
3.1. Expresión heteróloga de las proteínas del SARS-CoV-2.....	18
4. Justificación	21
5. Hipótesis	23
6. Objetivos.....	23
6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
7. Diagrama experimental.....	24
8. Materiales y métodos.....	25
8.1. Microorganismos	25
8.1.1. Condiciones de cultivo.....	25
8.1.2. Antibiótico e inductor	26
8.2. Medios de cultivo y soluciones amortiguadoras.....	26
8.3. Manipulación genética	29
8.3.1. Células ultracompetentes	29

8.3.2.	Transformación por choque térmico sin ligación	29
8.3.3.	Extracción de DNA plasmídico	30
8.3.3.1.	TENS-Miniprep (Zhou et al., 1990)	30
8.3.3.2.	Megaprep (Zhou et al., 1990)	30
8.3.4.	Vector de clonación	31
8.3.5.	Vector de expresión	32
8.3.6.	Oligonucleótidos	34
8.3.7.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
8.3.7.1.	Obtención del amplicones	34
8.3.7.2.	Confirmación de la construcción del vector pTWIN1- <i>RBD</i>	35
8.3.8.	Digestiones enzimáticas	36
8.3.9.	Purificación	37
8.3.10.	Ligación de amplicones en el vector pTWIN1	37
8.3.11.	Transformación por choque térmico de las construcciones.	37
8.3.12.	Selección, aislamiento y comprobación de clones	38
8.4.	Producción de la proteína recombinante	38
8.4.1.	Inducción y extracción proteica	38
8.4.2.	Cuantificación de la concentración de proteína	39
8.4.3.	Purificación por cromatografía de afinidad	40
8.4.4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	41
8.4.5.	Tinción	41
9.	Resultados y discusión	42
9.1.	Verificación del plásmido de clonación y el plásmido de expresión	42
9.2.	Obtención purificación y digestión del amplicón	44
9.3.	Digestión enzimática del vector pTWIN.	46
9.4.	Obtención de transformantes en <i>E. coli</i> TOP-10.	47
9.5.	Digestión Megapreps	49
9.6.	PCR de Megapreps	49
9.7.	Obtención de transformantes en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	51
9.8.	Comprobación de la integración del vector pTWIN1-SARS2- <i>RBD</i>	52
9.9.	Obtención de extractos intracelulares de <i>E. coli</i> BL21	53
9.10.	Análisis de la expresión	54

9.11. Purificación de la proteína	57
10. Conclusiones.....	58
11. Perspectivas	59
12. Referencias.....	60
13. Anexos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma y proteínas del SARS-CoV-2, extraída de Protein Data Bank (2020).	7
Figura 2. Localización de las proteínas estructurales de membrana (Cortés, 2020)	8
Figura 3. Dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 unido a ACE-2. Hélices α : púrpura; hélice 310: azul grisáceo; hojas β : amarillo; giros/espiras: cian. Los puentes disulfuro se muestran en rojo; los residuos de triptófano, en azul; y los residuos de asparagina como esferas verdes. Los residuos 1-115 de ACE-2 que interactúan con RBD mostrada en blanco. Tomada de Arbeitman et al. (2020)	11
Figura 4. Resultados de ensayos in vitro en células VeroE6 con H7R y F7G. (a) Título viral de SARS-CoV-2 en función del tiempo de preincubación con H7R y F7G. (b) Viabilidad celular infectada con SARS-CoV-2 (Abs = 1.0 indica células sanas) en presencia y ausencia de H7R y F7G. (c) Efecto de FTNP comparado con agentes antimicrobianos en la replicación del SARS-CoV-2. Adaptado de León-Gutiérrez et al. (2022).	15
Figura 5. Fusión celular mediada por Spike y ACE-2 con el reportero luciferasa. Panel a): presencia de ACE-2; Panel b): ausencia de ACE-2. Células efectoras que co-expresan Spike de SARS-CoV-2 con la polimerasa T7, co-cultivadas con la célula diana que co-expresan Spike de SARS-CoV-2 con la polimerasa T7, co-cultivadas con la célula diana que co-expresa ACE-2 con el gen luciferasa (panel a) y un plásmido pCDNA3.1 vacío con plásmido de luciferasa (panel b). Actividad de luciferasa a las 24 h de co-cultivo en presencia y ausencia de nanopartículas.	16
Figura 6. Esquema de clonación de genes por enzimas de restricción. Tomada de Tirabassi (n.d.).	17
Figura 7. Diagrama de flujo metodológico.	24
Figura 8. Mapa del vector pcDNA3.1, el cual contiene el gen S de SARS-CoV-2.	32
Figura 9. Mapa de restricción del vector pTWIN1.	33
Figura 10. Esquema que muestra el método de fusión del gen objetivo dentro del vector de expresión pTWIN1, representando los cortes de las enzimas utilizadas. Tomada de New England Biolabs (2025b).	37
Figura 11. Purificación de proteínas en vector pTWIN1. Fusión de Intein2 al extremo C-terminal de la proteína objetivo y liberación de esta por escisión inducida por tiol. Tomada de New England Biolabs (2025b).	40

Figura 12. Colonias obtenidas después de 14 horas de incubación. El control negativo no presentó crecimiento bacteriano, lo cual confirma la efectividad de la ampicilina. El control positivo mostró crecimiento, confirmando la viabilidad de las células *ultracompetentes*. *Las colonias transformadas se seleccionaron y se sembraron en medio LB agar con ampicilina, con el fin de conservar colonias aisladas.* 42

Figura 13. Gel de agarosa al 0.8%. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (ThermoScientific, 1kb), el carril 2 al plásmido pcDNA3.1 SARS2 Spike obtenido por megaprep y el carril 3 al mismo plásmido linealizado con XhoI. Los carriles 4 y 5 corresponden al plásmido pTWIN1 obtenido por megaprep y linealizado con XhoI, respectivamente. *Se utilizó el buffer de carga RedGel para este procedimiento.* 43

Figura 14. Gel de agarosa al 0.8% cargado con reacciones de PCR a partir del plásmido pTWIN1 utilizando los primers F-pTWIN y R-pTWIN. En el esquema inferior se visualiza la región dentro de pTWIN que fue amplificada para esta comprobación del vector... 44

Figura 15. Esquema que representa los sitios de anillamiento de los oligonucleótidos para el gen Spike y el gen RBD. 45

Figura 16. Gel de agarosa al 0.8% cargado con productos de PCR purificados. Los carriles 2 y 3 muestran el amplicón de 582 pb, correspondiente al dominio RBD y los carriles 4 y 5 contienen el amplicón de el gen S de 3855pb..... 45

Figura 17. Gel de agarosa al 0.8% obtenido tras las digestiones enzimáticas. Se cargó 1 µL de muestra por carril, excepto en el carril 4. En el carril 2 se observa el plásmido pTWIN1 en su conformación circular no digerida; en el carril 3, el mismo plásmido digerido con la enzima XhoI. Los carriles 4 y 5 contienen el plásmido digerido con las enzimas XhoI y NdeI. Finalmente, en los carriles 6 y 7 se observan los fragmentos correspondientes a los amplicones de Spike y RBD, respectivamente, ambos doblemente digeridos. 46

Figura 18. Colonias bacterianas observadas tras 16 horas de cultivo. Los controles positivo y negativo confirman, respectivamente, la viabilidad de las células competentes y la efectividad de la ampicilina. El control con pTWIN1 de megaprep valida el correcto desarrollo del protocolo de transformación, mientras que el control pTWIN1 religado permite evaluar la funcionalidad de la enzima T4 ligasa. La colonia transformante obtenida fue sembrada en medio LB agar con ampicilina 48

Figura 19. a) Gel de agarosa al 0.8% que muestra el ADN plasmídico del vector pTWIN-RBD extraído por megaprep (carriles 3, 4 y 5). A partir de estas muestras se realizaron digestiones enzimáticas y reacciones de PCR para su verificación. b) Tinción de Gram a partir de la colonia obtenida de E. coli TOP-10. 48

Figura 20. Gel de agarosa al 0.8% que muestra las digestiones con la enzima NdeI. En el carril 2 se observa el vector pTWIN1 linealizado (7375pb), mientras que en el carril 3 se muestra el vector pTWIN1-SARS2-RBD linealizado (7256 pb). Se aprecia una diferencia en la migración entre ambos productos, correspondiente a la inserción del fragmento. 49

Figura 21. Gel de agarosa al 0.8%. Primer par de primers (amarillo), el control -vector vacío- presenta una banda en un tamaño similar que el amplicón esperado, no obstante, la banda obtenida en la construcción presenta una mayor intensidad, lo que sugiere una

mejor especificidad. Segundo par de primers (morado) el control presenta un amplicón en aproximadamente 1713 pb, mientras que en la construcción se observa un amplicón que ronda las 1594 pb, valor cercano al tamaño esperado.....	50
Figura 22. Construcción del vector de expresión pTWIN-SARS2-RBD.....	51
Figura 23. Colonias obtenidas de E. coli BL21 (DE3). Cada colonia fue resembrada en medio LB Agar más ampicilina para generar parches celulares con fines de conservación. El procedimiento fue contrastado con controles positivo y negativo. ...	51
Figura 24. PCR de confirmación de integración del vector pTWIN-SARS2-RBD en la cepa E. coli BL21, junto con un control que presenta el mismo patrón observado en la Figura 14. Las transformantes están identificadas por número de colonia y por la fecha de transformación.	52
Figura 25. Diagrama que representa la región que se amplifica con los oligos universales de pTWIN en la construcción con el gen objetivo. Nótese que la secuencia correspondiente a RBD se localiza en el N-terminal de la Inteína 2.....	52
Figura 26. Análisis por SDS-PAGE al 12 % de extractos celulares clarificados. Carriles 2 y 6: E. coli BL21 sin plásmido (control negativo). Carriles 3 y 7: E. coli BL21 transformada con el vector pTWIN1 sin inserto, inducida con IPTG (control con vector vacío). Los carriles restantes contienen extractos de las cepas transformadas con el plásmido pTWIN1-SARS2-RBD.	53
Figura 27. Extractos celulares clarificados. Carriles 2 y 3, controles negativos de E. coli con pTWIN1 sin inserto, sin inducir (carril 2) e inducido con IPTG (carril 3). Carriles 4, 6 y 8, transformantes con pTWIN1-SARS2-RBD sin inducir. Carriles 5, 7 y 9 mismas muestras que los carriles previos, inducidas con IPTG.	55
Figura 28. SDS-PAGE al 12% que muestra la banda obtenida para el control pTWIN1 sin inserto (carril 4).	55
Figura 29. SDS-PAGE al 12% con 10 µg de extracto proteico obtenido después del tratamiento con urea. Mismo orden de muestras que en la figura 27.....	56
Figura 30. SDS-PAGE al 12 % con tinción de plata de extractos tratados con urea. Carril 2: extracto de la construcción C2D2 sin inducción; carril 3: extracto de la misma muestra inducida; carril 4: muestra purificada.	57
Figura 31. SDS-PAGE al 12% del extracto después del tratamiento con urea calculado. Mismo gel que en la figura 29.	71
Figura 32. SDS-PAGE al 12 % con tinción de plata de extractos tratados con urea y muestra purificada, la banda purificada se observa dentro del rango esperado.	71
Figura 33. Alineamiento entre la secuenciación de la construcción pTWIN1-SARS2-RBD (oligonucleótido F-pTWIN) y la secuencia control del gen RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea perfectamente con el inicio del gen RBD.	72
Figura 34. Alineamiento entre la secuenciación del gen RBD (oligonucleótido F-RBD) y la secuencia control de pTWIN1-RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea casi en su totalidad con la región de RBD de la secuencia control.....	73
Figura 35. Alineamiento entre la secuenciación del gen RBD (oligonucleótido R-RBD) y la secuencia control de pTWIN1-RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea casi en su totalidad con la región de RBD de la secuencia control.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos aprobados contra la COVID-19, uso restringido para el sector salud.	14
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación.....	34
Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación del gen S y dominio RBD.....	34
Tabla 4. Condiciones programadas en el Termociclador para Spike.....	35
Tabla 5. Condiciones programadas en el Termociclador para RBD.....	35
Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación de confirmación.....	36
Tabla 7. Condiciones programadas en el Termociclador para comprobación.....	36
Tabla 8. Datos del estándar.....	69
Tabla 9. Concentraciones de la curva.....	69
Tabla 10. Datos de concentración con sus respectivas absorbancias obtenidas.....	70
Tabla 11. Peso molecular obtenido por el software Imagen Lab para la línea 4 correspondiente al extracto purificado.....	72

Resumen

El daño multisistémico persistente provocado por el virus del SARS-CoV-2, conocido como Long-COVID, es considerado una enfermedad grave que afecta la calidad de vida a nivel mundial. Hasta ahora, no existe un tratamiento dirigido a su causa, sino únicamente al manejo de sus síntomas. Por tal motivo, se han estudiado metabolitos secundarios, como los flavonoides hesperetin 7-rutinoside (H7R) y flavanone-7-O-glucoside (F7G), con potencial inhibitorio contra la proteína Spike, considerada un posible blanco terapéutico. Esta proteína se une al receptor ACE-2 de la célula hospedadora a través de su dominio de unión al receptor (RBD) y ha sido señalada como una posible responsable del Long-COVID. Por lo tanto, la producción heteróloga de la proteína Spike o de su dominio RBD resulta fundamental para estudios de interacción con los flavonoides H7R y F7G, que han mostrado, *in silico* e *in vitro*, capacidad para inhibir dicha unión. Es por esto por lo que el objetivo de este proyecto fue producir de manera heteróloga el dominio RBD de la proteína Spike en *Escherichia coli* BL21 (DE3), con el fin de generar una herramienta funcional para estudios posteriores, como determinación de la unión de ligandos por resonancia de plasmones.

Se realizó la clonación del gen de interés en el plásmido pTWIN1, mediante digestión con las enzimas *Nde*I y *Xho*I, seguida de ligación y transformación por choque térmico en *E. coli* BL21(DE3). La inserción del gen se confirmó en las colonias transformadas mediante análisis de restricción y PCR. La expresión heteróloga de la proteína se indujo con IPTG, y su purificación se realizó por afinidad, utilizando perlas magnéticas recubiertas con quitina.

Se logró, transformar *E. coli* BL21 (DE3), con el gen que codifica el dominio RBD, cuya expresión fue inducida con 0.5 mM de IPTG. La purificación requirió tratamiento previo con urea, debido a la formación de cuerpos de inclusión. Se obtuvo la proteína de interés purificada, evidenciada por una banda de aproximadamente 25 kDa en un gel SDS-PAGE, aunque con una concentración baja, posiblemente por poca solubilización de las proteínas o por tratarse de un método de purificación rápido y a pequeña escala con las perlas magnéticas recubiertas con quitina. Estos resultados constituyen una base para optimizar futuras estrategias de expresión y purificación del dominio RBD.

Abstract

Long COVID, characterized by persistent multisystem symptoms after SARS-CoV-2 infection, is a serious disease that significantly impacts quality of life worldwide. To date, there is no treatment targeting its cause, only symptomatic management. For this reason, secondary metabolites such as the flavonoids hesperetin 7-rutinoside (H7R) and flavanone-7-O-glucoside (F7G) have been studied for their inhibitory potential against the Spike protein. This protein binds to the ACE2 receptor on the host cell through its receptor binding domain (RBD) and has been implicated as a possible contributor to Long-COVID. Therefore, the heterologous production of the Spike protein or its RBD domain is essential for interaction studies with the H7R and F7G flavonoids, which have shown, *in silico* and *in vitro*, the potential to inhibit the binding of the Spike protein to the ACE2 receptor. The aim of this work was the heterologous production of the RBD domain of the Spike protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3), to generate a functional tool for future studies, such as ligand-binding determination using plasmon resonance.

Cloning of gene of interest into the pTWIN1 plasmid was carried out by digestion with the restriction enzymes NdeI and XhoI, followed by ligation and transformation via the heat shock method in *E. coli* BL21 (DE3). The presence of the insert in the transformed colonies was verified by restriction analysis and PCR. Heterologous protein expression was induced with IPTG, and purification was performed by affinity using chitin magnetic beads.

The RBD domain was successfully cloned in *E. coli* BL21 (DE3). Its expression was induced with 0.5 mM IPTG. Purification required prior treatment with urea due to the formation of inclusion bodies, which were attempt solubility.

Purified protein was obtained, as evidenced by a band of approximately in 25 kDa on an SDS-PAGE; however, the protein concentration was low, possibly due to insufficient protein solubilization and/or the use of a rapid, small-scale purification method with chitin magnetic beads. Despite this, these results represent a valuable starting point for improving future strategies for RBD domain expression and purification.

1. Introducción

En 2020, el mundo enfrentó una pandemia derivada del virus del SARS-CoV-2 causante de la enfermedad COVID-19, que hasta junio de 2025 ha afectado a más de 796 millones de personas y causado aproximadamente 7.2 millones de muertes confirmadas (Our World in Data, 2025b). Algunas estimaciones, sin embargo, indican un incremento acumulado de alrededor de 27 millones de muertes atribuibles directa e indirectamente al COVID-19 (Our World in Data, 2025a).

A cuatro años de la emergencia sanitaria, la enfermedad COVID-19 comenzó a ser catalogada como enfermedad endémica. No obstante, persiste como una amenaza a la salud pública debido a las limitadas opciones de tratamiento y a la persistencia de secuelas prolongadas después de la infección, conocidas como Long-COVID. Aunque las vacunas han reducido el número de casos graves, aún no se tiene certeza de si previenen las manifestaciones a largo plazo (Chow et al., 2024; Quach et al., 2024). Por ello, se requiere investigar alternativas terapéuticas que contribuyan tanto a la prevención como al tratamiento de las complicaciones asociadas al virus.

La entrada del SARS-CoV-2 a las células humanas inicia con la interacción de la proteína Spike (S) viral y el receptor ACE-2, presente en células del pulmón, corazón, riñón e intestino, entre otros tejidos (Sodhi et al., 2022; Yadav et al., 2021). Esta interacción es mediada por el dominio de unión al receptor (RBD) encontrado en la subunidad S1 de la proteína Spike, que presenta un cambio conformacional que mejora la unión con el receptor y la entrada del material genético a la célula hospedadora (Gorkhali et al., 2021; Kumar et al., 2022; Qian et al., 2024)

Investigaciones recientes han detectado la persistencia de la proteína Spike en diversos tejidos hasta un año después de la infección por SARS-CoV-2, lo cual se asocia con una inflamación crónica que lleva, a su vez, a un daño multiorgánico (Davis et al., 2023), provocando complicaciones respiratorias, neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, autoinmunes, entre otras (Talwar et al., 2025). En este contexto, el bloqueo de la interacción entre la proteína Spike y el receptor ACE-2 representa una estrategia terapéutica potencial para mitigar las secuelas asociadas al Long-COVID.

Desde el inicio de la pandemia en México se exploraron las nanopartículas (NPs) de TiO_2 funcionalizado como posibles agentes contra el virus causante del COVID-19, basándose en estudios previos que demostraron la capacidad del TiO_2 no funcionalizado para inactivar el virus de la influenza (Mazurkova et al., 2010). Además, el conocimiento sobre metabolitos secundarios con propiedades antivirales condujo a la investigación de flavonoides y terpenos como posibles candidatos para aportar valor agregado a la terapia antiviral (Castro-Jiménez, 2022; Fernández et al., 2022; Tandon et al., 2024).

Entre los compuestos estudiados, los flavonoides hesperetina-7-rutinosido (H7R) y flavanona-7-O-glucósido (F7G) han mostrado un efecto antiviral contra el SARS-CoV-2, tanto en su forma libre como adsorbidos sobre NPs de TiO_2 funcionalizadas. Estudios de dinámica molecular, acoplamiento molecular y cálculos de energía de afinidad indican que estos flavonoides se unen a regiones clave de la proteína Spike, tanto en su conformación abierta como cerrada, lo que podría impedir su interacción con el receptor ACE-2. Estos hallazgos se respaldan con ensayos de fusión célula a célula mediados por la proteína Spike. (Castro-Jiménez, 2022; León-Gutiérrez et al., 2022).

Lo anterior resulta novedoso, ya que podría representar la obtención de un antiviral capaz de interferir directamente con la unión de la proteína Spike del SARS-CoV-2 y el receptor ACE-2 del hospedador, evitando así la infección y disminuyendo la incidencia de padecer Long-COVID. Además, ofrece la ventaja de ser un tratamiento relativamente económico, debido a su eficacia a bajas concentraciones.

Para poder estudiar la interacción de los flavonoides H7R y F7G con la proteína Spike del SARS-CoV-2 se requiere disponer de dicha proteína y/o su dominio RBD. En este contexto, el presente proyecto se enfoca en la expresión heteróloga de la proteína Spike y/o su dominio RBD, con el objetivo de generar una herramienta para investigaciones futuras sobre mecanismos de interacción molecular y evaluación de potenciales antivirales.

2. Generalidades

2.1. COVID

El Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) brotó en la capital de la provincia de Hubei (China) en diciembre de 2019 y se propagó rápidamente a nivel mundial debido a su alta transmisibilidad, dando lugar a una neumonía viral inusual conocida como COVID-19 (Hu et al., 2021). El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la enfermedad de COVID-19 como pandemia (World Health Organization, 2021a).

La manifestación de la enfermedad COVID-19 puede presentarse con síntomas leves, como tos, fiebre, mialgias y dolor de cabeza. Sin embargo, puede dar lugar a complicaciones graves como disnea, infiltraciones pulmonares e, incluso, la muerte (Polatoğlu et al., 2023). En 2024, las complicaciones graves han disminuido, pero un gran número de personas sigue presentando secuelas de la enfermedad, como niebla mental, fatiga, problemas cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, tos crónica, entre otras, que persisten durante meses como consecuencia de haber padecido la COVID-19 (Davis et al., 2023).

2.2. Long-COVID

Los términos: Long-COVID, COVID-19 prolongado o síndrome post-COVID, hacen referencia a los padecimientos posteriores a la enfermedad por el virus del SARS-CoV-2. Esta condición es considerada una enfermedad multisistémica que puede persistir durante semanas, meses e incluso años. Los síntomas que presentan aquellas personas que lo han padecido incluyen, pérdida del olfato y del gusto, pérdida de audición, fatiga, “niebla mental”, debilidad muscular, problemas respiratorios y, en algunos casos, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, trombóticas, neurológicas, diabetes tipo 2 y/o la reactivación de patógenos subyacentes (Davis et al., 2023; Tandon et al., 2024).

La incidencia de padecer Long-COVID varía en función de la evolución clínica del paciente durante la infección, de la necesidad de hospitalización y de la presencia de condiciones comórbidas. En general, las estimaciones indican que se presenta con una

frecuencia de entre 10 al 30% en los casos no hospitalizados, de entre 50 al 70% en los casos hospitalizados y hasta de 10 al 12% en aquellos que no presentaron la enfermedad, pero fueron vacunados (Davis et al., 2023).

Estudios sobre este padecimiento sugieren que el Long-COVID puede ser consecuencia de una inflamación crónica provocada por un reservorio viral, donde el SARS-CoV-2 se replica y mantiene su material genético en diversos tejidos, incluidos hígado, riñón, estómago, intestino, cerebro y vasos sanguíneos, entre otros (Rodríguez-Torres et al., 2025; Tandon et al., 2024). Además, se han detectado proteínas virales, generalmente la proteína Spike, circulando en el organismo de pacientes con COVID prolongado, hasta un año después del diagnóstico (Davis et al., 2023).

Hasta ahora, las herramientas para el diagnóstico del Long-COVID continúan en desarrollo, y aún no existe un tratamiento aprobado para tratar esta condición (Mueller et al., 2025). Además, la evidencia sobre el efecto protector de la vacunación frente a este padecimiento sigue siendo contradictorio: algunos estudios reportan una reducción del riesgo, mientras que otros no encuentran diferencias significativas entre pacientes vacunados y no vacunados (Quach et al., 2024).

2.3. SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un miembro de familia de los coronavirus, un grupo de virus que se caracterizan por su forma esférica y las glicoproteínas incrustadas formando una corona. Anteriormente, estos virus no eran considerados mortales para los humanos, sin embargo, el interés en su estudio aumentó a partir del brote del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) en 2002, que reveló su potencial para causar enfermedades graves (Burrell et al., 2017).

