



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**Estudio sobre la utilización del DNA recombinante en el diseño de vacunas contra el
SARS-CoV-2**

TESINA
PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA
ANGEL PEREA FRAUSTO

ASESOR
DOCTOR EN CIENCIAS. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA, MICHOACÁN.

NOVIEMBRE DE 2022

Agradecimientos

A mis padres:

Angel Josafath Perea Morales y Evelia Frausto Rodríguez, los admiro y quiero, nunca me cansaré de agradecerles a ambos por la vida y el cariño que nos tienen a mis hermanos y a mí, son el pilar de mi familia y han hecho una gran labor al dedicar todo su esfuerzo en nuestra educación. Gracias por todos sus consejos, por la confianza y el apoyo que me brindan, son la base de lo que hoy se ve reflejado aquí, al culminar esté capítulo más de mi vida.

A mis hermanos:

Valeria Yoselin Perea Frausto y Brayan Alexis Perea Frausto, gracias por su paciencia, por preocuparse por su hermano mayor, gracias por compartir sus vidas, por los buenos momentos, siempre podrán contar conmigo como se que yo con ustedes, también espero servirles de ejemplo y así mismo demostrarles que con esfuerzo y dedicación podrás cumplir tus metas.

A mi abuela:

Margarita Rodríguez Álvarez, aunque ya no estés conmigo no olvido cada una de las cosas que aprendí estando contigo, cada anécdota, cada emoción, cada experiencia pero sobre todo, el amor que me diste. Fuiste una persona muy importante en mi vida porque siempre me enseñaste el gusto del estudio y se que estarías muy orgullosa, fuiste maravillosa.

A mi asesor de tesina:

Dr. Carlos Cortés Penagos, una persona a la cuál admiro muchísimo cómo persona, cómo profesor e investigador, agradezco su orientación, soporte y criterio científico que siempre me brindó. Estaré agradecido por confiar en mí, por su amistad, por su paciencia con la cuál

logro guiarme a lo largo de este camino dándome la oportunidad de culminar este proyecto en mi vida.

A mis revisores de tesina:

Dra. Rosa E. Torres Ruiz, Dr. Rodrigo Díaz Balcazar, M.C. Víctor A. Pérez Contreras, Dra. Patricia Y. Figueroa Chavez y a la Mtra. Judith E. Prieto Sierra, por los que siento un gran aprecio y admiración ya que aceptaron ser mis revisores de tesina, invirtiendo su valioso tiempo para leer este trabajo y así aportar una valiosa parte en este proyecto de investigación.

A mis amigos:

A Alondra Huitrón, por brindarme su apoyo incondicional todo el tiempo, quién ha hecho creer en mí y que ha estado ahí para compartir mis alegrías y angustias, ganándose todo mi cariño y afecto, confiando en que será la persona con la que siempre contaré.

A Edgar, Cristina, Pontifes, Gabriela y Jaqueline, de mis mejores amigos ya que compartimos y disfrutamos de grandes experiencias durante los primeros semestres de la carrera. A mis compañeros de generación Efrain, Julio, Arturo, Santos y Gerardo por su gran amistad y buenos momentos que pasamos juntos a lo largo de la carrera. También a Ivan, Lenin, Eduardo, Ivan A., Zambrano porque nunca faltaban las risas, el apoyo mutuo y que siempre estaban en la mejor disposición, además de hacerme sentir cómo en casa durante el tiempo que compartimos vivienda. A todos los tengo presentes en mis recuerdos y que además confío en que siempre contaré con su valiosa amistad.

También quiero agradecer a Sergio, Pavel, Jackie y Pedro por demostrarme que la verdadera amistad existe ya que últimamente me han dejado buenas experiencias de compañerismo y apoyo. Finalmente agradecer a Dios, tu amor y bondad no tiene fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son el resultado de tu ayuda.

Dedicatorias

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Su bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien. Me formaron con valores, reglas y con algunas libertades, dejando en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación que día con día van surgiendo, a final de cuentas, me motivaron continuamente para alcanzar mis objetivos y así mismo, mi sueños.

Resumen

En la actualidad el SARS-CoV-2 sigue siendo una enfermedad encabezando una de las principales causas de muerte a nivel mundial y representa una amenaza a los humanos debido a su alta mortalidad ya que es una enfermedad que se caracteriza por su facilidad de propagarse, infectando así exponencialmente a otros huéspedes. Entre las mejores alternativas de prevención y tratamiento se encuentra el uso de las vacunas que utilizan el DNA recombinante. En el presente trabajo de investigación se describe de manera general al SARS-CoV-2 tanto su origen, estructura, propagación y ciclo infectivo. También se describe el diseño de las vacunas que utilizan el DNA recombinante como estrategia para prevenir el COVID-19, incluyendo las fases previas a su utilización.

Palabras clave: Mortalidad, huésped, DNA recombinante, ciclo infectivo, vacunas.

Abstract.

Currently, SARS-CoV-2 continues to be a disease leading one of the main causes of death worldwide and represents a threat to humans due to its high mortality since it is a disease that is characterized by its ease of spread, thus exponentially infecting other hosts. Among the best alternatives for prevention and treatment is the use of vaccines that use recombinant DNA. In the present research work, SARS-CoV-2 is described in a general way, both its origin, structure, propagation and infective cycle. The design of vaccines that use recombinant DNA as a strategy to prevent COVID-19 is also described, including the phases prior to its use.

Índice general

Índice general	7
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Glosario	10
Abreviaciones	11
1 Introducción	12
1.1 Estructura y genoma del virus SARS-CoV-2	13
1.2 Mecanismos de infección y respuesta inmune del hospedero	17
1.3 Tratamiento de la enfermedad COVID-19	23
2 Justificación	26
3 Objetivo	26
4 Estado del arte	27
4.1 Vacunas	27
4.2 Desarrollo de vacunas contra el virus SARS-CoV- 2	28
4.3 DNA recombinante como estrategia para generar vacunas anti-SARS-CoV-2	32
4.4 Vacunas contra el COVID-19 en la práctica clínica actual	36
4.4.1 El método en el que se utiliza el agente patógeno íntegro	36
4.4.2 El método en el que se utiliza una subunidad antigénica	37
4.4.3 El método genético (vacunas de ácido nucleico).	37
4.5 Efectividad de las vacunas basadas en DNA recombinante	40
5 Conclusiones	44
6 Referencias bibliográficas	45

Índice de figuras

Figura 1. Forma y estructura del virus SARS-CoV-2.	14
Figura 2. Parentesco de las secuencias genómicas entre el Sars-CoV-2 y otras especies.	16
Figura 3. Interacción virus – receptor.	20
Figura 4. Replicación intracelular del virus.	21
Figura 5. Liberación de partículas virales de la célula infectada.	23
Figura 6. Fases para el desarrollo de una vacuna con imágenes ilustrativas.	29
Figura 7. Ejemplo de una vacuna que utiliza la tecnología del ADN recombinante.	33
Figura 8. Pasos de la estrategia general de clonación de un gen recombinante.	35
Figura 9. Tipos de vacunas contra el SARS-CoV-2.	38
Figura 10. Efectividad de la vacuna cansino (Ad3-nCoV).	40

Índice de tablas

TABLA I. Principales funciones de las proteínas estructurales esenciales para el ensamblaje del Sars-CoV-2	15
TABLA II. Mecanismos de transmisión del sars-cov-2	19
TABLA III. Estatus de los antivirales y otros fármacos utilizados en el tratamiento de covid-19	25
TABLA IV. Fases para el desarrollo de una vacuna	28
TABLA V. Principales tipos de vacunas utilizadas en la actualidad.	38
TABLA VI. Características de los estudios publicados con resultados de efectividad	43

Glosario

Pandemia	Es una epidemia que se ha extendido por varios países, continentes o todo el mundo, y que afecta a un gran número pobladores
Virus	Son pequeñas partículas de DNA o RNA
Antígeno	Es una partícula extraña el cual es estimulante para la producción de anticuerpos
Anticuerpo	Es una molécula de globulina trilobulada que se encuentra en la sangre u otros líquidos y se produce ante la presencia de un antígeno
Patógeno	Es un agente infeccioso que puede provocar una enfermedad
Gen	Es un segmento particular de la secuencia del material genético
Zoonótica	Es aquella enfermedad que puede pasar de animales a humanos
Virión	Estructura completa de un virus con capacidad infecciosa
Plásmido	moléculas de DNA extra cromosómico que pueden promover la transferencia de genes entre microorganismos.
Variación antigénica	Son pequeños cambios en los genes de los virus los cuales pueden cambiar las proteínas estructurales.
Genomas	Es el conjunto de material genético de algún organismo.
Liposomas	Es una pequeña cantidad de agua envuelta por una capa de lípidos, la cual ayuda al transporte de distintos compuestos biológicos.
Citotóxicas	Sustancia que daña o mata a las células y/o tejidos.

Abreviaciones

COVID-19:	Enfermedad ocasionada por coronavirus de 2019
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SARS-CoV-2	Coronavirus de tipo 2 causante de enfermedad COVID-19
OMS	Organización mundial de salud
RBD	Receptor Binding Domain (Dominio de unión al receptor)
NsP	Proteínas no estructurales
ACE-2 o ECA 2	Enzima convertidora de angiotensina 2
FDA	U.S. FOOD & DRUG Administration
RNA-polimerasa	Conjunto de enzimas que sintetizan RNA a partir de DNA
$\overline{R_0}$	Número de reductor básico
CRT	Complejo de Replicasa-Transcriptasa
RBM	El motivo de unión al receptor
ORF	Open Reading Frame (Complejo de Replicasa-Transcriptasa)
PLpro	Proteasas tipo papaína
SRT	Secuencias reguladoras transcripcionales

1 Introducción

En diciembre de 2019 en la ciudad Wuhan provincia de Hubei, China, se informaron casos de grupos de pacientes con neumonía por causas desconocidas, presentando síntomas de neumonía viral, fiebre, tos, malestar torácico, mientras que en casos mas graves se presentaba disnea e infiltración pulmonar bilateral. La mayoría de los pacientes hospitalizados que se documentaron estaban vinculados epidemiológicamente al mercado mayorista de mariscos de Huanan, ubicado en Wuhan, más tarde se identificaron pacientes sin antecedentes de exposición a dicho mercado en el cual, aparte de vender mariscos, también comercializan animales vivos. Se cree que la aparición del primer caso conocido se remonta al 8 de diciembre de 2019. El 30 de enero del año 2020 la OMS declaró el nuevo brote de coronavirus como una emergencia de salud pública, posteriormente el comité internacional de taxonomía de los virus nombró el nuevo coronavirus ‘SARS-CoV-2’, mientras que la OMS el 11 de marzo del mismo año nombro a la enfermedad que este virus provoca como ‘COVID-19’. Debido a que se registraron más de 3,000 casos confirmados por día se tuvieron que implementar medidas de salud pública estrictas. Hay evidencia genética que sugiere que el SARS-CoV-2 es un virus natural que probablemente se originó en animales, sin embargo, no se sabe con certeza cuándo y dónde el virus infecto al humano por primera vez, ya que algunos de los primeros casos reportados en Wuhan no tenían ningún vínculo epidemiológico con el mercado antes mencionado. (Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. 2021). Cabe destacar que el salto ocasional de un virus animal al hombre (spillover) es común en los coronavirus, sucedió así con el SARS en el 2003 y con el MERS en 2012.

La capacidad de transmisión se estima habitualmente a partir del determinado número reductor básico o $\overline{R_0}$ es una variable convertidora de esta enfermedad, $\overline{R_0}$ inferior a 1 indica una escasa capacidad de extensión de una enfermedad infecciosa, por otro lado, los valores

de $\overline{R_0}$ superiores a 1 indicaran la necesidad de emplear medidas de control para limitar su extensión. Se cree que el valor $\overline{R_0}$ de COVID-19 oscila entre 1,4-2,5 (Trilla A. 2020).

La vía de transmisión más probable del COVID-19 es por contacto y gotitas respiratorias (aerosoles) en distancias cortas (1.5m) y, también por fómites contaminados. Aunque no se puede descartar que exista cierto grado de transmisión por vía aérea. Se cree que la mayoría de los contagios se producen por pacientes sintomáticos pero también pueden existir los contagios a partir de pacientes asintomáticos e incluso a partir de personas en periodo de incubación de la enfermedad (Med Clin, 2021). El SARS-CoV-2 es un virus nuevo, todavía estamos aprendiendo como se propaga y la gravedad de la enfermedad que causa (CDC, 2020).

1.1 Estructura y genoma del virus SARS-CoV-2

Se denomina coronavirus por la apariencia que tiene bajo el microscopio electrónico parecido a una corona. Son virus envueltos, con un diámetro aproximado de 125 nm, genoma RNA de cadena simple, sentido positivo. Se considera el genoma más grande de los virus RNA con un tamaño de 26-32 kilobases, codifica para cuatro proteínas estructurales que incluyen: glicoproteína espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) y otras 16 proteínas no estructurales que participan en la transcripción y replicación viral como es la helicasa y la RNA polimerasa dependiente de RNA (**Figura 1**). (Aragón-Nogales R., 2019)

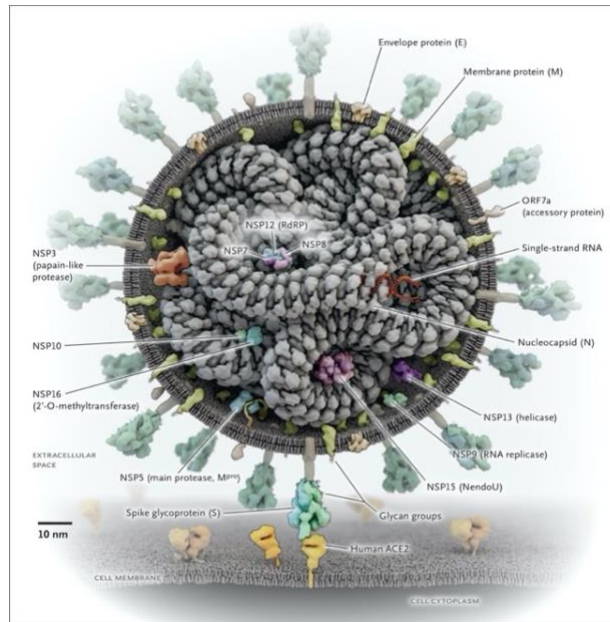


Figura 1. Forma y estructura del virus SARS-CoV-2. Partícula vírica del SARS-CoV-2 que posee una nucleocápside, proteínas estructurales y proteínas accesorias.

Tomado de <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcibr2007042>

El virión de SARS-CoV-2 consta de una nucleocápside y de una envoltura externa compuesta por proteínas estructurales principales y accesorias. En su material genético presenta la modificación química de metilación en el extremo 5' o "CAP" y una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3'. Este genoma viral contiene al menos seis marcos abiertos de lectura (ORF). Su genoma puede dividirse en tres tercios, los dos primeros tercios (más cerca del extremo 5') codifican para el gen de la replicasa viral. Este gen está constituido por dos ORF (ORF 1a y ORF 1b), los que, al comienzo de la infección, serán traducidos directamente en dos poliproteínas de gran tamaño llamadas pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas posteriormente serán procesadas proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps), las cuales estarán implicadas en la replicación del genoma viral y en la transcripción de RNAm subgenómicos. El último tercio del genoma (más cerca del extremo 3') codifica los genes de las 4 proteínas estructurales principales: S, M, E y N y los genes de las proteínas accesorias

(HE, 3, 7a, entre otras). En la **Tabla I** se muestran algunas de las funciones más importantes de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 (Pastrian-Soto, 2020).

Tabla I. Principales funciones de las proteínas estructurales esenciales para el ensamblaje del SARS-CoV-2

Proteína	Función
Proteínas S (Spike)	Constituyen la espiga en la superficie de las partículas virales y es la clave para la unión viral al receptor del huésped.
Proteínas M (Membrana)	Tiene tres dominios transmembrana, da forma a los viriones, promueve la curvatura de la membrana y se une a la nucleocápside.
Proteínas E (Envoltura)	Es la proteína de envoltura, está juega un papel en el ensamblaje y liberación del virus, y es necesaria para la patogénesis. Además, da la capacidad de camuflajearse.
Proteínas N (Nucleocápside)	Contiene dos dominios, ambos pueden unirse al genoma de RNA del virus a través de diferentes mecanismos.

Basado de Pastrian-Soto, 2020

El SARS-CoV-2 se identificó como un beta-coronavirus mediante secuenciación metagenómica de RNA a partir del aislamiento del virus de muestras de líquido de lavado bronco alveolar de pacientes con neumonía grave. Es un virus de ácido ribonucleico (RNA), monocatenario positivo (+ssRNA). El SARS-CoV-2 comparte el 79.6% de su secuencia genética con el SARS-CoV (causante del brote epidémico en 2003) y ambos utilizan el mismo receptor de entrada que la enzima convertidora de angiotensina II (Muñoz Jaramillo, et al. 2021).

Los CoV son unos patógenos importantes en humanos y vertebrados. Estos pueden infectar los sistemas respiratorio, gastrointestinal, hepático y nervioso central de humanos, ganado, aves, murciélagos, ratones y de muchos otros animales salvajes. Se pueden dividir genotípica y serológicamente en cuatro géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus

y Deltacoronavirus, basado en las relaciones filogenéticas y estructuras genómicas (Pastrian-Soto, 2020).

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, pertenecen al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, esta última consta de cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (Aragón-Nogales R. 2019). Como nuevo betacoronavirus, comparte 79% de identidad de secuencia del genoma con SARS-CoV y 50% con MERS-CoV (**Figura 2**). (J. Reina 2020)

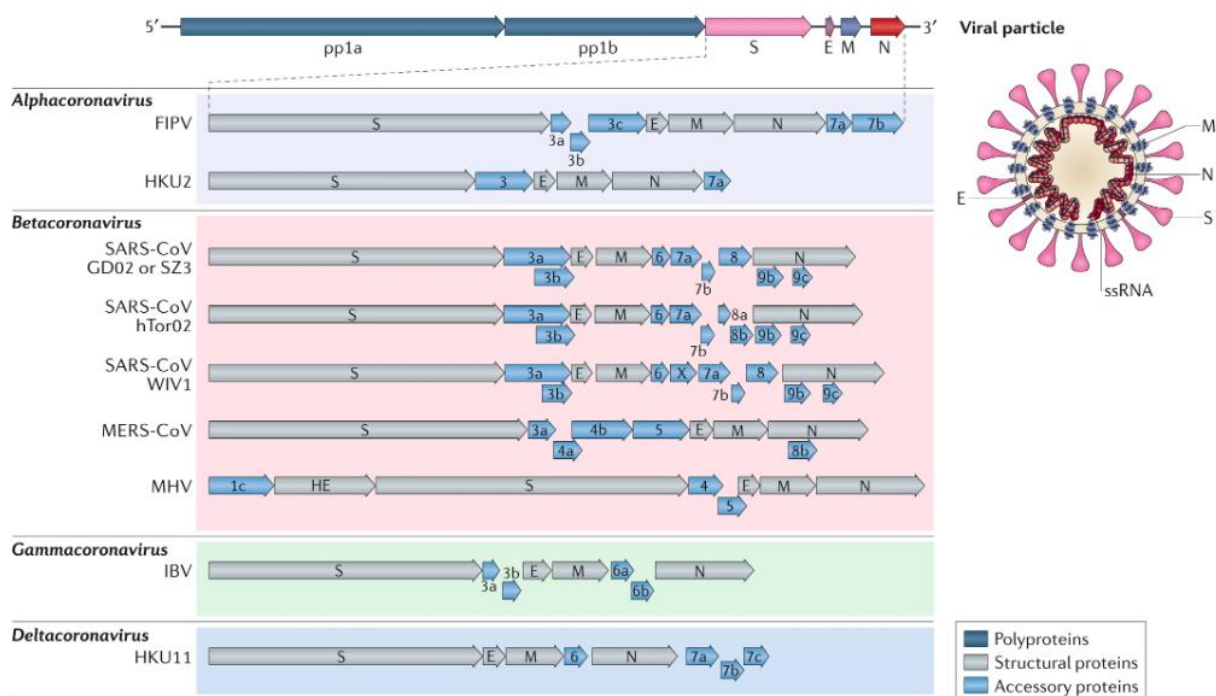


Figura 2. Parentesco de las secuencias genómicas entre el SARS-CoV-2 y otras especies. Representación esquemática de las diferentes secuencias genómicas de otros coronavirus Tomado de Cui J. 2019.