El material genético de los virus como el SARS-CoV-2 consiste en ARN monocatenario, envuelto y de sentido positivo (Pal et al., 2020), que lo clasifica en el orden de los *Nidovirales* siguiendo el sistema de Baltimore. Pertenecen a la familia *Coronaviridae* y subfamilia *Orthocoronavirinae*, misma que se divide en cuatro géneros: *Alfa*, *Beta*, *Gamma* y *Deltacoronavirus* (α , β , γ y δ CoV) (Chan et al., 2020). Aunque regularmente los coronavirus infectan animales, algunos han cruzado las barreras entre especies,

existiendo actualmente siete que infectan a los humanos (zoonosis) y son pertenecientes a los géneros CoV α y β (Chan et al., 2020; Zmasek et al., 2022).

El SARS-CoV-2 es un *Betacoronavirus* (Zmasek et al., 2022) con genoma similar en un 79-82% con SARS-CoV y un 50% con MERS-CoV (Hu et al., 2021). El banco de información estructural de proteínas (Protein Data Bank, 2020) define el genoma y proteínas del virus SARS-CoV-2 de la siguiente manera:

“El genoma del SARS-COV-2 es una sola hebra de ARN que codifica una gran colección de proteínas que son sintetizados por la maquinaria ribosomal después de que el virus infecta una célula hospedadora. Cuatro **PROTEÍNAS ESTRUCTURALES** (S, E, M, N) empaquetan el **GENOMA DE ARN** dentro de una **BICAPA LIPÍDICA DE MEMBRANA** para formar partículas virales infecciosas. Dieciséis **PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES** (Nsp 1-16) y seis **PROTEÍNAS ACCESORIAS** facilitan la construcción y liberación de nuevas partículas virales y apoyan la evasión de las defensas celulares y del sistema inmunológico del hospedador” (Figura 1).

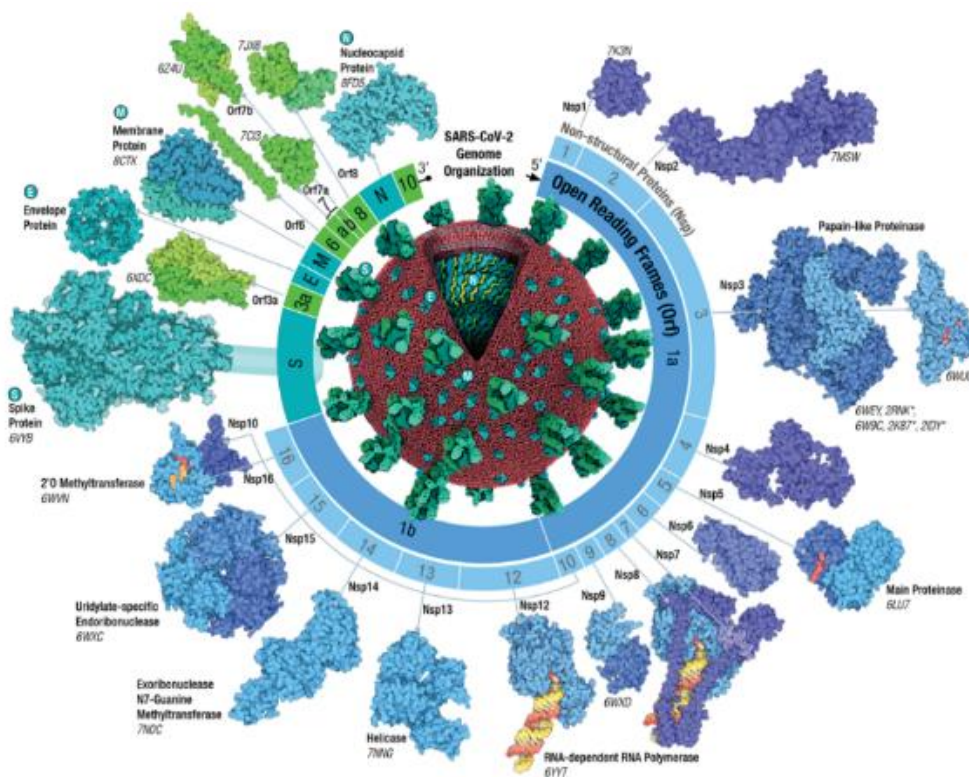


Figura 1. Organización del genoma y proteínas del SARS-CoV-2, extraída de Protein Data Bank (2020).

De acuerdo con lo anterior, se observa que 2/3 del genoma están constituidos por genes que codifican 16 proteínas no estructurales (Nsp1-16), mientras que el tercio restante está destinado a las proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). Además, se observan ocho marcos de lectura abiertos que codifican proteínas accesorias (Yadav et al., 2021).

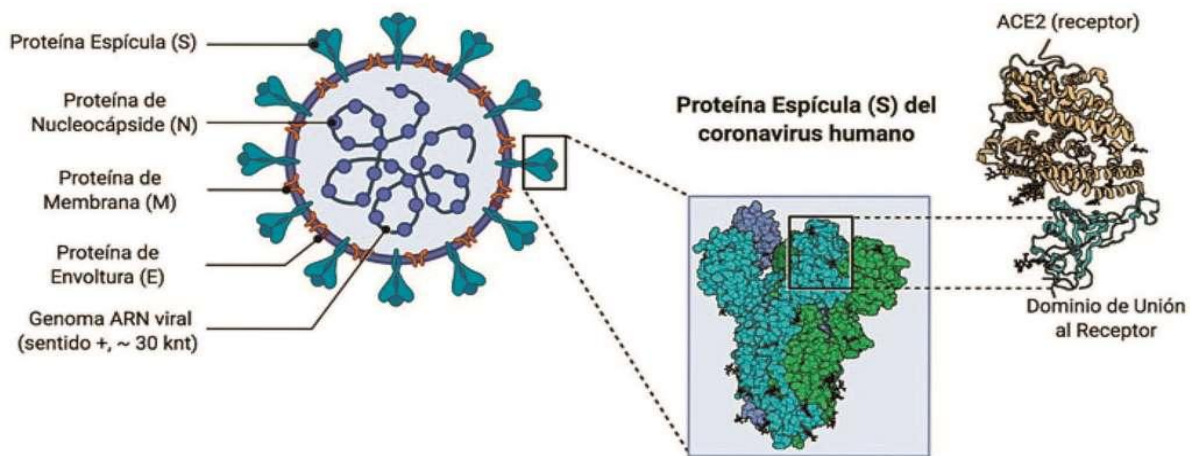


Figura 2. Localización de las proteínas estructurales de membrana (Cortés, 2020)

Las proteínas no estructurales participan en la replicación del genoma del virus, formando una maquinaria en donde se generan extensas interacciones entre sí, con el fin de realizar una síntesis eficiente de ARN. Por otro lado, las proteínas estructurales de membrana presentan funciones independientes (Gorkhali et al., 2021).

La proteína de nucleocápside (**N**), entre sus diversas funciones, mantiene estable y organizado al ARN genómico dentro del virus, protegiendo los ribonucleótidos virales. Además, controla el proceso metabólico de la célula hospedadora, desregulando su ciclo de vida y regulando negativa y positivamente sus productos génicos. Un ejemplo de esto es la producción de la proteína ciclooxygenasa 2 (COX2), un elemento proinflamatorio inducido durante la infección por coronavirus (Gorkhali et al., 2021).

La proteína de membrana (**M**) es la más abundante de las proteínas estructurales. Debido a su emparejamiento con la proteína N, su unión a la proteína S y sus interacciones con algunos receptores de la superficie del hospedador, está relacionada con la morfogénesis y el buen ensamble del virus a la célula infectada (Gorkhali et al., 2021; Qian et al., 2024).

La proteína de envoltura (**E**) es pequeña (76-109 aminoácidos), en comparación con las otras proteínas estructurales. Del mismo modo que la proteína M, participa en el ensamblaje del virus, y también promueve funciones relacionadas con la morfogénesis y patogénesis durante el proceso infectivo; además, forma canales en la membrana para el intercambio de iones (Gorkhali et al., 2021).

Finalmente, la proteína spike (**S**) reconoce, interactúa y se ancla al receptor, la enzima convertidora de angiotensina II humana (**ACE-2**). De este modo, media la invasión del virus y participa en la entrada viral (Gorkhali et al., 2021).

2.4. Proteína Spike (S)

Spike es una proteína estructural homotrimérica glicosilada, responsable de la entrada del virus a la célula hospedadora (Qian et al., 2024; Zhang et al., 2024). Estas proteínas se encuentran expuestas en la superficie del virus y desempeñan un papel crucial en la fusión de membranas y en la entrada viral. Es una proteína conservada dentro de la familia *Coronaviridae*, con 1273 aminoácidos y un peso por monómero de alrededor de 140 a 200 kDa (UniProt Consortium, 2025; Yadav et al., 2021).

Estructuralmente, esta proteína tiene dos subunidades, S1 (aminoácidos 13 – 685) y S2 (aminoácidos 686 – 1273) (Zhang et al., 2024) que, en conjunto, comprenden sitios altamente funcionales, como el dominio N-terminal (NTD), el dominio C-terminal (CTD), el dominio de unión al receptor (RBD, que contiene el motivo de unión al receptor (RBM), el péptido de fusión (FP) y el dominio transmembrana (TM), entre otros (Yadav et al., 2021). De forma general, la subunidad S1 identifica los receptores del hospedador y se une a ellos, mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión entre la membrana viral y la célula que será infectada (Gorkhali et al., 2021).

La proteína Spike tiene aproximadamente un 40% de su superficie rodeada de modificaciones glucídicas, 22 de las cuales están ligados al aminoácido asparagina (Asn) que corresponden a N-glicosilaciones; además, hasta el momento se han identificado 17 sitios con O-glicosilaciones (Zhang et al., 2024).

La subunidad S1, ubicada en la región externa y superior de la proteína Spike, estabiliza a la subunidad S2 en su estado de prefusión y es responsable de las distintas

conformaciones que puede adoptar la proteína, ya que contiene el dominio de unión al receptor (RBD), el cual es el encargado de interactuar directamente con el receptor ACE-2 (Gorkhali et al., 2021). Por su parte, la subunidad S2 contiene cuatro sitios importantes: un péptido de fusión (FP) que media la asociación entre el hospedador y el virus; una repetición de siete aminoácidos en tándem (HR1/2) que forma una protuberancia esencial para iniciar la fusión entre la envoltura viral y la membrana del; un dominio transmembrana (TM) que sujeta a la proteína S en la membrana viral; y un dominio de citoplasma (CT). Estos sitios no se exponen hasta el momento de la unión de la subunidad S1 con el receptor ACE-2. (Qian et al., 2024; Yadav et al., 2021).

A diferencia de otros coronavirus, las subunidades S1 y S2 de la proteína Spike del SARS-CoV-2 están separadas por una secuencia de cinco aminoácidos (PRRAR), que es el sitio de escisión reconocido por la proteasa furina, el cual contribuye a la transmisibilidad del virus (Yadav et al., 2021; Zhang et al., 2024). Además, la subunidad S2 es escindida por una proteasa de serina transmembrana II (TMPRSS2), dando lugar a la región S2' e induciendo la acción del péptido de fusión (Gorkhali et al., 2021; Qian et al., 2024; Xia, 2021).

2.5. Dominio de Unión al Receptor (RBD)

El dominio de unión al receptor (RBD) es el actor principal para la unión de la proteína Spike con el receptor ACE-2 del hospedador. Se encuentra entre los residuos 319 a 541 de la subunidad S1 de Spike, con un peso de aproximadamente 25 kDa sin glicosilaciones (Protein Data Bank, 2023). Posee nueve residuos de cisteína que forman ocho puentes disulfuro y dos N-glicosilaciones ubicados en los aminoácidos N331 y N343 (Arbeitman et al., 2020). El dominio RBD tiene a su vez dos regiones importantes, una región central plegada como una lámina β antiparalela y el motivo de unión al receptor (RBM) con dos hélices α cortas y hebras β (Ciccozzi & Pascarella, 2023).

Durante el inicio del proceso infectivo, ocurre un cambio conformacional en el dominio RBD, de la posición “abajo” hacia la posición “arriba”, que es determinante para que pueda unirse con el receptor ACE-2 humano. Este cambio conformacional expone el motivo de unión al receptor (RBM), que es el que directamente hace una fuerte unión

con ACE-2 (Qian et al., 2024). Debido a esta interacción, la región RBD se considera un buen objetivo para las vacunas y medicamentos antivirales (Borkotoky et al., 2023).

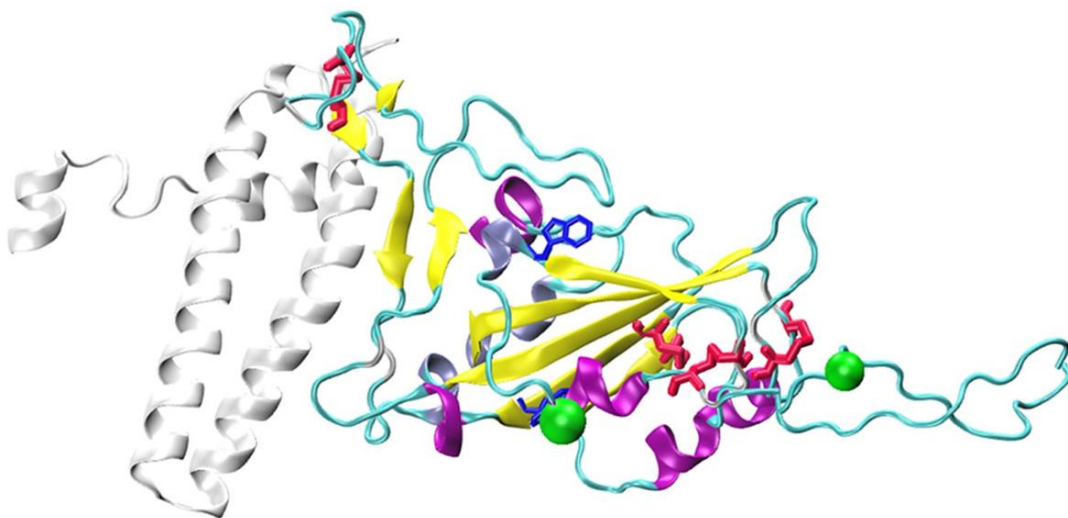


Figura 3. Dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 unido a ACE-2. Hélices α : púrpura; hélice 310: azul grisáceo; hojas β : amarillo; giros/espiras: cian. Los puentes disulfuro se muestran en rojo; los residuos de triptófano, en azul; y los residuos de asparagina como esferas verdes. Los residuos 1-115 de ACE-2 que interactúan con RBD mostrada en blanco. Tomada de Arbeitman et al. (2020)

Sin embargo, el dominio RBD ha sido una región particularmente variable debido a las mutaciones registradas, las cuales aumentan su afinidad por el receptor ACE-2 e influyen en el desarrollo, detección, tratamiento e inmunización frente a la enfermedad (Barton et al., 2021; Polatoğlu et al., 2023; Qian et al., 2024).

2.6. Variantes

Desde el 2020, la OMS ha clasificado las variantes del SARS-CoV-2 derivadas de mutaciones. A partir de marzo del 2023, se han mantenido tres categorías oficiales: variantes de interés (VOI), variantes de preocupación (VOC) y variantes bajo monitoreo (VUM), según la OMS; o variantes bajo supervisión (VMB) según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (CDC, 2023; OMS, 2024).

Dentro de esta clasificación, las variantes VOC se caracterizan por provocar una mayor gravedad clínica de la enfermedad, una significativa disminución en la neutralización por anticuerpos generados tras infección previa o vacunación, así como una baja respuesta a los tratamientos (CDC, 2023; OMS, 2024).

Hasta 2024, se han registrado al menos 12 variantes en el mundo, que son Alfa, Beta, Gamma, Delta, Delta plus, Epsilon, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda y Ómicron (Verma et al., 2024). De estas variantes, a partir de mayo de 2022, Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), y Omicron (B.1.1.529) han sido clasificadas como variantes de preocupación (VOC) ya que se han extendido por todo el mundo, mientras que las variantes restantes se consideraron como de interés (Polatoğlu et al., 2023; Verma et al., 2024).

En comparación con el prototipo inicial encontrado en Wuhan, se han identificado distintas mutaciones en cada una de las variantes del SARS-CoV-2. Hasta la fecha, Ómicron es la variante con el mayor número de mutaciones, con aproximadamente 15 en el dominio RBD y 30 en total (Polatoğlu et al., 2023; Verma et al., 2024).

El estudio de las mutaciones del virus SARS-CoV-2 y, principalmente, las de la proteína Spike ha sido de gran importancia para el desarrollo de tratamientos terapéuticos que puedan atacar a este nivel.

2.7. Compuestos de interés terapéutico

2.7.1. Flavonoides

Antes de la pandemia por SARS-CoV-2, los flavonoides ya eran estudiados por presentar actividad antiviral contra el virus SARS-CoV, al inhibir sus enzimas proteolíticas fundamentales, como la proteasa viral tipo quimiotripsina 3CLpro o proteasa viral tipo papaína PLpro (Fernández et al., 2022).

Dos casos particulares son el flavonoide quercetina, que junto con el ácido ascórbico presenta una actividad antiviral sinérgica útil para el tratamiento de la COVID-19, y el flavonoide luteolina y su análogo eriodictyol, los cuales han mostrado capacidad para inhibir los efectos de la proteína Spike asociados al Long-COVID (Tandon et al., 2024; Theoharides et al., 2021). De manera general, diversos estudios destacan los posibles efectos antivirales de otros flavonoides contra la COVID-19, y para finales de 2023 se contaba con evidencia adicional de que estos compuestos podrían reducir los síntomas principales de la COVID-19 al interactuar con la proteína Spike (Toigo et al., 2023).

Los flavonoides son productos naturales, obtenidos principalmente como metabolitos secundarios de plantas, flores y vegetales. Se caracterizan por ser un grupo amplio de compuestos polifenólicos, con una estructura de esqueleto de quince carbonos que forma dos anillos de benceno conectados por un anillo pirano (Liskova et al., 2021). Tradicionalmente reconocidos por su actividad antioxidante, actualmente investigados por sus propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias, antibacterianas y/o antivirales (Toigo et al., 2023).

Es importante mencionar que, a pesar de su potencial terapéutico, los flavonoides pueden presentar limitaciones relacionadas con su estabilidad y biodisponibilidad. Ante esto, se han explorado estrategias nanotecnológicas como vía para potenciar sus efectos biológicos, mejorar su funcionalidad y desarrollar herramientas terapéuticas más eficientes (Nguyen et al., 2015).

2.7.2. Nanopartículas funcionalizadas

Las nanopartículas funcionalizadas representan un área emergente de la nanotecnología, centrada en el diseño y manipulación de estructuras con dimensiones nanométricas, que pueden ser modificadas a nivel atómico o molecular. En los últimos años, las nanopartículas (NP), en especial las de origen metálico, han sido estudiadas para su uso en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas debido a su alta relación superficie-volumen, su capacidad para interactuar con tejidos biológicos, y su poder para atravesar membranas celulares (Ahmad et al., 2022).

No obstante, algunas NP presentan limitaciones importantes, como una tendencia a la oxidación y agregación recién sintetizadas, lo que puede afectar su estabilidad y reactividad. Por ello, se han desarrollado estrategias de funcionalización, que consisten en incorporar grupos funcionales, polímeros, biomoléculas o ligandos específicos en la superficie de las nanopartículas. (Martinelli et al., 2003). Estas modificaciones permiten mejorar su estabilidad, aumentan su valor y amplían su aplicación a diversas áreas (Ahmad et al., 2022).

Este enfoque despierta el interés en el uso de la funcionalización con extractos naturales, como flavonoides y terpenos, para el desarrollo de productos con potencial antiviral.

2.8. Flavonoides adsorbidos en nanopartículas funcionalizadas de TiO₂.

La pandemia de COVID-19 impulsó la búsqueda de nuevas estrategias para desarrollar principios activos que beneficiaran la salud de la población frente a este nuevo agente. Importantes farmacéuticas han desarrollado antivirales que ya cuentan con la autorización de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) para su uso contra el SARS-CoV-2; sin embargo, su uso controlado y sus altos costos limitan el acceso para una parte importante de la población (Tabla 1).

Tabla 1. *Fármacos aprobados contra la COVID-19, uso restringido para el sector salud.*

Fármaco	Precio	Disponibilidad
Paxlovid® Nirmatrelvir / Ritonavir	\$8,570	Restringida
Veklury® Remdesivir	\$8,190	Restringida
Lagevrio® Molnupiravir	\$14,000	Restringido

Diversos estudios han reportado el uso de nanopartículas con actividad antiviral contra diferentes virus, sin generar toxicidad en la célula hospedadora (Cagno et al., 2018). Entre ellas, las nanopartículas de TiO₂ han demostrado capacidad para inactivar el virus de la influenza (Mazurkova et al., 2010). Por otro lado, investigaciones sobre metabolitos secundarios, como los flavonoides y terpenos, han mostrado propiedades antivirales prometedoras. A partir de esta evidencia, surge el interés por desarrollar una molécula de flavonoides adsorbidos en nanopartículas funcionalizadas como una alternativa nano-biotecnológica innovadora frente al virus SARS-CoV-2 (Castro-Jiménez, 2022; Tandon et al., 2024; Toigo et al., 2023).

León-Gutiérrez et al. (2022) ha realizado un análisis de acoplamiento molecular en el que evaluó la interacción de diversos flavonoides y terpenos con la proteína Spike del SARS-CoV-2. Los resultados mostraron que los flavonoides Hesperetin-7-rutinoside

(H7R) y Flavanone-7-O-glucoside (F7G) presentaron los valores más bajos de energía de afinidad, lo cual indica una alta afinidad de unión. Estas interacciones se localizaron en regiones críticas, tanto dentro como fuera del dominio RBD, interfiriendo con la transición al estado abierto de la proteína y, además de ser específicas, mostraron una alta estabilidad en estudios de dinámica molecular. Cabe destacar que, al unirse a distintas regiones, es posible que los efectos antivirales se mantengan en caso de variación genética de la proteína Spike.

Partiendo de estos resultados, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con los flavonoides H7R y F7G, tanto en forma libre como adsorbidos a nanopartículas de TiO₂ funcionalizadas, con el fin de evaluar su efecto sobre la infectividad de dos coronavirus (HCoV 229E y SARS-CoV-2) y sobre la interacción de la proteína Spike con el receptor ACE-2.

Lo anterior evidenció el efecto antiviral de H7R y F7G, tanto en su forma libre como adsorbidos en nanopartículas de TiO₂, en un rango de diluciones entre 10⁻⁶ y 10⁻⁹. Se observó una disminución significativa en el título viral durante el periodo de preincubación con estos compuestos bioactivos, manteniéndose en niveles cercanos a cero incluso después de 96 horas de cultivo en células infectadas, lo cual no se observó con otros agentes como la ivermectina y la azitromicina (Figura 4).

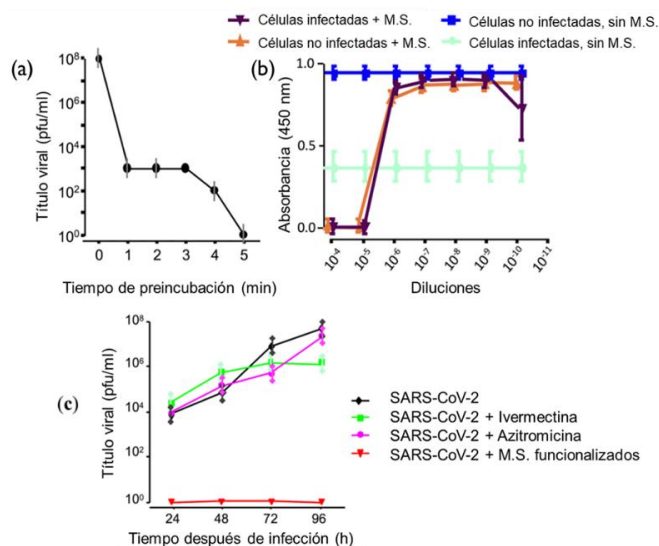


Figura 4. Resultados de ensayos *in vitro* en células VeroE6 con H7R y F7G. (a) Título viral de SARS-CoV-2 en función del tiempo de preincubación con H7R y F7G. (b) Viabilidad celular infectada con SARS-CoV-2 (Abs = 1.0 indica células sanas) en presencia y ausencia de H7R y F7G. (c) Efecto de FTNP comparado con agentes antimicrobianos en la replicación del SARS-CoV-2. Adaptado de León-Gutiérrez et al. (2022).