La proteína S del SARS-CoV-2 tiene un tamaño completo de 1,273 aminoácidos, más largo que el del SARS-CoV (1,255 aminoácidos). Es distinto de las proteínas S de la mayoría de los miembros del subgénero Sarbecovirus, compartiendo similitudes de secuencia de

aminoácidos de 76.7%-77.0% con SARS-CoV de civetas y humanos, de 75%-97.7% con coronavirus de murciélago del mismo subgénero y 90.7%-92.6% con coronavirus de pangolín. (Hu, B., et al. 2021)

1.2 Mecanismos de infección y respuesta inmune del hospedero

El SARS-CoV-2 utiliza el mismo receptor que el SARS-CoV, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Además de la ACE2 humana (hACE2), el SARS-CoV-2 también reconoce la ACE2 de cerdo, hurón, mono rhesus, civeta, gato, pangolín, conejo y perro. El amplio uso de receptores del SARS-CoV-2 implica que puede tener una amplia gama de huéspedes, y la variada eficiencia del uso de ACE2 en diferentes animales puede indicar sus diferentes susceptibilidades a la infección por SARS-CoV-2. La subunidad S1 de un coronavirus se divide además en dos dominios funcionales, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal. Los análisis estructurales y bioquímicos han identificado una región de 211 aminoácidos (aminoácidos 319–529) en el dominio C-terminal de S1 del SARS-CoV-2 como RBD, que tiene un papel clave en la entrada del virus y es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes. El RBM media el contacto con el receptor ACE2 (aminoácidos 437–507 de la proteína S del SARS-CoV-2), y esta región en el SARS-CoV-2 difiere de la del SARS-CoV en los cinco residuos críticos para la unión de ACE2, a saber Y455L, L486F, N493Q, D494S y T501N. Además, un motivo de cuatro residuos en el RBM del SARS-CoV-2 (aminoácidos 482–485: GVEG) genera una conformación más compacta de su cresta de unión a hACE2 que en el SARS-CoV y permite un mejor contacto con el N- hélice terminal de hACE2. Los datos bioquímicos confirmaron que las características estructurales del SARS-CoV-2 RBD han fortalecido su afinidad de unión a hACE2 en comparación con la del SARS-CoV. (Hu, B., et al. 2021)

Al tratarse de un RNA de sentido positivo, al ser liberado, el RNA viral se traduce directamente a poliproteínas, las cuales son procesadas en proteínas funcionales responsables de la replicación y transcripción del virus. Así, por una parte, se producen RNAs que son traducidos en proteínas estructurales del virus y por otra se generan RNAs genómicos que serán empaquetados en los nuevos viriones que se van formando. Por último, los viriones se liberan al exterior de la célula y pueden infectar otras células. (Amparo T., 2020)

El análisis de células en cultivo infectadas con SARS-CoV-2 indica que el virus se replica rápidamente en las células. Además, SARS-CoV-2 aumenta la actividad ciertas rutas celulares como la traducción de proteínas, la edición del RNA o el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estudios preliminares en cultivo celular, indican que inhibidores de estas rutas inhiben la replicación del virus. Investigaciones futuras deberán evaluar si estos resultados tienen aplicación clínica en pacientes. (Amparo T., 2020)

Con los primeros reportes de infección por SARS-CoV-2 fue posible identificar que la infección es transmitida de una persona a otra a través del contacto cercano y tanto la población inmunocompetente como inmunocomprometida son susceptibles. (Aguilar, Hernández e Ibanes, 2020) La transmisión de SARS-CoV-2 se ha descrito por mecanismos directos e indirectos (**Tabla II**).

Tabla II. Mecanismos de transmisión del SARS-CoV-2

Directos	SARS-CoV-2 puede transmitirse, como la mayoría de los virus respiratorios, mediante secreciones respiratorias, siendo éste el mecanismo principal de transmisión (persona a persona).	Transmisión por gotas	Tienen un tamaño $> 5-10 \mu\text{m}$; se producen al hablar, toser, estornudar, cantar o respirar. Se desplazan aproximadamente un metro de distancia al hablar y hasta cuatro metros al toser o estornudar.
		Transmisión por aerosoles	Partículas $< 5 \mu\text{m}$ que quedan suspendidas en el aire ambiente siendo infectivas por al menos tres horas, con una mayor concentración en las fases iniciales de la enfermedad y durante la realización de procedimientos que generen aerosoles como intubación endotraqueal, broncoscopia y resucitación cardiopulmonar.
Indirectos	Virus depositado en distintas superficies por las gotas o aerosoles producidos por un individuo infectado permanece por tiempo variable en función de las características del material. Así, el contacto con algún fómite y, posteriormente, con alguna mucosa (oral, nasal o conjuntival) puede ocasionar la infección.	Asintomáticos	Portadores asintomáticos, capaces de transmitir el virus e incluso de desarrollar lesión pulmonar demostrada por imagen a pesar de no presentar ninguna manifestación clínica.
		Transmisión presintomática	De manera similar es posible la transmisión presintomática, es decir, durante el periodo de incubación, este es un factor clave para la transmisión de SARSCoV-2 dada la elevada excreción viral en el tracto respiratorio superior, incluso en pacientes presintomáticos.

Basado de Aguilar, Hernández e Ibanes, 2020

Gracias a estudios recientes en pacientes positivos a COVID-19 que presentaban molestias abdominales y síntomas de diarrea, ahora sabemos que en menor frecuencia la transmisión fecal es posible. Se ha demostrado que en el sistema digestivo los enterocitos del íleon y el colon expresan altamente receptor de ECA II. Por lo que se ha detectado la presencia de SARS-CoV-2 en muestras fecales, hisopos fecales y sangre en pacientes con neumonía grave. (Vargas-Lara A., et al. 2020)

Una vez que el virus entra en contacto con una célula comienza el mecanismo de infección del COVID-19. Como sucede en general con los coronavirus, la infección viral inicia con la

unión del virión a la célula huésped mediante la interacción de la proteína S y su receptor. Se conoce que SARS-CoV, HCoV-NL63 y posiblemente SARS-CoV-2 utilizan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA II) como su receptor, mientras que MERS-CoV se une al dipeptidil-peptidasa 4 (DPP4) para ingresar a las células humanas. Después de la unión al receptor, el virus tiene acceso al citosol de la célula huésped, una proteasa permite la fusión de la membrana viral y celular. Una serie de divisiones en la proteína S permite la formación y liberación del genoma viral al citoplasma. (Vargas-Lara A., et al. 2020)

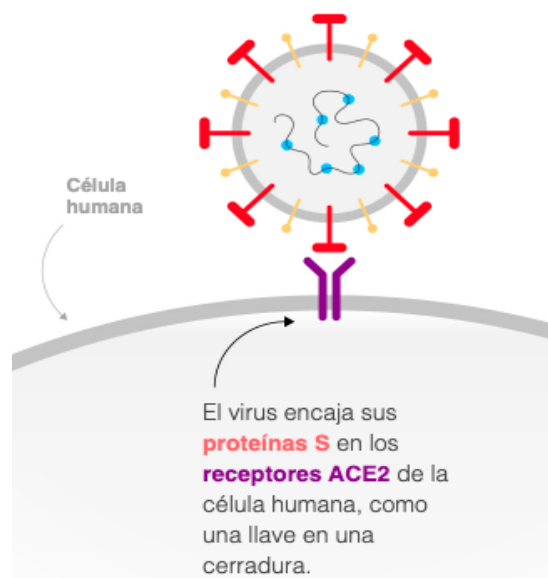


Figura 3. Interacción virus – receptor. Las espigas virales se unen al receptor ECA2 en la superficie de la célula huésped. Tomado de https://elpais.com/elpais/2020/03/06/ciencia/1583515780_532983.html

El siguiente paso después de infectar las células del huésped es la replicación de las proteínas virales, el cual comienza con la traducción del RNA genómico del virión. Este gen codifica dos poliproteínas utilizando una secuencia ya descrita, 5'-UUUAAAC-3', que permite el desplazamiento del ribosoma en el marco de lectura. Se desconoce por qué los coronavirus utilizan el desplazamiento de marcos para controlar la expresión de proteínas, pero se cree que puede controlar la producción de poliproteínas o retrasar este proceso hasta que haya un

entorno adecuado para la replicación del RNA. Los coronavirus codifican dos o tres proteasas tipo papaína (PLpro), las cuales se ensamblan en el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) para crear un entorno adecuado para la síntesis de RNA. Además de las funciones de replicación, se ha identificado que bloquean la respuesta inmunitaria innata. La mayoría de los coronavirus codifican dos PLpros, excepto los γ -coronavirus, SARS-CoV y MERSCoV, que sólo expresan un solo Plpro. **(Figura 4. A)** (Vargas-Lara A., et al. 2020)

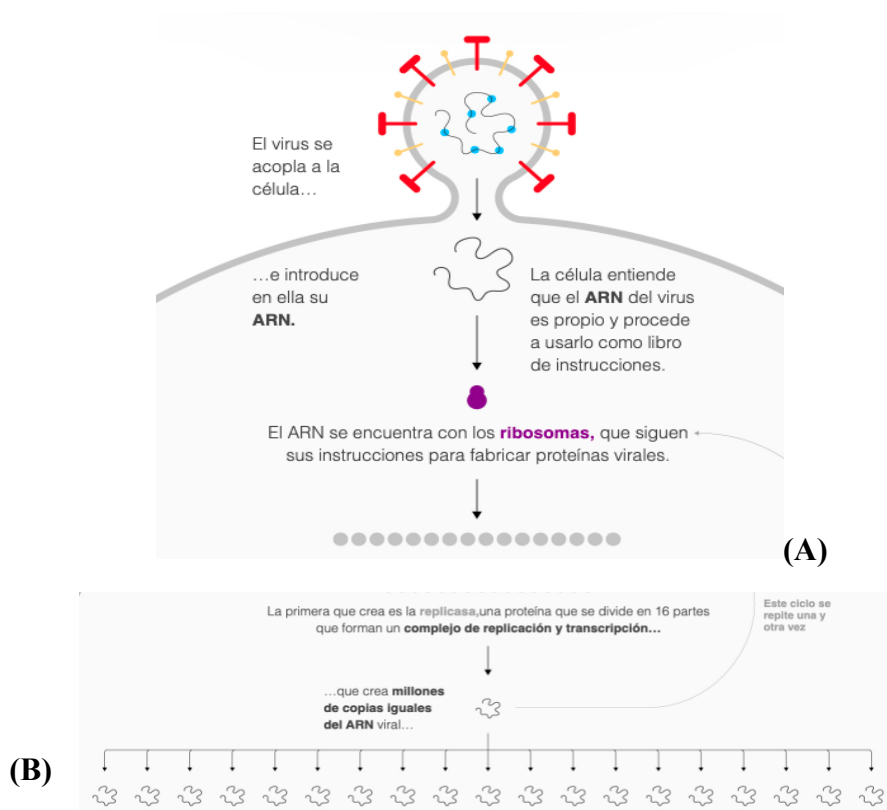


Figura 4. Replicación intracelular del virus. Esquema general de la endocitosis **(A)** y propagación del material genético en la célula huésped **(B)**.