El efecto protector de los metabolitos secundarios se observó nuevamente en el ensayo de interacción con la proteína Spike, utilizando un sistema de detección con luciferasa como proteína reportera. En este ensayo, la intensidad de la bioluminiscencia reflejaba el grado de interacción entre la proteína Spike y el receptor ACE-2. Se observó que, en presencia de H7R y F7G, la intensidad en la bioluminiscencia disminuía, lo que sugiere que estas moléculas interfieren en la unión entre la proteína Spike y el receptor ACE-2 (Figura 5).

Panel c): Bioluminiscencia de la interacción entre la proteína Spike y ACE-2 durante la fusión célula-a-célula en presencia de TiO₂ (NPs), H7R + F7G, y TiO₂ NPs funcionalizadas con H7R + F7G. Adaptado de León-Gutiérrez et al., (2022).

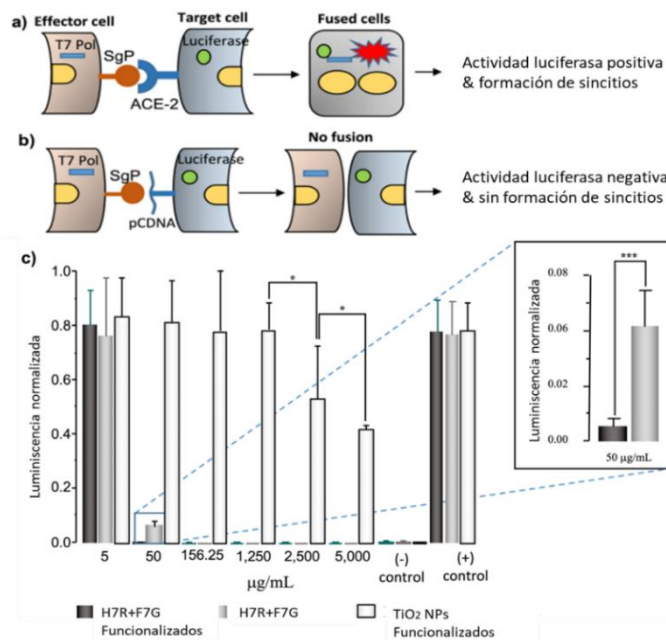
Partiendo de esto, se tiene la necesidad de contar con modelos moleculares adecuados que permitan evaluar la actividad de estas nuevas moléculas frente a agentes virales específicos. En este contexto, la producción recombinante de proteínas virales ofrece una alternativa segura y eficaz para su estudio, al evitar los riesgos asociados con el manejo del virus completo.

2.9. Expresión heteróloga de proteínas.

Figura 5. Fusión celular mediada por Spike y ACE-2 con el reportero luciferasa. Panel a): presencia de ACE-2; Panel b): ausencia de ACE-2. Células efectoras que co-expresan Spike de SARS-CoV-2 con la polimerasa T7, co-cultivadas con la célula diana que co-expresan Spike de SARS-CoV-2 con la polimerasa T7, co-cultivadas con la célula diana que co-expresa ACE-2 con el gen luciferasa (panel a) y un plásmido pCDNA3.1 vacío con plásmido de luciferasa (panel b). Actividad de luciferasa a las 24 h de co-cultivo en presencia y ausencia de nanopartículas.

Es una técnica que consiste en integrar

un gen de interés, generalmente exógeno, en un microorganismo distinto al original (New England Biolabs, 2025a). Los sistemas utilizados para la expresión heteróloga incluyen bacterias, levaduras, hongos y células de mamífero y la elección del sistema depende de las características deseadas.



2.9.1. Técnica de clonación por enzimas de restricción.

Una de las estrategias para la clonación de un gen consiste en el uso de endonucleasas de restricción, que permiten cortar el ADN en sitios específicos. En el gen de interés, estos sitios pueden añadirse en ambos extremos mediante PCR, lo que permite que el fragmento sea digerido con las enzimas seleccionadas. El ADN escindido se liga a un plásmido con extremos compatibles y posteriormente puede ser transformado en *Escherichia coli* (Tirabassi, n.d.) Los fragmentos de interés pueden provenir de ADN genómico o transferirse de un vector a otro mediante digestión con endonucleasas, como se ilustra en la figura 6.

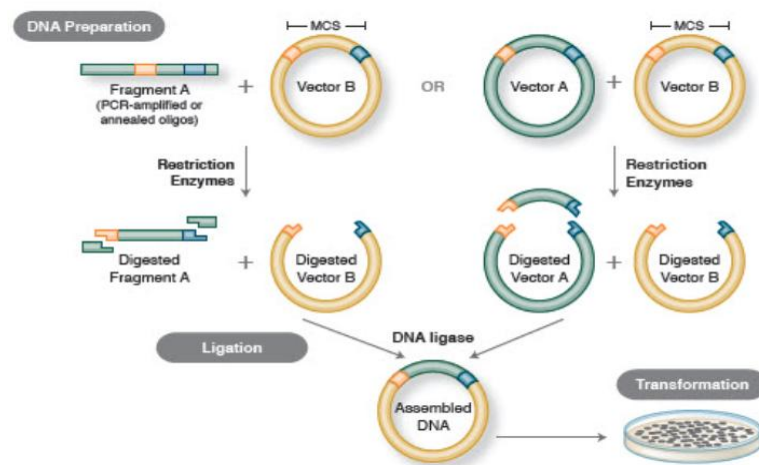


Figura 6. Esquema de clonación de genes por enzimas de restricción. Tomada de Tirabassi (n.d.).

2.9.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria Gramnegativa, tiene forma de bacilo y, por lo general, es móvil gracias a la presencia de flagelos distribuidos por toda su superficie. (Incir & Kaplan, 2024). Aunque en su forma silvestre se considera patógena, las cepas utilizadas en el laboratorio están genéticamente “atenuadas”, por lo que se consideran seguras y no perjudiciales. En condiciones óptimas (37°C y un pH de 7.0), este microorganismo tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 20 minutos (Tuttle et al., 2021).

E. coli ha sido ampliamente caracterizada, a diferencia de otras bacterias, lo que la convierte en un modelo frecuente tanto en la enseñanza como en la investigación. Su

uso en la producción de proteínas recombinantes continúa en aumento, debido a su facilidad de manipulación genética, eficiente cultivo, sencillo manejo durante la inducción y un bajo costo en la producción de ADN plasmídico y proteínas recombinantes. Actualmente, existe una gran cantidad de proteínas terapéuticas aprobadas que han sido producidas en *E. coli*, lo que la ha colocado como un hospedador ampliamente utilizado en diversas industrias biotecnológicas (Incir & Kaplan, 2024).

Cabe señalar que, a pesar de sus numerosas ventajas, *E. coli* también presenta ciertas limitaciones, como la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales. Esta característica puede dificultar el correcto plegamiento de las proteínas heterólogas y, en consecuencia, afectar su solubilidad favoreciendo la formación de cuerpos de inclusión y comprometiendo su funcionalidad.

No obstante, dicha limitación no representa un obstáculo significativo en el contexto del presente estudio, ya que el dominio RBD de la proteína Spike producido en este sistema, resulta adecuado para evaluar su interacción con los flavonoides estudiados, incluso careciendo de dichas modificaciones postraduccionales correspondientes. En nuestro grupo de investigación; mediante estudios de acoplamiento molecular *in silico*, se ha podido comprobar que las energías de afinidad con los ligandos estudiados no se ven modificadas de manera significativa por la presencia o ausencia de las glicosilaciones.

3. Antecedentes

3.1. Expresión heteróloga de las proteínas del SARS-CoV-2.

Desde el año 2020, diversas proteínas estructurales del SARS-CoV-2 han sido objeto de estudio debido a su papel clave en la infección viral y en la búsqueda de tratamientos terapéuticos. Gracias al desarrollo biotecnológico, proteínas como la Spike y la Nucleocápside han podido expresarse en sistemas heterólogos, como bacterias, levaduras, células de mamífero, plantas e insectos (Nithya Shree et al., 2024). Esto ha facilitado su estudio intensivo de manera más accesible, permitiendo su uso en

investigación, diagnóstico, prevención y desarrollo de tratamientos y/o vacunas (Arbeitman et al., 2020; McGuire et al., 2022; Rahbar et al., 2022).

Tobón et al. (2025) realizaron la expresión heteróloga de cinco variantes del dominio RBD del SARS-CoV-2 en *E. coli* BL21 (DE3); dos versiones de RBD Wuhan (Wt), Delta, Omicron BA.2 y Omicron JN.1. El objetivo del estudio fue comprender la interacción del dominio RBD con el receptor ACE-2 y contribuir al desarrollo de estrategias contra la enfermedad. La proteína, expresada en cuerpos de inclusión, fue solubilizada con cloruro de guanidina, renaturalizada mediante buffer redox de GSH/GSSG y posteriormente fue purificada por cromatografía de exclusión por tamaño.

El dominio RBD expresado en *E. coli* fue analizado y comparado con los dominios RBD de Wuhan y de la variante Ómicron BA.5, ambos expresados en células de hámster chino (CHO). Mediante estudios de resonancia de plasmones superficiales (RPS) demostraron la capacidad del dominio RBD bacteriano para unirse al receptor ACE-2, mostrando una afinidad comparable a la de los RBD producidos en células eucariotas.

Además, los resultados de RPS permitieron saber que, a pesar de que el dominio RBD replegado no cuente con glicosilaciones, conserva su capacidad de unirse al receptor ACE-2. Por lo tanto, los residuos glicosilados no resultan cruciales para la interacción entre el RBD y el receptor ACE-2.

Rahbar et al. (2022) llevaron a cabo la clonación heteróloga del dominio RBD del SARS-CoV-2 en *E. coli* BL21 (DE3). El fragmento del gen RBD fue insertado en el vector pET-28a mediante extremos compatibles generados por las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. Las células transformadas con el plásmido pET-28a-RBD fueron seleccionadas en medio LB suplementado con kanamicina, y la expresión de la proteína recombinante fue inducida con 1,0 mM de isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG). Posteriormente, la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad con resina Ni-NTA.

Sus resultados confirman la presencia del gen *RBD* en el plásmido pET-28a por PCR utilizando cebadores universales, así como por digestión enzimática con *HindIII* y *EcoRI*. Debido a la formación de cuerpos de inclusión durante la expresión, la proteína recombinante fue solubilizada con urea antes de su purificación por afinidad. Por análisis

SDS-PAGE al 12% se verificó la presencia del dominio RBD mediante la detección de una banda correspondiente a su peso molecular estimado (~25kDa). Los autores continuaron con análisis por *Wester blot* y pruebas inmunológicas posteriores para evaluar su antigenicidad, encontraron que la glicosilación no es esencial para la inducción de inmunidad protectora utilizando RBD producido en bacterias.

Hussein et al. (2022) estudiaron la respuesta de anticuerpos en sueros humanos, para lo cual expresaron la región 319-541 correspondiente al dominio RBD de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en diferentes cepas de *E. coli*: BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Arctic RIL, C43 y Rosetta. La expresión de la proteína se realizó utilizando concentraciones de IPTG entre 0.2 y 0.5 mM, a temperatura de 28 a 37°C durante periodos de 4 a 12 horas. Un hallazgo importante fue que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del dominio RBD entre las distintas cepas hospedadoras, obteniendo la proteína principalmente en la fracción insoluble. El proceso de purificación en condiciones desnaturalizantes permitió su solubilización, y la proteína resultante mostró una sensibilidad y especificidad superiores al 50% en la detección de IgG anti-SARS-CoV-2 en sueros humanos.

De igual manera, Fitzgerald et al. (2021) ante la necesidad de contar con una prueba serológica específica que ayudara a predecir la inmunidad adquirida, expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) el fragmento de 319 – 640 de la proteína Spike del SARS-CoV-2 que contiene el dominio RBD. La inducción de la expresión se realizó utilizando 0.2 mM de IPTG durante 2 horas a 37°C. Para la solubilización de la proteína utilizaron un tampón base suplementado con urea y el pellet celular fue sometido a procesos de sonicación y centrifugación. El sobrenadante obtenido fue renaturalizado y la proteína de interés se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap HP. La proteína obtenida permitió la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en muestras de suero humano y además presentó propiedades antigénicas similares a las de un fragmento que contiene RBD expresado en células humanas.

Así como *Escherichia coli* ha sido empleada para la expresión de proteínas del SARS-CoV-2 (McGuire et al., 2022), levaduras como *Pichia pastoris* representan una alternativa eficaz debido a su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales

y secretar proteínas. Se ha observado que el dominio RBD, expresado tanto en células HEK-293T como en *P. pastoris*, presenta una estructura similar a pesar de sus diferentes patrones de glicosilación (Arbeitman et al., 2020; Nithya Shree et al., 2024).

Como antecedente a este trabajo de investigación, nuestro grupo de trabajo llevó a cabo la clonación heteróloga del gen que codifica la proteína Spike del SARS-CoV-2 en *P. pastoris* X-33 y actualmente se están evaluando las condiciones óptimas para la expresión de la proteína. Independientemente de esto, la expresión heteróloga del dominio RBD en *E. coli* proporcionaría una herramienta útil para los fines del estudio con los metabolitos secundarios adsorbidos en nanopartículas. Así, *E. coli*, además de ofrecer las ventajas como rapidez, bajo costo y facilidad de cultivo, permitiría evaluar y/o validar la interacción de las moléculas de flavonoides a estas proteínas virales, en ausencia de glicosilaciones.

4. Justificación

En paralelo con el gran número de casos registrados a nivel mundial de COVID-19, que provocaron millones de muertes, la Organización Mundial de la Salud reconoció desde el inicio de la pandemia la existencia de afecciones posteriores a la infección. Así, el 6 de octubre de 2021 publicó la primera definición clínica de síndrome post COVID-19 (Long-COVID) como enfermedad patológica (World Health Organization, 2021b).

En México, hasta el 1 de junio de 2025, más de 7.7 millones de personas se contagiaron de SARS-CoV-2 y más de 340 mil fallecieron, aún después de haberse aplicado más de 225 millones de vacunas contra la COVID-19 (OPS, 2023; Our World in Data, 2025a). A esto se suma la presencia de síntomas prolongados en una proporción significativa de personas, tanto en México como a nivel mundial.

En el reporte del 26 de octubre de 2022 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2022), la COVID-19 fue la principal causa de muerte en México, superando incluso a las enfermedades del corazón y a la diabetes mellitus. Aunque la OMS declaró fin de la emergencia sanitaria, la enfermedad continuó ubicándose entre las primeras seis causas de muerte en México (INEGI, 2023). Incluso con la disminución de pruebas diagnósticas, en el reporte más reciente de INEGI (2024), la COVID-19 aún figura entre

las primeras veinte causas de muerte, considerando ahora complicaciones como el síndrome inflamatorio multisistémico y los efectos adversos de las vacunas.

Diversos estudios, tanto en México como en otros países, indican que quienes superaron la fase aguda de la enfermedad tienen hasta 33 veces más riesgo de desarrollar Long-COVID (Davis et al., 2023; Wong Chew et al., 2021). Además, otras investigaciones recientes han documentado efectos adversos neurológicos, cardiovasculares y auditivos incluso en personas previamente sanas, tras la administración de alguna vacuna contra COVID-19 (Yaamika et al., 2023; Yang & Huang, 2023). Esto subraya la necesidad urgente de contar con tratamientos antivirales efectivos y accesibles.

Desde finales del 2021 se han aprobado antivirales como el Molnupiravir, Paxlovid y Remdesivir para el tratamiento en pacientes positivos a COVID-19. Asimismo, el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) ha representado una alternativa para contrarrestar la infección, al dirigirse a proteínas virales como blanco de ataque. Sin embargo, la FDA ha limitado su uso debido a la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2 que disminuyen su efectividad (Centers for Disease Control and Prevention, 2025; Vangeel et al., 2022). Además de la baja disponibilidad de estos tratamientos, su principal desventaja es el alto costo de adquisición.

Actualmente, la proteína Spike del virus sigue considerándose el principal blanco terapéutico, tanto por su papel en el proceso infeccioso como por su posible vínculo con el síndrome post-COVID (Davis et al., 2023; Gannage, 2024). De este modo, interrumpir la unión ACE2/RBD de Spike representaría un mecanismo antiviral prometedor.

En este contexto, cobran relevancia los metabolitos secundarios adsorbidos en nanopartículas funcionalizadas de TiO₂, molécula desarrollada por nuestro grupo de investigación. A través de estudios de dinámica molecular, estas moléculas han mostrado potencial para interferir en la unión de la proteína Spike con el receptor ACE-2, lo que podría bloquear la entrada del virus al hospedador y llegar a reducir la incidencia del Long-COVID.

Continuando con este enfoque, en el presente trabajo se tiene como propósito expresar el dominio RBD de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en *Escherichia coli*, con el fin de disponer de una herramienta accesible que, en futuras investigaciones, permita evaluar interacciones moleculares con compuestos antivirales prometedores, como los reportados previamente por nuestro grupo. Esto permitiría validar experimentalmente posibles inhibidores de la unión entre la proteína Spike y el receptor ACE-2, y así contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas contra la COVID-19 y sus secuelas prolongadas.

5. Hipótesis

Es posible expresar y purificar la proteína Spike y/o el dominio RBD del SARS-CoV-2 en un sistema de expresión de *Escherichia coli*, mediante el uso del vector pTWIN y un sistema de purificación de afinidad a quitina.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Expresar el dominio RBD de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en *Escherichia coli* y purificarlo en su forma nativa mediante afinidad a quitina, con el fin de generar una herramienta funcional que permita validar in vitro su interacción con los metabolitos secundarios H7R y F7G.

6.2. Objetivos particulares

- Construir el vector de expresión pTWIN1-SARS2-RBD.
- Obtener colonias transformantes de *E. coli* TOP-10 con el vector pTWIN1-SARS2-RBD.
- Inducir la expresión del dominio RBD de la proteína Spike recombinante en *E. coli* BL21 (DE3)
- Purificar el dominio RBD recombinante mediante cromatografía de afinidad, empleando perlas magnéticas recubiertas con quitina (Chitin Magnetic Beads).

- Evaluar la identidad del dominio de RBD purificado mediante técnicas como electroforesis SDS-PAGE y *Western Blot*.

7. Diagrama experimental

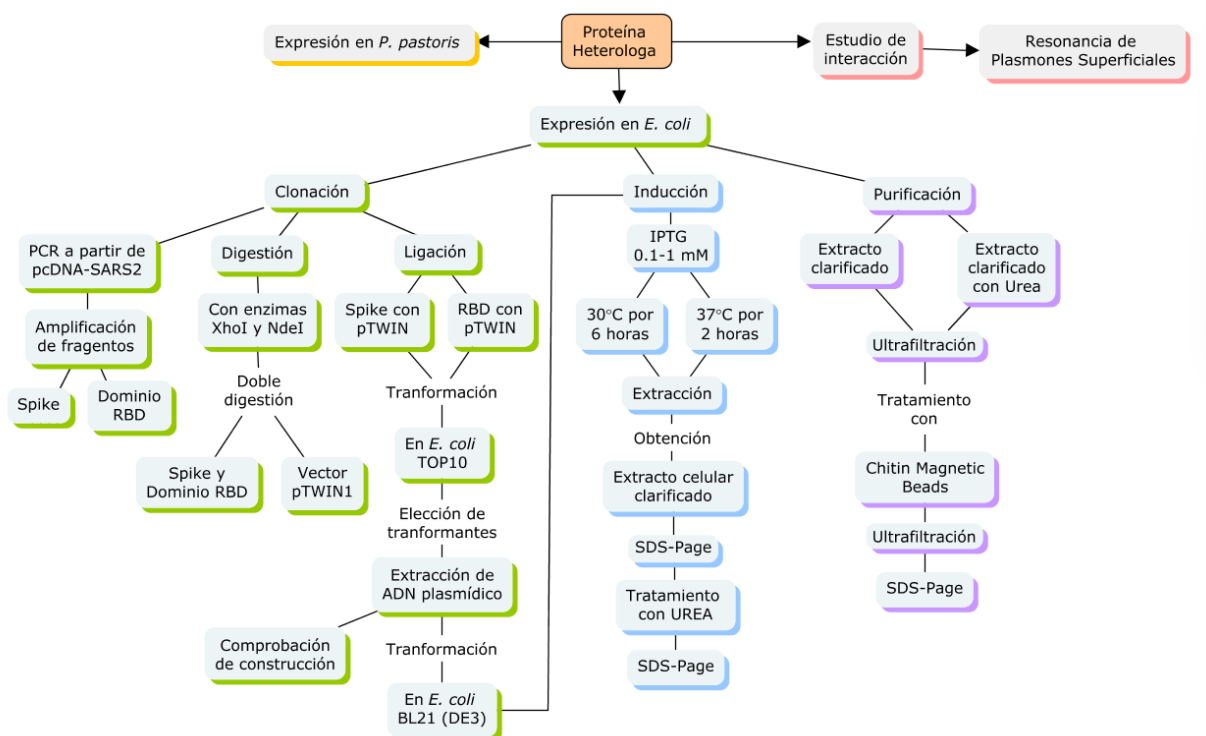


Figura 7. Diagrama de flujo metodológico.

En la Figura 7 se describen de manera general los pasos para lograr el proceso de expresión con IPTG del dominio RBD en *E. coli* BL21 (DE3). Este proceso incluye la construcción del vector pTWIN1 con la secuencia del gen correspondiente a Spike y/o al dominio RBD, esta construcción fue posteriormente integrada en la bacteria mediante transformación.

Para llevar a cabo la inducción, fue necesario probar diferentes condiciones experimentales, siendo las más representativas aquellas que se muestran en la figura 7. Todos los experimentos fueron acompañados de controles positivos y negativos para validar la expresión y asegurar la confiabilidad de los resultados.

8. Materiales y métodos

8.1. Microorganismos

Escherichia coli Top10: Es una cepa de *E. coli* ideal para la clonación y manipulación del ADN. Permite la replicación estable de plásmidos de número de copias alto y presenta una eficiencia de transformación mayor a 1×10^9 transformantes/ μg (Thermo Fisher Scientific, 2024). Esta cepa fue utilizada para la clonación y el mantenimiento de los vectores pcDNA SARS2 Spike, pTWIN1 sin inserto y pTWIN1 con inserto (dominio RBD). La conservación de las cepas transformadas fue a -20°C en glicerol al 40%.

Escherichia coli BL21 (DE3): Publicada por primera vez por Studier & Moffatt (1986) es una cepa utilizada para la expresión de proteínas recombinantes a partir del promotor T7 de plásmidos de bajo o alto número de copias. Posee dos mutaciones importantes que disminuyen la actividad de las proteasas Lon y ompT encargadas de la degradación de proteínas durante su expresión y/o purificación, además, presenta la capacidad de expresar la ARN polimerasa T7 (Thermo Fisher Scientific, n.d.). Por lo anterior, esta cepa fue utilizada para la expresión de la proteína de interés tras su inducción con IPTG (isopropil β -D-tiogalactósido).

8.1.1. Condiciones de cultivo

Crecimiento: Para el cultivo de las cepas se utilizó medio sólido y líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C y 180 rpm durante 12 horas (Cerón-Moreno, 2020). El medio LB, suplementado con el antibiótico correspondiente, fue empleado para la selección de transformantes. Ambos plásmidos utilizados conferían resistencia a ampicilina a las células hospedadoras.

Inducción: Confirmada la presencia del gen de interés en las colonias de *E. coli* BL21, se continuó con el proceso de inducción, siguiendo el protocolo descrito por New England Biolabs (2025b).

A un cultivo con densidad óptica (OD_{600}) entre 0.5 -0.7, se le añadió IPTG en un rango de 0.4 a 1 mM para inducir la expresión proteica. Posteriormente, la incubación continuó a 220 rpm, bajo alguna de las siguientes condiciones: 37°C por 2 horas, 30°C por 6 horas o entre $20 - 25^\circ\text{C}$ durante la noche.

8.1.2. Antibiótico e inductor

Ampicilina: Se preparó una solución stock con una concentración de 200 mg/mL en agua inyectable. Para conservar sus propiedades, se esterilizó por filtración utilizando una jeringa con una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro, y se almacenó bien cerrada a -20°C.

IPTG: Se preparó una solución stock a una concentración de 1 M en agua inyectable. La esterilización se realizó mediante filtración a través de una membrana de 0.22 µm, y se almacenó a -20 °C.