Tomado de https://elpais.com/elpais/2020/03/06/ciencia/1583515780_532983.html

La etapa de replicación más importante es cuando se fusionan los segmentos de secuencias reguladoras transcripcionales (SRT) durante la producción de RNA subgenómico. Actualmente, se ha descrito que la RNA-polimerasa continúa el alargamiento del siguiente SRT o cambia para amplificar la secuencia líder en el extremo 5' del genoma guiado por el

SRT líder. En la actualidad, muchas pruebas respaldan este modelo, incluida la presencia de una secuencia antilíder en el extremo 3' de los RNA subgenómicos de cadena negativa. Por último, los coronavirus son conocidos por su capacidad de recombinarse; esta capacidad está ligada al cambio de cadena de la RNA-polimerasa. La recombinación tiene un papel destacado en la evolución viral y la patogenicidad de la infección. **(Figura 4. B)** (Vargas-Lara A., et al. 2020)

Después de la replicación y la síntesis de RNA subgenómico, las proteínas estructurales virales S, E y M se traducen y se insertan en el retículo endoplásmico de las células del huésped. Estas proteínas se desplazan al aparato de Golgi, donde se envuelven en la membrana y forman viriones maduros. La proteína M y E median la mayoría de las interacciones necesarias para el ensamblaje del coronavirus. Se cree que estas dos proteínas funcionan juntas para producir la envoltura viral y la incorporación de los viriones. Se desconoce cómo la proteína E ayuda a la proteína M en el ensamblaje del virión, y se han sugerido varias posibilidades: se dice que la proteína E actúa en la inducción de la curvatura de la membrana que previene la agregación de la proteína M; y por otra parte, tiene un papel separado en la liberación viral al alterar la vía secretora del huésped. Después del ensamblaje, los viriones son transportados a la superficie celular en vesículas y liberados por exocitosis **(Figura 5)**. (Vargas-Lara A., et al. 2020)

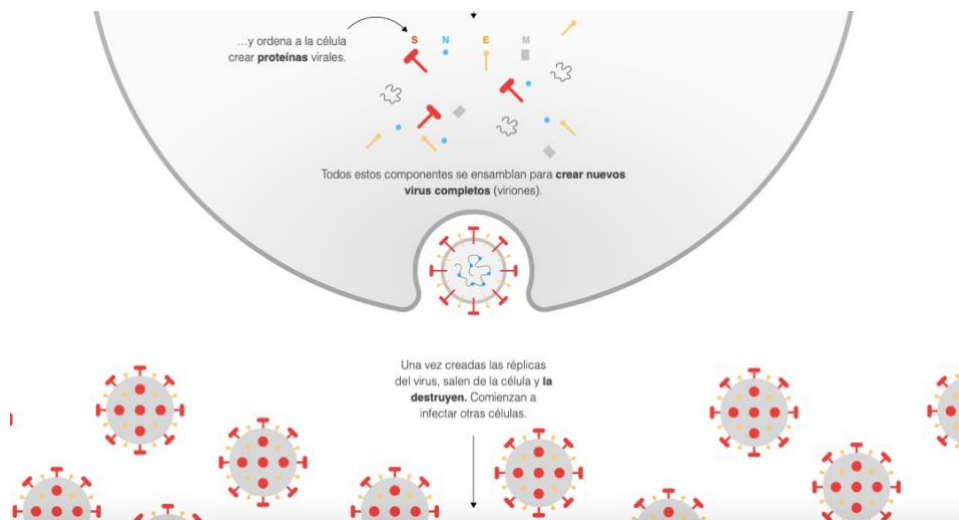


Figura 5. Liberación de partículas virales de la célula infectada. Esquema general de la exocitosis de los coronavirus. Tomado de https://elpais.com/elpais/2020/03/06/ciencia/1583515780_532983.html

1.3 Tratamiento de la enfermedad COVID-19

El tratamiento de esta enfermedad es, esencialmente, de soporte y sintomático. La administración preventiva de antibióticos no debe realizarse sin una sobreinfección bacteriana confirmada microbiológicamente, pero se requieren antibacterianos y antifúngicos si se prueba la presencia de bacterias u hongos. Hasta el momento, no existe un tratamiento aprobado para la COVID-19, lo que pone de manifiesto la necesidad urgente de desarrollar vacunas eficaces o profilaxis posterior a la exposición para prevenir futuras epidemias. (Pareja A., Luque J., 2020)

A continuación se mencionan algunas de las alternativas terapéuticas farmacológicas para la enfermedad COVID-19.

ARBIDOL (UMIFENOVIR). Se ha demostrado que arbidol tiene, *in vitro*, un efecto antiviral directo en la replicación viral temprana del SARS-CoV. El arbidol (una pequeña molécula derivada de indol) inhibe la fusión, mediada por el virus, con la membrana objetivo, con el consecuente bloqueo de la entrada viral a las células blanco. (Pareja A., Luque J., 2020)

COLORQUINA Y LA HIDROXICOLORQUINA. Inhiben la glicosilación de los receptores celulares e interfieren con la unión virus-huésped, aumentan el pH e inhiben la fusión de la membrana, pero según estudios estos medicamentos aumentan el riesgo de morir de un paro cardíaco. (Ben, 2021).

REMDESIVIR (GS-5734). Remdesivir es un profármaco análogo de la adenosina. Según los datos recopilados, podría interferir en la polimerasa NSP12, in vitro. Recientemente, ha sido reconocido como un antiviral prometedor contra una amplia gama de infecciones por virus RNA (incluidos SARS-CoV y MERS-CoV) en células cultivadas, ratones y modelos primates no humanos. (Pareja A., Luque J., 2020)

FAVIPIRAVIR (T-705). En China, el medicamento favipiravir se encuentra sometido a estudios clínicos para evaluar su eficacia y seguridad en el tratamiento de COVID-19 con resultados prometedores hasta ahora. El favipiravir es un nuevo tipo de inhibidor de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) que se convierte en una forma fosforribosilada activa (favipiravir-RTP) en las células y se reconoce como sustrato por la RNA polimerasa viral, y así inhibe su actividad. (Pareja A., Luque J., 2020)

Además existe terapia con agentes inmunomoduladores, estos agentes inhiben la respuesta inflamatoria excesiva y pueden ser una terapia adyuvante potencia para COVID-19. (Ben, 2021).

Tabla III. Estatus de los antivirales y otros fármacos utilizados en el tratamiento de COVID-19

Medicamentos utilizados	Medicamentos en investigación	Medicamentos en fase III
• Lopinavir/ritonavir • Cloroquina • Ribavirina • Oseltamivir • Penciclovir/aciclovir • Ganciclovir • Nitazoxanida	• Nafamostat • Ganciclovir • Favipiravir (T-705) • Nitazoxanida	• Remdesivir (GS-5734)

Tomado de Vargas-Lara (2020)

2 Justificación

El SARS-CoV-2 es una enfermedad viral de probable procedencia zoonótica que representa una amenaza a los humanos a nivel mundial debido a su alta mortalidad la cuál tiene un impacto considerable en todo el mundo. La vacunación continúa siendo una estrategia para prevenir cualquier enfermedad viral y esta no es la excepción, aunque por ser una enfermedad nueva y la variación antigénica dificulta la producción de vacunas más eficientes.

Por ello muchos grupos de investigación de organizaciones públicas y privadas han trabajado para lograr una vacuna segura y eficaz. En la actualidad existen ya diversas vacunas para el SARS-CoV-2 las cuáles comparten estrategias similares para inactivar el virus, por lo que se hace necesaria la búsqueda de los métodos mas eficaces para la inactivación del virus es por este motivo que esté trabajo tiene como objetivo investigar y analizar las diferentes estrategias que utilizan actualmente las vacunas contra el SARS-CoV-2 que utilizan el rDNA en México.

3 Objetivo

Establecer las características de las vacunas diseñadas a partir de DNA recombinante contra el SARS-CoV-2.

4 Estado del arte

4.1 Vacunas

La vacunación es el método más eficaz para una estrategia a largo plazo de prevención y control de la COVID-19 en el futuro. Se están desarrollando muchas plataformas de vacunas diferentes contra el SARS-CoV-2, cuyas estrategias incluyen vectores recombinantes, DNA, RNAm en nanopartículas lipídicas, virus inactivados, virus vivos atenuados y subunidades proteicas. (Hu B., et al. 2021). A grandes rasgos una vacuna está elaborada con microorganismos vivos atenuados, inactivos o muertos, fracciones del microorganismo o partículas proteicas, es decir; partes muy pequeñas del organismo causante de la enfermedad, además de contener otros ingredientes más que ayudan a la conservación y seguridad de la vacuna, los cuales al ser administrados son capaces de producir una respuesta inmunitaria que previene y/o protege ante la enfermedad que se le ha vacunado.

El desarrollo clínico de una vacuna o fármaco consta de cuatro fases. Los tres primeros son antes de que esta salga a la venta y se realizan en una pequeña proporción de voluntarios para determinar si el fármaco es apto para su distribución. La cuarta y última fase evalúa la eficacia real de una vacuna o medicamento en un gran número de personas que han sido vacunadas o tratadas con el medicamento. En cada etapa, el producto debe ser aprobado por la autoridad sanitaria competente antes de pasar a la siguiente etapa.

Los diferentes estudios de investigación tienen como prioridad la seguridad de uso de una vacuna y en seguida su eficacia. Los estudios son realizados en fases: fase preclínica y fases I, II, III, y IV. (**Tabla IV**). (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2020)

Tabla IV. Fases para el desarrollo de una vacuna

Fase Preclínica:	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Resultados experimentales sobre la eficacia y tolerancia en modelo animal apoyan su posterior investigación en humanos. Los estudios preclínicos usan sistemas de cultivos de tejidos o cultivos de células y pruebas en animales, que pueden ser ratones o monos.	Se evalúa una nueva vacuna en etapa experimental en un pequeño número de humanos, en general menos de 100 adultos con el objetivo de evaluar inicialmente su seguridad y sus efectos biológicos, incluida la inmunogenicidad.	Evalúa una vacuna que fue considerada segura en la Fase I y que necesita un grupo más grande de humanos (generalmente entre 200 y 500) para monitorear seguridad inmunógena, dosis propuestas, y método de administración.	Se evalúa de forma más completa la seguridad y la eficacia en la prevención de las enfermedades e involucran una mayor cantidad de voluntarios que participan en un estudio multicéntrico adecuadamente controlado. Pueden incluir cientos a miles de humanos en un país o varios países.	Son los estudios que ocurren después de la aprobación de una vacuna en uno o varios países. Estos estudios tienen como objetivo evaluar como la vacuna funciona en el “mundo real”. Son los estudios de efectividad y también siguen monitoreando los eventos adversos.

Elaborada con datos de: [OPS], 2020

4.2 Desarrollo de vacunas contra el virus SARS-CoV- 2

La enfermedad del COVID-19 ha ocasionado una pandemia con unas altas tasas de mortalidad, debido a ello toda la comunidad científica, empresas e instituciones académicas se han visto obligadas a desarrollar una vacuna eficiente ante esta enfermedad en el menor tiempo posible, sin embargo, para que una vacuna sea efectiva y segura para la sociedad debe de pasar por varias pruebas clínicas, lo cual conlleva esto a ser un proceso muy largo, de entre 5 a 10 años.

La OMS y sus asociados se han comprometido a acelerar el desarrollo de vacunas contra la COVID-19 y, al mismo tiempo, mantener las máximas normas en materia de seguridad. En el pasado, el desarrollo de las vacunas suponía una serie de fases que podían llevar muchos años. En la actualidad, debido a la necesidad urgente de vacunas contra la COVID-19, las inversiones financieras y las colaboraciones científicas sin precedentes están modificando los procesos para el desarrollo de vacunas. Esto significa que algunas de las fases del proceso de

investigación y desarrollo se han realizado de forma paralela, manteniendo al mismo tiempo estrictas normas clínicas y de seguridad. Por ejemplo, en algunos ensayos clínicos se están evaluando múltiples vacunas al mismo tiempo. No obstante, esto no menoscaba el rigor de los estudios. (Organización Mundial de la Salud [OMS] 2021a) En la **Figura 6** se describen las fases del desarrollo de la vacuna contra el COVID-19.