8.2. Medios de cultivo y soluciones amortiguadoras

Los medios de cultivo para el desarrollo de este trabajo se esterilizaron a 121°C, a 15 lb/in² durante 15 minutos.

Medios de cultivo

Medio Luria Bertani	
Bacto-Tryptona (BD)	10 g
Extracto de levadura (BD Bioxon)	5 g
NaCl (Meyer)	10 g
Agua destilada	1 L
pH: 7.0 antes de esterilizar	

Para preparar medio sólido, añadir agar bacteriológico al 2%.

Soluciones amortiguadoras

Solución TENS	
EDTA pH 8 (J.T. Baker)	1 mM
Tris-HCl pH 8 (J.T. Baker)	10 mM
NaOH (J.T. Baker)	0.1 N
SDS (Bio-Rad)	0.5 % (p/v)

Se recomienda realizar la solución de EDTA y Tris-HCl a las concentraciones indicadas en el mismo recipiente y posteriormente realizar el ajuste de pH.

Solución TAE 50X	
Tris-base (Meyer)	242 g
Ácido acético glacial (Meyer)	57.1 mL
EDTA (J.T. Baker)	18.61 g

Disolver Tris-base en aproximadamente 700 mL de agua. Luego, agregar EDTA y, a continuación, añadir ácido acético. Finalmente, ajustar el volumen hasta 1 L con agua.

TB	
PIPES (Sigma Aldrich)	10 mM
CaCl ₂ (Meyer)	15 mM
KCl (Meyer)	250 mM
MnCl ₂ (Meyer)	50 mM
pH: 6.7	

Buffer de corrida SDS-PAGE 10X	
Tris-base (Meyer)	30.3 g
Glicina	144 g
SDS (Bio-Rad)	10 g

Disolver en aproximadamente 800 mL de agua. Luego ajustar el volumen a 1 L con agua.

Soluciones amortiguadoras para extracción y purificación.

Solución B1	
Na-HEPES pH: 8.5* (Sigma Aldrich)	20 mM
NaCl (Meyer)	500 mM
EDTA (J.T. Baker)	1 mM
SDS** (Bio-Rad)	0.06 %
Tween20** (Bio-Rad)	0.2 %

*Se puede usar Tris-HCl o Na-Fosfato

**Reactivos utilizados para mejorar la solubilidad de las proteínas.

Solución B3	
HEPES pH: 8.5 (Sigma Aldrich)	20 mM
NaCl (Meyer)	500 mM
DTT (Thermo Scientific)	40 Mm
EDTA (J.T. Baker)	1 mM

Preparar antes de usar o preparar alícuotas y guardar a -20°C.

Solución 1x CBD Column Binding	
NaCl (Meyer)	500 mM
Tris-HCl (J.T. Baker)	20 mM
EDTA (J.T. Baker)	1 mM
Tween-20* (Bio-Rad)	0.1%
pH: 8.0	

*Se agregó 0.2% para mejorar la solubilidad de la proteína objetivo.

Geles de poliacrilamida.

Gel separador 12% 2X	
Agua Milli-Q	4.28 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	3.29 mL
SDS al 10 %	130 µL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30% (Bio-Rad)	5.2 mL
Persulfato de amonio al 20 % (Bio-Rad)	65 µL
TEMED (Bio-Rad)	13 µL

Gel concentrador 12% 2X	
Agua Milli-Q	3.4 mL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	644.4 µL
SDS al 10 %	50.7 µL
Acrilamida/Bisacrilamida al 30% (Bio-Rad)	844.6 µL
Persulfato de amonio al 20 % (Bio-Rad)	25.4 µL
TEMED (Bio-Rad)	10.1 µL

8.3. Manipulación genética

8.3.1. Células ultracompetentes

Las células ultracompetentes tienen sus paredes celulares alteradas, lo cual les permite permanecer en un estado inducido que permite la captación de material genético del exterior (Fisher scientific, 2024). La obtención de estas se realizó de acuerdo con lo descrito por Zúñiga-León (2010).

Para el precultivo, se inocularon 10 colonias de *E. coli* TOP-10 y de BL21, por separado, en 25 mL de medio LB, se incubó a 37°C durante 8-10 horas. Luego, se tomaron 2.5 mL de precultivo y se adicionaron en 250 mL de medio LB, se incubó a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.5-0.6. Alcanzada la OD, el cultivo se colocó en un baño de hielo durante 10 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El botón celular se resuspendió en 80 mL de buffer TB frío, se mantuvo en hielo por otros 10 min y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriores. El nuevo botón celular se resuspendió en 20 mL de TB más 1.4 mL de DMSO y se dejó en hielo por 10 minutos. Finalmente, el volumen se distribuyó en alícuotas de 100 µL en tubos de 1.5 mL, los cuales se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80 °C.

8.3.2. Transformación por choque térmico sin ligación

Se llevó a cabo una primera transformación utilizando células ultracompetentes de *E. coli* Top 10. A muestras independientes de estas células se les introdujo, por separado, uno de los vectores plasmídicos: pcDNA3.1 y/o pTWIN1, como se menciona a continuación:

Las células se descongelaron en hielo y se agregó rápidamente 5 µL del plásmido correspondiente en cada uno de los tubos que las contenían. Se mantuvieron en hielo durante 35 minutos. Transcurrido el tiempo, los tubos se pasaron a 42°C por un minuto. Luego, se regresaron al hielo por dos minutos más. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio líquido LB y se incubó durante una hora a 37°C y 180 rpm. Al finalizar la incubación, se concentró y distribuyó el contenido de los tubos en placas de Agar LB con ampicilina (placas de selección de transformantes). Las placas se incubaron durante

una noche a 37 °C. Este mismo procedimiento se realizó para insertar la construcción del vector verificada en *E. coli* BL21.

8.3.3. Extracción de DNA plasmídico

Se recomienda extraer el plásmido de interés de cultivos bacterianos que han sido inoculados con una sola colonia transformada obtenida de la placa de agar realizada para la selección de transformantes (Sambrook & Russell, 2001). Para ello, se toma una colonia bacteriana de una placa de agar LB con ampicilina, que ha crecido durante 12 a 16 horas, se siembra en una nueva placa de agar LB con ampicilina y se deja incubar a 37 °C durante una noche. Las extracciones de DNA plasmídico pueden realizarse a partir de esta última siembra o realizar una siembra extra en medio líquido LB con antibiótico.

8.3.3.1. TENS-Miniprep (Zhou et al., 1990)

Con un asa bacteriológica se recogió una parte de la película bacteriana formada en la placa LB agar con ampicilina y se resuspendió en 50 µL de agua estéril y 300 µL de amortiguador TENS con un vórtex por 2 a 5 segundos. Posteriormente se agregaron 100 µL de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2, y se volvió a resuspender perfectamente en vórtex. Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL. A continuación, fueron adicionados 900 µL de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Nuevamente se centrifugó por 2 minutos y se retiró el sobrenadante. El botón se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó durante 2 minutos para retirar el sobrenadante. El botón de ADN se dejó secar al aire durante aproximadamente 15 minutos y finalmente se resuspendió con 100 µL de agua estéril. Se verificó la correcta extracción del ADN plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

8.3.3.2. Megaprep (Zhou et al., 1990)

Se tomó una porción de película bacteriana formada en el cultivo de agar LB con antibiótico, se resuspendió en medio LB líquido con ampicilina y se incubó una noche a 37 °C y 180 rpm. En tubos Eppendorf de 1.5 mL se agregó 1 mL del cultivo, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón celular fue

resuspendido en 100 μ L de agua estéril y 350 μ L de amortiguador TENS con vórtex por 5 min. A esta mezcla se le añadió RNAsa a una concentración final de 100 μ L/mL y, de inmediato, 100 μ L de acetato de sodio. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL limpio y estéril. Se añadieron 600 μ L de isopropanol frío y se mezcló por inversión. La precipitación de ácidos nucleicos se facilitó dejando el tubo a -20 °C durante 20 a 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 14000 rpm durante 4 minutos para retirar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol al 70% frío, centrifugando durante 2 minutos y retirando el sobrenadante en cada lavado. El botón de DNA se dejó secar durante 15 minutos o hasta no observar alcohol residual y finalmente se resuspendió con 100 μ L de agua estéril. Se analizaron 2 μ L de la muestra en un gel de agarosa al 0.8%, a 90V durante 60 minutos. Para verificar la construcción se realizó una digestión con la enzima de restricción *Xho*I.

8.3.4. Vector de clonación

Para la amplificación del gen *S*, que expresa a la proteína Spike, se empleó el plásmido pcDNA3.1 SARS2 Spike (figura 8). Este vector fue proporcionado por el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales de la UAM. El pcDNA3.1 SARS2 Spike tiene un tamaño de 9202 pb y contiene el gen de resistencia a ampicilina -*AmpR*-. El gen de la proteína Spike se encuentra situado inmediatamente después del promotor de citomegalovirus y antes de la secuencia señal de poliadenilación BGH.

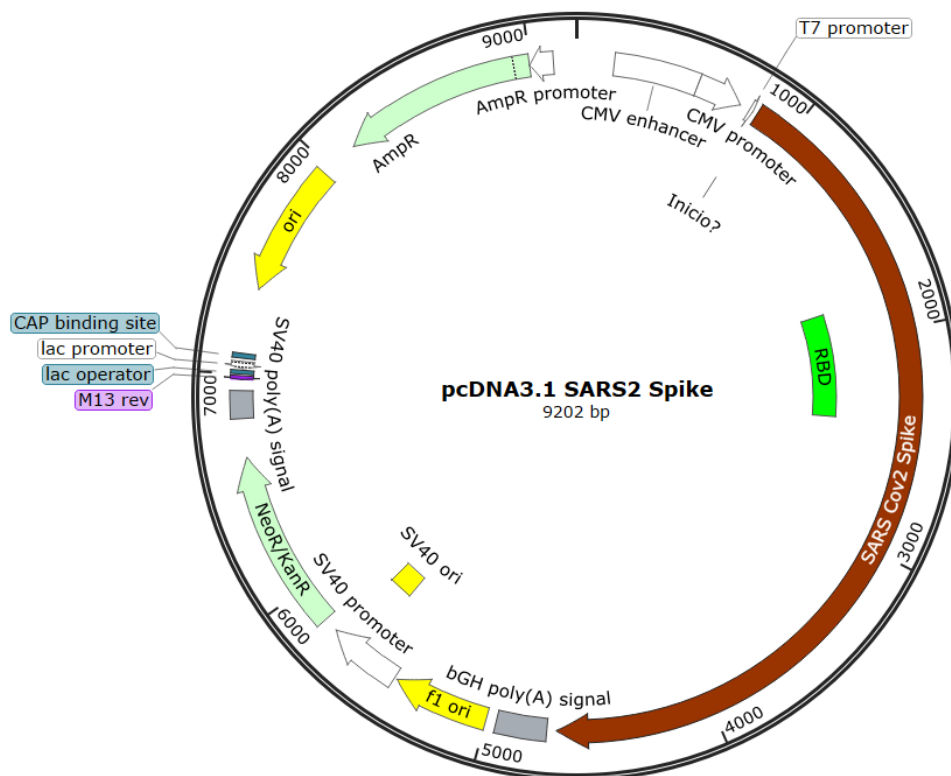


Figura 8. Mapa del vector pcDNA3.1, el cual contiene el gen S de SARS-CoV-2.

8.3.5. Vector de expresión

Se empleó el plásmido pTWIN1, un vector de 7375 pares de bases (pb) utilizado para expresar proteínas recombinantes en *E. coli*. Al igual que el pcDNA3.1, este vector posee el gen *-AmpR-* que le transfiere resistencia a ampicilina a la célula hospedadora. Se seleccionó este plásmido por el fuerte control de la expresión del gen de fusión que presentan los vectores pTWIN por utilizar un promotor T7, esto se deriva de la presencia del gen *lacI* que codifica el represor LacI, el cual mediante su unión al operador lac, suprime la expresión basal del gen de fusión, permitiendo un control transcripcional estricto incluso en cepas de *E. coli* que no presentan *lacI* endógeno. Además, contiene cinco terminadores en tándem que reducen la transcripción basal en ausencia de IPTG (New England Biolabs, 2025b).

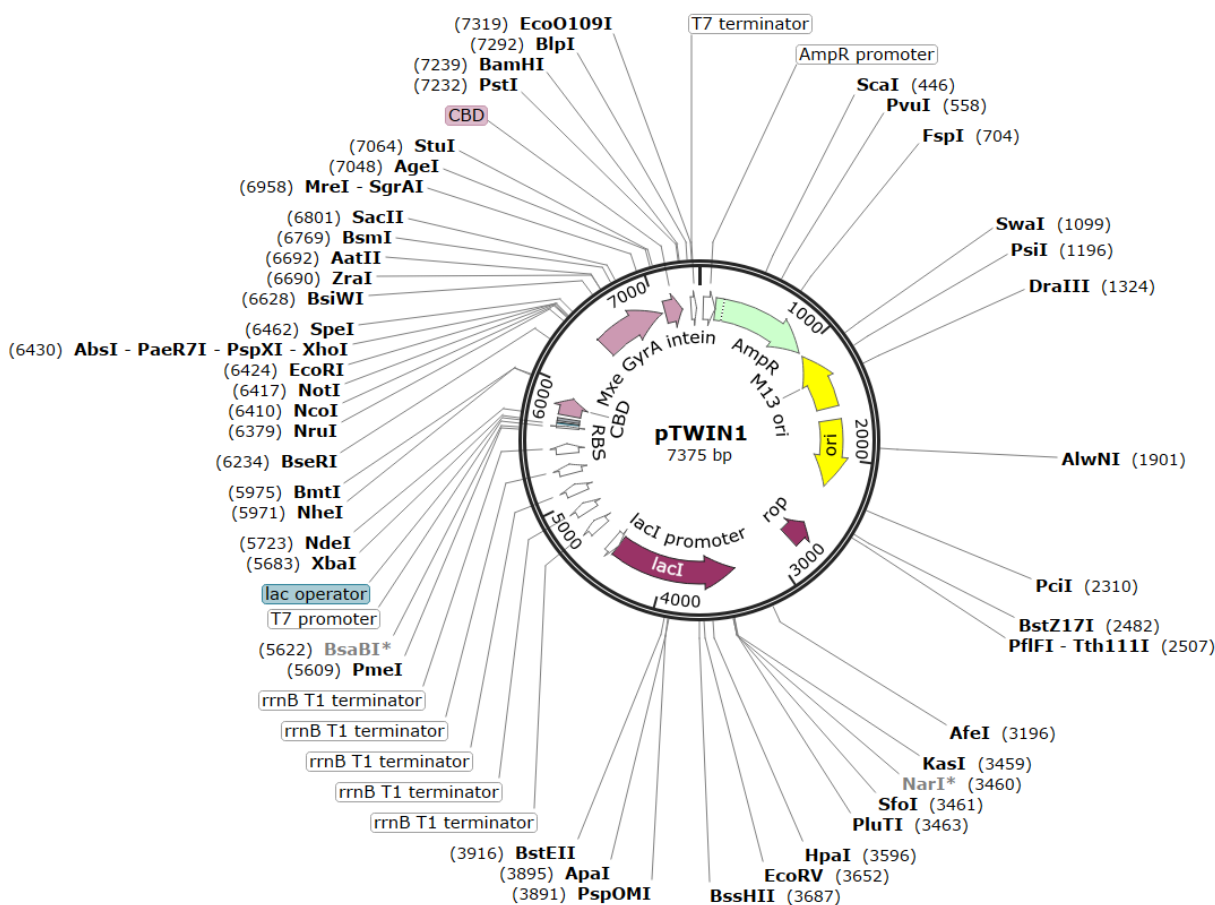


Figura 9. Mapa de restricción del vector *pTWIN1*.

Otro punto importante es su innovador sistema de purificación de proteínas mediado por inteínas. El plásmido *pTWIN1* contiene una etiqueta de unión a quitina (CBD) unida a proteínas con actividad de autoescisión inducible (denominadas inteínas), lo que permite separar la proteína objetivo de la etiqueta CBD mediante afinidad en una resina de quitina. Este sistema posibilita la obtención de proteínas recombinantes en su forma nativa. Las dos inteínas que posee están diseñadas para sufrir escisión en el extremo C-terminal o N-terminal en respuesta de condiciones específicas como presencia de grupos tiol, temperatura y pH. (New England Biolabs, 2025b). En este estudio, el amplicón de interés fue insertado corriente abajo del promotor T7, con la fusión de la etiqueta interna en el extremo C-terminal de la proteína de interés.

8.3.6. Oligonucleótidos

Se diseñaron los oligonucleótidos Forward y Reverse para el gen que codifica el dominio RBD y para el gen S de Spike, este último con la finalidad de contar con una alternativa secundaria al objetivo principal de la tesis. El diseño de ambos pares de oligonucleótidos incluyó secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* en los extremos 3' y 5', respectivamente, con el fin de facilitar la construcción y la ligación posterior.

Asimismo, se diseñaron oligos para el vector pTWIN1 con el propósito de utilizarlos como método de comprobación de la construcción.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación.

Oligonucleótido	Secuencia	Función
F-Spike	5' GGTGGT CATATG TTTGTCTTCCTGGTCCTGC 3'	Amplificación de Spike
R-SpikesinH	5' GGTGGT CTCGAG CCTGTATAGTGACGTTTGACG 3'	
F-RBD	5' GGTGGT CATATG AACCTGTGCCATTTCGG 3'	Amplificación de RBD
R-RBD	5' GGTGGT CTCGAG TCTTTGGTCCGCACACGGTA 3'	
F-pTWIN	5' TAATACGACTCACTATAGGGGA 3'	Confirmación de la construcción del vector de expresión en transformantes.
R-pTWIN	5' AAAAAACCCCTCAAGACCCGT 3'	

8.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de las secuencias que expresan la proteína Spike y el dominio RBD se utilizó el plásmido pcDNA3.1 SARS2 Spike.

8.3.7.1. Obtención del amplicones

Los amplicones esperados tienen un tamaño de 3855 pb para el gen S de Spike y de 582 pb para el dominio RBD. Para la amplificación se utilizó la enzima iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad, Catálogo: 172-5300). Las condiciones de mezcla de reacción se encuentran a continuación.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación del gen S y dominio RBD.

Componente	Volumen (μL)
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 50 μL
5X iProof HF Buffer	10
10 mM dNTP mix	1
F-Spike / F-RBD	2.5

R-SpikesinH / R-RBD	2.5
DNA plasmídico	50 ng
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase	0.5

Tabla 4. Condiciones programadas en el Termociclador para Spike.

	Etapas	Temperatura	Tiempo
Ciclo extenso	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	64°C	30 s
	Extensión	72°C	3.5 min
34 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	64°C	30 s
	Extensión	72°C	3.5 min
	Extensión final	72°C	5 min
	Infinity Hold	10°C	∞

Tabla 5. Condiciones programadas en el Termociclador para RBD.

	Etapas	Temperatura	Tiempo
Ciclo extenso	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	62°C	30 s
	Extensión	72°C	30 s
34 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	62°C	30 s
	Extensión	72°C	30 s
	Extensión final	72°C	5 min
	Infinity Hold	10°C	∞

8.3.7.2. Confirmación de la construcción del vector pTWIN1-RBD

Para este proceso se utilizaron los *primers* universales del plásmido pTWIN1, la amplificación del fragmento en la construcción se realizó a partir de ADN plasmídico extraído por miniprep de las colonias transformadas, utilizando el pTWIN1 vacío como control. La enzima utilizada para este proceso fue GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Catálogo: M8291).

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación de confirmación.

Componente	Volumen (μL)
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 50 μL
5X GoTaq® Flexi Buffer	10
MgCl ₂ , 25mM	5
10 mM dNTP mix	1
F-pTWIN	2.5
R-pTWIN	2.5
DNA plasmídico	50 ng
GoTaq® DNA Polymerase	0.25

Tabla 7. Condiciones programadas en el Termociclador para comprobación.

	Etapas	Temperatura	Tiempo
Ciclo extenso	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	64°C	30 s
	Extensión	72°C	5 min
34 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	64°C	30 s
	Extensión	72°C	5 min
	Extensión final	72°C	5 min
	Infinity Hold	10°C	∞

8.3.8. Digestiones enzimáticas

Las digestiones enzimáticas se realizaron con dos propósitos. El primero de ellos es para linealizar el vector, lo cual permite verificar que se trata del plásmido deseado, y comprobar que las ligaciones se han realizado correctamente. El segundo propósito de las digestiones enzimáticas es para realizar la inserción de genes en un vector de interés.

Se utilizó la enzima *Xho*I (Promega, Catálogo: R6161) para linealizar los plásmidos pcDNA3.1 SARS2 Spike y pTWIN1 previamente extraídos mediante megaprep, con el único fin de comprobar su tamaño. Las condiciones de la reacción se realizaron según las indicaciones del proveedor.

Para la clonación de los amplicones obtenidos por PCR en el vector pTWIN1, se realizaron digestiones enzimáticas tanto de los productos de PCR como del plásmido. En este caso, se utilizaron las enzimas de restricción: *Nde*I 10 U/μ (Jena Bioscience, Catálogo: EN-E2293-01) y *Xho*I 10 U/μL (Thermo Scientific, Catálogo: ER0691) siguiendo los protocolos recomendados por cada proveedor.

El uso de estas enzimas de restricción permitió la fusión del gen objetivo en el extremo N-terminal de la inteína 2, *Mxe Gyra Inteín*, encontrada corriente arriba del dominio de unión a quitina (CBD).

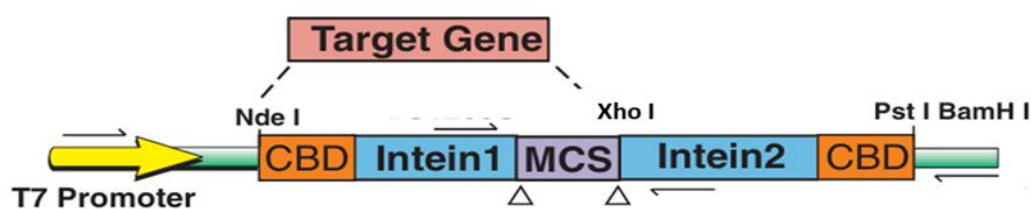


Figura 10. Esquema que muestra el método de fusión del gen objetivo dentro del vector de expresión pTWIN1, representando los cortes de las enzimas utilizadas. Tomada de New England Biolabs (2025b).

8.3.9. Purificación

Los productos de PCR y el vector de expresión digeridos fueron purificados siguiendo las indicaciones del protocolo del Kit PCR Clean-Up & Gel Extraction (PureDireX, Catálogo: PDC01-0100)

8.3.10. Ligación de amplicones en el vector pTWIN1

Una vez obtenidos y purificados tanto el vector como los amplicones digeridos, se realizó la ligación de estos, considerando una relación molar vector:inserto 1:3, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Catálogo: M1801), con su protocolo correspondiente.

8.3.11. Transformación por choque térmico de las construcciones.

Se realizó otra transformación con el objetivo de introducir la construcción del vector de expresión pTWIN1 SARS2-Spike/RBD a las células de *E. coli* Top10.

A células ultracompetentes se le adicionaron 10 μ L de la reacción de ligación, y la mezcla se mantuvo en hielo durante 35 minutos. Posteriormente, se continuó con el protocolo de transformación descrito previamente.

8.3.12. Selección, aislamiento y comprobación de clonas

A partir de la placa obtenida tras la transformación, se aislaron colonias, y se comprobó la presencia de *E. coli* mediante tinción de Gram (Hycel, Catálogo: 541). Posteriormente, se realizó una resiembra en una segunda placa con medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), la cual fue etiquetada como parche bacteriano. Para asegurar la presencia del plásmido se realizaron resiembras en diferentes medios LB incrementando la concentración de ampicilina hasta 120 μ g/mL.

Previo a la transformación en *E. coli* BL21 (DE3) se extrajo el ADN plasmídico mediante la técnica de megaprep, y la construcción de pTWIN1-SARS2-RBD fue verificada por digestión enzimática con *Nde*I y análisis por PCR utilizando *primers* universales de pTWIN1. Además, se realizó un análisis de secuenciación para confirmar la integración del inserto (Anexo 3).

8.4. Producción de la proteína recombinante

8.4.1. Inducción y extracción proteica

Para el proceso de inducción y extracción de la proteína heteróloga se siguieron las condiciones descritas en el manual NEB #6960S de New England Biolabs (2025b), basadas en los protocolos de Vaillancourt (2003), con algunas modificaciones.

El proceso de inducción se llevó a cabo en tres etapas:

1. Cultivo inicial: A partir de una colonia transformada de *E. coli* BL21 aislada o de una alícuota de glicerol proveniente de la misma, se creció un precultivo durante la noche a 37°C y 180 rpm en medio LB con ampicilina (100 μ g/mL).
2. Inoculo: En un matraz de 250 mL se agregaron 60 mL de medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina. Se añadió una alícuota de 0.6 mL del cultivo inicial para obtener una dilución 1:100 y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) entre 0.5 -0.7. En todos los matraces la OD₆₀₀ obtenida fue cercana a 0.55.

3. Inducción: Al cultivo de inóculo se le añadió IPTG para alcanzar una concentración de 0.5 mM y así iniciar la inducción de la expresión. Posteriormente, la incubación se realizó en dos condiciones diferentes: a 220 rpm, 37°C durante 2 horas y a 220 rpm, 30°C durante 6 horas.

En este proceso se incluyeron controles negativos, cultivos de transformantes sin adicionar el inductor.

Se continuó con el proceso de extracción descrito a continuación:

1. Recolección: El cultivo de inducción se centrifugó a 5000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado. *En esta etapa el pellet celular se puede almacenar a -20 °C.*
2. Extracto de células crudas: El pellet de células se resuspendió en 5 mL de buffer B1 preparado con SDS y Tween20. Tras la resuspensión, las células fueron lisadas por sonicación pulsada al 40% de amplitud, con ciclos de 10 segundos encendido / 20 segundos apagado durante 5 minutos en un equipo disruptor ultrasónico. Todo el proceso se realizó en hielo.
3. Extracto de células clarificadas: La suspensión se centrifugó a 19000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó, se concentró en unidades de ultrafiltración (Sartorius, Catalogo: VS0192) y se almacenó a -20 °C.

Rompimiento de cuerpos de inclusión

4. Tratamiento con urea: El pellet de células lisadas se resuspendió en buffer B1 suplementado con 2.5 M de urea. La mezcla se agitó durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugó a 19000 xg durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se recuperó, luego se ultrafiltró para eliminar la urea y se almacenó a -20 °C. Este proceso se realizó siguiendo las consideraciones del manual NEB #E6901S New England Biolabs (2020).

Las muestras se cuantificaron y analizaron por SDS-PAGE al 12%,

8.4.2. Cuantificación de la concentración de proteína

Para medir la concentración de la proteína se utilizó la técnica de microensayo descrita por Bradford (1976), siguiendo las indicaciones del reactivo Sigma-Aldrich (Bulletin

Bradford Reagent, B6916). Se mezclaron 5 μL de la muestra con 250 μL del reactivo de Bradford, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó a partir de una curva patrón con albumina bovina (BSA) como estándar (Anexo 1).

8.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad

Para el proceso de purificación por afinidad se utilizaron perlas magnéticas recubiertas con quitina (New England Biolabs, catálogo: E8036S), siguiendo el protocolo del proveedor, basado en lo reportado por Chong et al. (1997), con algunas modificaciones.

En este procedimiento se utilizó el buffer B3 que promueve la escisión inducible por tior de la etiqueta en el extremo C-terminal de la proteína objetivo.

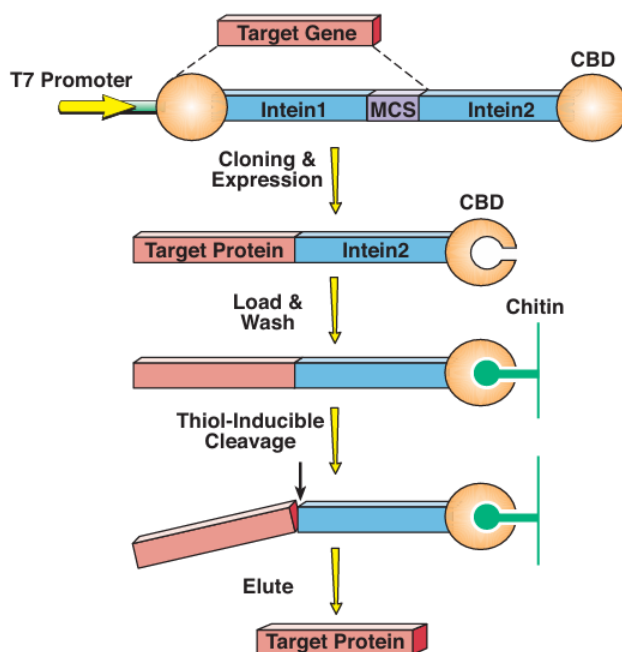


Figura 11. Purificación de proteínas en vector pTWIN1. Fusión de Intein2 al extremo C-terminal de la proteína objetivo y liberación de esta por escisión inducida por tior. Tomada de New England Biolabs (2025b).

1. Se tomaron dos alícuotas de 50 μL de perlas resuspendidas y se transfirieron a tubos estériles de 2 mL.
2. Se agrego 500 μL de buffer de columna CBD con 0.2% de Tween20 y se mezcló en vórtex. Se aplicó el imán durante 30 segundos y se decantó el sobrenadante. Este proceso se realizó tres veces.

3. En dos tubos se agregaron 800 μL del extracto clarificado (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 800 μL del extracto tratado con urea (0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), de manera independiente. Se mezclaron en vórtex y se incubaron a 4 °C con agitación durante 3 horas.
4. Se aplicó el imán y se descartaron los sobrenadantes. Cada tubo se lavó con 500 μL de buffer de columna CBD con 0.2% de Tween20 como en el paso 2.
5. Se agregaron 180 μL de buffer B3 en cada tubo y se dejaron incubando a 4 °C con agitación durante una noche. Al día siguiente se recuperó el sobrenadante y se ultrafiltró para eliminar el DTT y concentrar la muestra.

Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 12%.

8.4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para esta técnica se utilizaron modificaciones del protocolo descrito por Laemmli (1970). Se prepararon geles separadores al 12% y concentradores al 5%, el voltaje aplicado fue de 120 V en una cámara Mini-PROTEAN®Tetra Cell (Bio-Rad). La detección de proteínas se llevó a cabo mediante tinción con Coomassie y tinción con plata.

8.4.5. Tinción

Tinción con Coomassie: Esta técnica se basa en lo reportado por (Neuhoff et al., 1988). Una vez terminada la electroforesis, se fijaron los geles con una solución de 40 % etanol y 10 % ácido acético durante 30 minutos. Posterior a esto, los geles se enjuagaron durante 10 minutos con agua Milli-Q tres veces. Finalmente, se adicionó la solución de Bio-Safe Coomassie G-250 (BioRad, Catalogo: 161-0786) a los geles por separado y se dejaron en agitación durante la noche. Los geles se destiñen con lavados de agua Milli-Q antes de su digitalización.

Tinción de plata: Para el desarrollo de esta técnica se siguió el protocolo del kit Silver Stain Plus kit (BioRad, Catalogo: 161-0449).

9. Resultados y discusión

9.1. Verificación del plásmido de clonación y el plásmido de expresión.

La transformación por choque térmico inicial permitió insertar los plásmidos pCDNA3.1 SARS2 Spike y pTWIN1 en células de *E. coli* Top10, observando colonias bacterianas resistentes a ampicilina tras una noche en incubación y posterior resiembra de colonias aisladas en medio LB suplementado con ampicilina (Figura 12). Esto confirma la inserción de los plásmidos dentro de *E. coli* y permite el mantenimiento estable de estos plásmidos para usos subsecuentes.

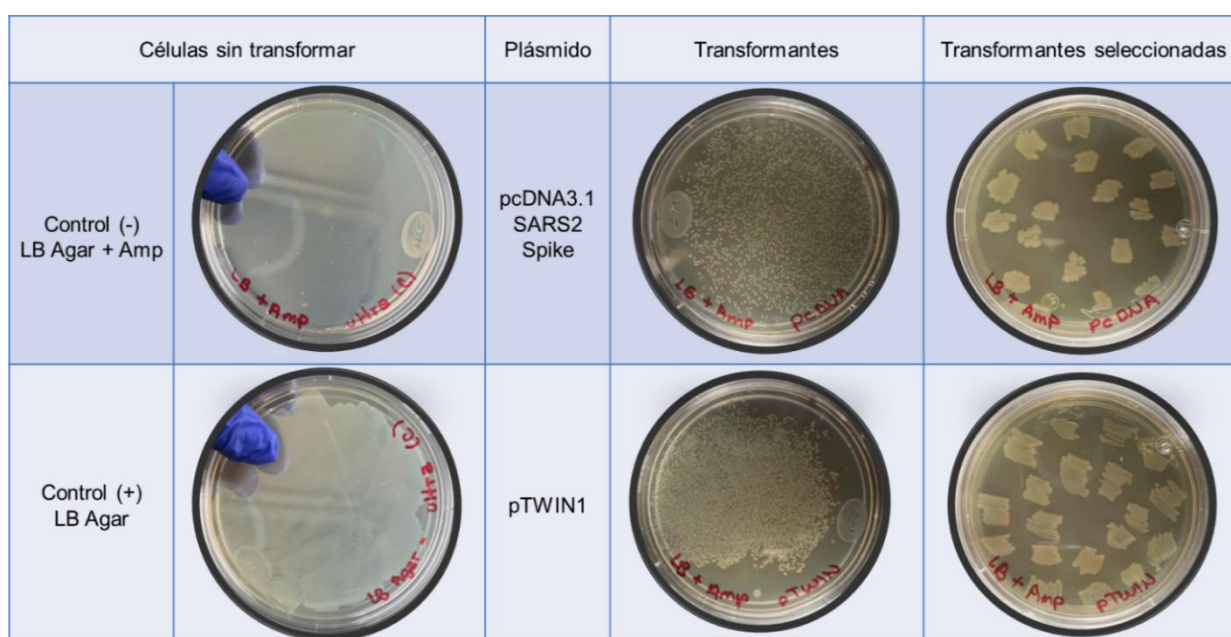


Figura 12. Colonias obtenidas después de 14 horas de incubación. El control negativo no presentó crecimiento bacteriano, lo cual confirma la efectividad de la ampicilina. El control positivo mostró crecimiento, confirmando la viabilidad de las células *ultracompetentes*. Las colonias transformadas se seleccionaron y se resembraron en medio LB agar con ampicilina, con el fin de conservar colonias aisladas.

Después de extraer ADN plasmídico por megaprep, se confirmó el tamaño en pares de bases de ambos plásmidos mediante digestión enzimática con la enzima *XhoI*. La figura 13 muestra el gel de agarosa al 0.8% en donde se observan bandas correspondientes a los plásmidos linealizados, con tamaños consistentes con los teóricos esperados: 9202 pb para pcDNA3.1 SARS2 Spike y 7375 pb para pTWIN1.

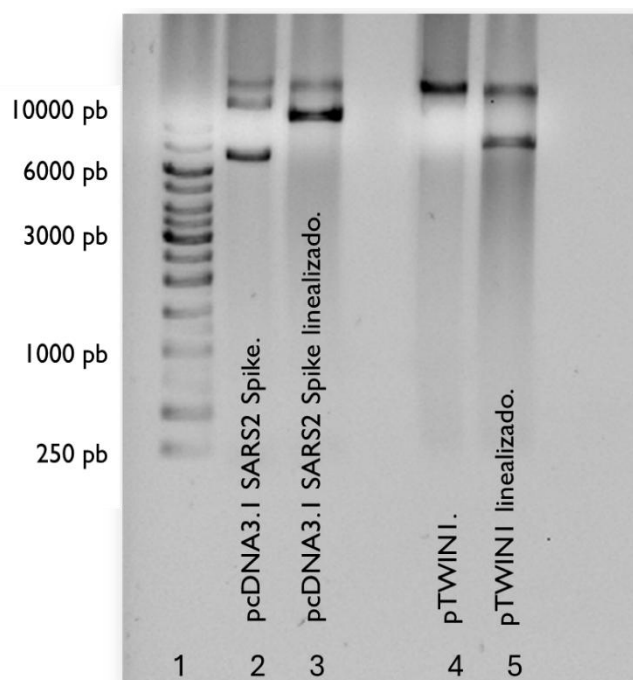


Figura 13. Gel de agarosa al 0.8%. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (ThermoScientific, 1kb), el carril 2 al plásmido pcDNA3.1 SARS2 Spike obtenido por megaprep y el carril 3 al mismo plásmido linealizado con XhoI. Los carriles 4 y 5 corresponden al plásmido pTWIN1 obtenido por megaprep y linealizado con XhoI, respectivamente. Se utilizó el buffer de carga RedGel para este procedimiento.

El ADN plasmídico sin digestión enzimática puede presentarse en diferentes conformaciones: superenrollado, circular relajado y lineal. Por esta razón, en geles de agarosa, bajo ciertas condiciones, se observa la migración de dos o más bandas (Sambrook & Russell, 2001), como ocurre en los carriles dos y cuatro del gel analizado, donde se distinguen hasta tres conformaciones del ADN plasmídico.

La presencia de doble banda en los carriles tres y cinco sugiere que el ADN plasmídico no fue completamente digerido con XhoI, no obstante, las bandas observadas son claras para corroborar sus tamaños y asegurar la integridad de los plásmidos. Cabe mencionar que, el uso del buffer con GelRed puede retardar la migración del ADN en los geles de agarosa, lo que puede explicar la ligera diferencia en los tamaños aparentes observados (Merck, 2018).

Además, se realizó una verificación por PCR del vector pTWIN1 utilizando *primers* que hibridan en el promotor y terminador T7, obteniéndose una banda de aproximadamente 1713 pb, como se observa en la figura 14, lo cual concuerda con el tamaño predicho por análisis *in silico*.

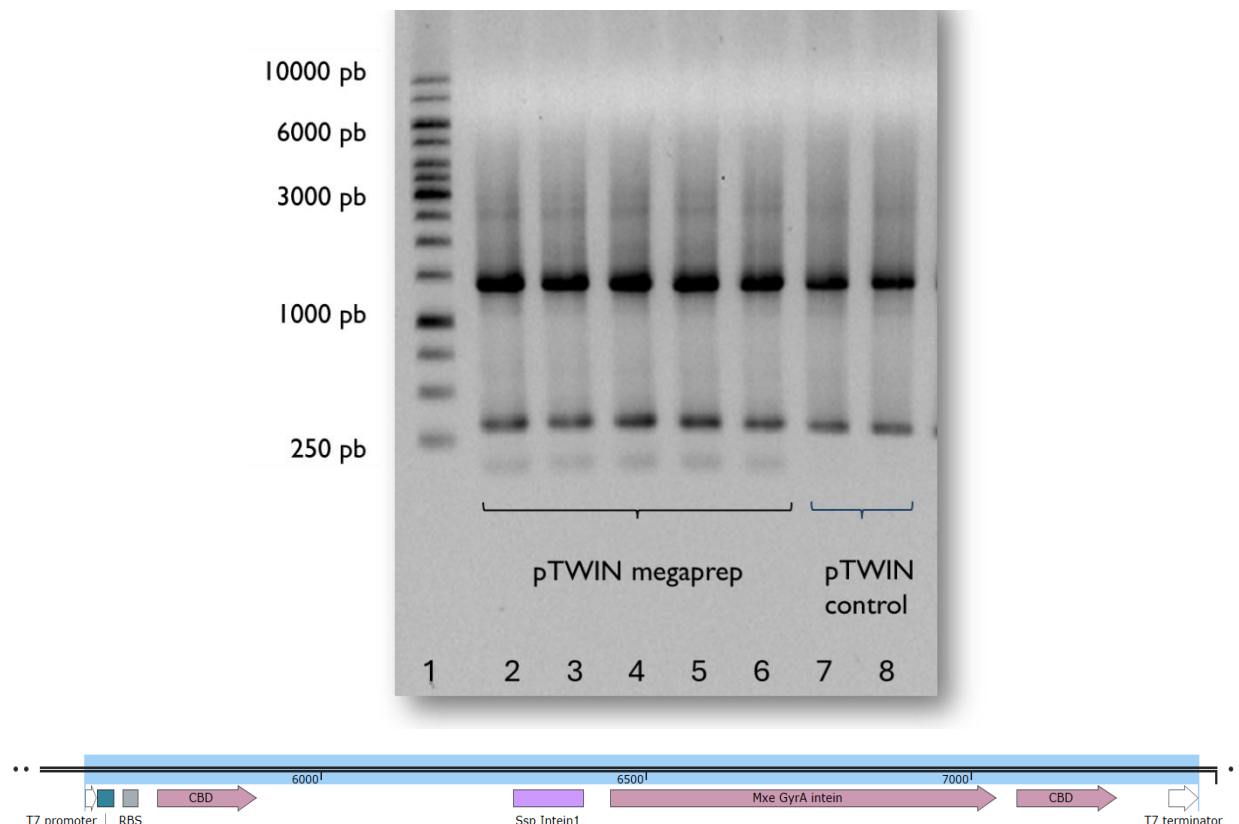


Figura 14. Gel de agarosa al 0.8% cargado con reacciones de PCR a partir del plásmido pTWIN1 utilizando los primers F-pTWIN y R-pTWIN. En el esquema inferior se visualiza la región dentro de pTWIN que fue amplificada para esta comprobación del vector.

9.2. Obtención purificación y digestión del amplicón.

Se amplificó un fragmento correspondiente a los aminoácidos 334 a 527, que representa una porción significativa del dominio RBD, con una longitud de 586 pb. Este fragmento se obtuvo a partir del gen S, que codifica a la proteína Spike (Wuhan-Hu-1, GenBank: QHD43416.1), contenido en el vector pcDNA3.1-SARS2-Spike (Nurisyah et al., 2025) y tiene una longitud total de 3855 pb.

Adicionalmente, se amplificó la región completa del gen S con el fin de contar con una alternativa experimental complementaria. Ambas regiones fueron amplificadas con el propósito de ser clonadas en el vector pTWIN1 (Figura 15).

Para generar extremos cohesivos compatibles, se realizaron digestiones enzimáticas con *Nde*I y *Xho*I de cada uno de los amplicones.

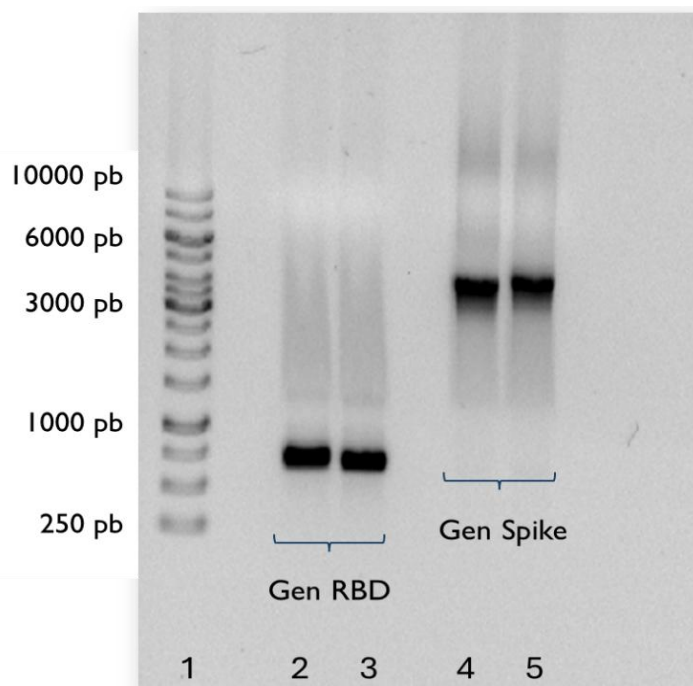


Figura 16. Gel de agarosa al 0.8% cargado con productos de PCR purificados. Los carriles 2 y 3 muestran el amplicón de 582 pb, correspondiente al dominio RBD y los carriles 4 y 5 contienen el amplicón de el gen S de 3855pb.

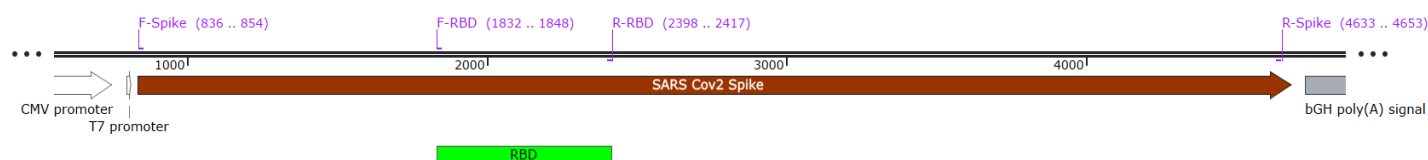


Figura 15. Esquema que representa los sitios de anillamiento de los oligonucleótidos para el gen Spike y el gen RBD.

Cabe destacar que, las digestiones enzimáticas de los amplicones no son visibles en geles de agarosa, ya que la eliminación de pocos nucleótidos (~24 pb) no genera un cambio significativo en su tamaño. Por lo tanto, los amplicones digeridos presentan un patrón de migración similar al de los no digeridos durante la electroforesis.

9.3. Digestión enzimática del vector pTWIN.

El vector de expresión pTWIN fue digerido de forma independiente con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Esta doble digestión se realizó, en primer lugar, para linealizar el vector y generar extremos cohesivos compatibles con el amplicón y, en segundo lugar, para garantizar la correcta orientación del inserto en el vector después de la ligación (Sambrook & Russell, 2001).

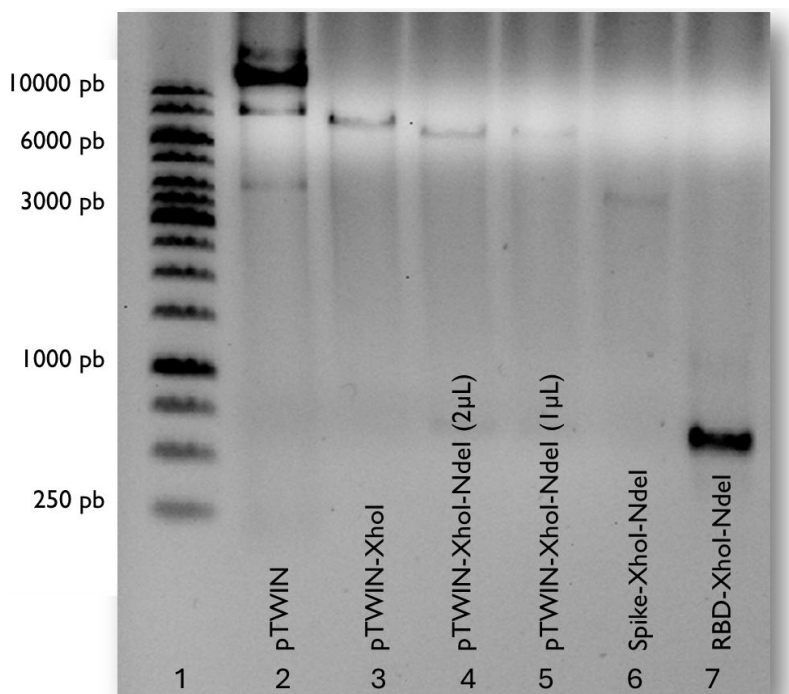


Figura 17. Gel de agarosa al 0.8% obtenido tras las digestiones enzimáticas. Se cargó 1 µL de muestra por carril, excepto en el carril 4. En el carril 2 se observa el plásmido pTWIN1 en su conformación circular no digerida; en el carril 3, el mismo plásmido digerido con la enzima *XhoI*. Los carriles 4 y 5 contienen el plásmido digerido con las enzimas *XhoI* y *NdeI*. Finalmente, en los carriles 6 y 7 se observan los fragmentos correspondientes a los amplicones de *Spike* y *RBD*, respectivamente, ambos doblemente digeridos.

El vector pTWIN, al ser doblemente digerido, pierde un fragmento de 707 pb, quedando de un tamaño de 6668 pb. Por este motivo, en un gel de agarosa al 0.8% se observa una ligera diferencia de migración entre la banda correspondiente al plásmido únicamente digerido con *XhoI* (carril 3, 7375 pb) y la banda de pTWIN1 digerido con ambas enzimas (carril 4 y 5, 6668pb). Con esto, fue posible continuar con la ligación entre el vector y los fragmentos.

El proceso de clonación con el gen para *Spike* no se concretó, ya que no se obtuvieron colonias transformadas tras la ligación y transformación en *E. coli* TOP-10. Esto puede deberse a múltiples factores, como la pureza de los fragmentos y/o vector, la concentración del plásmido, así como la estructura y longitud del fragmento a insertar (Sambrook & Russell, 2001).