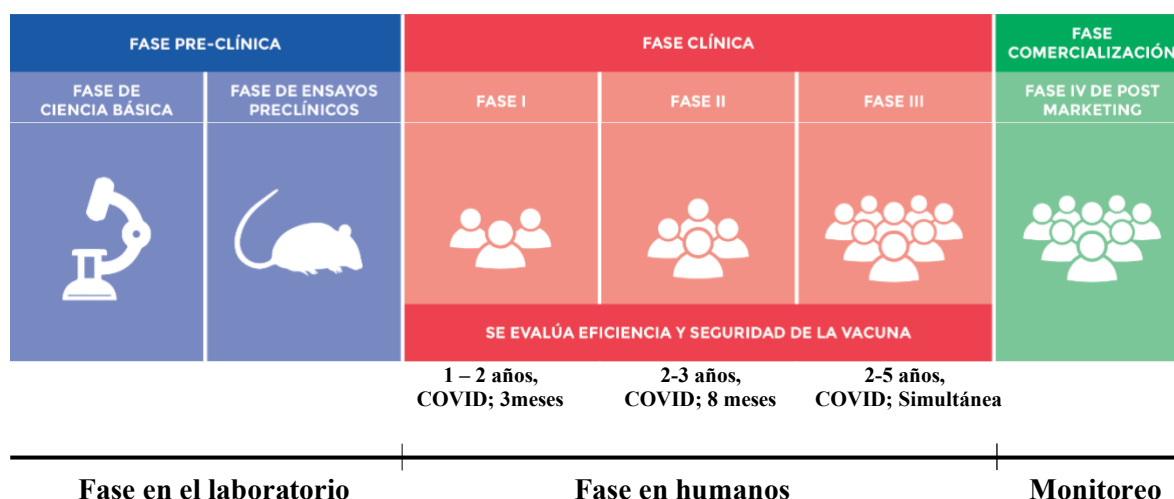


Figura 6. Fases para el desarrollo de una vacuna con imágenes ilustrativas. Tomado de Confianza e las vacunas Latinoamérica (s.f.)

Las vacunas contra el COVID-19 ayudan a nuestro organismo a estimular la producción de anticuerpos contra el virus sin contraer la enfermedad.

- Actúan mediante diferentes mecanismos de defensa para brindar protección.
- El organismo se queda con un suministro de linfocitos T de "memoria".
- Linfocitos B que recordarán cómo combatir ese virus en el futuro.

Para prevenir y controlar el alcance de la enfermedad COVID-19, se han desarrollado diferentes vacunas contra el SARS-CoV-2 que incluyen vectores recombinantes, DNA, RNAm en nanopartículas lipídicas, virus inactivados, virus vivos atenuados y subunidades

de proteínas. Hasta octubre de 2020 se había informado de 51 vacunas en ensayos clínicos en humanos (Hu B., et al. 2021), y los avances continúan de forma activa. Para la vacuna RBD219-N1C1 se desarrolló una proteína de dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2, expresada en niveles altos en levadura (*Pichia pastoris*), y tras estudios de inmunogenicidad en ratones, y después de dos dosis, indujo altos niveles de unión de anticuerpos IgG (Pollet et al., 2021). La proteína S del SARS-CoV-2 posee diez sitios inmunodominantes lineales en de los cuales cuatro están ubicados dentro del RBD, así, fueron diseñados dos candidatos a vacuna de sitio inmunodominante enlazador (LIS) que se componen de cuatro sitios inmunodominantes dentro del RBD (RBD-ID) o los 10 sitios inmunodominantes dentro del pico completo (S-ID). Al administrarse por inyección subcutánea en hámster, indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes significativa (Zhang et al., 2021). CVnCoV es una vacuna de RNAm encapsulado en nanopartículas de lípidos que codifica la proteína S de SARS-CoV-2, se compone exclusivamente de nucleótidos de origen natural. La inmunización en hámsteres indujo fuertes respuestas humorales con títulos altos de anticuerpos neutralizantes de virus y respuestas robustas de células T (Rauch et al., 2021). Mediante biología sintética se empleó un vector de expresión con un auto transportador gramnegativo inducible para expresar antígenos de vacuna en la superficie de bacterias con genoma reducido para mejorar la interacción del antígeno de la vacuna con el sistema inmunológico. En un modelo de cerdo, indujo potentes respuestas anamnésicas tras la exposición al virus, potenció las respuestas de interferón- γ , redujo las cargas de RNA viral en el tejido del yeyuno y proporcionó una protección significativa contra la enfermedad clínica (Lina Nascimento Fabris Maeda et al., n.d.). En humanos, se probó en fase 1 la vacuna de RNAm del SARS-CoV-2 BNT162b1 en adultos chinos jóvenes y mayores. BNT162b1 codifica el dominio de unión al receptor de glucoproteína S (RBD) del

SARS-CoV-2. Indujo fuertes respuestas de linfocitos T de interferón- γ (Li et al., 2021). En un ensayo de fase 3, se probó en humanos la vacuna Ad26.COV2.S. Es un vector de adenovirus humano de tipo 26 recombinante, incompetente para la replicación, que codifica la proteína S del SARS-CoV-2 de longitud completa en una conformación estabilizada por perfusión. Protegió contra COVID-19 crítico de moderado a grave con inicio al menos 14 días después de la administración (116 casos en el grupo de vacuna frente a 348 en el grupo de placebo; eficacia, 66,9%). (Sadoff et al., 2021)

En un ensayo de fase II en 603 voluntarios de una vacuna de adenovirus tipo 5 con vectores, éste expresa la proteína SARS-CoV-2 S, fue desarrollada por CanSino Biologicals y la Academia de Ciencias Médicas Militares de China. La vacuna indujo considerable respuesta inmunitaria humoral y celular en la mayoría de los receptores después de una sola inmunización. La vacuna ChAdOx1, fue desarrollada sobre la base del adenovirus de chimpancé por la Universidad de Oxford. En un ensayo aleatorizado de fase I / II, se demostró que fue capaz de inducir anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 en los 1.077 participantes después de una segunda dosis de vacuna, su perfil de seguridad también fue aceptable. El NIAID y Moderna fabricaron el RNAm-1273, un candidato a vacuna de RNAm formulado con nanopartículas lipídicas que codifica la proteína de profusión estabilizada SARS-CoV-2 S. Mediante un ensayo de fase I se confirmó su efecto al inducir fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes dependiendo de la dosis, puesto que aumentaron después de una segunda dosis. (Hu B., et al. 2021)

La vacuna de virus completo COVID-19 tuvo escasas reacciones adversas e indujo la producción de anticuerpos neutralizantes. La seguridad e inmunogenicidad verificadas respaldan el avance de estas vacunas candidatas a los ensayos clínicos de fase III, que

evaluarán su eficacia para proteger a las poblaciones sanas de la infección por SARS-CoV-2. (Hu B., et al. 2021)

Se están desarrollando diversos tipos de posibles vacunas contra la Covid-19, un enfoque pionero es la utilización de RNA o DNA genéticamente modificados para generar una proteína que por sí sola desencadena una respuesta inmunitaria. Vacunas con vectores víricos que utilizan un virus genéticamente modificado que no causa la enfermedad, pero da lugar a proteínas coronavíricas que inducen una respuesta inmunitaria. Biológicos basados en proteínas: utilizan fragmentos inocuos de proteínas o estructuras proteínicas que imitan el virus causante de la COVID-19 con el fin de generar una respuesta inmunitaria. Vacunas con virus inactivados o atenuados que utilizan un virus previamente inactivado o atenuado, de modo que no provoca la enfermedad, pero aun así genera una respuesta inmunitaria. (De Francisco ALM, 2021)

4.3 DNA recombinante como estrategia para generar vacunas anti-SARS-CoV-2

Las vacunas de DNA están compuestas por vectores virales: un plásmido bacteriano y liposomas. En el plásmido se inserta la secuencia de DNA que codifica el antígeno o la proteína diana. (López Monteon, A., et al. 2013)

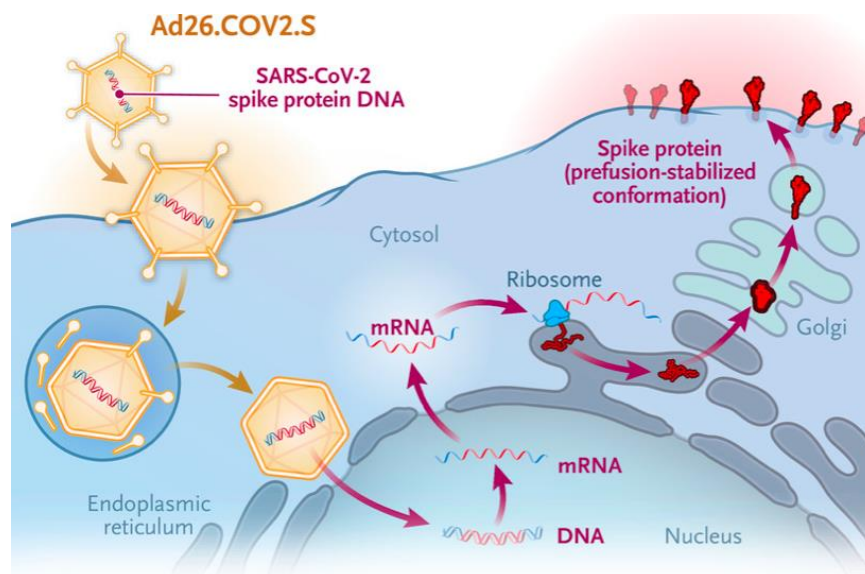


Figura 7. Ejemplo de una vacuna que utiliza la tecnología del ADN recombinante. Tomada de <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2101544>

Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA circular que se autorreplican y se obtienen mediante su introducción en bacterias competentes como *E. coli* previamente tratadas con una mezcla de cationes divalentes que las hacen permeables temporalmente a pequeñas moléculas de DNA. La pequeña población de bacterias que adquieren el plásmido es identificada mediante marcadores selectivos que confieren resistencia a antibióticos. Por esta razón, los plásmidos tienen además diversos genes de resistencia a antibióticos, como la ampicilina (Amp) o la Kanamicina. (López Monteon, A., et al. 2013)

El DNA recombinante ha jugado un papel muy importante, esta tecnología es un conjunto de procedimientos, mediante el cual se puede manipular la información genética contenida en cualquier organismo, que se encuentra almacenada en cada una de sus células, y colocarla en otro organismo distinto, con diferentes objetivos o fines los cuales pueden ser: expresar y obtener proteínas producto de esa información genética, conferir o eliminar características únicas en el organismo receptor, almacenar información genética de interés en un

microorganismo para su posterior uso o codificar un antígeno de un patógeno, en este caso es COVID-19. (López Domínguez, J., 2017)

La clonación del ácido desoxirribonucleico (DNA) es la piedra angular de la tecnología recombinante, clonar en un sentido simple significa hacer copias idénticas, esta contempla el aislamiento de una pequeña secuencia de DNA específica que codifica para una proteína de interés (gen), así como la unión a otra molécula de DNA portador (vector), con el fin de replicar este recombinante ciento de veces. (López Domínguez, J., 2017)

La estrategia general de clonación de un gen consta de cinco pasos que se realizan con la ayuda de diferentes herramientas moleculares:

- a) Cortar el DNA en sitios específicos de una manera exacta y con bastante fidelidad.
Para esto se emplea un grupo de enzimas denominadas enzimas de restricción.
- b) Selección de una molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) transportadora.
- c) Ligar o pegar los dos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA).
- d) Introducción del ácido desoxirribonucleico (DNA) al interior de la célula huésped; aquí se utilizan metodologías que facilitan el ingreso de la molécula de DNA recombinante.
- e) Selección o identificación de las células que contienen el DNA recombinante.

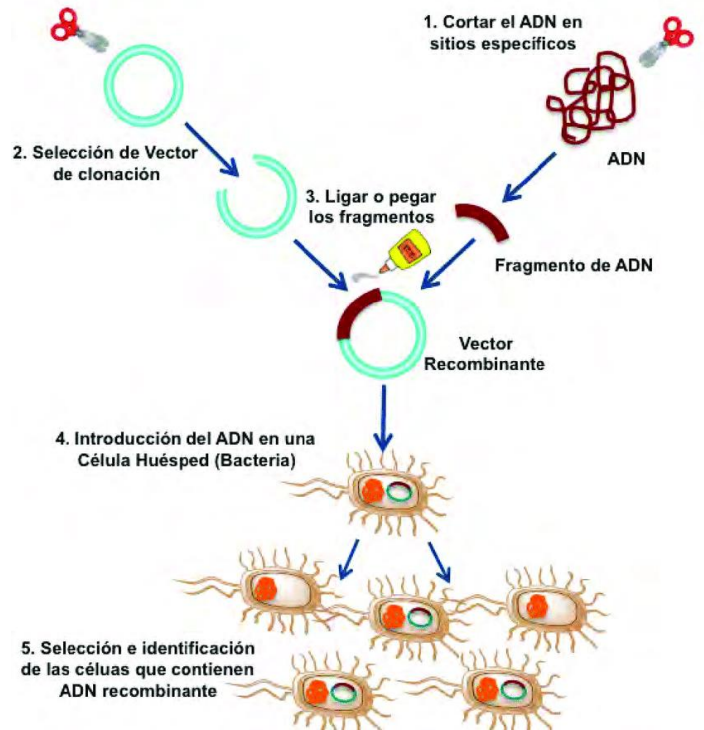


Figura 8. Pasos de la estrategia general de clonación de un gen recombinante. Tomado de principios de bioquímica (2014)

Las vacunas de DNA se basan en la inyección directa en el huésped de un plásmido que codifica para un antígeno de un patógeno, en lugar del antígeno proteico o del patógeno atenuado o muerto. Al ser las células del paciente las que producen la proteína, el antígeno no contiene impurezas, al contrario de lo que sucede con las vacunas tradicionales, en donde durante el proceso de purificación pueden quedar trazas de antibióticos o proteínas del medio de cultivo. La expresión del antígeno dentro de las células del huésped puede inducir una respuesta inmune completa y duradera que incluye anticuerpos, aunque es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas recombinantes, así como una activación fuerte y duradera de células T cooperadoras y citotóxicas o de respuesta celular. Un aspecto que aún no se comprende del todo consiste en la interacción de la vacuna de DNA con el sistema inmune. Las cantidades del antígeno que se producen cuando se administra el

plásmido están en el orden de los pico o nano gramos. Estos niveles relativamente pequeños de antígeno hacen pensar que la respuesta inmune tan fuerte y sostenida se debe al tipo de células que capturan el DNA, ya que es necesario que células especializadas llamadas células presentadoras de antígeno (CPA) capturen el antígeno lo procesen y lo presenten a otras células del sistema inmune como los linfocitos T. (López Monteon, A., et al. 2013)

4.4 Vacunas contra el COVID-19 en la práctica clínica actual

Existen varios métodos principales para diseñar una vacuna. Esos métodos se distinguen en función de si en ellos se utilizan virus o bacterias íntegros; solo los fragmentos del agente patógeno que inducen una respuesta del sistema inmunitario; o solamente el material genético que contiene las instrucciones para fabricar proteínas específicas y no todo el virus. (OMS, 2021b)

4.4.1 El método en el que se utiliza el agente patógeno íntegro

Vacunas inactivadas. La primera de las estrategias que pueden utilizarse para diseñar una vacuna es aislar el virus o la bacteria patógenos, o uno muy parecido, e inactivarlos o destruirlos por medio de sustancias químicas, calor o radiación **Figura 9 (C)**. (OMS, 2021b)

Vacunas atenuadas. Para diseñar las vacunas atenuadas se utilizan los virus patógenos o alguno que sea muy parecido y se mantienen activos pero debilitados. La vacuna de tipo SPR (con componente antisarampionoso, antiparotídico, y antirrubeólico), y las vacunas contra la varicela y contra el zóster son ejemplos de este tipo de vacuna. En esta estrategia se utiliza tecnología parecida a la de las vacunas inactivadas; además, es posible fabricar grandes cantidades de vacuna. Sin embargo, en ocasiones no es conveniente aplicar vacunas de este tipo a las personas inmunodeprimidas **Figura 9 (E)**. (OMS, 2021b)

Vacunas basadas en vectores víricos. Para diseñar este tipo de vacunas se utiliza un virus inocuo para transportar fragmentos específicos (llamados «proteínas») del agente patógeno de interés con el fin de que estos induzcan una respuesta inmunitaria sin llegar a causar la enfermedad. Para conseguirlo, las instrucciones para fabricar fragmentos específicos del agente patógeno de interés se insertan en un virus inocuo. Una vez hecho esto, el virus inocuo sirve como una plataforma (un «vector») para introducir la proteína en el organismo. Posteriormente, la proteína induce una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la vacuna contra el ébola es una vacuna basada en un vector vírico. Este tipo de vacuna puede desarrollarse rápidamente **Figura 9 (C)**. (OMS, 2021b)

4.4.2 El método en el que se utiliza una subunidad antigénica

Las vacunas con subunidades antigénicas. Son aquellas en las que solamente se utilizan los fragmentos específicos (llamados «subunidades antigénicas») del virus o la bacteria que es indispensable que el sistema inmunitario reconozca. Estas vacunas no contienen el agente patógeno íntegro ni utilizan un virus inocuo como vector. Las subunidades antigénicas suelen ser proteínas o hidratos de carbono. La mayoría de las vacunas que figuran en los calendarios de vacunación infantil son del tipo de subunidades antigénicas y protegen a las personas de enfermedades como la tos ferina, el tétanos, la difteria y la meningitis meningocócica **Figura 9 (D)**. (OMS, 2021b)

4.4.3 El método genético (vacunas de ácido nucleico).

A diferencia de los métodos para diseñar vacunas en los que se utilizan agentes patógenos íntegros atenuados o destruidos o fragmentos de uno, en las vacunas de ácido nucleico solamente se utiliza una secuencia de material genético que proporciona las instrucciones para fabricar proteínas específicas y no todo el agente. Las moléculas de DNA y RNA son

las instrucciones que nuestras células utilizan para fabricar proteínas **Figura 9 (E)**. (OMS, 2021b)

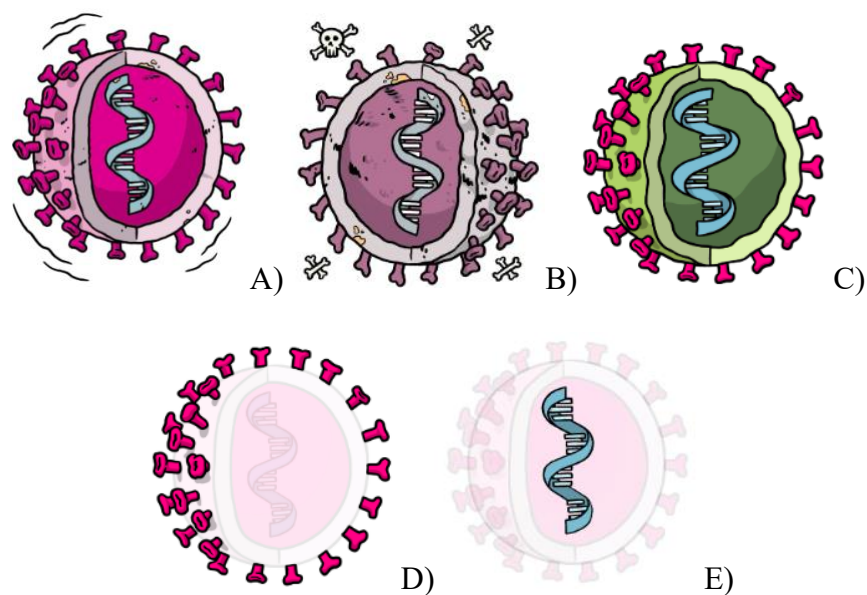


Figura 9. Tipos de vacunas contra el SARS-CoV-2. Representación esquemática de los diferentes tipo de vacunas: Virus Atenuado (A), Virus inactivado (B), Vector viral (C) y Subunidad proteica (D), RNAm viral (E). Tomadas de (OMS, 2021b), (s.f.)

En la **Tabla V** se pueden observar algunas de las vacunas aprobadas y autorizadas para ser administradas actualmente contra la enfermedad COVID-19 y al grupo al cuál pertenecen según la estrategia que utiliza ante este agente patógeno.

Tabla V. Principales tipos de vacunas utilizadas en la actualidad.

RNAm viral	Vector viral	Virus inactivado	Subunidad proteica
BNT162b2 PFIZE/BIONTECH mRNA-1273 MODERNA	Ad5-nCoV Cansino ChAd0x1/AZD1222 AZTRAZENECA/OXFORD JANSSEN/Ad26.COV2.S JOHNSON&JOHNSON SPUTNIK V GAMALEYA COVISHIELD	BBIBP-CorV (Beijin) SINOPHARM CoronaVac SINOVAC	EpiVacCorona FBRI MVC-COV1901 MEDIGEN

A continuación, se mencionan algunas de las vacunas más estudiadas, seguras y efectivas que ya están aprobadas en diferentes partes del mundo.

A. Moderna: Se trata de una vacuna de RNA. Las instrucciones genéticas para la proteína S de coronavirus están codificadas en RNAm, entregado a través de nanopartículas lipídicas. Dentro de la célula, es en el ribosoma donde se codifica la proteína S que llega a la superficie celular para producir la respuesta inmunitaria. (de Francisco ALM, 2021)

B. BioNTech, Pfizer: También es de RNA mensajero. Es el resultado de un proyecto de investigación en Mainz, Alemania. BioNTech comenzó a trabajar en una vacuna de RNAm para el coronavirus desde el principio y acordó asociarse con Pfizer a mediados de marzo. (de Francisco ALM, 2021)

C. Universidad de Oxford, AstraZeneca: Se basa en un vector viral no replicante, secuencia de DNA para la proteína S de coronavirus, transportada a través de un vector viral de chimpancé. (de Francisco ALM, 2021)

D. Johnson y Johnson (J&J): Se basa en un vector viral no replicante, secuencia de DNA para la proteína S de coronavirus, entregada a través del vector de adenovirus tipo 26. (de Francisco ALM, 2021)

E. Novavax: Basada en una proteína derivada de coronavirus producida en líneas celulares de insectos, extraída y administrada junto con un adyuvante. (de Francisco ALM, 2021)

F. Sputnik5, Instituto de Investigaciones Gamaleya (Rusia): Basada en un vector viral no replicante. Secuencia de DNA para la proteína S de coronavirus entregada a través de vectores de adenovirus tipo 5 y tipo 26. (de Francisco ALM, 2021)

G. Synovac (China): Vacuna por Virus inactivado. El SARS-CoV-2 se aísla, se expande y luego se hace no infeccioso mediante un tratamiento químico. (de Francisco ALM, 2021)

4.5 Efectividad de las vacunas basadas en DNA recombinante

Resultados de la eficacia de algunas de las vacunas que están aprobadas actualmente para enfrentar la enfermedad causada por COVID-19 que utilizan la estrategia del DNA recombinante.

Cansino: Los resultados del análisis intermedio del ensayo clínico de Fase III, mostraron que la vacuna tiene una eficacia general del 68.83 % para la prevención de todas las infecciones sintomáticas de COVID-19, 14 días después de la vacunación y 65.28 % 28 días después de su aplicación. Adicionalmente, la vacuna Ad5-nCoV tiene una eficacia del 95.47 % para la prevención de enfermedad grave 14 días después de la vacunación y 90.07 %, 28 días después de su aplicación. En la **figura 10** se muestra una comparación de la eficacia tras la vacunación con cansino (Ad5-nCoV) o placebo. (Díaz, J., et al. (2021).

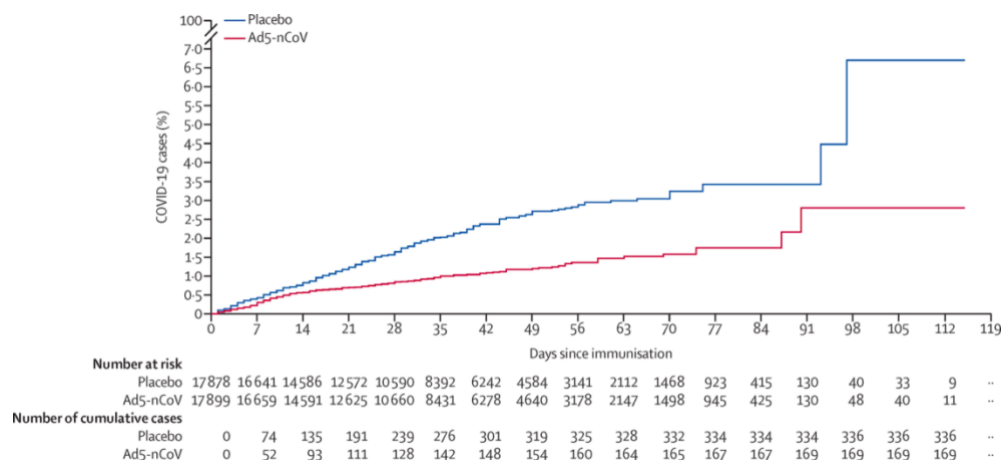


Figura 10. Efectividad de la vacuna Cansino (Ad3-nCoV). Cómo podemos ver en la figura 10 se muestra la efectividad de la vacuna después de un grupo de personas después de ser vacunados con Ad5-nCoV o con placebo. (Tomada de Scott A., 2021)

SputniK V: Nuestros resultados provisionales del ensayo de fase 3 Gam-COVID-Vac muestran que la vacuna tiene una eficacia del 91,6 % (95 % IC 85,6–95,2) contra la COVID-

19 (desde el día 21 después de la primera dosis, el día de recibiendo la segunda dosis). Nuestros resultados también mostraron que la vacuna fue 100 % (IC 95 % 94.4–100) eficaz contra la COVID-19 grave, aunque este fue un resultado secundario, por lo que los resultados son preliminares. La vacuna fue bien tolerada, con 45 (0.3%) de 16 427 participantes en el grupo de la vacuna que informaron eventos adversos graves, todos los cuales se consideraron no relacionados con la vacuna. (Denis Y Logunov, et al. 2021)

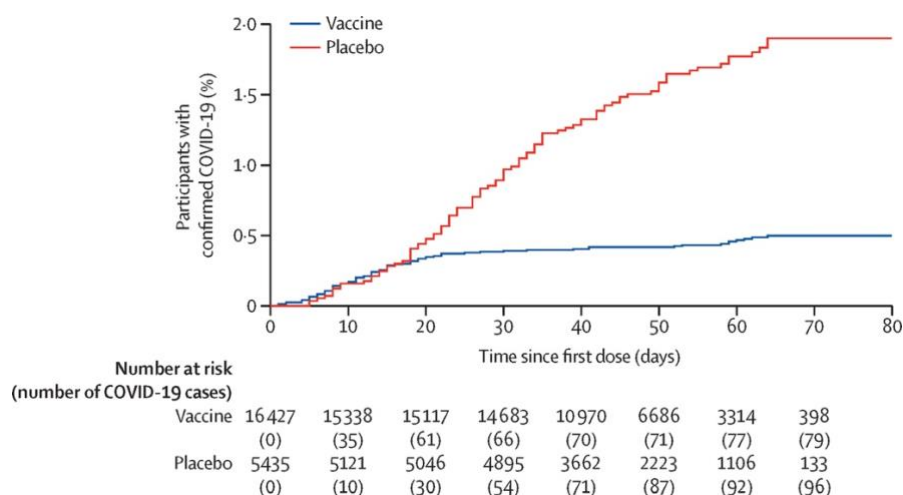


Figura 11. Efectividad de la vacuna Sputnik V. Se muestra la efectividad después de ser vacunados con Sputnik V o placebo. (Tomada de: Denis Y Logunov, et al. 2021)

Oxford / AstraZeneca: La vacuna AZD1222 contra COVID-19 tiene una eficacia del 63.09% contra la infección sintomática del SARS-CoV-2. Los intervalos de dosis más largos dentro del rango de 8 a 12 semanas se asocian con una mayor eficacia de la vacuna. (OMS. 2021c)

Janssen de Johnson & Johnson J&J: La eficacia general de la vacuna fue de 66.9% (IC 95%: 59-73.4%) para prevenir la aparición de COVID-19 moderado a grave al menos 14 días después de la vacunación y un 66.1% (IC 95%: 55-74.8%) de eficacia para prevenir la aparición de COVID-19 moderado a grave al menos 28 días después de la vacunación. También, la vacuna fue 76.7% (IC 95%: 54.6-89.1%) efectiva para prevenir la aparición de

COVID-19 grave al menos 14 días después de la vacunación y un 85.4% (IC 95%: 54.2-96.9%) de eficacia para prevenir la aparición de COVID-19 grave al menos 28 días después de la vacunación. En este momento, no hay datos disponibles para determinar cuánto tiempo brindará protección la vacuna, ni hay evidencia de que la vacuna prevenga la transmisión del SARS-CoV-2 de persona a persona. (Díaz, J., et al. (2021).

Tabla VI. Características de los estudios publicados con resultados de efectividad

Vacuna	Plataforma utilizada	Protección conferida en estudios clínicos	Eficacia contra las variantes	Efectos secundarios	Para quién está recomendada	Efectos secundarios de especial interés
ChAdOx1/ Covishield y Vaxzevria (AstraZeneca/ Oxford)	Vector viral	Entre 63,0% y 78,0% (aumenta con intervalo más largo entre dosis)	Alfa: infección 70,4%; beta: infección: 21,4%; delta: 59,8%; gamma/epsilon/delta: sin datos	Reacciones locales, dolor de cabeza, fatiga, mialgia, fiebre, artralgia y náusea	Mayores de 18 años.	Trombosis venosa cerebral riesgo 5,0 por millón. Casos de debilidad bifacial con parestesias, variantes del síndrome de Guillain-Barré
AD26.COVS.2.S (Janssen-Cilag/Johnson & Johnson)	Vector viral	COVID-19 moderada a grave: 66,9% a 14 días; 66,1% a 28 días; grave a crítica: 76,7% a 14 días; 85,4% a 28 días.	Alfa: enfermedad moderada a grave: 66,1% y enfermedad grave a crítica: 85,4%; beta: enfermedad moderada a grave: 64% y enfermedad grave a crítica: 81%; gamma: eficaz	Reacciones en el sitio de inyección, fatiga, dolor de cabeza, mialgias y fiebre	Mayores de 18 años.	Eventos tromboembólicos y trombocitopenia: asociación causal plausible. Los únicos posibles factores de riesgo identificados son la edad y el sexo
Sputnik V (Gamaleya Research Institute)	Vector viral	91,6%.	Actividad neutralizante contra las variantes alfa, beta, gamma y delta	Síntomas similares al resfriado, reacciones locales, dolor de cabeza	Mayores de 18 años.	No se han descrito eventos adversos graves o de interés.
Ad5-nCoV (CanSino)	Vector viral	65,7% (aún sin datos finales fase 3)	Sin información.	Reacciones en el sitio de inyección, dolor de cabeza, fatiga y fiebre	Mayores de 18 años.	No se han descrito eventos adversos graves o de interés.
BNT162/ Comirnaty Pfizer/BioNTech	RNA mensajero	95,0% (adultos) y 75% en adolescentes (12-15 años)	Alfa: infección: 89,5% y enfermedad grave 100%; beta: infección 75% y enfermedad grave: 100%; delta: 87,9%	Reacciones locales, fatiga, dolor de cabeza, mialgia, escalofríos, artralgia y fiebre	Mayores de 12 años.	Miocarditis en adultos jóvenes después de la segunda dosis. Trombosis venosa cerebral riesgo 4,1 por millón.
Covaxin (Bharat Biotech)	Virus inactivado	73,0% a 81,0%, dos participantes produjeron anticuerpos (aún sin datos finales fase 3)	Anticuerpos neutralizantes contra beta y delta (preimpresión)	Reacciones en el sitio de inyección, dolor de cabeza, fatiga y fiebre	La fase 2 se llevó a cabo en > 12 años y < 65 años.	No se han descrito eventos adversos graves o de interés.

Tabla elaborada con datos de: (Teixeira, 2021)

5 Conclusiones

En la actualidad afortunadamente existen ya varias vacunas aprobadas en distintos países además de que muchas más son candidatos vacunales. Teniendo esto en cuenta debemos comprender que este proceso de desarrollo de vacunas COVID-19 es un conjunto de una buena coordinación entre la investigación, innovación, competencia, apoyo económico y colaboración tanto pública como privada. Gracias a ello es evidente que la velocidad de respuesta ante la enfermedad COVID-19 fue buena debido a estas colaboraciones, al conocimiento previo con el que se contaba del virus SARS-CoV-1 desde el 2002 y la flexibilidad regulatoria también ayudo para el pronto avance y desarrollo, realizando 1 o 2 fases del desarrollo de manera simultánea sin socavar la seguridad de la vacuna.

El uso de las vacunas contra el COVID-19 independientemente del mecanismo de acción, esta; te ayudara a la producción de anticuerpos y siendo así de las formas más alentadoras de contrarrestar a esta enfermedad de procedencia viral.

En algunos de los gráficos de efectividad de las vacunas se puede apreciar la efectividad de vacunas diseñadas a partir de DNA recombinante contra el COVID-19 las cuáles nos evidencian que son seguras y efectivas. Estas cuentan con una buena estabilidad dándole versatilidad de transporte y así mismo pueda llegar a más lugares ya que no requiere medios de transporte tan sofisticados

Las vacunas de DNA ofrecen muchas ventajas sobre las tecnologías de producción de vacunas existentes. Estimulan las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares y, a diferencia de otras, estas no tienen una respuesta inmunitaria al portador, dado que no se utilizan microorganismos vivos, se pueden utilizar en personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas.

6 Referencias bibliográficas

- Aguilar, P. E. (2020). Pruebas diagnósticas para la COVID-19: la importancia del antes y el después. *Centro de Investigación de Infectología*, 1-7. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v20n2/1727-558X-hm-20-02-e1231.pdf>
- Ben, H. H. (2021). Características de SARS-CoV-2 y Covid-19. *nature*, 19(1), 141-154.
- Melian, A. C. (2020). Detección de COVID -19 (SARS-CoV-2) Mediante la Saliva:. 316-320. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v14n3/0718-381X-ijodontos-14-03-316.pdf>
- Aragón-Nogales R, Vargas-Almanza I, Miranda-Novales MG. COVID-19 por SARS-CoV-2: la nueva emergencia de salud. *Rev Mex Pediatr*. 2019;86(6):213-218. <https://doi.org/10.35366/91871>
- Mexico, G. D. (2020). recomendaciones para el tratamiento de la infección por SARS-coV-2, agente causal del covid 19. *covid-19*, 2-7. Obtenido de https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2020/07/Recomendaciones_para_tratamiento_SARS-CoV2.pdf
- 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>
- Li, J., Hui, A., Zhang, X., Yang, Y., Tang, R., Ye, H., Ji, R., Lin, M., Zhu, Z., Türeci, Ö., Lagkadinou, E., Jia, S., Pan, H., Peng, F., Ma, Z., Wu, Z., Guo, X., Shi, Y., Muik, A., ... Zhu, F. (2021). Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 BNT162b1 mRNA vaccine in younger and older Chinese adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 1 study. *Nature Medicine*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094554/#:~:text=Un%20valor%20de%20R0,control%20para%20limitar%20su%20extensi%C3%B3n.>

- Trilla A. (2020). One world, one health: The novel coronavirus COVID-19 epidemic. Un mundo, una salud: la epidemia por el nuevo coronavirus COVID-19. *Medicina clinica*, 154(5), 175–177. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.002>
- Lina Nascimento Fabris Maeda, D., Tian, D., Yu, H., Dar, N., Rajasekaran, V., Meng, S., Mahsoub, H. M., Sooryanarain, H., Wang, B., Lynn Heffron, C., Hassebroek, A., LeRoith, T., Meng, X.-J., & Zeichner, S. L. (n.d.). *Killed whole-genome reduced-bacteria surface-expressed coronavirus fusion peptide vaccines protect against disease in a porcine model*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025622118/-/DCSupplemental>
- Pollet, J., Chen, W.-H., Versteeg, L., Keegan, B., Zhan, B., Wei, J., Liu, Z., Lee, J., Kundu, R., Adhikari, R., Poveda, C., Villar, M. J., de Araujo Leao, A. C., Altieri Rivera, J., Momin, Z., Gillespie, P. M., Kimata, J. T., Strych, U., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2021). SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1901545>
- Rauch, S., Roth, N., Schwendt, K., Fotin-Mleczek, M., Mueller, S. O., & Petsch, B. (2021). mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents. *Npj Vaccines*, 6(1), 57. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00311-w>
- Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A., Cárdenas, V., Shukarev, G., Grinsztejn, B., Goepfert, P. A., Truysers, C., Fennema, H., Spiessens, B., Offergeld, K., Scheper, G., Taylor, K.

- L., Robb, M. L., Treanor, J., Barouch, D. H., Stoddard, J., Ryser, M. F., Marovich, M. A., ... ENSEMBLE Study Group. (2021). Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>.
- Svitkin, Y. v., Cheng, Y. M., Chakraborty, T., Presnyak, V., John, M., & Sonenberg, N. (2017). N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acids Research*, 45(10), 6023–6036. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx135>.
- Zhang, B.-Z., Wang, X., Yuan, S., Li, W., Dou, Y., Poon, V. K.-M., Chan, C. C.-S., Cai, J.-P., Chik, K. K., Tang, K., Chan, C. C.-Y., Hu, Y.-F., Hu, J.-C., Badea, S. R., Gong, H.-R., Lin, X., Chu, H., Li, X., To, K. K.-W., ... Huang, J.-D. (2021). A novel linker-immunodominant site (LIS) vaccine targeting the SARS-CoV-2 spike protein protects against severe COVID-19 in Syrian hamsters. *Emerging Microbes & Infections*, 1–27. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1921621>
- Aguilar, N; Hernández, A; Ibanes, C. (2020). Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 144-146. <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2020/lip203g.pdf>
- Vargas-Lara, A; Schreiber-Vellnagel V; Ochoa-Hein, E; López-Ávila, A. (2020). SARS-CoV-2: una revisión bibliográfica de los temas más relevantes y evolución del conocimiento médico sobre la enfermedad. *Revista NCT*. 186-196. <https://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2020/nt203k.pdf>
- López Monteon, Aracely, Hurtado Melgoza, María de Lourdes, & Ramos Ligonio, Angel. (2013). ¿Qué sabe Ud. acerca de ... las vacunas de ADN?. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(1), 79-81. Recuperado en 18 de julio de 2022, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000100010&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000100010&lng=es&tlng=es)

Galucha, A. (2020). Así infecta el coronavirus. Revista el Pais.
https://elpais.com/elpais/2020/03/06/ciencia/1583515780_532983.html?rel=friso-portada

López Monteon, A., Hurtado Melgoza, M. L., & Ramos Ligonio, A. (2013). ¿Qué sabe Ud. acerca de ... las vacunas de ADN?. Revista Mexicana de ciencias farmaceuticas.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000100010

De Francisco ALM. Nefrología al día. Vacunas SARS-COV2 (2021).
<https://www.nefrologiaaldia.org/366>

Cui, J., Li, F. y Shi, ZL. Origen y evolución de coronavirus patógenos. *Nat Rev Microbiol* 17, 181-192 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

Díaz, J; Pérez, J; Zuñiga, C; Leriche, C; Gaertner, S; Rodríguez, M. 2021. Guía técnica para la aplicación de la vacuna. Recuperado de:
http://vacunacovid.gob.mx/wordpress/wp-content/uploads/2021/06/GTApp_Janssen_24Junio2021.pdf#page=11

Organización Panamericana de la Salud (2020). Fases de desarrollo de una vacuna.
<https://www.paho.org/es/file/64674/download?token=0httZ2Ax>

Confianza en las vacunas latinoamérica (s.f). Fases.
<https://confianzaenlasvacunasla.org/seguridad-y-vacunas/desarrollo/>

Scott A. Halperin, Lingyun Ye, Donna MacKinnon-Cameron, Bruce Smith, Pedro E Cahn, Guillermo M Ruiz-Palacios, et al. Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine

(adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: an international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet, 23 de diciembre de 2021 DOI: 10.1016/S0140-6736 (21) 02753-7 <https://bit.ly/3465HHv>

Rojas D., Gonzáles D. (marzo de 2022). Eficacia y seguridad de la tercera dosis (esquema homólogo o heterólogo) de la vacuna AZD1222 o ChAdOx1 nCoV19 (AstraZeneca) contra la infección por SARS-CoV-2. Unidad de Análisis y Generación de Evidencias en Salud Pública (UNAGESP), Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Recuperado el 25 de junio de 2022 de: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/05/1369440/nt_23_azd1222.pdf

Jerald Sadoff, et al. for the ENSEMBLE Study Group* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19 N Eng J Med April 21, 2021, <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>

Pastrian-Soto, Gabriel. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *Revista internacional de odontoestomatología* , 14 (3), 331-337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>

Amparo T., Genotipia (2020) Coronavirus SARS-CoV-2: estructura, mecanismo de infección y células afectadas. Recuperado el 15 de julio del 2022 de: https://genotipia.com/genetica_medica_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/

Pareja A., Luque J., (2020). Alternativas terapéuticas farmacológicas para COVID-19. Recuperado el 15 de julio del 2022 de: <https://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/download/1216/786?inline=1>

- Organización mundial de la salud (10 agosto 2021a). Enfermedad por coronavirus (COVID-19): Investigación y desarrollo de vacunas. Recuperado el 15 de julio del 2022 de: [https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccine-research-and-development](https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccine-research-and-development)
- Organización mundial de la salud (10 agosto 2021b). Los distintos tipos de vacunas que existen. Recuperado el 15 de julio del 2022 de: <https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
- Organización mundial de la Salud. (10 de febrero 2021c). Recomendaciones provisionales sobre el uso de la vacuna AZD1222 (ChAdOx1-S [recombinante]) contra la COVID-19 desarrollada por la Universidad de Oxford y AstraZeneca. Recuperado el 15 de julio del 2022 de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340943/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-AZD1222-2021.1-spa.pdf>
- Teixeira S., (2021, 15 julio). *Comparación de 9 vacunas contra la COVID-19*. Medscape. Recuperado 9 de septiembre de 2022, de: https://espanol.medscape.com/verarticulo/5906665_2?reg=1&icd=ssl_login_succes_s_220923
- De Francisco ALM. Nefrología al día. Vacunas SARS-COV2 marzo 2021. Recuperado 9 de septiembre de 2022, de: <https://www.nefrologiaaldia.org/366>
- Denis Y Logunov*, Inna V Dolzhikova*, Dmitry V Shcheblyakov, Amir I Tikhvatulin, Olga V Zubkova, Alina S Dzharullaeva, Anna V Kovyrshina, Nadezhda L Lubenets, Daria M Grousova, Alina S Erokhova, et al. Seguridad y eficacia de una vacuna COVID-19 heteróloga de refuerzo primario basada en vectores rAd26 y rAd5: un análisis intermedio de un ensayo controlado aleatorizado de fase 3 en Rusia Recuperado 2 de septiembre de 2022, de: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)