Siguret et al. (1994) mencionan que la eficacia de la ligación y posterior transformación se ve afectada cuando el tamaño del plásmido supera los 10 kb. Por lo tanto, considerando que el gen de la proteína Spike tiene una longitud de aproximadamente 3.8 kb, es posible que se hayan presentado dos factores, un impedimento estérico que afectó la ligación y/o una disminución en la eficiencia de transformación debido al tamaño total del plásmido construido (~10.5 kb).

Dado los resultados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la reacción de ligación entre pTWIN1 y la secuencia de Spike; sin embargo, no se observó ninguna banda que indicara que la ligación entre el plásmido pTWIN1 y el gen S de Spike se hubiera logrado (datos no mostrados).

Cabe destacar que, de acuerdo con Nithya Shree et al. (2024), la proteína Spike solo ha sido expresada como fragmentos en *E. coli*, siendo el dominio RBD el más comúnmente expresado. Esto pone en evidencia el desafío que representa clonar y expresar la proteína Spike en dicho sistema. Desafortunadamente, por falta de tiempo, no fue posible evaluar otras condiciones de clonación y se continuó con el objetivo inicial de la tesis. Por lo tanto, para estudios posteriores, la implementación de estrategias alternativas, como la técnica de Golden Gate Assemble o la transformación por electroporación, podrían favorecer la inserción y expresión exitosa del gen de *Spike* en *E. coli*.

9.4. Obtención de transformantes en *E. coli* TOP-10.

Se obtuvo una colonia tras la transformación en *E. coli* TOP-10 con el plásmido pTWIN1 que contenía el gen que codifica el dominio RBD (Figura 18). Para el análisis de la clona se realizó una tinción de Gram y posteriormente una mega preparación que permitió la

extracción de ADN plasmídico, cuya integridad se comprobó mediante electroforesis (Figura 19).

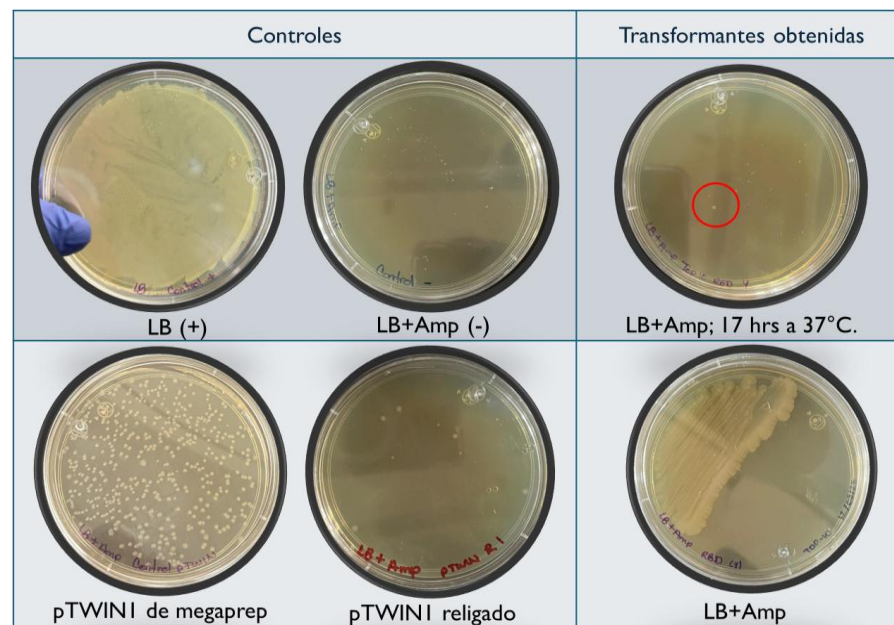


Figura 18. Colonias bacterianas observadas tras 16 horas de cultivo. Los controles positivo y negativo confirman, respectivamente, la viabilidad de las células competentes y la efectividad de la ampicilina. El control con pTWIN1 de megaprep valida el correcto desarrollo del protocolo de transformación, mientras que el control pTWIN1 religado permite evaluar la funcionalidad de la enzima T4 ligasa. La colonia transformante obtenida fue sembrada en medio LB agar con ampicilina

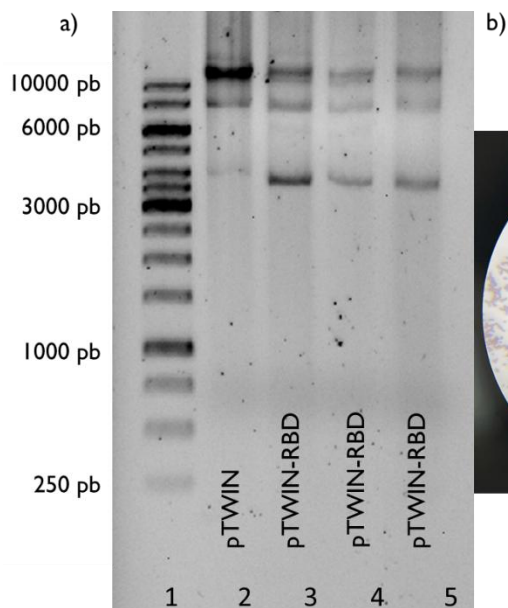


Figura 19. a) Gel de agarosa al 0.8% que muestra el ADN plasmídico del vector pTWIN-RBD extraído por megaprep (carriles 3, 4 y 5). A partir de estas muestras se realizaron digestiones enzimáticas y reacciones de PCR para su verificación. b) Tinción de Gram a partir de la colonia obtenida de *E. coli* TOP-10.

9.5. Digestión Megapreps

El ADN plasmídico de las megapreps fue digerido con *NdeI* con el propósito de confirmar la construcción del vector pTWIN1-SARS2-RBD, utilizando el vector vacío como control. Aunque la diferencia teórica entre ambos vectores es de solo 120 pb, fue posible observar una ligera variación en la migración de las bandas correspondientes al vector pTWIN1 control y a la construcción de pTWIN1-SARS2-RBD (Figura 20).

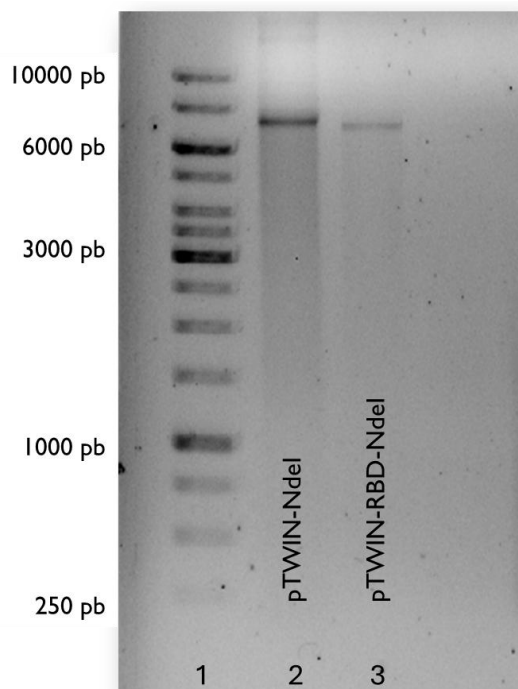


Figura 20. Gel de agarosa al 0.8% que muestra las digestiones con la enzima *NdeI*. En el carril 2 se observa el vector pTWIN1 linealizado (7375pb), mientras que en el carril 3 se muestra el vector pTWIN1-SARS2-RBD linealizado (7256 pb). Se aprecia una diferencia en la migración entre ambos productos, correspondiente a la inserción del fragmento.

9.6. PCR de Megapreps

Para esta confirmación, se emplearon dos pares de oligonucleótidos. Un par correspondía a los oligonucleótidos que hibridan en extremos del gen *RBD*, mientras que el segundo consistía en los oligos universales del vector pTWIN1 (Ver Tabla 2).

Con el primer par de *primers*, se esperaba que en el caso del vector vacío (control), no se obtuviera amplificación; en cambio, si la construcción del vector pTWIN1-SARS2-*RBD* es correcta, se observaría una banda en aproximadamente 586 pb, correspondiente al tamaño del amplicón esperado.

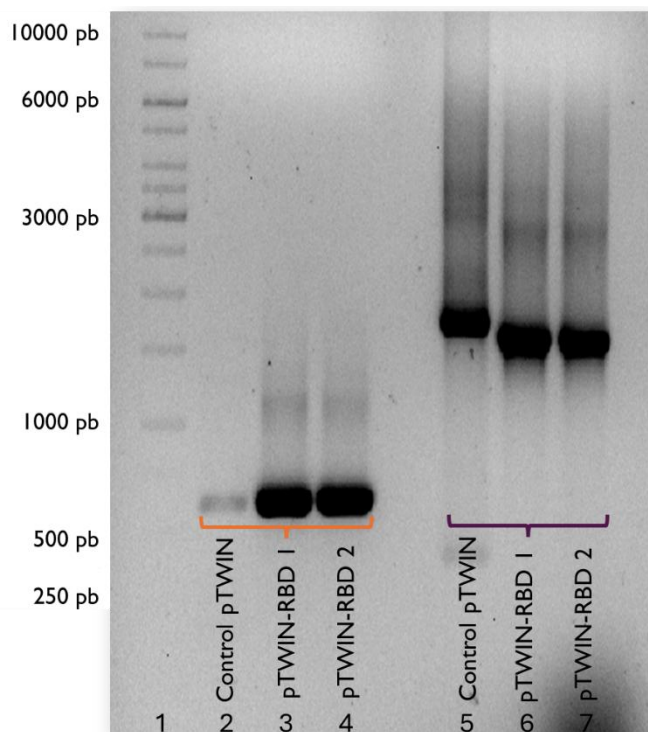


Figura 21. Gel de agarosa al 0.8%. Primer par de *primers* (amarillo), el control -vector vacío- presenta una banda en un tamaño similar que el amplicón esperado, no obstante, la banda obtenida en la construcción presenta una mayor intensidad, lo que sugiere una mejor especificidad. Segundo par de *primers* (morado) el control presenta un amplicón en aproximadamente 1713 pb, mientras que en la construcción se observa un amplicón que ronda las 1594 pb, valor cercano al tamaño esperado.

Sin embargo, los *primers* diseñados para amplificar el gen *RBD* presentan una ligera hibridación inespecífica con regiones de vector pTWIN1 sin inserto. Esta unión no específica genera un producto de amplificación en baja concentración, de aproximadamente 567 pb, cuyo tamaño es muy similar al esperado para el gen *RBD*, lo que explica la banda observada en el control negativo.

En la segunda PCR, el resultado se interpreta mejor ya que se observa diferencia en la migración entre el vector control y la construcción del vector pTWIN-SARS2-*RBD* atribuible a la diferencia de 120 pb entre ambos, lo que respalda la correcta incorporación del fragmento del gen *RBD* en el vector, lo que fue corroborado por

alineamiento de la región secuenciada con los oligos F-RBD y R-RBD y la región control esperada de pTWIN1-RBD.

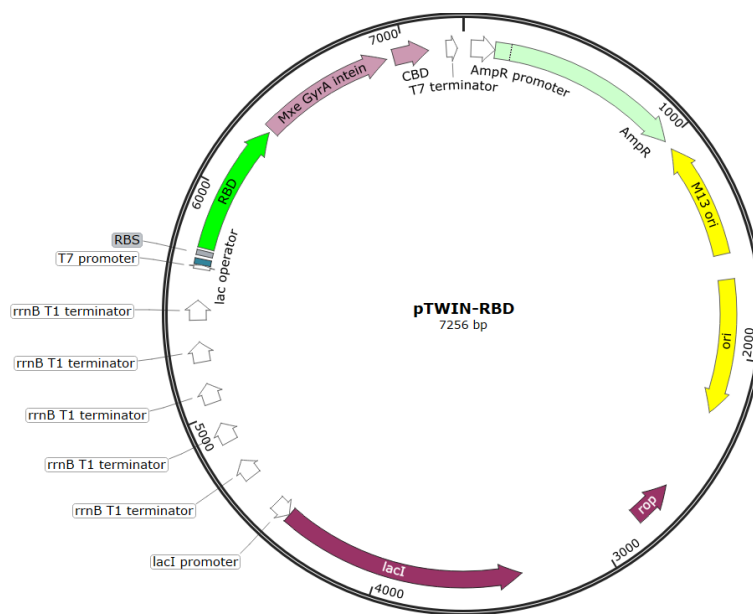


Figura 22. Construcción del vector de expresión pTWIN-SARS2-RBD.

9.7. Obtención de transformantes en *E. coli* BL21 (DE3).

El proceso de transformación se realizó en tres ocasiones para obtener las 8 colonias transformadas con morfología correspondiente a *E. coli* (Figura 23). Para su análisis se realizó una extracción de ADN plasmídico por mega preparación.

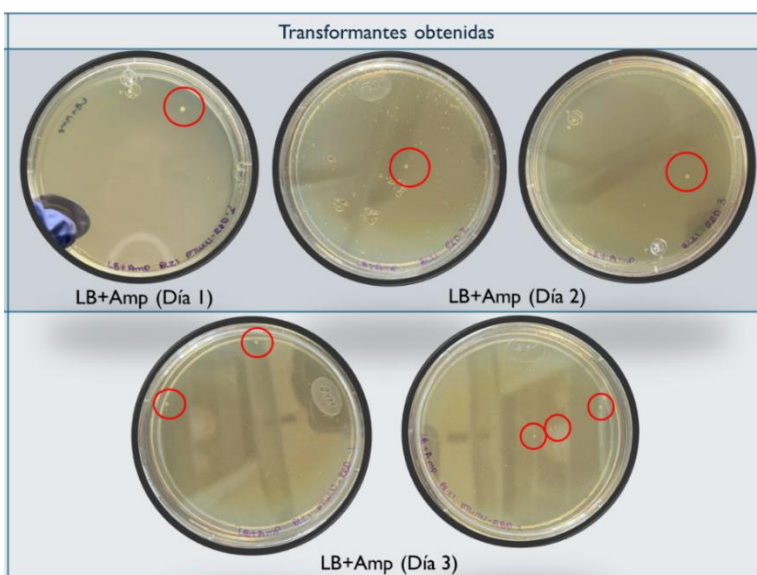


Figura 23. Colonias obtenidas de *E. coli* BL21 (DE3). Cada colonia fue resembrada en medio LB Agar más ampicilina para generar parches celulares con fines de conservación. El procedimiento fue contrastado con controles positivo y negativo.

9.8. Comprobación de la integración del vector pTWIN1-SARS2-RBD

Para esta comprobación se utilizaron nuevamente los oligos universales para el vector pTWIN1. El tamaño del amplicón observado en la construcción fue de aproximadamente 1594 pb, lo que confirma que la transformación con el vector pTWIN1-SARS2-RBD en *E. coli* BL21 (DE3) se realizó correctamente (Figura 24). Las colonias transformantes fueron conservadas en glicerol al 40%, y a partir de estas se inició el proceso de inducción para la expresión de la proteína, eligiendo una transformante de cada día.

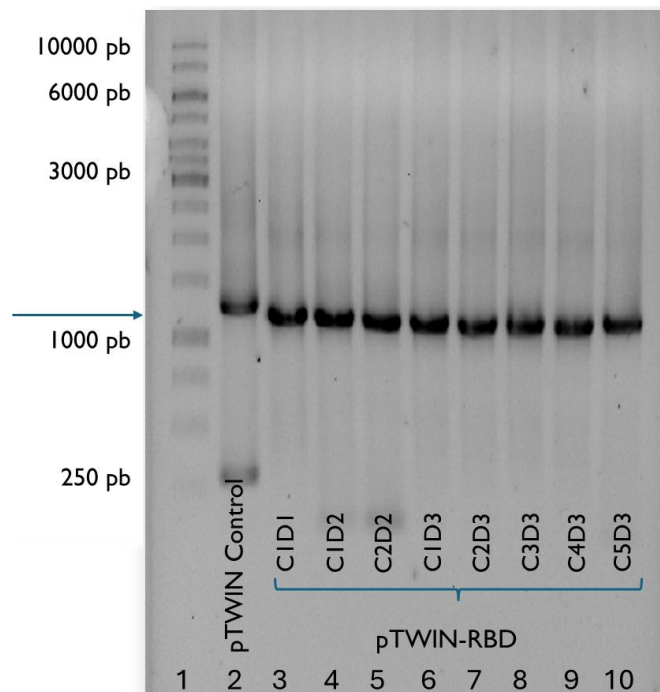


Figura 24. PCR de confirmación de integración del vector pTWIN-SARS2-RBD en la cepa *E. coli* BL21, junto con un control que presenta el mismo patrón observado en la Figura 14. Las transformantes están identificadas por número de colonia y por la fecha de transformación.

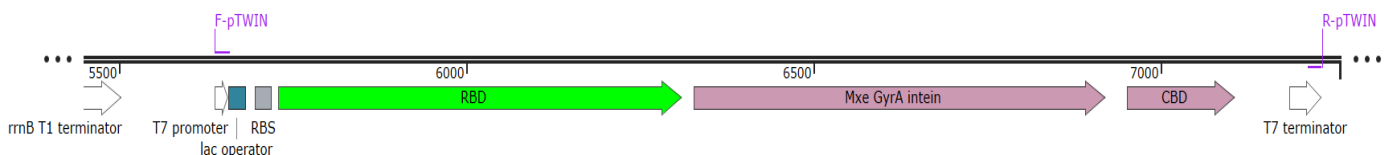


Figura 25. Diagrama que representa la región que se amplifica con los oligos universales de pTWIN en la construcción con el gen objetivo. Nótese que la secuencia correspondiente a RBD se localiza en el N-terminal de la Inteína 2.

9.9. Obtención de extractos intracelulares de *E. coli* BL21

Para inducir la expresión de la proteína se evaluaron dos condiciones: 37°C durante 2 horas y 30°C durante 6 horas, utilizando en ambos casos una concentración de IPTG de 0.5 mM y 220 rpm. El análisis por SDS-PAGE de los extractos celulares clarificados reveló diferencias significativas en los niveles de expresión. A pesar de cargar cantidades equivalentes de proteína total (15 µg por pozo), las muestras inducidas a 37 °C mostraron un patrón de bandas de menor intensidad y más difuso en comparación con las obtenidas a 30 °C (Figura 26).

Lo anterior coincide con lo reportado por Huang et al. (2021), quienes observaron que las bandas proteicas eran más abundantes cuando la inducción se realizaba a 25°C en comparación con 37°C. Por lo tanto, una sobreproducción de proteínas debido a una inducción rápida en *E. coli* favorece la degradación proteolítica y, en consecuencia, la formación de cuerpos de inclusión, lo que podría explicar el resultado de un patrón de bandas con señal poco definida de los extractos clarificados de 37 °C (Baneyx, 1999).

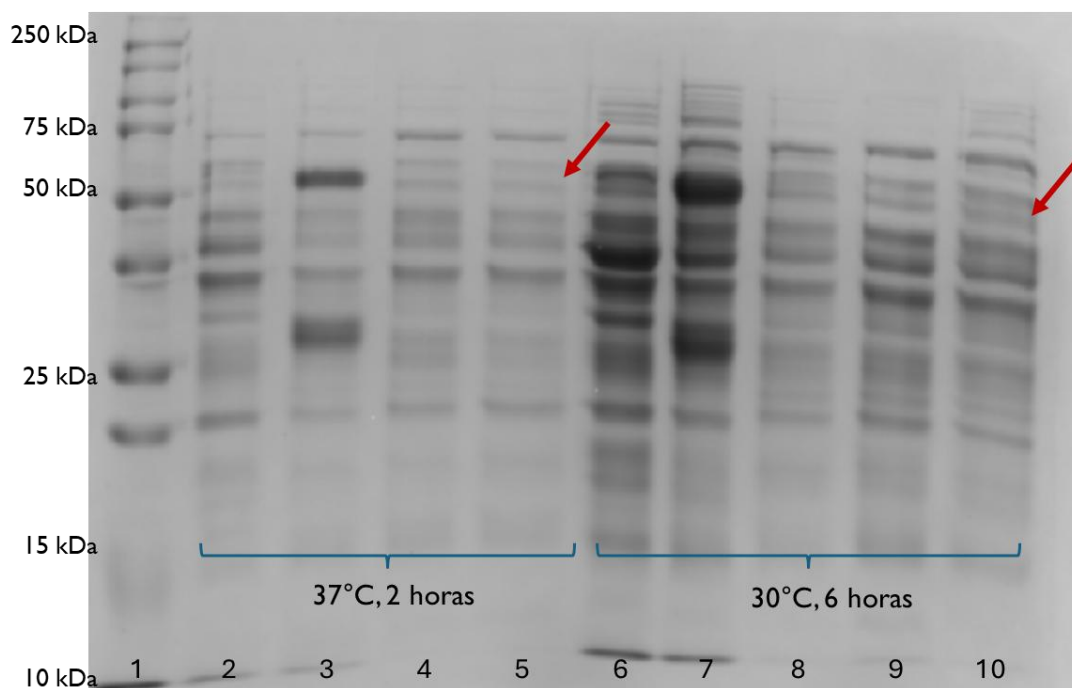


Figura 26. Análisis por SDS-PAGE al 12 % de extractos celulares clarificados. Carriles 2 y 6: *E. coli* BL21 sin plásmido (control negativo). Carriles 3 y 7: *E. coli* BL21 transformada con el vector pTWIN1 sin inserto, inducida con IPTG (control con vector vacío). Los carriles restantes contienen extractos de las cepas transformadas con el plásmido pTWIN1-SARS2-RBD.

Además de los niveles de expresión observados, en el gel de SDS-PAGE (Figura 26) se detectó una aparente sobreexpresión en los controles con el vector pTWIN1 sin inserto (carriles 3 y 7). Esto se debe a que, al agregar IPTG, se activa la transcripción de la región de la etiqueta de fusión, ya que esta posee todos los elementos necesarios para iniciar la transcripción (promotor T7, secuencia Shine-Dalgarno, codón de inicio y terminador).

En los extractos clarificados correspondientes a la construcción pTWIN1-SARS2-RBD (carriles 4, 5, 9 y 10) no se detecta una sobreexpresión evidente; sin embargo, se observa una banda en aproximadamente 55 kDa (indicada con una flecha roja), la cual podría corresponder al dominio RBD (~25 kDa) fusionado con la etiqueta inteína-CBD (~26.9 kDa).

En los extractos crudos no se observó una diferencia significativa en el perfil de bandas con respecto a los extractos clarificados (datos no mostrados). Se realizó una primera purificación; sin embargo, esta no permitió recuperar una banda definida en el peso esperado (~25 kDa), correspondiente al dominio RBD escindido.

9.10. Análisis de la expresión

Una segunda inducción a 30 °C durante 6 horas con 0.5 mM de IPTG y agitación a 220 rpm permitió verificar el buen funcionamiento del inductor (IPTG) en las cepas transformadas con pTWIN1-SARS2-RBD. En el gel correspondiente (Figura 27), se observan los extractos proteicos (10 µg de proteína total) sin inducir junto con sus respectivas muestras inducidas, notándose claramente que, en presencia de IPTG, el patrón de bandas cambia, además, se detecta nuevamente la banda en ~55 kDa (flecha roja).

Se realizó una segunda purificación del extracto correspondiente a la construcción pTWIN1-SARS2-RBD, incluyendo como control el extracto de pTWIN1 sin inserto (Figura 28). En este procedimiento, se obtuvo una banda de aproximadamente 27 kDa en el control con pTWIN1 sin inserto; sin embargo, en las muestras correspondientes a la construcción con el dominio RBD no se logró recuperar una banda en el peso

esperado (~25 kDa). No obstante, este resultado permitió confirmar que el proceso de purificación se estaba llevando a cabo correctamente.

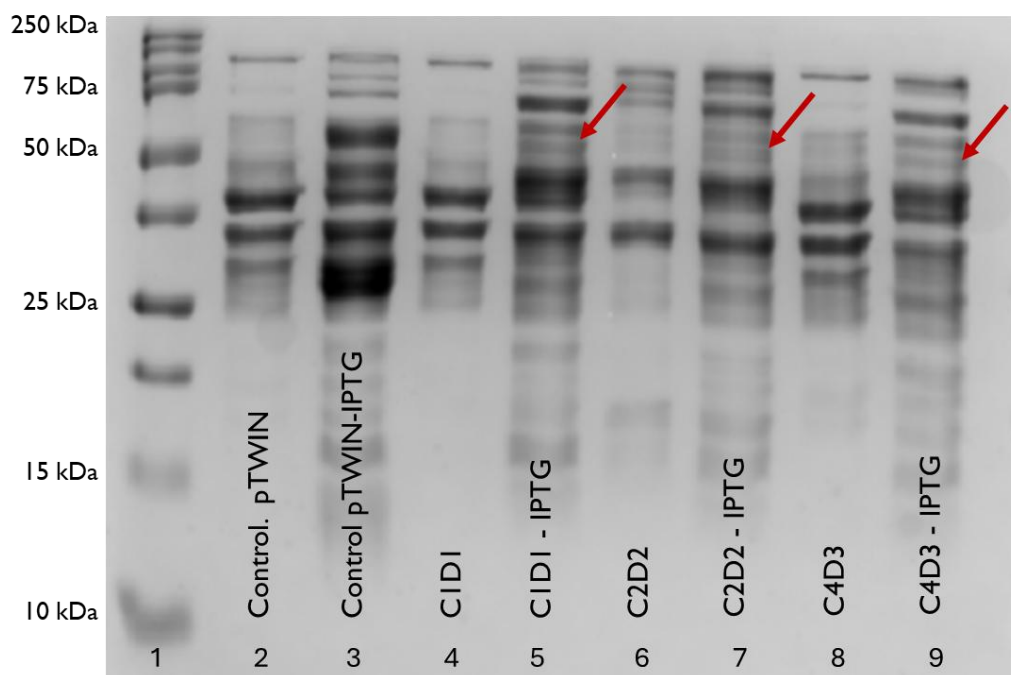


Figura 27. Extractos celulares clarificados. Carriles 2 y 3, controles negativos de *E. coli* con pTWIN1 sin inserto, sin inducir (carril 2) e inducido con IPTG (carril 3). Carriles 4, 6 y 8, transformantes con pTWIN1-SARS2-RBD sin inducir. Carriles 5, 7 y 9 mismas muestras que los carriles previos, inducidas con IPTG.

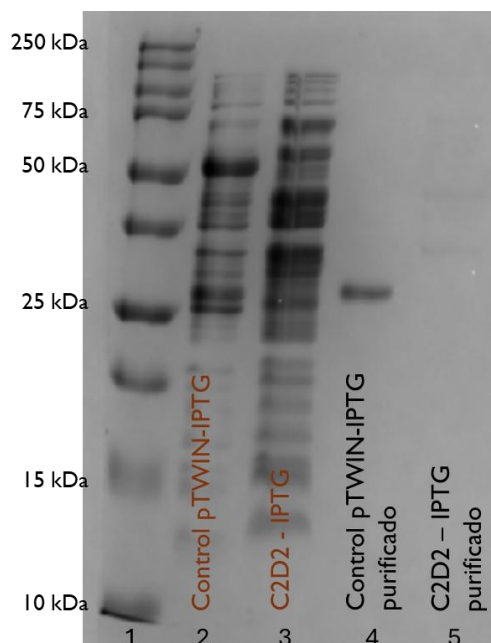


Figura 28. SDS-PAGE al 12% que muestra la banda obtenida para el control pTWIN1 sin inserto (carril 4).

Estos resultados afirman el desafío que representa expresar el dominio RBD en sistemas heterólogos debido a su compleja topología (Figura 3), por ejemplo, los requerimientos para la formación de enlaces disulfuro (Arbeitman et al., 2020). No obstante, otros grupos de investigación han logrado expresar fragmentos de la proteína Spike del SARS-CoV-2, incluido el dominio RBD, en *E. coli*, aunque en forma insoluble (McGuire et al., 2022), como podría ser el caso de este estudio.

La insolubilidad de esta proteína en *E. coli* podría deberse al ambiente reductor del citoplasma bacteriano, que es incompatible con la formación de los cuatro enlaces disulfuro necesarios en la estructura nativa del RBD y/o por los glicanos ausentes en su estructura (McGuire et al., 2022); incluso por el sistema deficiente de chaperonas en *E. coli* para plegar proteínas complejas. Todo ello conduce a proteínas mal plegadas y, en consecuencia, a la formación de cuerpos de inclusión (Vaillancourt, 2003).

Las soluciones suplementadas con 0.06 % de SDS y 0.2 % de Tween20 mejoran la solubilidad sin interferir en la unión con la quitina. Por otro lado, el tratamiento del pellet con solo 2 M de urea favorece la desnaturalización sin reducir la eficiencia de unión a la columna de afinidad (New England Biolabs, 2020).

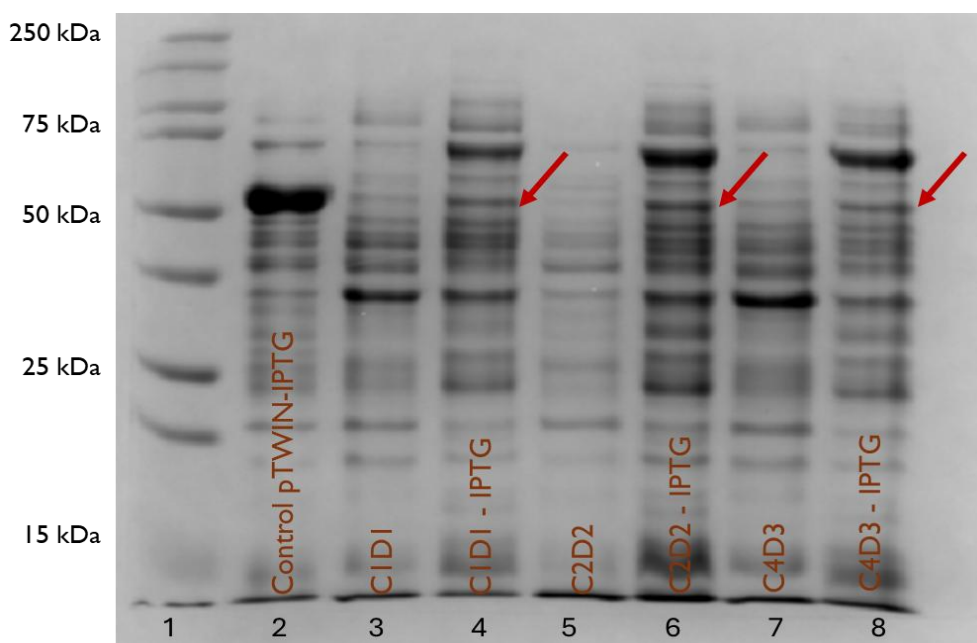


Figura 29. SDS-PAGE al 12% con 10 μ g de extracto proteico obtenido después del tratamiento con urea. Mismo orden de muestras que en la figura 27.

Los extractos ultrafiltrados tras el tratamiento con urea se muestran en la figura 29. En ellos, se observa que los extractos de la construcción pTWIN1-SARS2-RBD presentan una ligera sobreexpresión en un peso aproximado de 55 kDa, en contraste con lo observado antes del tratamiento (Figura 27). Esto podría sugerir que se alcanzó una solubilización parcial del dominio RBD.

9.11. Purificación de la proteína

A partir de los extractos mencionados se realizó la purificación de la proteína, lo obtenido se ultrafiltró nuevamente, con el fin de concentrar la muestra y eliminar el DTT. Posteriormente, se realizó un SDS-PAGE teñido con plata. En la figura 30 se observa la comparación de una misma transformante sin inducción (-IPTG), con inducción (+IPTG) y tras la purificación. Se detectaron dos bandas prometedoras alrededor de los 25 y 30 kDa, correspondientes al peso esperado del dominio RBD.

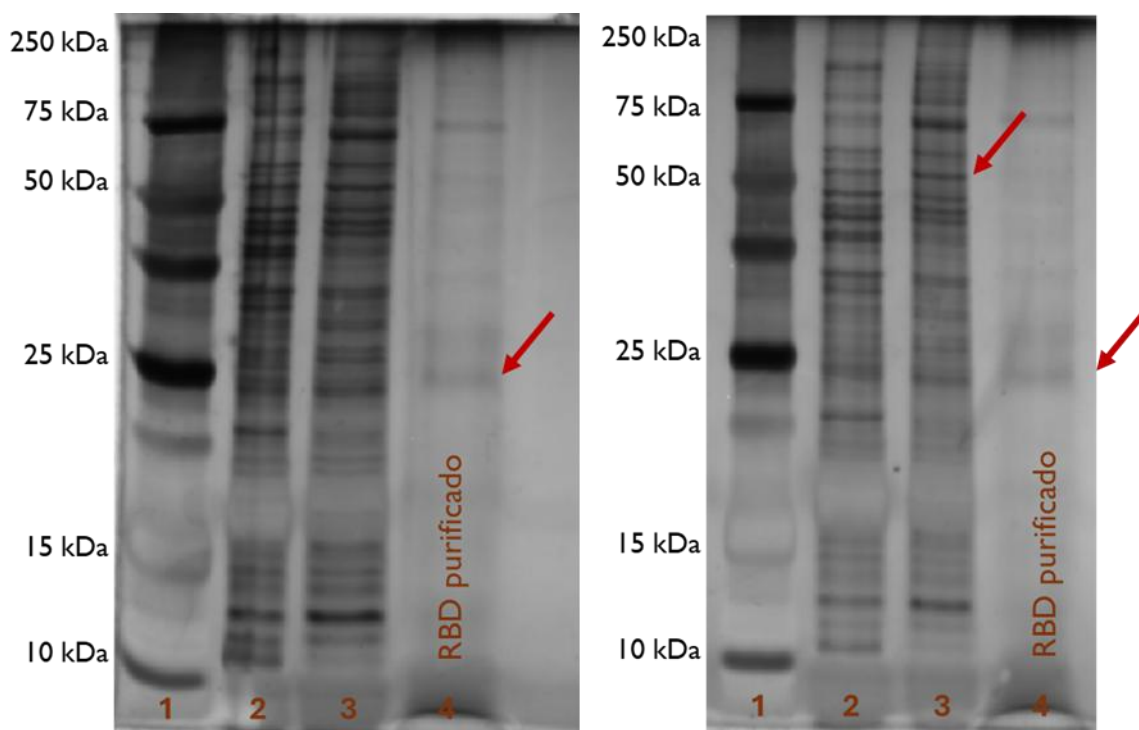


Figura 30. SDS-PAGE al 12 % con tinción de plata de extractos tratados con urea. Carril 2: extracto de la construcción C2D2 sin inducción; carril 3: extracto de la misma muestra inducida; carril 4: muestra purificada.

La tinción de plata es hasta 30 veces más sensible que la tinción con Bio-Safe Coomassie G-250, permitiendo detectar de 0.6 a 1.2 ng de proteína en un gel de

poliacrilamida (Electrophoresis Guide, Bulletin 6040, Rio-Rad). Esto sugiere que la concentración de proteína recuperada tras la purificación (Figura 30) podría encontrarse dentro de ese rango, lo que indica una baja cantidad de proteína purificada, y resalta la necesidad de optimizar el sistema de expresión y/o purificación para mejorar el rendimiento.

10. Conclusiones

- Se logró insertar el gen del dominio RBD de la proteína Spike en el vector de expresión pTWIN1 obteniendo una colonia transformada con la construcción pTWIN1-SARS2-RBD de *E. coli* TOP-10.
- Aunque no era el objetivo primordial de este trabajo, la clonación del gen completo de la proteína Spike del SARS-CoV-2 no fue exitosa, lo que impidió su posterior expresión en *Escherichia coli*. Esta dificultad podría atribuirse al gran tamaño del gen y a características estructurales que complican su manipulación en sistemas bacterianos.
- El análisis de restricción con *NdeI* y la reacción de PCR con *primers* universales de pTWIN1 verificaron la adecuada construcción del vector pTWIN1-SARS2-RBD.
- El dominio RBD fue expresado de manera heteróloga en la fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3), lo que requirió tratamiento con urea para su solubilización. Se logró la purificación del dominio RBD por afinidad utilizando perlas magnéticas recubiertas con quitina.
- El análisis por SDS-PAGE con tinción de plata evidenció dos bandas dentro del peso molecular esperado (~25 - 30 kDa) lo que sugiere la presencia del dominio RBD, aunque en una baja concentración.

Estos resultados constituyen una base experimental para futuros estudios de validación *in vitro* de la interacción entre el dominio RBD y los metabolitos secundarios H7R y F7G, previamente identificados como posibles inhibidores mediante estudios *in silico*. La optimización de las condiciones de expresión y purificación podría mejorar el rendimiento y funcionalidad de la proteína recombinante para dichos fines.

11. Perspectivas

Probar un proceso de repliegue posterior a la purificación de la proteína con concentraciones decrecientes de urea y presencia de glutatión (GSH y GSSG)

Producir el dominio RBD a gran escala y purificarlo con columnas de cromatografía de afinidad para obtener una mayor concentración de proteína.

Análisis por *Western Blot* y espectrofotometría de masas (MS) para confirmar la obtención del dominio RBD purificado.

Secuenciación de la fracción purificada (banda) para confirmar la identidad del dominio RBD.

Ensayos de unión específico entre el RBD y ACE-2 en presencia y ausencia de metabolitos:

- Resonancia de plasmones de superficie (Biacore) para registrar la interacción en tiempo real y obtener datos cinéticos de unión y disociación.
- Cromatografía de exclusión molecular para determinar la tasa de disociación y asociación entre los flavonoides nanoparticulados y el receptor ACE-2 con base en el análisis de sus tiempos de retención.
- ELISA de unión donde el receptor ACE-2 se inmoviliza en la placa y se añade el RBD recombinante. La unión se detecta con un anticuerpo específico contra el RBD o una etiqueta de este, indicando interacción directa.
- Uso de marcadores fluorescentes (como AlexaFluor) en el RBD para incubarlo con células que expresan ACE-2 y medir la unión por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.
- Difracción de rayos X o crio-EM para la obtención de estructuras cristalinas del complejo RBD-ACE2 que demuestren la interacción directa.

12. Referencias

- Ahmad, F., Salem-Bekhit, M. M., Khan, F., Alshehri, S., Khan, A., Ghoneim, M. M., Wu, H.-F., Taha, E. I., & Elbagory, I. (2022). Unique Properties of Surface-Functionalized Nanoparticles for Bio-Application: Functionalization Mechanisms and Importance in Application. *Nanomaterials*, 12(8), 1333. <https://doi.org/10.3390/nano12081333>
- Arbeitman, C. R., Auge, G., Blaustein, M., Bredeston, L., Corapi, E. S., Craig, P. O., Cossio, L. A., Dain, L., D'Alessio, C., Elias, F., Fernández, N. B., Gándola, Y. B., Gasulla, J., Gorojovsky, N., Gudesblat, G. E., Herrera, M. G., Ibañez, L. I., Idrovo, T., Rando, M. I., ... Zelada, A. M. (2020). Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Scientific Reports*, 10(1), 21779. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78711-6>
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Barton, M. I., MacGowan, S. A., Kutuzov, M. A., Dushek, O., Barton, G. J., & van der Merwe, P. A. (2021). Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.70658>
- Borkotoky, S., Dey, D., & Hazarika, Z. (2023). Interactions of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD): a structural perspective. *Molecular Biology Reports*, 50(3), 2713–2721. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08193-4>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Coronaviruses. In *Fenner and White's Medical Virology* (pp. 437–446). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X>
- Cagno, V., Andreozzi, P., D'Alicarnasso, M., Silva, P. J., Mueller, M., Galloux, M., Goffic, R. Le, Jones, S. T., Vallino, M., Hodek, J., Weber, J., Sen, S., Janecek, E. R., Bekdemir, A., Sanavio, B., Martinelli, C., Donalisio, M., Welti, M. A. R., Eleouet, J. F., ... Stellacci, F. (2018). Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism. *Nature Materials*, 17(2), 195–203. <https://doi.org/10.1038/NMAT5053>
- Castro-Jiménez, S. R. (2022). *Acoplamiento molecular de metabolitos secundarios que potencialmente inhiben las conformaciones activas de la proteína Spike del virus SARS-COV-2*. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2023, September 1). *Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2*. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2025, May 8). *Types of COVID-19 Treatment*. <https://www.cdc.gov/covid/treatment/index.html>
- Cerón-Moreno, M. F. (2020). *Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotriméricas en *Penicillium chrysogenum**. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chong, S., Mersha, F. B., Comb, D. G., Scott, M. E., Landry, D., Vence, L. M., Perler, F. B., Benner, J., Kucera, R. B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J. J., Paulus, H., & Xu, M.-Q. (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 192(2), 271–281. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00105-4)
- Chow, N. K. N., Tsang, C. Y. W., Chan, Y. H., Telaga, S. A., Ng, L. Y. A., Chung, C. M., Yip, Y. M., & Cheung, P. P.-H. (2024). The effect of pre-COVID and post-COVID vaccination on long COVID: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 89(6), 106358. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106358>
- Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2023). Two Sides of the Same Coin: the N-terminal and the Receptor-Binding Domains of SARS-CoV-2 Spike. *Future Virology*, 18(2), 75–78. <https://doi.org/10.2217/fvl-2022-0181>
- Cortés, E. (2020). Conociendo al coronavirus SARS-CoV-2, protagonista de una pandemia. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 54, 333–333.
- Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 133–146). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>
- Fernández, M. C., Cuesta-Rubio, O., & Márquez Hernández, I. (2022). Productos naturales de origen vegetal contra el COVID-19. *CIENCIA UNEMI*, 15(40), 52–65. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol15iss40.2022pp52-65p>
- Fitzgerald, G. A., Komarov, A., Kaznadzey, A., Mazo, I., & Kireeva, M. L. (2021). Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in *E. coli*, and its refolding and purification. *Protein Expression and Purification*, 183, 105861. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105861>

- Gannage, J. (2024). *The Connection Between Spike Protein and Long COVID " "*.
<https://integrative-medicine.ca/the-connection-between-spike-protein-an...>
- Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. In *Bioinformatics and Biology Insights* (Vol. 15). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/11779322211025876>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 141–154). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C.-J., Peng, H.-L., Patel, A. K., Singhania, R. R., Dong, C.-D., & Cheng, C.-Y. (2021). Effects of Lower Temperature on Expression and Biochemical Characteristics of HCV NS3 Antigen Recombinant Protein. *Catalysts*, 11(11), 1297. <https://doi.org/10.3390/catal11111297>
- Hussein, N. A., Ali, E. A. A., El-Hakim, A. E., Tabll, A. A., El-Shershaby, A., Salamony, A., Shaheen, M. N. F., Ali, I., Elshall, M., & Shahein, Y. E. (2022). Assessment of specific human antibodies against SARS-CoV-2 receptor binding domain by rapid in-house ELISA. *Human Antibodies*, 30(2), 105–115. <https://doi.org/10.3233/HAB-220003>
- İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2024). *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expression and Purification*, 219, 106463. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106463>
- INEGI. (2022). *ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/EDR/EDR2021_10.pdf
- INEGI. (2023). *ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS*. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf>
- INEGI. (2024). *ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS*.
- Kumar, A., Narayan, R. K., Prasoon, P., Kumari, C., Kaur, G., Kumar, S., Kulandhasamy, M., Sesham, K., Pareek, V., Faiq, M. A., Pandey, S. N., Singh, H. N., Kant, K., Shekhawat, P. S., Raza, K., & Kumar, S. (2022). Mecanismos del COVID-19 en el cuerpo humano: Lo que sabemos hasta ahora. *Kompass Neumología*, 4(1), 3–20. <https://doi.org/10.1159/000521507>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- León-Gutiérrez, G., Elste, J. E., Cabello-Gutiérrez, C., Millán-Pacheco, C., Martínez-Gómez, M. H., Mejía-Alvarez, R., Tiwari, V., & Mejía, A. (2022). A potent virucidal activity of functionalized TiO₂ nanoparticles adsorbed with flavonoids against SARS-CoV-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 5987–6002. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12112-9>
- Liskova, A., Samec, M., Koklesova, L., Samuel, S. M., Zhai, K., Al-Ishaq, R. K., Abotaleb, M., Nosal, V., Kajo, K., Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Brockmueller, A., Shakibaei, M., Sabaka, P., Mozos, I., Ullrich, D., Prosecky, R., La Rocca, G., Caprnda, M., ... Kubatka, P. (2021). Flavonoids against the SARS-CoV-2 induced inflammatory storm. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 138). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111430>
- Martinelli, M., Froimowicz, P., Calderon, M., & Strumia, M. (2003). Materiales Poliméricos Funcionalizados. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4. <https://reviberpol.org/wp-content/uploads/2019/08/2003-strumia1.pdf>
- Mazurkova, N. A., Spitsyna, Y. E., Shikina, N. V., Ismagilov, Z. R., Zagrebel'nyi, S. N., & Ryabchikova, E. I. (2010). Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus. *Nanotechnologies in Russia*, 5(5–6), 417–420. <https://doi.org/10.1134/S1995078010050174>
- McGuire, B. E., Mela, J. E., Thompson, V. C., Cucksey, L. R., Stevens, C. E., McWhinnie, R. L., Winkler, D. F. H., Pelech, S., & Nano, F. E. (2022). *Escherichia coli* recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01753-0>
- Merck. (2018). *GelRed Nucleic Acid Stain*. https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/726/438/sct121ds.pdf?srsltid=AfmBOOrQK_rcwWjqJ2CMVZt06AmdtvRiwEoeR-IXMUxpiqw_hyy3Znpt
- Mueller, M. R., Ganesh, R., Beckman, T. J., & Hurt, R. T. (2025). Long COVID: emerging pathophysiological mechanisms. *Minerva Medica*, 116(2), 156–165. <https://doi.org/10.23736/S0026-4806.25.09539-4>
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *ELECTROPHORESIS*, 9(6), 255–262. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>
- New England Biolabs. (2020). *IMPACT Kit*. <https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/manuals/manuale6901.pdf?srsltid=AfmBOoqa8qFkJiSJQ2AVegBaGsLVRqzzUmGXkv4ADBKW8v53YSyaieUU>
- New England Biolabs. (2025a). *DNA Assembly and Cloning*. Cloning & Synthetic Biology. <https://www.neb.com/en/applications/cloning-and-synthetic-biology>

- New England Biolabs. (2025b). *IMPACT™-TWIN*. https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/manuals/impact-twin-manual-e6950-708.pdf?rev=b5d93033cb034cba9987c836e30d3c4e&hash=C5F1097A56492AD67519C1702DAEF1E6&srsId=AfmBOoqqMYs9eSk-XKQHdBAK_dzd4Ua_8CqFyzZINnGX1dRW34nqt3bk
- New England Biolabs. (2025c). *Isolation of CBD-fusion protein using Chitin Magnetic Beads*. https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/isolation-of-cbd-fusion-protein-using-chitin-magnetic-beads?srsId=AfmBOooj7jDeLbqVSGM6udEV1gTAAkD4_H6qftu9HL2fJN6YqiSiPx7N
- Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S., & Kim, M. (2015). Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 15, Issue 5, pp. 10481–10510). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s150510481>
- Nithya Shree, J., Premika, T., Sharlin, S., & Annie Aglin, A. (2024). Diverse approaches to express recombinant spike protein: A comprehensive review. *Protein Expression and Purification*, 223, 106556. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106556>
- Nurisyah, S., Iyori, M., Hasyim, A. A., Amru, K., Itani, K., Nakamura, K., Zainal, K. H., Halik, H., Djaharuddin, I., Bukhari, A., Asih, P. BS., Syafruddin, D., Yoshida, S., Idris, I., & Yusuf, Y. (2025). Evaluation of an *E. coli*-expressed spike protein-based in-house ELISA system for assessment of antibody responses after COVID-19 infection and vaccination. *Narra J*, 5(1), e1250. <https://doi.org/10.52225/narra.v5i1.1250>
- OMS. (2024, April 5). *Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2*. <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- OPS. (2023, December 31). *Perfil de país para la vacunación contra la COVID-19*. https://im-data-paho.github.io/cov19-country-profiles/es/report_MEX.html
- Our World in Data. (2025a, February 9). *Estimated cumulative excess deaths per 100,000 people during COVID-19*. https://ourworldindata.org/explorers/covid?tab=chart&country=~OWID_WRL&Metric=Excess+mortality+%28estimates%29&Interval=Cumulative&Relative+to+population=true
- Our World in Data. (2025b, February 9). *Total confirmed COVID-19 deaths and cases per million people, World*. <https://ourworldindata.org/grapher/total-covid-cases-deaths-per-million?focus=Confirmed+cases+per+million~Confirmed+deaths+per+million>
- Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>

- Polatoğlu, I., Oncu-Oner, T., Dalman, I., & Ozdogan, S. (2023). COVID-19 in early 2023: Structure, replication mechanism, variants of SARS-CoV-2, diagnostic tests, and vaccine & drug development studies. In *MedComm* (Vol. 4, Issue 2). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mco2.228>
- Protein Data Bank. (2020). *SARS-CoV-2 Genome and Proteins*. <https://pdb101.rcsb.org/learn/flyers-posters-and-other-resources/flyer/sars-cov-2-genome-and-proteins>
- Protein Data Bank. (2023, December 13). *Crystal structure of the SARS-CoV-2 receptor binding domain*. <https://doi.org/10.2210/pdb8sgu/pdb>
- Qian, J., Zhang, S., Wang, F., Li, J., & Zhang, J. (2024). What makes SARS-CoV-2 unique? Focusing on the spike protein. In *Cell Biology International* (Vol. 48, Issue 4, pp. 404–430). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cbin.12130>
- Quach, T. C., Miglis, M. G., Tian, L., Bonilla, H., Yang, P. C., Grossman, L., Paleru, A., Xin, V., Tiwari, A., Shafer, R. W., & Geng, L. N. (2024). Post-COVID-19 Vaccination and Long COVID: Insights from Patient-Reported Data. *Vaccines*, 12(12), 1427. <https://doi.org/10.3390/vaccines12121427>
- Rahbar, Z., Nazarian, S., Dorostkar, R., Sotoodehnejadmatalahi, F., & Amani, J. (2022). Recombinant expression of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) in *Escherichia coli* and its immunogenicity in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.65045.14333>
- Rodriguez-Torres, J. F., Romero-Ibarguengoitia, M. E., Garza-Silva, A., Rivera-Cavazos, A., Hurtado-Cabrera, M., Kalife-Assad, R., Villarreal-Parra, D. L., Loose-Esparza, A., Gutierrez-Arias, J. J., Mata-Porras, Y. G., Ojeda-Salazar, D. A., Morales-Rodriguez, D. P., Sanz-Sánchez, M. Á., & Gonzalez-Cantú, A. (2025). Association between Mexican vaccination schemes and the duration of long COVID syndrome symptoms. *Scientific Reports*, 15(1), 5301. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59954-z>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning* (K. A. Janssen & N. Irwin, Eds.; Third Edition, Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Siguret, V., Ribba, A. S., Chérel, G., Meyer, D., & Piétu, G. (1994). Effect of plasmid size on transformation efficiency by electroporation of *Escherichia coli* DH5 alpha. *BioTechniques*, 16(3), 422–426.
- Sodhi, P. V., Sidime, F., Tarazona, D. D., Valdivia, F., & Levano, K. S. (2022). A Closer Look at ACE2 Signaling Pathway and Processing during COVID-19 Infection: Identifying Possible Targets. *Vaccines*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010013>

- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Talwar, S., Harker, J. A., Openshaw, P. J. M., & Thwaites, R. S. (2025). Autoimmunity in long COVID. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 155(4), 1082–1094. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2025.02.005>
- Tandon, P., Abrams, N. D., Avula, L. R., Carrick, D. M., Chander, P., Divi, R. L., Dwyer, J. T., Gannot, G., Gordiyenko, N., Liu, Q., Moon, K., PrabhuDas, M., Singh, A., Tilahun, M. E., Satyamitra, M. M., Wang, C., Warren, R., & Liu, C. H. (2024). Unraveling Links between Chronic Inflammation and Long COVID: Workshop Report. *The Journal of Immunology*, 212(4), 505–512. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300804>
- Theoharides, T. C., Cholevas, C., Polyzoidis, K., & Politis, A. (2021). Long-COVID syndrome-associated brain fog and chemofog: Luteolin to the rescue. *BioFactors*, 47(2), 232–241. <https://doi.org/10.1002/biof.1726>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Choosing a Bacterial Strain for your Cloning Application*. Retrieved January 10, 2025, from <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-selection-applications.html#expression>
- Thermo Fisher Scientific. (2024). *TOP10 Competent Cells*. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/top10-competent-cells.html>
- Tirabassi, R. (n.d.). *Foundations of Molecular Cloning - Past, Present and Future*. Retrieved July 9, 2025, from https://www.neb.com/en/tools-and-resources/feature-articles/foundations-of-molecular-cloning-past-present-and-future?srsId=AfmBOoohZCv6ksqgbxgzZz2gNTujd7_xrsKazJR17fQf11sH698P_Zuu
- Tobón, E., Riaño-Umbarila, L., Flores, H., Gutierrez, M., Soberón, X., Becerril-Lujan, B., Ramírez, O. T., & Rudiño-Piñera, E. (2025). Functional expression of five refolded recombinant variants of RBD from SARS-CoV-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 235, 106781. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2025.106781>
- Toigo, L., dos Santos Teodoro, E. I., Guidi, A. C., Gancedo, N. C., Petruco, M. V., Melo, E. B., Tonin, F. S., Fernandez-Llimos, F., Chierrito, D., de Mello, J. C. P., de Medeiros Araújo, D. C., & Sanches, A. C. C. (2023). Flavonoid as possible therapeutic targets against COVID-19: a scoping review of in silico studies. In *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 31, Issue 1, pp. 51–68). Springer

Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40199-023-00461-3>

Tuttle, A. R., Trahan, N. D., & Son, M. S. (2021). Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>

UniProt Consortium. (2025). *Spike glycoprotein*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2/entry>

Vaillancourt, P. E. (Ed.). (2003). *E. coli gene expression protocols* (Vol. 205). Humana Press.

Vangeel, L., Chiu, W., De Jonghe, S., Maes, P., Slechten, B., Raymenants, J., André, E., Leyssen, P., Neyts, J., & Jochmans, D. (2022). Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Research*, 198, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105252>

Verma, A., Manojkumar, A., Dhasmana, A., Tripathi, M. K., Jaggi, M., Chauhan, S. C., Chauhan, D. S., & Yallapu, M. M. (2024). Recurring SARS-CoV-2 variants: an update on post-pandemic, co-infections and immune response. *Nanotheranostics*, 8(2), 247–269. <https://doi.org/10.7150/ntno.91910>

Wong Chew, R. M., Ángel Ambrocio, A. H., Bautista Carbajal, P., García León, M. L., Vite Velázquez, X., Cortázar Maldonado, L. A., Díaz Ramírez, J. B., Valadez González, Y., Vásquez Martínez, L. M., García Osorno, Z. R., Perón Medina, L. Á., Ramírez Velázquez, I. O., Chávez Aguilar, J. E., Cruz Salgado, A. X., Morales Fernández, J. A., Joaquín Vilchis, H., Mosqueda Martínez, E. E., & Gutiérrez Bautista, D. (2021). Efectos a largo plazo de la COVID-19: una revisión de la literatura. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 19(3), 421–428. <https://doi.org/10.35366/101741>

World Health Organization. (2021a, January 29). *Cronología de la pandemia del coronavirus y la actuación de la Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline>

World Health Organization. (2021b, October 6). *A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021*. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1

Xia, X. (2021). Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses*, 13(1), 109. <https://doi.org/10.3390/v13010109>

Yaamika, H., Muralidas, D., & Elumalai, K. (2023). Review of adverse events associated with COVID-19 vaccines, highlighting their frequencies and reported cases. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 18(6), 1646–1661. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2023.08.004>

- Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A., Kumar, A., & Handu, S. (2021). *Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19*. 10, 821. <https://doi.org/10.3390/cells>
- Yang, Y., & Huang, L. (2023). Neurological Disorders following COVID-19 Vaccination. *Vaccines*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/vaccines11061114>
- Zhang, F., Schmidt, F., Muecksch, F., Wang, Z., Gazumyan, A., Nussenzweig, M. C., Gaebler, C., Caskey, M., Hatzioannou, T., & Bieniasz, P. D. (2024). SARS-CoV-2 spike glycosylation affects function and neutralization sensitivity. *MBio*, 15(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.01672-23>
- Zhou, C., Yang, Y., & Jong, A. Y. (1990). *Mini-prep in ten minutes*. 8(2), 172–173.
- Zmasek, C. M., Lefkowitz, E. J., Niewiadomska, A., & Scheuermann, R. H. (2022). Genomic evolution of the Coronaviridae family. *Virology*, 570, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.03.005>

13. Anexos

Anexo 1. Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Tabla 8. Datos del estándar.

Solución Estándar Albumina		
Merck Cát: A7030-10G		Lote: 0000301727
Pureza:	103	% de proteína
Solución madre		
Peso:	0.0141	g
Concentración	14.5	mg/mL

Calculo para la preparación de los puntos de la curva

$$\text{Solución madre: } \frac{0.0141g}{1mL} \times \frac{1000mg}{1g} \times 1.03 = 14.5 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Concentración 1} = \frac{\frac{1.4mg}{mL} \times 1000\mu L}{14.5 \frac{mg}{mL}} = 96.6\mu L$$

A partir de la concentración 1 se utiliza la fórmula de dilución para las concentraciones subsecuentes.

Ejemplo:

$$\text{Concentración 2} = \frac{\frac{1.2mg}{mL} \times 100\mu L}{1.4 \frac{mg}{mL}} = 85.71\mu L$$

Tabla 9. Concentraciones de la curva.

Concentraciones	
C1	1.40
C2	1.20
C3	1.00
C4	0.80
C5	0.60
C6	0.40
C7	0.20

Cálculo de los valores de la curva con absorbancias, la medición de absorbancias se hace por triplicado en una placa de 96 pocillos.

Tabla 10. Datos de concentración con sus respectivas absorbancias obtenidas.

Concentración (mg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	Desv	C.V.	R-Blanco
Blanco	0.336	0.359	0.416	0.347	0.016	4.61	0
0.2	0.408	0.438	0.433	0.426	0.016	3.755	0.079
0.4	0.48	0.476	0.474	0.476	0.003	0.63	0.129
0.6	0.583	0.613	0.594	0.596	0.015	2.516	0.249
0.801	0.662	0.667	0.625	0.651	0.022	3.379	0.304
1.001	0.722	0.722	0.701	0.715	0.012	1.678	0.368
1.201	0.796	0.737	0.745	0.759	0.032	4.216	0.412
1.402	0.824	0.818	0.884	0.842	0.036	4.275	0.495

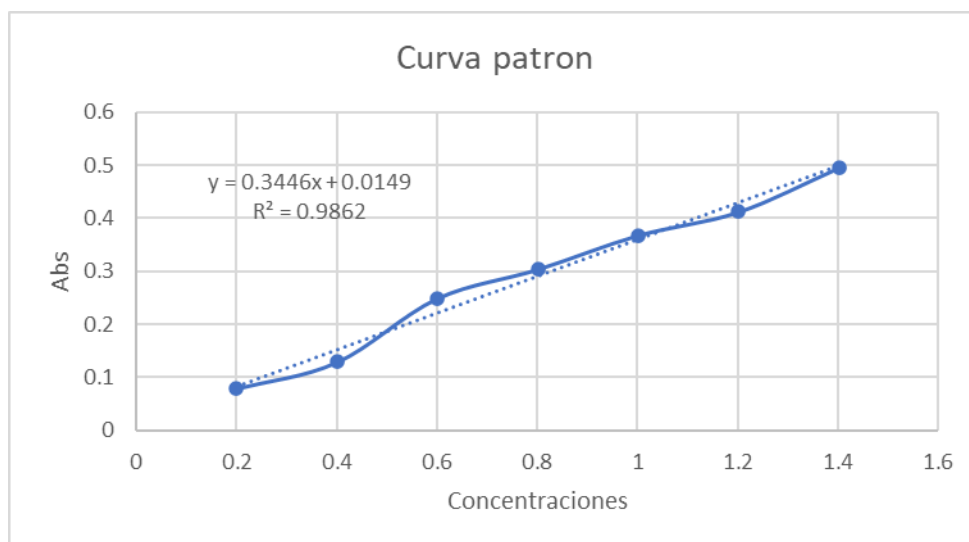


Gráfico 1. Curva patrón de concentraciones vs absorbancias.

Anexo 2. Cálculo de peso molecular con programa Image Lab 6.01

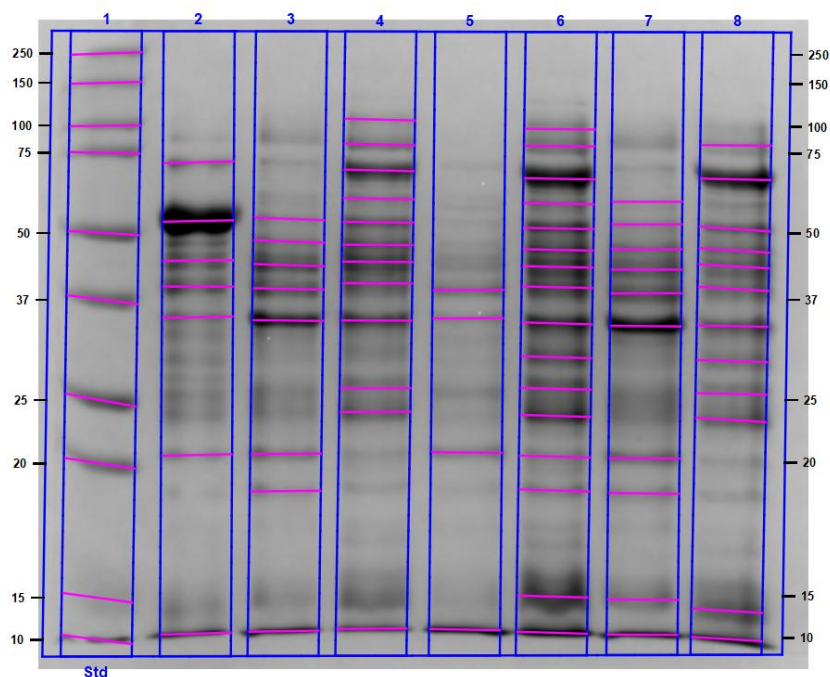


Figura 31. SDS-PAGE al 12% del extracto después del tratamiento con urea calculado. Mismo gel que en la figura 29.

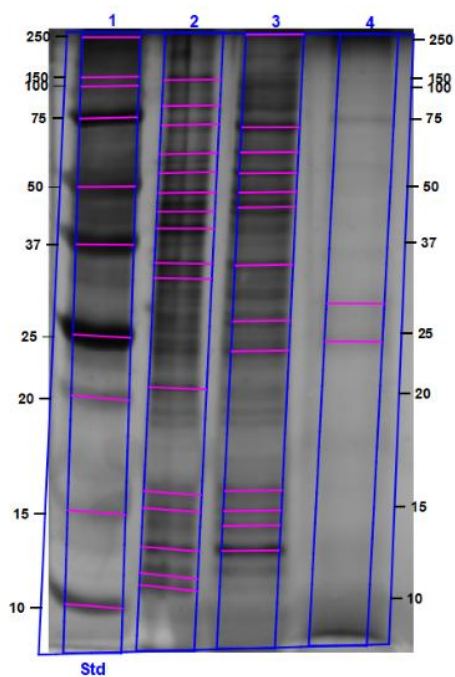


Figura 32. SDS-PAGE al 12 % con tinción de plata de extractos tratados con urea y muestra purificada, la banda purificada se observa dentro del rango esperado.

Tabla 11. Peso molecular obtenido por el software Imagen Lab para la línea 4 correspondiente al extracto purificado.

Lane 4			
Lane	Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)
4	1		28.5
4	2		24.3

Anexo 3. Análisis de secuenciación por método de Sanger.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment			
pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	AGATATACATATGAACCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAACGCTACCAGGTTGCCAG	60	
RBD_SeqControl	-----AACCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAACGCTACCAGGTTGCCAG	47	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	CGTGACGCTTGGAAATCGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGCGCCGACTACAGCGTGCTGTA	120	
RBD_SeqControl	CGTGACGCTTGGAAATCGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGCGCCGACTACAGCGTGCTGTA	107	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	CAACTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCTCCACCAAGCTGAATGA	180	
RBD_SeqControl	CAACTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCTCCACCAAGCTGAATGA	167	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	TCTGTGCTTACCAACGCTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAGGGGCGACGAGGTGCGCCA	240	
RBD_SeqControl	TCTGTGCTTACCAACGCTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAGGGGCGACGAGGTGCGCCA	227	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	GATCGCTCCAGGACAGACCGGCAAGATCGCTGACTACAATTACAAGCTGCCGACGATTT	300	
RBD_SeqControl	GATCGCTCCAGGACAGACCGGCAAGATCGCTGACTACAATTACAAGCTGCCGACGATTT	287	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	-----	300	
RBD_SeqControl	CACCGGCTGCGTGATCGCTGGAACCTCAACAACTGGATAGCAAAGTGGGCGGCAACTA	347	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	-----	300	
RBD_SeqControl	CAATTACCTGTACCGCTGTTCCGCAAGTCCAATCTGAAGCCATTGAGCGCGACATCTC	407	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	-----	300	
RBD_SeqControl	CACCGAGATCTACAGGCTGGAAGCACCCATGCAATGGAGTGGAGGGCTTCAACTGCTA	467	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	-----	300	
RBD_SeqControl	CTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGAGTGGGATACGACCATACAG	527	

pTWIN-RBD_TOP10_F-pTWIN	-----	300	
RBD_SeqControl	GGTGGTGGTGCTGTCTTCGAGCTGCTGCACGCTCCAGCTACCGTGTGCGGACCA	582	

Figura 33. Alineamiento entre la secuenciación de la construcción pTWIN1-SARS2-RBD (oligonucleótido F-pTWIN) y la secuencia control del gen RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea perfectamente con el inicio del gen RBD.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

RBD_F-RBD	-----	0
pTWIN-RBD_SeqControl	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTT	60
RBD_F-RBD	-----	0
pTWIN-RBD_SeqControl	TGTTTAACTTTAAAGAGGAGATATACATATGAACCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAA	120
RBD_F-RBD	-----CGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGGC	26
pTWIN-RBD_SeqControl	CGCTACCAGGTTGCCAGCGTGACGCTTGAATCGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGGC	180

RBD_F-RBD	CGACTACAGCGTGCTGTACAACCTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGTACGGCGTGTC	86
pTWIN-RBD_SeqControl	CGACTACAGCGTGCTGTACAACCTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGTACGGCGTGTC	240

RBD_F-RBD	CCCCACCAAGCTGAATGATCTGTGCTTCACCAACGTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAG	146
pTWIN-RBD_SeqControl	CCCCACCAAGCTGAATGATCTGTGCTTCACCAACGTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAG	300

RBD_F-RBD	GGGCGACGAGGTGCCAGATCGCTCCAGGACAGACCGCAAGATCGCTGACTACAATTA	206
pTWIN-RBD_SeqControl	GGGCGACGAGGTGCCAGATCGCTCCAGGACAGACCGCAAGATCGCTGACTACAATTA	360

RBD_F-RBD	CAAGCTGCCGACGATTTACCGGCTGCGTGATCGCCTGGAACCTCAACAATCTGGATAG	266
pTWIN-RBD_SeqControl	CAAGCTGCCGACGATTTACCGGCTGCGTGATCGCCTGGAACCTCAACAATCTGGATAG	420

RBD_F-RBD	CAAAGTGGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGCTGTTCCGCAAGTCCAATCTGAAGCC	326
pTWIN-RBD_SeqControl	CAAAGTGGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGCTGTTCCGCAAGTCCAATCTGAAGCC	480

RBD_F-RBD	ATTCGAGCGCGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCTGGAAGCACCCCATGCAATGGAGT	386
pTWIN-RBD_SeqControl	ATTCGAGCGCGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCTGGAAGCACCCCATGCAATGGAGT	540

RBD_F-RBD	GGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGAGT	446
pTWIN-RBD_SeqControl	GGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGAGT	600

RBD_F-RBD	GGGATACCAGCCATACAGGGTGGTGGTGTCTTTCGAGCTGTGCACGCTCCAGCTAC	506
pTWIN-RBD_SeqControl	GGGATACCAGCCATACAGGGTGGTGGTGTCTTTCGAGCTGTGCACGCTCCAGCTAC	660

RBD_F-RBD	-----	506
pTWIN-RBD_SeqControl	CGTGTGCGGACCACTCGAGGGGCTCTTCTGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCCCTAC	720
RBD_F-RBD	-----	506
pTWIN-RBD_SeqControl	CCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTGACA	780
RBD_F-RBD	-----	506
pTWIN-RBD_SeqControl	ACGCCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGCTCGCCGACCGGCTGT	840
RBD_F-RBD	-----	506
pTWIN-RBD_SeqControl	TCCACTCCGGCGAGCATCCGGTGTACACGGTGCCTACGGTCGAAGGTCTGCGTGTGACGG	900

Figura 34. Alineamiento entre la secuenciación del gen RBD (oligonucleótido F-RBD) y la secuencia control de pTWIN1-RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea casi en su totalidad con la región de RBD de la secuencia control.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

RBD_R-RBD	-----	0
pTWIN-RBD_SeqControl	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTT	60
RBD_R-RBD	-----GGTGTTCAA	9
pTWIN-RBD_SeqControl	TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAA	120

RBD_R-RBD	CGCTACCAGGTTCCGACGCGTGTACGCTTGAATCGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGGC	69
pTWIN-RBD_SeqControl	CGCTACCAGGTTCCGACGCGTGTACGCTTGAATCGCAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGGC	180

RBD_R-RBD	CGACTACAGCGTGTGTACAACCTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTC	129
pTWIN-RBD_SeqControl	CGACTACAGCGTGTGTACAACCTCCGCCAGCTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTC	240

RBD_R-RBD	CCCCACCAAGCTGAATGATCTGTGCTTCACCAACGTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAG	189
pTWIN-RBD_SeqControl	CCCCACCAAGCTGAATGATCTGTGCTTCACCAACGTGTACGCCGATAGCTTCGTGATCAG	300

RBD_R-RBD	GGGCGACGAGGTGCGCCAGATCGCTCCAGGACAGACCGGCAAGATCGCTGACTACAATTA	249
pTWIN-RBD_SeqControl	GGGCGACGAGGTGCGCCAGATCGCTCCAGGACAGACCGGCAAGATCGCTGACTACAATTA	360

RBD_R-RBD	CAAGCTGCCCCGACGATTTACCGGCTGCGTGATCGCTGGAACCTCAACAATCTGGATAG	309
pTWIN-RBD_SeqControl	CAAGCTGCCCCGACGATTTACCGGCTGCGTGATCGCTGGAACCTCAACAATCTGGATAG	420

RBD_R-RBD	CAAAGTGGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGCTGTTCCGCAAGTCCAATCTGAAGCC	369
pTWIN-RBD_SeqControl	CAAAGTGGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGCTGTTCCGCAAGTCCAATCTGAAGCC	480

RBD_R-RBD	ATTCGAGCGCGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCTGGAAGCACCCCATGCAATGGAGT	429
pTWIN-RBD_SeqControl	ATTCGAGCGCGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCTGGAAGCACCCCATGCAATGGAGT	540

RBD_R-RBD	GGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGAGT	489
pTWIN-RBD_SeqControl	GGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGAGT	600

RBD_R-RBD	GGGATACCAGCCATAC-----	505
pTWIN-RBD_SeqControl	GGGATACCAGCCATACAGGGTGGTGGTGTCTCTTCGAGCTGCTGCACGCTCCAGCTAC	660

RBD_R-RBD	-----	505
pTWIN-RBD_SeqControl	CGTGTGCGGACCACTCGAGGGGCTCTTCCTGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCCCTAC	720
RBD_R-RBD	-----	505
pTWIN-RBD_SeqControl	CCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTGACA	780

Figura 35. Alineamiento entre la secuenciación del gen RBD (oligonucleótido R-RBD) y la secuencia control de pTWIN1-RBD. Se observa como la secuenciación obtenida se alinea casi en su totalidad con la región de RBD de la secuencia control.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00327

Matrícula: 2233801415

PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DEL
DOMINIO RBD DE LA PROTEÍNA
SPIKE DE SARS-COV-2 COMO
HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS DE
INTERACCIÓN CON LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS H7R
Y F7G

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas
del día 12 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO
MTRA. DORIS MARIA ARELLANO QUINTANILLA
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: MARIA ISABEL CAMPOS CASTILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del
Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad
Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado
resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARIA ISABEL CAMPOS CASTILLO
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO

VOCAL

MTRA. DORIS MARIA ARELLANO
QUINTANILLA

SECRETARIO

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO