



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Tesis:

**“DESCRIPCIÓN DE LA RESPUESTA A PÉPTIDOS DERIVADOS DE
LA PROTEÍNA S EN UN MODELO DE CULTIVO 3D DE
CÉLULAS SUSCEPTIBLES A SARS-CoV-2”**

Presenta:

LIC. BT. XALLY GERÓNIMO URTIZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Director de tesis:

DR. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

Profesor-Investigador Titular B

FMVZ-UMSNH

Co-Director de tesis:

DR. DANIEL DURAND HERRERA

Investigador Postdoctoral por México

FMVZ-UMSNH

Morelia, Michoacán, México. mayo 2026.



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Declaración de originalidad

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de Xally Gerónimo Urtiz, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por Xally Gerónimo Urtiz durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección del Dr. Alejandro Bravo Patiño y la Co-Dirección del Dr. Daniel Durand Herrera.

Morelia, Mich., a 16 de febrero de 2026

Lic. Bt. Xally Gerónimo Urtiz

Dr. Alejandro Bravo Patiño

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH

Dedicaroria

A mis padres, Omar Gerónimo Aguilar y Fabiola Urtiz Ceja, por apoyarme en cada meta, por confiar en mí incluso cuando yo dudaba y por hacer posible que hoy esté cumpliendo uno de mis más grandes sueños. Gracias por enseñarme que todo aquello que vale la pena requiere esfuerzo, constancia y disciplina; por impulsarme a superarme cada día y por recordarme siempre que soy capaz de lograr todo lo que me proponga. Este logro lleva su nombre, su esfuerzo, su sacrificio silencioso en cada página y les pertenece tanto como a mí.

A mis abuelos María Luisa Aguilar Ortiz, Sergio Gerónimo Morales, Josefina Ceja Favela y Rodolfo Urtiz Campos, quienes a través de sus enfermedades y los retos que enfrentaron, sembraron en mí la vocación de estudiar. Su fortaleza, amor y ejemplo fueron el motor que orientó mi camino profesional.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección del Dr. Alejandro Bravo Patiño y la codirección del Dr. Daniel Durand Herrera.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología y a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular-CONACYT por las facilidades en las instalaciones y materiales para la realización de este trabajo.

Además, agradecemos la financiación parcial por la CIC-UMSNH 2024-2025. Agradecimiento al apoyo por parte de CONAHCYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONAHCYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular. También al proyecto 317189 para el fortalecimiento de la Infraestructura para el estudio de virus respiratorios, 2022.

Agradecemos el apoyo otorgado a Xally Gerónimo Urtiz que consistió en la Beca Nacional SECICHTI con el número de becario y CVU 1346942, para llevar a cabo este proyecto en el Programa Institucional de Ciencias Biológicas del PNPC.

Agradecemos el apoyo otorgado al Dr. Daniel Durand Herrera que consistió en la Beca Postdoctoral SECICHTI con el número de becario y CVU 694261.

Agradecimientos también a los miembros del comité tutorial al Dr. Marcos Cajero Juárez, Dr. Juan José Valdez Alarcón y Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, por tomarse el tiempo para revisar, mejorar y evaluar el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis Asesores, Dr. Alejandro y Dr. Daniel, por sus consejos, sus experiencias compartidas y por el tiempo dedicado a cada duda, cada experimento y cada nuevo reto. Su guía fue fundamental en este proceso. Gracias por impulsarme a crecer académica y personalmente a lo largo de este proceso. Al Dr. Daniel, por su entrega y disposición incondicional, incluso en jornadas que se extendían hasta altas horas de la noche con tal de acompañar y fortalecer cada experimento. Al Dr. Alejandro, por sus palabras siempre alentadoras y por su confianza. Ambos representan para mí no solo referentes académicos, sino ejemplos de superación, resiliencia y equilibrio; profesionales íntegros que aman lo que hacen y que, al mismo tiempo, construyen con dedicación su vida personal y familiar. Sin duda, son el tipo de personas a quienes aspiro a convertirme.

A mis sinodales, Dra. Rosa Elvira, por su compromiso y por su constante disposición para brindar apoyo y por su iniciativa para encontrar soluciones a cada uno de los experimentos, el Dr. Marcos Cajero y Dr. Juan José, por su disposición, por su tiempo y por el análisis crítico, que contribuyeron a consolidar este trabajo.

A mi hermano menor, Omar Gerónimo Urtiz por acompañarme en cada una de mis etapas y por recordarme, con su presencia y apoyo, que nunca camino sola.

A mi amiga, Ararat Amezcua Arroyo, por su presencia constante, por acompañarme dentro y fuera del laboratorio. Gracias por las risas que hicieron más ligero el camino, por sostenerme en los momentos difíciles y por enseñarme a confiar en mí.

A mis compañeros, Gabriela Medina, Abraham Medina y Sergio Isais, por los consejos compartidos y por las risas que hicieron del laboratorio un espacio más ameno. A mis amigas Alexia, Scarlett, Melisa, Miriam, Ariadna y Jessica por acompañarme a la distancia y celebrar cada logro conmigo.

A mis alumnos, Luis, David, Heza y Mario, por recordarme que siempre existen mejores maneras de compartir lo que sabes y por enseñarme tanto como yo intenté enseñarles.

1. ÍNDICE.

1.	ÍNDICE.....	6
2.	LISTA DE ABREVIACIONES.....	9
3.	RESUMEN.	13
4.	ABSTRACT.....	15
5.	INTRODUCCIÓN.....	17
6.	MARCO TEÓRICO.....	19
6.1	Agente etiológico: clasificación, genoma y estructura del <i>SARS-CoV-2</i>	19
6.2	Replicación del <i>SARS-CoV-2</i> y mecanismos de evasión.	20
6.3	Cuadro clínico del COVID-19.	22
6.4	Modelos de cultivo 2D y cultivo 3D: bases estructurales y relevancia biomimética.	22
6.5	El sistema uPAR/uPA e Integrinas: implicaciones en la inflamación y remodelación tisular.	24
6.6	Generalidades de NFkB.	27
6.7	Mediadores dependientes de NFkB.....	29
7.	ANTECEDENTES.	32
7.1	Citocinas en respuesta a virus respiratorios.	32
7.2	Citocinas e inflamación.	33
7.3	Activación inflamatoria inducida por <i>SARS-CoV-2</i>	33
7.4	Análisis comparativo de cultivos celulares 2D y 3D.....	35
7.5	Caracterización de microtejidos de células mesenquimales.....	37
7.6	Modelos 3D celulares humanos para estudiar la infección por <i>SARS-CoV-2</i>	38
7.7	Estudios de péptidos plasmáticos.	40
7.8	Integración de métodos experimentales y computacionales en el diseño de péptidos sintéticos.....	40
7.8.1	Importancia de la evaluación de propiedades fisicoquímicas en péptidos sintéticos.	41
8.	JUSTIFICACIÓN.....	43
9.	HIPÓTESIS.....	44
10.	OBJETIVO GENERAL.....	45
11.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
12.	METODOLOGÍA.....	46
12.1	Selección de células para la elaboración de cultivos 3D.....	46
12.2	Elaboración de micromoldes de agarosa para el cultivo en 3D.....	46
12.3	Elaboración de cultivos 3D de células susceptibles a la infección por <i>SARS-CoV-2</i>	46

12.4	Caracterización de cultivos 3D de células susceptibles a <i>SARS-CoV-2</i> .	47
12.4.1	Reversión morfológica y reorganización celular de cultivos 3D.	47
12.4.2	Histología de cultivos 3D.	47
12.4.3	Liberación de ADN celular.	48
12.4.4	Prueba metabólica de cultivos 3D.	49
12.5	Péptidos.	50
12.6	Determinación de la expresión de citocinas y moléculas de adhesión celular en cultivos 3D.	51
12.6.2	Exposición de cultivos 3D a péptidos virales y LPS.	51
12.6.3	Extracción de ARN de cultivos 3D.	51
12.6.4	Retrotranscripción.	52
12.6.5	Diseño de oligonucleótidos de los genes de interés.	52
12.6.6	Estandarización de la temperatura de oligonucleótidos por gradiente.	53
12.6.7	Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR.	55
13.	RESULTADOS.	58
13.1	Caracterización morfológica de cultivos 2D de células susceptibles a <i>SARS-CoV-2</i> .	58
13.2	Elaboración de micromoldes de agarosa y formación de cultivos 3D.	59
13.3	Caracterización de cultivos 3D de A549.	62
13.3.1	Reversión morfológica y reorganización celular de cultivos 3D.	62
13.3.2	Estandarización de densidad celular de siembra en micromoldes para cultivos 3D de A549.	63
13.3.3	Análisis de péptidos <i>in silico</i> .	64
13.3.4	Extracción de ARN de cultivos 3D tras la estimulación con péptidos virales y estandarización de la temperatura de oligonucleótidos.	67
13.3.5	Integridad tridimensional de A549 tras la estimulación con péptidos virales.	70
11.3.5.1	Histología.	70
11.3.5.2	Expresión de moléculas asociadas a la adhesión celular en cultivos 3D mediante qPCR.	71
13.3.6	Viabilidad tisular, metabolismo y proliferación celular.	72
13.3.6.1	Liberación de ADN total.	72
13.3.6.2	Proliferación celular/viabilidad.	74
13.3.6.3	Expresión génica de marcadores de proliferación y cohesión celular mediante qPCR.	75
13.4	Determinación de la respuesta inflamatoria de cultivos 3D de A549 tras su exposición a péptidos derivados de la proteína S.	77
14.	Discusión.	82

15. Conclusión.....	90
16. BIBLIOGRAFÍA.....	91
17. ANEXOS.....	108
Anexo 1. Protocolos de fijación, deshidratación, inclusión en parafina y tinción de cultivos 3D	108
Anexo 2. Composición de las mezclas de reacción para la síntesis de ADNc.	110
Anexo 3. Elección de oligonucleótidos para su síntesis.	111
Anexo 4. Diseño de placas RT-qPCR	114

2. LISTA DE ABREVIACIONES.

ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2.
ADM	Actividad deshidrogenasa mitocondrial.
ALO	Organoides alveolares pulmonares.
ARDS	Síndrome distrés respiratorio agudo.
ARN / RNA	Ácido ribonucleico.
AT1/AT2	Neumocitos alveolares tipo 1/tipo2.
ATCC	Colección Americana de Tipo de Cultivos.
AWO	Organoides de vías respiratorias.
BAFF-R	Receptor del factor activador de células B.
BCO	Organoides bronquiales.
BepiPred	Algoritmo de predicción de posibles epítomos de células B lineales.
CCK-8	Kit de conteo celular-8.
CCL-2 (MCP-1)	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
CD	Cluster de diferenciación.
CO ₂	Dióxido de carbono.
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019.
CXCL8 (IL-8)	Quimiocina ligando C-X-C 8/Interleucina-8
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DPP4	Dipeptidil-peptidasa-4
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares.
Expasy	Portal Suizo de Recursos Bioinformáticos.
FAK	Cinasa de adhesión focal.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos.
GLUT-2/GLUT-4	Transportadores de glucosa tipo 2 y tipo 4.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol.
HE	Hematoxilina-eosina

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
hPSC	Células madre pluripotentes humanas.
HRV	Rinovirus humano.
HSAEpCs	Células epiteliales primarias de vía aérea humana.
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal.
IEDB	Base de datos de Inmuno péptidos.
IFNAR	Receptor de interferón tipo I.
IFN- α / IFN- β / IFN- γ / IFN- λ	Interferones alfa, beta gamma y lambda.
IKK	Complejo cinasa de I κ B.
IL-6	Interleucina-6
InPeps	Péptidos intracelulares.
IOS	Organoides intestinales.
IRAK	Quinasas asociadas al receptor de interleucina-1.
IRF	Factor regulador de interferón.
JAK-STAT	Vía Janus quinasa / transductor de señal y activador de la transcripción.
KOS	Organoides renales.
LPS	Lipopolisacárido, componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas.
LT β R	Receptor de linfotoxina beta.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos.
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular.
MEM	Medio mínimo esencial.
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio.
MHC I / MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I / II.
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos.
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular.
MT	Microtejidos.
NF κ B	Factor nuclear kappa B.

NIK	Quinasa inductora de NFkB.
NLR	Receptores tipo NOD.
NSPs	Proteínas no estructurales.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORF	Marco abierto de lectura.
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación.
PCR / qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa / PCR en tiempo real.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDMS	Polidimetilsiloxano.
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinasa / proteína quinasa B.
PLpro	Proteasa tipo papaína.
ProtParam	Herramienta que calcula varias propiedades físico-químicas que se pueden deducir de una secuencia de proteínas.
PRRS	Receptores de reconocimiento de patrones.
PRSSV	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
PRSSV	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
RANK	Receptor activador del factor nuclear kB.
RANTES	Quimiocina regulada por activación normal de células T.
RHD	Dominio homólogo Rel.
RT-qPCR	PCR en tiempo real con transcriptasa reversa.
SARS-CoV / SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo / Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo.
scuPA / tc-UPA	uPA de cadena simple / uPA de doble cadena.
suPAR	Receptor soluble del activador de plasminógeno tipo uroquinasa.
TLR	Receptor tipo Toll.
TMPRSS2	Serina-proteasa transmembrana de tipo 2.
TMPRSS2	Serina-proteasa transmembrana tipo 2.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
uPA	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa.

uPAR	Receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
WHO	Organización Mundial de la Salud.
Wnt	Vía de señalización Wingless-related integration site.
β-CoV	Betacoronavirus.

3. RESUMEN.

La pandemia de COVID-19, causada por el virus *SARS-CoV-2*, ha provocado más de 7 millones de muertes a nivel mundial. El virus SARS-CoV-2 posee 5 proteínas estructurales que interactúan con receptores como ACE2 o InPeps del hospedero para ingresar a las células y 16 proteínas no estructurales (NSPs) que le permiten evadir la respuesta inmunológica. Estas interacciones pueden desencadenar una respuesta inflamatoria que pueden ir acompañadas de respuestas inmunitarias epiteliales innatas. Las células epiteliales pulmonares detectan directamente los patógenos y responden defensivamente, proporcionando barreras protectoras esenciales. Sin embargo, el estudio del virus en tejidos pulmonares y extrapulmonares tiene limitaciones éticas y costos elevados. Por ello, los modelos tridimensionales (3D) de cultivo celular representan una alternativa eficiente y reproducible, al imitar la arquitectura tisular y las interacciones célula-célula-matriz extracelular. Objetivo: generar y describir el comportamiento morfogénico y la expresión génica de cultivos 3D de células epiteliales pulmonares y células de colon después del tratamiento con péptidos virales. Metodología: los cultivos 3D se generaron utilizando la técnica en hidrogeles con moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) e incubados a 37.5°C y 5% de CO₂ durante 7-14 días. La caracterización de los cultivos 3D incluyó análisis histológicos, cuantificación de ADN liberado al medio y determinación de la actividad metabólica. Solo los cultivos biomiméticos 3D de células epiteliales pulmonares se utilizaron para analizar la respuesta inflamatoria inducida por péptidos sintéticos derivados de la proteína espiga (S) del virus *SARS-CoV-2*. Grupos experimentales: control sin estímulo (C), estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con péptidos (PEP). La respuesta inflamatoria se determinó mediante qPCR de las citocinas (*IL-6* e *IFN-β*), quimiocinas (*IL-8* y *CCL-2*), marcadores asociados a inflamación (*NF-kB1*), señalización y mantenimiento tisular (*PCNA*, *Integrin-α*, *β-catenina*, *uPA* and *uPAR*). Resultados: los cultivos 3D de células A549, derivadas de epitelio alveolar humano tipo II, formaron agregados compactos, presentando baja liberación de ADN y alta viabilidad hasta 48 h posteriores a la estimulación con péptidos solubles y antigénicos (derivados de la proteína S) de baja citotoxicidad. Por el contrario, las células de adenocarcinoma de colon Caco-2 no desarrollaron cultivos 3D. A las 24 h se observó una mayor expresión de *IL-6*, *IL-8*, *CCL-2*, *PCNA*, *IFN-β*, *Integrin-α* y *uPAR*, junto con un incremento en la expresión de *NF-kB1*, probablemente por el heterodímero (p50/p65).

A las 48 h, la expresión génica se mantuvo cercana al control sin estímulo, con excepción de la *Integrina- α* y *uPA*. Así mismo, el mantenimiento de los niveles de expresión de β -*Catenina*, la persistencia de la expresión *Integrina- α* y el aumento en la expresión de *uPA* a las 48 h se asociaron con la conservación de la organización celular en el modelo tridimensional. En conjunto, estos resultados demostraron la modulación de la respuesta epitelial en un modelo 3D frente a péptidos virales.

Palabras Clave: COVID 19, Virus, Muerte, Enfermedad.

4. ABSTRACT.

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by *SARS-CoV-2* has resulted in more than seven million deaths around worldwide. SARS-CoV-2 virus contains five structural proteins that interact with host receptors, such as ACE2 and InPeps, to facilitate viral entry, as well as sixteen non-structural proteins (NSPs) that contribute to evasion of host immune mechanisms. These relationships can trigger inflammatory responses that can be accompanied by innate epithelial immune responses. Pulmonary epithelial cells directly sense pathogens and respond defensively providing essential protective barriers. However, studying SARS-CoV-2 in pulmonary and extrapulmonary tissues have ethical and economic limitations. Therefore, three-dimensional (3D) cell culture models represent an efficient and reproducible alternative, as they better mimic tissue architecture and cell-cell-extracellular matrix interactions. Objective: Generate and describe morphogenic behavior and gene expression of 3D culture of pulmonary epithelial cells and colon cells after treatment with viral peptides. Methodology: 3D cultures were generated using hidrogel based techniques with polydimethylsiloxane molds and incubated at 37.5 °C and 5% CO₂ for 7-14 days. Characterization of 3D cultures included histological analysis, extracellular DNA release quantification and metabolic activity assays. Only 3D biomimetic culture model pulmonary epithelial cells were used to analyze the inflammatory response induced by spike (S) protein-derived synthetic peptides derived from *SARS-CoV-2* virus. Experimental groups: control without stimulation (C), stimulated with lipopolysaccharide (LPS), stimulated with peptides (PEP). The inflammatory response was assessed by qPCR of cytokines (*IL-6* and *IFN-β*), chemokines (*IL-8* and *CCL-2*), and markers related to inflammation (*NF-κB1*), signaling, and tissue maintenance (*PCNA*, *Integrin-α*, *β-catenina*, *uPA* and *uPAR*). Results: A549 3D cultures, derived from human type II alveolar epithelium, formed compact aggregates, exhibiting low DNA release and high viability up to 48 h after stimulation with low cytotoxicity soluble, antigenic peptides derives of protein S. Conversely, colon adenocarcinoma cells CaCo-2 did not develop 3D cultures. At 24 h, A549 3D cultures exhibited increased expression of *IL-6*, *IL-8*, *CCL-2*, *PCNA*, *IFN-β*, *Integrin-α*, and *uPAR* were observed, together with an increase in *NF-κB1* expression, likely involving the p50/p65 heterodimer. At 48 h, gene expression levels were comparable to those of unstimulated controls, except for *Integrin-α* levels. Likewise, the maintenance of *β-catenina* expression

levels, the persistence of *integrin- α* expression, and increased *uPA* expression at 48 h were associated with the preservation of cellular organization within the 3D model. Collectively, these findings showed modulation of epithelial response to viral peptides in a 3D system.

5. INTRODUCCIÓN.

El coronavirus tipo dos del síndrome respiratorio agudo severo (*SARS-CoV-2*) está asociado a la enfermedad por coronavirus (COVID-19), la cual, aunque en menor grado, continúa siendo una enfermedad que afecta la salud pública mundial desde su aparición en Wuhan, China, a finales del 2019, hasta la fecha. De acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta enero del 2026, se han notificado aproximadamente 779,102,516 casos confirmados y 7,110,188 defunciones en todo el mundo, lo que subraya la persistencia del virus y su circulación sostenida a escala global (WHO, 2026a). Estos números reflejan únicamente los casos confirmados, mientras que estimaciones basadas en exceso de mortalidad sugieren que la carga real de muertes directas e indirectas asociadas a la pandemia podría ser mucho mayor, alcanzando millones de fallecimientos cuando se consideran factores como la saturación de sistemas de salud y el subregistro de defunciones. Desde su irrupción, el *SARS-CoV-2* ha experimentado una continua evolución genética, dando lugar a múltiples variantes con mutaciones que pueden modificar su transmisibilidad, patogenicidad y capacidad de evadir la respuesta inmune. La OMS clasifica estas variantes en función de su impacto en la salud pública, que incluyen la variante Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529), junto con sus sublinajes que han dominado la circulación global en distintos periodos, lo que enfatiza la importancia de la vigilancia epidemiológica molecular continua (WHO, 2026b).

Los efectos de la pandemia también son marcados en términos sociales y económicos, provocando interrupciones en servicios esenciales y exacerbando desigualdades preexistentes, contribuyendo a pérdidas económicas y retrocesos en indicadores de bienestar (Decerf *et al.*, 2024). Este impacto global coloca a la COVID-19 entre las pandemias más significativas de la historia moderna, no solo por el número de casos y muertes, sino por sus consecuencias duraderas en la salud pública, economía y sociedad.

Clínicamente, la COVID-19 presenta desde cuadros asintomáticos hasta enfermedad grave, complicaciones a largo plazo y síntomas persistentes en diversos órganos del cuerpo, incluyendo el intestino, los pulmones, los riñones, el endotelio, el sistema nervioso y el tejido óseo, entre otros. En los casos severos, uno de los eventos determinantes es la desregulación

de la respuesta inflamatoria, conocida como “tormenta de citocinas”. En este contexto, el epitelio constituye una de las principales barreras frente a agentes infecciosos, desempeñando un papel en la detección de patógenos y en la activación de respuestas inflamatorias. Diversas investigaciones demuestran que componentes estructurales del *SARS-CoV-2*, especialmente la proteína S, puede inducir respuestas incluso en ausencia de replicación viral, lo que sugiere que regiones específicas de esta proteína podrían contribuir al microambiente inflamatorio observado en la enfermedad. Estas respuestas incluyen la activación de vías de señalización celular y la producción de citocinas, quimiocinas y marcadores de daño tisular que participan en la regulación del microambiente epitelial o en la progresión de la inflamación (Khan *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022).

Para abordar estas interrogantes, los científicos han trabajado arduamente para entender las causas de la gravedad de la enfermedad COVID-19 mediante estudios clínicos, líneas celulares inmortalizadas, modelos de ratones transgénicos que expresan el receptor ACE2 humano y cultivos tridimensionales; sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos detallados que determinan la gravedad de la enfermedad son desconocidos (Jamison *et al.*, 2022; Lam Cabanillas *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022; Moscoso-Mujica *et al.*, 2022; Qiao *et al.*, 2022; Zhang & An, 2007).

En este sentido, existe la necesidad de desarrollar modelos biomiméticos eficientes, reproducibles y de menor costo que permitan estudiar de manera controlada los mecanismos de patogenicidad de virus respiratorios, así como complementar o sustituir el uso de modelos animales. Por ello, en este estudio se evaluará un modelo 3D biomimético de células susceptibles a *SARS-CoV-2* generado en micromoldes de agarosa obtenidos a partir de geometrías establecidas mediante moldes de polidimetilsiloxano (PDMS), para el estudio de la respuesta a péptidos derivados de la proteína spike (S) del virus *SARS-CoV-2*, con el objetivo de comprender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regulación del microambiente epitelial (Achilli *et al.*, 2012; Durand-Herrera *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020; Maury *et al.*, 2021).

6. MARCO TEÓRICO.

6.1 Agente etiológico: clasificación, genoma y estructura del *SARS-CoV-2*.

El coronavirus tipo dos del síndrome respiratorio agudo severo (*SARS-CoV-2*) es un virus de ARN monocatenario de polaridad positiva, pertenece a la familia *Coronaviridae* del género *Betacoronavirus* (β -CoV), subfamilia *Coronavirinae*, subgénero *Sarbecovirus* identificado por primera vez en Wuhan, China a finales del año 2019. El *SARS-CoV-2* es un *Betacoronavirus* por el aspecto de sus viriones al microscopio electrónico, esférico con proyecciones de superficie que forman sus proteínas. Este virus tiene una similitud del 80% con el CoV-1 y un 96.2 % con el CoV del murciélago (RaTG13). A lo largo del tiempo se ha descubierto que 7 coronavirus causan infección en humanos, los cuales incluyen el alfa coronavirus (α -CoV) como HCoV-229E y HCoV-NL63 que causan resfriado común, y β -CoV como HCoV-HKU1 que causa neumonía leve, HCoV-OC43 que causa resfriado común, SARS-CoV, el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) que causan neumonía grave y *SARS-CoV-2*, que causa la COVID-19 y puede ser asintomático como causar neumonía grave (Antezana-Llaveta & Arandia-Guzmán, 2020; Kesika *et al.*, 2024).

El genoma del *SARS-CoV-2* codifica para 16 proteínas no estructurales (NSPs) y 5 proteínas estructurales, las cuales son responsables de la replicación viral y otras proteínas accesorias, como ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10, que son responsables de la patogénesis viral. Las proteínas estructurales del virus comprenden la glucoproteína espiga (proteína S), que a su vez se subdivide en las subunidades S1 y S2; la proteína de envoltura (proteína E); la proteína de membrana (proteína M); la proteína de nucleocápside (proteína N) y la hemaglutinina esterasa (proteína HE), tal como se muestra en la Fig. 1. Entre estas, las proteínas de superficie S, M y E presentan regiones altamente antigénicas, las cuales interactúan con componentes del sistema inmunológico del hospedero. En particular, la proteína S se caracteriza por su papel en la interacción con receptores del hospedero y en la activación de respuestas celulares (Antezana Llaveta & Arandia-Guzmán, 2020; Latifi-Pupovci, 2022; Kesika *et al.*, 2024).

Familia: *Coronaviridae*

Subfamilia: *Coronavirinae*

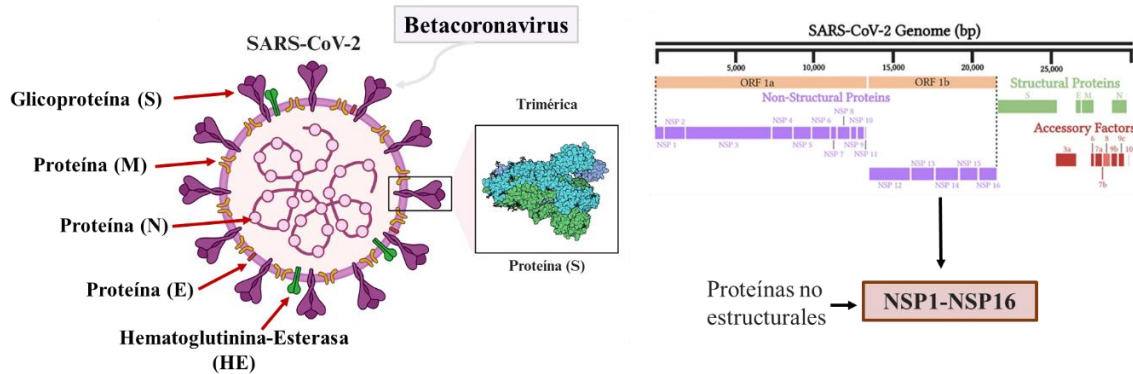


Figura 1. Clasificación, genoma y estructura del *SARS-CoV-2*. La imagen ilustra la conformación trimérica de la proteína S y la organización del genoma viral, destacando las proteínas no estructurales (NSP1-NSP16), estructurales y accesorias, Modificado de Jamison *et al.* (2022).

6.2 Replicación del *SARS-CoV-2* y mecanismos de evasión.

Este virus utiliza diversas vías de internalización, como la vía endocítica, donde la Cathepsina L endolisosómica facilita la fusión del virus con la membrana plasmática y la formación del endosoma; después el virus se desensambla y el genoma viral se traduce mediante los ribosomas del hospedero. También puede utilizar la vía no endosómica, que aumenta los niveles de Furina, una proteasa de tipo 1, que se une a la membrana de los receptores pro-proteína convertasa Subtilisina/Kexina participando en la escisión de la proteína S, que junto con el correceptor proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) facilitan el ingreso de la nucleocápside viral a la célula del hospedero (Jamison *et al.*, 2022; Lam Cabanillas *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022).

El virus evade el sistema inmunológico mediante proteínas accesorias y no estructurales como PLpro, ORF3, ORF6, NSP1, NSP3, NSP13, NSP14 y NSP16. Estas proteínas interfieren con la activación de factores de transcripción esenciales en mecanismos antivirales, que incluyen IRF3, IRF7, AP-1, STAT-1/STAT-2, NFkB, lo que le permite replicarse con garantía y orquestar una respuesta inflamatoria excesiva, conocida como tormenta de citocinas, o una respuesta antiinflamatoria. Estas estrategias favorecen al virus,

provocando enfermedades graves, complicaciones a largo plazo y síntomas persistentes en diversos órganos del cuerpo, incluyendo el intestino, los pulmones, los riñones, el endotelio, el sistema nervioso el tejido óseo, entre otros (Jamison *et al.*, 2022; Lam Cabanillas *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022).

Los principales receptores celulares involucrados en estos mecanismos de ingreso y evasión incluyen los receptores de insulina (RI), el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT-2), la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP4), el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), el receptor ACE2, el TMPRSS2 esencial para la propagación viral, JAK-STAT, MAPK, TLR3, TLR7, TLR8, TLR4 y algunos RLR, NLR e inflamasomas (Lam Cabanillas *et al.*, 2021; Jamison *et al.*, 2022; Latifi-Pupovci, 2022; Moscoso-Mujica *et al.*, 2022).

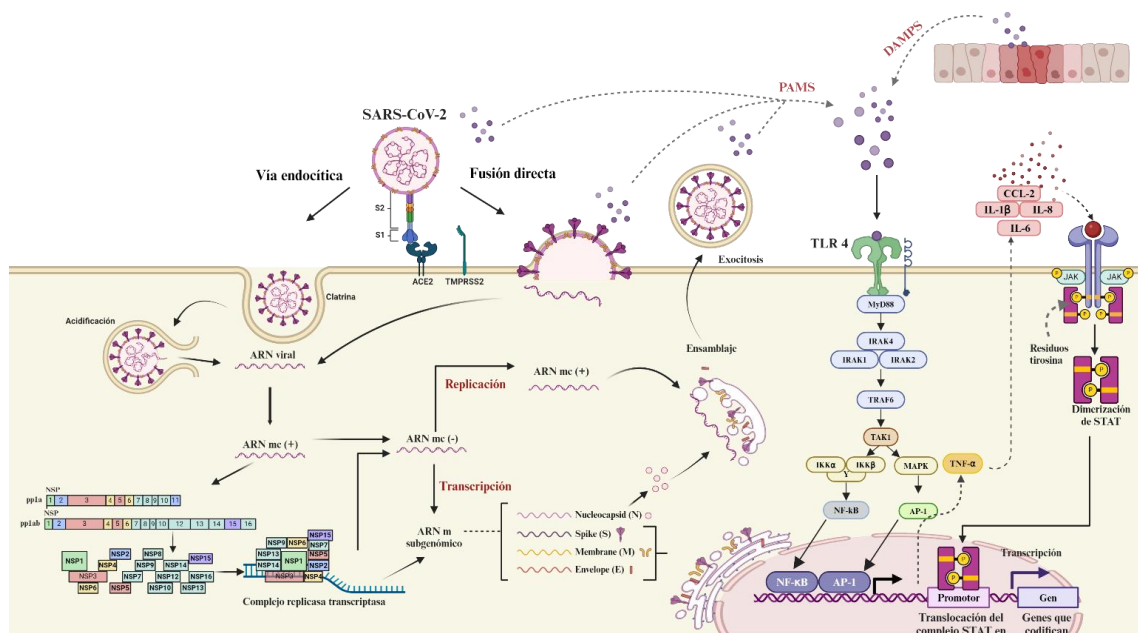


Figura 2. Vías de internalización del *SARS-CoV-2*, receptores y vías inflamatorias involucradas. Se muestran las vías de internalización mediadas por ACE2/TMPRSS2, la replicación viral dependiente de NSPs y la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) o receptores como JAK/STAT que inducen la expresión de mediadores proinflamatorios.

6.3 Cuadro clínico del COVID-19.

Las respuestas inflamatorias en pacientes con COVID-19 grave se caracterizan por niveles elevados de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, tales como, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-2, IFN γ , MCP1/CCL-2, MCP1 α , IP-10 y GM-CSF, lo que refleja un estado de hiperinflamación asociado con daño tisular y mal pronóstico clínico. En contraste, diversos estudios han documentado una respuesta deficiente o nula de interferones tipo I, particularmente en macrófagos y células dendríticas, atribuida a mecanismos de evasión viral mediados por proteínas no estructurales (NSPs) de *SARS-CoV-2*, las cuales interfieren con la activación y señalización de IFN- β (Khan *et al.*, 2021).

Además, se ha demostrado que la proteína S de *SARS-CoV-2*, incluso en ausencia de replicación viral, es capaz de inducir respuestas inflamatorias directas mediante la activación de receptores tipo Toll, principalmente TLR2 y TLR4, desencadenando cascadas de señalización dependientes de NF κ B. Incluso, estos receptores son ampliamente identificados como mediadores clave de la inflamación inducida por la proteína S o por fragmentos derivados de la misma. Sin embargo, las proteínas estructurales del virus, como M, N y E, no activan la vía TLR-2/NF κ B, lo que señala un papel diferencial y específico de la proteína S en la inducción de la respuesta inflamatoria asociada a *SARS-CoV-2* (Khan *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022).

6.4 Modelos de cultivo 2D y cultivo 3D: bases estructurales y relevancia biomimética.

Los microtejidos (MT), organoides, órgano en un chip o esferoides multicelulares son variedades de un modelo tridimensional *in vitro* que permite formar agregados celulares embebidos en una matriz extracelular de manera natural (esferoides), dando lugar a interacciones célula-célula/matriz extracelular, permitiéndoles mantener el fenotipo y la función celular similar a tejidos naturales de origen. Los cultivos 3D se destacan de cultivos en monocapa o experimentos *in vivo* optimizando nutrientes, factores de crecimiento y fármacos, lo que da lugar a una exposición diferencial entre las células que los conforman, a dichos estímulos externos. Los cultivos 3D están compuestos por una matriz extracelular (MEC) nativa que está constituida por una red de polisacáridos como los proteoglicanos,

proteínas estructurales como el colágeno, la elastina, la fibrilina y proteínas especializadas como la fibronectina y laminina. La fibronectina permite la unión y migración de las células mediante motivos RGD (arginina, glicina y ácido aspártico), que facilitan la interacción con integrinas celulares. Por su parte, la elastina contribuye a las propiedades de elasticidad y relajación del tejido, mientras que la laminina es una glucoproteína heterotrimérica que permite la unión entre proteínas, como el colágeno y las integrinas que se encuentran en la superficie celular. Estos componentes de la MEC favorecen el establecimiento de uniones celulares estables y una comunicación intercelular eficiente, tanto yuxtacrina como paracrina, condiciones que reproducen la arquitectura y funcionalidad tisular en contraste con los cultivos bidimensionales, donde las células presentan una disposición uniforme y una exposición homogénea a nutrientes y estímulos externos (Fig. 3) (Takezawa *et al.*, 1993; Gumbiner, 1996; Arvelo & Cotte, 2006; R. Lin & Chang, 2008; Barczyk *et al.*, 2010; Frantz *et al.*, 2010; Calvo García, 2013; Kinney *et al.*, 2014; Mantilla *et al.*, 2015; Charwat & Egger, 2018; González, 2021; Shah *et al.*, 2023; Sánchez, 2024).

Por lo tanto, los cultivos 3D son ampliamente utilizados como modelos biomiméticos, ya que su morfología permite observar distintos estados celulares de proliferación, quiescencia, hipoxia y necrosis. Por esto, los cultivos 3D se utilizan en una variedad de aplicaciones que incluyen el desarrollo y evaluación de nuevos fármacos y vacunas, así como el estudio de interacciones huésped-microorganismo. En particular, los cultivos 3D representan una alternativa frente a la limitada disponibilidad de biopsias pulmonares humanas, cuya obtención está restringida por consideraciones clínicas y éticas, posicionándolos como herramientas experimentales para el estudio de procesos patológicos asociados a enfermedades respiratorias (Achilli *et al.*, 2012; Durand-Herrera *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020; Maury *et al.*, 2021; Pampaloni *et al.*, 2007).

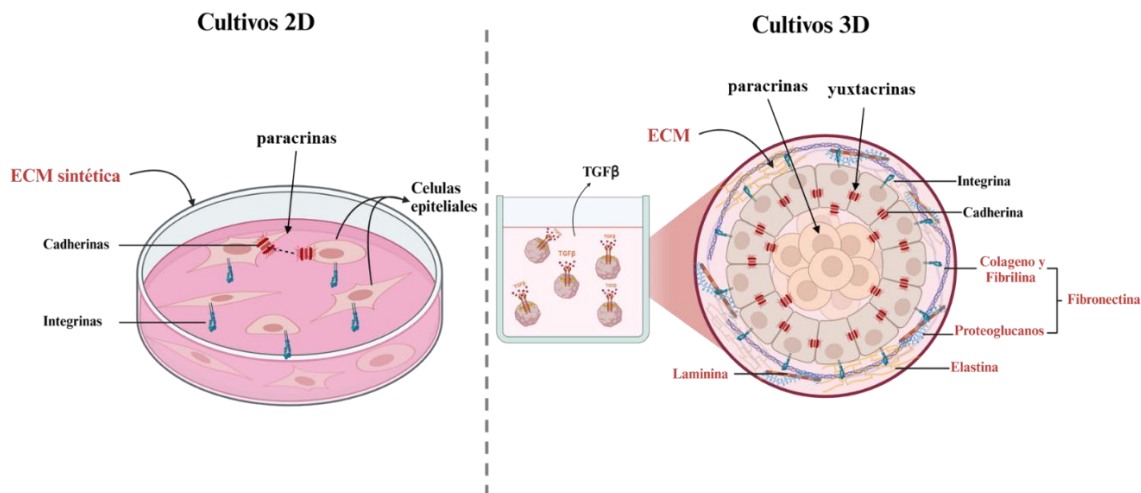


Figura 3. Análisis comparativo de cultivos celulares 2D y 3D. Los cultivos 2D presentan crecimiento en monocapa y exposición homogénea a estímulos por su MEC sintética, mientras que los cultivos 3D forman agregados celulares rodeados por MEC nativa compuesta por colágeno, laminina, fibronectina, elastina y proteoglicanos, favoreciendo interacciones célula-célula-MEC, así como gradientes de oxígeno y nutrientes que reproducen mejor la arquitectura y funcionalidad de los tejidos.

6.5 El sistema uPAR/uPA e Integrinas: implicaciones en la inflamación y remodelación tisular.

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) es una serina-proteasa, de la misma familia que la tripsina, porque contiene una tríada catalítica conformada por serina (Ser), histidina (His) y aspartato (Asp), los cuales cortan de manera específica enlaces peptídicos entre los aminoácidos arginina (Arg) y lisina (Lys). Por ejemplo, uPA corta el plasminógeno en un sitio específico que contiene Arg, convirtiéndolo en plasmina, proceso clave en la activación de metaloproteasas para la degradación de componentes de la matriz extracelular, migración celular e inflamación. Sin embargo, esta enzima es sintetizada y secretada como zimógeno (forma inactiva) de una sola cadena (scuPA); las células como acción normal para evitar la acumulación de fibrina producen la plasmina, la cual escinde (scuPA), promoviendo su conversión a doble cadena (tc-uPA) que es la forma enzimáticamente activa, y capaz de escindir el plasminógeno a plasmina. Así mismo, uPA en su forma activa (tc-uPA) participa en un mecanismo de retroalimentación positiva al favorecer la generación de plasmina, la cual a su vez promueve la conversión de uPA inactivo (scuPA) a su forma activa (tc-uPA). Finalmente, la plasmina activa genes que degradan la MEC, tales como las metaloproteasas,

tal como se muestra en la Fig. 4. Esta forma activa (tc-uPA) está conformada por tres regiones: el dominio amino-terminal, el dominio c-terminal catalíticamente activo, y el dominio kringle que actúa como inhibidor de uPA e integrinas (Mendieta, 2011).

Además, la expresión del gen de uPA es inducible por diversas señales, tales como, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), hormonas esteroides, calicreína, calcitonina, ésteres de forbol, luz ultravioleta, etc. (Mendieta Trejo, 2011).

El receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) anclado a la superficie celular por glicosil-fosfatidil inositol (GPI) está implicado en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Por lo tanto, uPAR es una glicoproteína que regula procesos de actividad proteolítica, migración celular y remodelación tisular, los cuales son esenciales para la cicatrización y la proliferación en la homeostasis celular. Sin embargo, en la patogénesis por COVID-19 niveles altos de uPAR se le ha asociado a la gravedad clínica de la enfermedad y al mal progreso de la enfermedad, sugiriendo que este receptor podría ser un marcador de diversas enfermedades, tales como, cardiovasculares, bacterianas, fibrosis pulmonar, síndrome de distrés agudo (ARDS), COVID-19, Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide, lupus, degeneración macular asociada a la edad (AMD), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y varios tipos de cáncer (Mendieta Trejo, 2011; Iftikhar *et al.*, 2025).

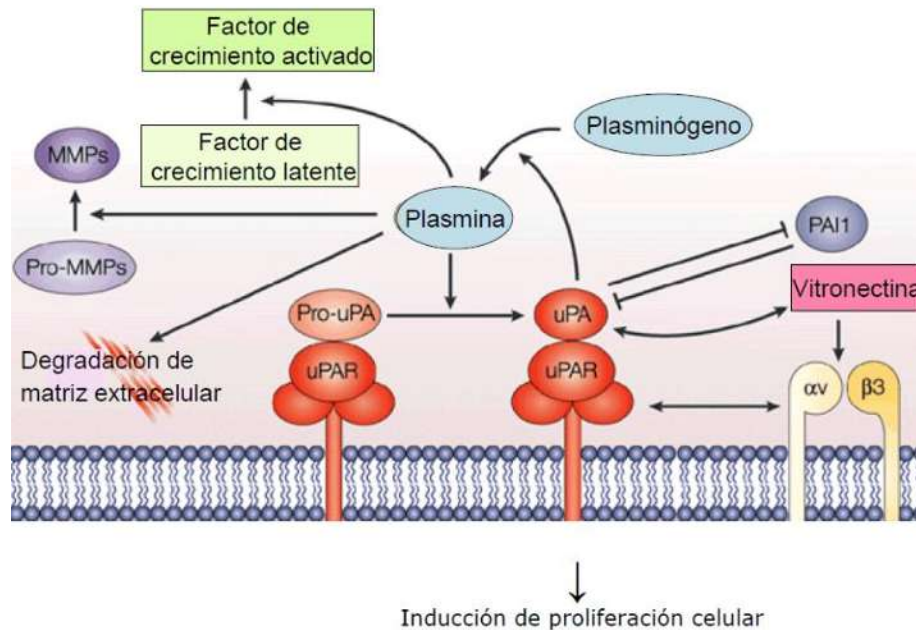


Figura 4. Mecanismos de degradación de la MEC y activación de uPA en la superficie celular. Diversas señales de estrés celular inducen la activación de uPA a su forma activa (tc-uPA), la cual convierte el plasminógeno en plasmina, promoviendo la activación de MMPs, que favorecen la degradación de la MEC (Ramírez & Castillo, 2005).

El uPAR es codificado por el gen *PLAUR*, localizado en el cromosoma 19.q13.31. Este gen contiene siete exones, que codifican para 335 aminoácidos, los cuales sufren modificaciones post-traduccionales incluida la glicosilación para formar el uPAR maduro. Estructuralmente, uPAR está formado por tres dominios homólogos (DI, DII, DIII), DI interactúa colectivamente con su ligando uPA, que convierte el zimógeno plasminógeno en plasmina, una enzima anteriormente descrita como responsable de la degradación de la matriz extracelular. Adicionalmente, uPAR no solo converge en estos mecanismos, sino que interactúa con otros componentes de la MEC, incluidas las integrinas, vitronectinas, el factor de crecimiento epidermal, etc. Estas interacciones no solo regulan la actividad proteolítica de uPA, sino que también liberan factores de crecimiento que interaccionan con receptores tirosina-cinasa o serina-treonina que desencadenan distintas vías de señalización que promueven la migración y adhesión celular para su supervivencia, tales como, MAPK/ERK, PI3K/AKT, MEK y JAK/STAT, las cuales convergen en la translocación y activación de NF κ B que favorece la transcripción de genes de supervivencia, como *IL-6*, *IL-8*, *CCL-2*, *IL-1 β* y genes de proliferación como *PCNA*, descrito en la (Fig. 5). Incluso, un mecanismo

importante de uPAR es su propia escisión proteolítica en GPI, liberando una forma soluble (suPAR) que puede exhibir actividad biológica dependiendo del contexto celular y el co-receptor con el que interactúe (Iftikhar *et al.*, 2025).

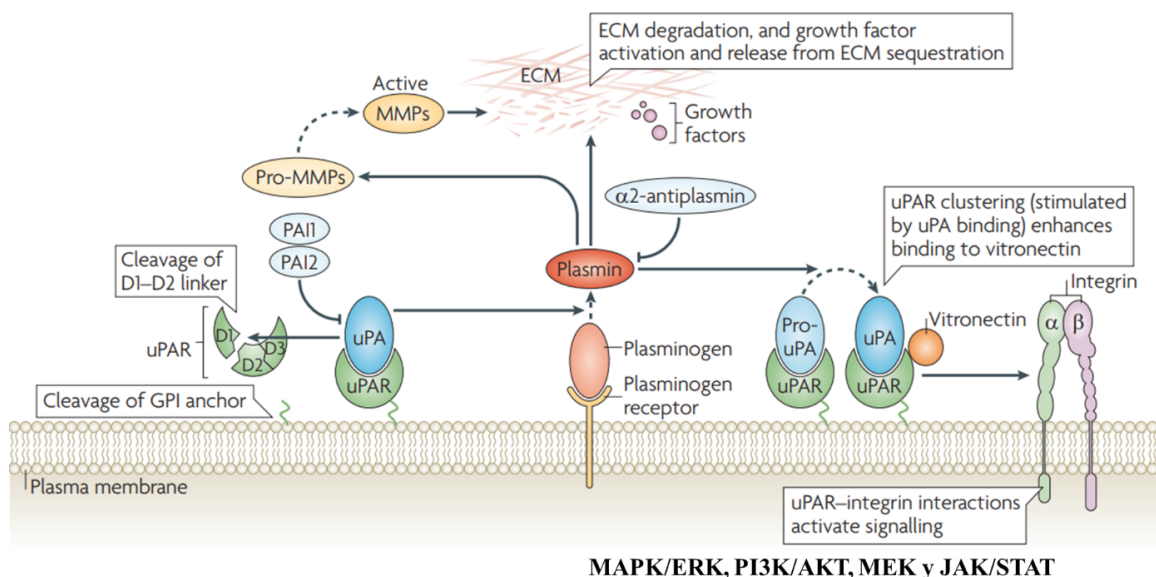


Figura 5. Papel central de uPAR-Integrinas en la transducción de señales. uPAR (D1-D3) promueve la generación de plasmina y la activación de MMPs. Asimismo, uPAR interactúa con integrinas y otros receptores de membrana, integrando señales que activan vías como MAPK/ERK, PI3K/AKT y JAK/STAT, asociadas a proliferación, migración, adhesión y supervivencia celular. Modificado de Iftikhar *et al.*, (2025); Smith & Marshall (2010).

6.6 Generalidades de NFκB.

El factor nuclear κB (NFκB) constituye una familia de factores de transcripción inducibles, debido a su participación en procesos fisiopatológicos y a su relevancia como diana terapéutica. Si bien este factor es multifuncional y se conoce que su actividad no ocurre de manera aislada, sino que coopera con múltiples vías de señalización celular para coordinar respuestas complejas. Estímulos como citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo e infecciones son capaces de inducir su activación. Una vez activado, NFκB regula las distintas vías de señalización que involucran, diferenciación celular, proliferación, supervivencia celular y modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, alteraciones en la regulación de

esta vía se han asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos y cáncer. En este contexto, el NFkB se ha descrito como factor central de las respuestas inmunitarias e inflamatorias por *SARS-CoV-2* y el entendimiento del papel de esta vía podría facilitar el desarrollo de nuevos tratamientos para la enfermedad (T. Liu *et al.*, 2017; Kesika *et al.*, 2024; Kombe Kombe *et al.*, 2024).

En mamíferos, el NFkB está conformado por cinco subunidades: *RelA* (p65), *RelB*, *c-Rel*, *NFkB1*/(P50), derivado de su precursor (*p105*) y *NFkB2* / (p52, derivado de p100). Estas subunidades comparten un dominio conservado denominado dominio homólogo Rel (RHD), responsable de la unión al ADN, la dimerización y la interacción con proteínas inhibitorias (IkB). Las subunidades de NFkB pueden formar diversos homodímeros y heterodímeros, siendo los más relevantes el heterodímero canónico p50/p65, asociado a la inducción de genes proinflamatorios, y el homodímero p50/p50, que carece de dominio transactivador y suele ejercer funciones reguladoras. Por lo tanto, la composición del dímero determina la especificidad transcripcional y la respuesta celular. En condiciones basales, los dímeros de NFkB se encuentran retenidos en el citoplasma en un estado inactivo, asociados a proteínas inhibitorias de la familia IkB (principalmente IkB α , IkB β e IkB ϵ). Estas proteínas enmascaran las señales de localización nuclear (NLS) de NFkB, impidiendo su translocación al núcleo y, por lo tanto, su actividad transcripcional (Holden *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2021; Kombe Kombe *et al.*, 2024; Kesika *et al.*, 2024).

La vía canónica de NFkB es activada por una amplia variedad de estímulos, incluyendo citocinas proinflamatorias, PAMs y DAMPs. En el contexto de la inmunidad innata, muchos de estos estímulos son reconocidos por receptores tipo Toll (TLRs), los cuales actúan como sensores de peligro en la membrana plasmática o en compartimentos endosomales. Tras la activación de TLRs, se produce el reclutamiento de proteínas adaptadoras con dominio TIR, principalmente MyD88 y, en el caso de TLR2 y TLR4, el adaptador TIRAP/MAL. Estas proteínas permiten la asociación secuencial de quinasas de tipo IRAK (IL-1 receptor asociado a quinasas), en particular IRAK1 e IRAK4, cuya activación conduce al reclutamiento y activación de TRAF6. TRAF6 actúa como una E3 ubiquitina ligasa, catalizando la formación de cadenas poliubiquitina enlazadas por lisina-63 (K63-ubiquitina), las cuales funcionan

como plataformas de señalización. Estas cadenas de ubiquitina reclutan y activan TAK1 (TAB1/TAB2), una cinasa que fosforila y activa el complejo IKK (IkB cinasa). El complejo IKK está compuesto por las subunidades catalíticas IKK α e IKK β , y la subunidad NEMO (IKK γ). En la vía canónica IKK β cinasa desempeña el papel predominante, fosforilando a la proteína inhibidora IkB α en residuos específicos de serina, marcándola para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (T. Liu *et al.*, 2017; Q. Guo *et al.*, 2024; Kesika *et al.*, 2024).

Como consecuencia de la degradación de IkB α , el dímero p50/p65 queda liberado, y expone su señal de localización nuclear para translocar al núcleo, donde se une a secuencias κ B en el ADN y regula la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmune, supervivencia y proliferación celular, así como de genes que codifican inhibidores de la propia vía, como IkB α y A20, estableciendo mecanismos de retroalimentación negativa que limitan la duración de la señal. Por otro lado, la vía no canónica de NFkB es activada por un conjunto de estímulos relacionados con el sistema inmune adaptativo, como la activación de (CD40, BAFF-R, LT β R y RANK). Esta vía es independiente de NEMO y dependiente de la estabilización de la quinasa NIK (quinasa inductora de NFkB), la cual converge en la fosforilación de IKK α . En este contexto, IKK α fosforila el precursor p100 (NFkB2), promoviendo su procesamiento proteolítico a p52. Finalmente, el dímero resultante p52/RelB transloca al núcleo (T. Liu *et al.*, 2017; Q. Guo *et al.*, 2024; Kesika *et al.*, 2024).

6.7 Mediadores dependientes de NFkB.

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica que desempeña un papel central en la regulación de la respuesta inflamatoria. IL-6 es producida por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos, en respuesta a estímulos como infecciones, estrés celular, citocinas proinflamatorias, activación de PRRs, como los TLRs (Tanaka *et al.*, 2014). La señalización de IL-6 se inicia mediante su unión al receptor de IL-6 (IL-6R), el cual puede presentarse en dos formas: una forma transmembrana (mIL-6R) y una forma soluble (sIL-6R). La unión de IL-6 a cualquiera de estas formas permite la asociación con la glicoproteína señalizadora gp130, dando lugar a la activación de cascadas intracelulares, principalmente JAK-STAT3,

así como MAPK/ERK y PI3K/AKT. A través de estos mecanismos, IL-6 regula la expresión de genes involucrados en inflamación, supervivencia celular, proliferación y diferenciación. La activación persistente o desregulada de esta citocina se asocia con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, trastornos inmunes, fibrosis y procesos tumorales. En patologías respiratorias y en la enfermedad por *SARS-CoV-2*, niveles elevados de IL-6 son asociados a la severidad clínica, reflejando su papel como amplificador de la inflamación cuando interactúa con otros componentes del sistema inmune (Lokau *et al.*, 2019; Gubernatorova *et al.*, 2020).

La interleucina-8 (IL-8), también conocida como CXCL8, es una quimiocina proinflamatoria perteneciente a la familia de las quimiocinas CXC, con funciones centrales en el reclutamiento y activación de neutrófilos. Es secretada por diversos tipos celulares, incluyendo macrófagos, células endoteliales y epiteliales, en respuesta a estímulos inflamatorios y estrés tisular. La IL-8 actúa principalmente al unirse a los receptores de quimiocinas CXCR1 y CXCR2, acoplados a proteínas G, presentes en neutrófilos y leucocitos. Esta capacidad de dirigir el tráfico de neutrófilos hace de IL-8 un mediador clave en la respuesta inflamatoria aguda, facilitando la eliminación de patógenos y la resolución de daño tisular. Además de su función quimiotáctica, IL-8 se ha asociado a la angiogénesis, la proliferación celular y la modulación de la respuesta inmunitaria, con efectos que dependen del contexto y el microambiente. En modelos de enfermedades respiratorias, incluidos mecanismos virales como *SARS-CoV-2*, niveles elevados de IL-8 en el suero y en fluidos respiratorios se han asociado con mayor gravedad clínica, correlacionándose con la presencia de neutrófilos, daño alveolar y disfunción pulmonar (Waugh & Wilson, 2008; Chen *et al.*, 2020; Cambier *et al.*, 2023).

La CCL-2, también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos-1, es una quimiocina proinflamatoria perteneciente a la familia CC, cuya función principal es el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células dendríticas hacia sitios de inflamación o daño tisular. Es producida por diversos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, en respuesta a estímulos inflamatorios y estrés celular. CCL-2 interactúa principalmente a través del receptor CCR2, desempeñando un papel clave en la

iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria, así como en la comunicación temprana entre el tejido afectado y el sistema inmune (Gschwandtner *et al.*, 2019; Z. Lin *et al.*, 2023; Yoshimura *et al.*, 2023)

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína nuclear que forma un homotrímero en forma de anillo que rodea el ADN de doble cadena. Esta estructura le permite actuar como un anillo deslizante, estabilizando el complejo de replicación y sirviendo como plataforma de interacción para múltiples proteínas involucradas en la síntesis y reparación del ADN. PCNA se localiza predominantemente en el núcleo durante la fase S del ciclo celular, aunque su expresión también suele presentarse en células que activan programas de reparación genómica en respuesta a estrés o daño leve. En términos funcionales, PCNA interactúa con diversas ADN polimerasas, nucleasas y proteínas reguladoras del ciclo celular, coordinando procesos de replicación, reparación y mantenimiento de la estabilidad genómica (Moldovan *et al.*, 2007; Boehm *et al.*, 2016; De March *et al.*, 2017; Slade, 2018; González-Magaña & Blanco, 2020).

La β -Catenina es una proteína multifuncional que participa tanto en la adhesión celular como en la regulación de la expresión génica. A nivel estructural, la β -Catenina se asocia con cadherinas en la membrana plasmática, formando complejos que conectan el citoesqueleto de actina y contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural del epitelio y de las uniones intercelulares. Esta función es esencial para preservar la arquitectura tisular y la estabilidad de los tejidos epiteliales. Además, la β -Catenina actúa como un mediador central de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina. En ausencia de señalización Wnt, β -Catenina es fosforilada por un complejo de degradación y dirigida a la degradación proteosomal. En contraste, cuando la vía Wnt se activa, β -Catenina se estabiliza, se acumula en el citoplasma y transloca al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción para regular genes implicados en la proliferación celular, diferenciación, supervivencia y procesos de reparación tisular. Por ello, β -Catenina es considerada un regulador clave de la homeostasis epitelial y de la respuesta celular frente a daño o estrés (Hansen & Nichols, 2009; MacDonald *et al.*, 2009; Clevers & Nusse, 2012; Kretschmar & Clevers, 2017; Z. Huang *et al.*, 2024).

El interferón beta (IFN- β) es una citocina antiviral perteneciente a la familia de los interferones tipo I. Los interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) son producidos por estímulos virales y activan principalmente las vías de señalización JAK-STAT e IFNAR. El IFN- β es una proteína secretada de bajo peso molecular, producida por diversos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, en respuesta al reconocimiento de PAMPs mediante PRRs, como los TLRs y sensores citosólicos de ARN (Khan *et al.*, 2021; Iftikhar *et al.*, 2025).

La inducción de IFN- β ocurre a través de la activación coordinada de factores de transcripción, entre los que destacan NF κ B, IRF3 e IRF7, los cuales forman un complejo transcripcional que se une al promotor del gen IFNB1, promoviendo su expresión. Una vez secretado, IFN- β ejerce sus efectos antivirales mediante la unión del receptor IFNAR, activando la vía JAK-STAT e induciendo la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) que limitan la replicación viral, inhiben la síntesis de proteínas virales y favorecen un estado antiviral en las células vecinas. IFN- β constituye un mediador clave de la defensa antiviral temprana, actuando como un puente entre el reconocimiento inicial del virus y el establecimiento de mecanismos celulares que restringen su propagación, contribuyendo así al control de infecciones virales en etapas tempranas (Lee & Ashkar, 2018; Acosta *et al.*, 2020; Wittling *et al.*, 2021).

7. ANTECEDENTES.

7.1 Citocinas en respuesta a virus respiratorios.

Diversos autores describen que los virus respiratorios afectan principalmente a las células epiteliales de las vías respiratorias, las cuales constituyen la primera línea de defensa frente a diversos patógenos (Rajan *et al.*, 2013; Sundström *et al.*, 2016; Berg *et al.*, 2018; Hillyer *et al.*, 2018; Xiong *et al.*, 2018; Vorobyeva *et al.*, 2024; Wang & Kim, 2024). Posteriormente, los virus pueden diseminarse a otras células del sistema inmune, como macrófagos sanguíneos y células dendríticas. Esta interacción inicial desencadena respuestas inflamatorias reguladas al alza durante la infección, que incluyen IL-6, IL-8, TNF- α y quimiocinas tales como MIP-1 α , MCP-1 y RANTES. Incluso en algunos casos, la regulación de esta respuesta puede dar lugar a una “tormenta de citocinas”, la cual compromete gravemente la integridad de la barrera alveolar, provocando la inundación de líquido en el

espacio aéreo, disminución en el intercambio gaseoso, insuficiencia respiratoria severa y, eventualmente, la muerte. No obstante, el microambiente celular que albergan las vías respiratorias es un sistema celular complejo que no es completamente comprendido (Do *et al.*, 2022; Vorobyeva *et al.*, 2024).

7.2 Citocinas e inflamación.

Actualmente, se han realizado estudios que permiten tener un panorama de las principales citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias involucradas en la tormenta de citocinas. IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α son citocinas que están asociadas al dolor patológico, enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. IL-1 β induce la expresión de citocinas proinflamatorias, IL-6 se involucra en la regeneración celular y es un marcador clave en enfermedades como la artritis reumatoide y COVID-19, IL-8 atrae neutrófilos y TNF- α es una caquécina. Por su parte, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) suprime la producción de citocinas IL-1, IL-2, IL-6 y TNF- α . IL-10 e IL-4 son citocinas antiinflamatorias que en bajas cantidades indican que existe dolor (Moreno Brea & Micó, 2009; Zhang & An, 2007). Por otro lado, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 están asociadas a una respuesta humoral (Calderon-Rico *et al.*, 2023). La quimiocina CCL-2 es quimioatrayente de monocitos en enfermedades inflamatorias crónicas.

7.3 Activación inflamatoria inducida por SARS-CoV-2.

La subunidad S1 de la proteína S del SARS-CoV-2 induce respuestas proinflamatorias, tales como la expresión de TNF- α ; la aparición de IL-6 e IL-1 β a través de la señalización del receptor tipo Toll 4 (TLR-4). Shirato & Kizaki. (2021), investigaron el papel de los TLR de macrófagos de exudado peritoneal murino y macrófagos derivados de células THP-1 en la inflamación excesiva producida por la proteína pico de SARS-CoV-2. Con ello, determinaron que la señalización de TLR-4 media las respuestas proinflamatorias inducidas por la proteína S1 de SARS-CoV-2. La presencia de un antagonista de TLR-4 o ARNi dirigido hacia el receptor de TLR-4 bloquea las vías de señalización que activan la inflamación, tales como NF- κ B, JNK y c-Jun, con ello los aumentos de TNF- α y las respuestas inflamatorias se suprimen.

Además, Khan *et al.* (2021) demuestran que los TLR 2, TLR4, TLR1/2 y TLR 2/6 están involucrados en la activación de las vías NF-kB, JNK, ERK y STAT3 en diversos modelos epiteliales, como A549 y Calu-3, al exponerlos a los fragmentos S1 y S2 de la proteína S de *SARS-CoV-2*. Dado que estas vías participan en procesos de inflamación y reparación celular, su activación comienza a generar interrogantes sobre su posible papel en el desarrollo de la enfermedad por COVID-19.

En este contexto, Do *et al.* (2022) realizaron una revisión de modelos celulares tridimensionales desarrollados *in vitro*, que minimizan la variabilidad comúnmente vista en otros modelos como cultivos 2D y explantes de tejidos en la inflamación producida por *SARS-CoV-2* (tabla 1). Por lo tanto, el uso de diferentes modelos celulares permite comparar la respuesta inflamatoria y los mecanismos de reparación tisular inducidos por componentes virales como la proteína S.

Tabla 1. Comparación de la respuesta inflamatoria y marcadores de reparación tisular de diferentes modelos para el estudio de *SARS-CoV-2*, modificado de Do *et al.* (2022).

Modelo	Patógeno	Citocinas/expresión de proteínas	Referencias
A549 2D/3D	LPS	IL-6[*] , IL-8[*] , MCP1 (CCL-2)^{***} , uPAR , PCNA	J. Liu <i>et al.</i> (2011); Bhandary <i>et al.</i> (2018); Kiyani <i>et al.</i> (2020).
Explantes pulmonares	<i>SARS-CoV-2</i>	↑ G-CSF^{**} , GM-CSF^{**} , GRO-a^{**} , IFNγ^{**} , IL-6[*] , IL-8[*] , IP-10^{**} , MCP-3^{**} , MIP-1α[*] , PDGF-AA[*] , TNF-α[*] , VEGF[*] ↓ IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1).	Vorobyeva <i>et al.</i> (2024).
Células epiteliales, A549 2D, Macrófagos y Células dendríticas	Proteína S S1/S2	↑ IL-6^{**} , TNF-α^{***} , IL-8 , MCP1 (CCL-2)^{**} , IL-2 , CXCL1^{***} , CXCL2^{***} IFNγ , IP-10 y GMCSF , uPAR	Khan <i>et al.</i> (2021); Huang <i>et al.</i> (2020); Wang <i>et al.</i> (2020); Mehta <i>et al.</i> (2020).
Revisión	<i>SARS-CoV-2</i>	↑ IL-6^{**} , TNF-α^{***} , IL-8 , CCL-2(MCP1)^{**} , IL12 , IL17 , uPAR ↓ IFN-β	Latifi Pupovci, (2022); Iftikhar <i>et al.</i> (2025).

↑ = aumento; ↓ = disminución; los valores en negritas corresponden a proteínas asociadas con punto final clínico en pacientes con COVID-19; los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, respectivamente.

7.4 Análisis comparativo de cultivos celulares 2D y 3D.

La matriz extracelular (MEC) y sus componentes, incluidas las integrinas, cadherinas, cinasas de adhesión focal (FAK), metaloproteinasas y factores de crecimiento, desempeñan un papel fundamental en las interacciones autocrinas, paracrinas, endocrinas y yuxtácrinas, las cuales son esenciales para la comunicación celular. Estas interacciones regulan procesos críticos como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, garantizando la funcionalidad celular. La Tabla 2 ilustra cómo estos componentes participan en los diferentes cultivos celulares, destacando su relevancia en el comportamiento y organización celular.

Tabla 2. Interacciones celulares implicadas en los cultivos celulares.

<i>Aspecto</i>	<i>Descripción</i>	<i>Función</i>	<i>Cultivo 2D</i>	<i>Cultivo 3D</i>	<i>Referencias</i>
<i>Interacción con la MEC</i>	Está compuesta de colágeno, fibronectina y laminina.	Proporciona soporte estructural, regula la adhesión celular y la señalización.	Las células dependen de una superficie adherente recubierta por MEC sintética.	Las integrinas median las uniones célula-MEC nativa y la señalización.	Calvo García, 2013; Charwat & Egger, 2018; Frantz <i>et al.</i> , 2010.
<i>Integrinas</i>	Receptores transmembranales.	Mantienen las uniones célula-MEC nativa y activan vías de señalización celular esenciales para la proliferación, migración y supervivencia celular.	Se unen a la MEC sintética (proteínas como fibronectina y colágeno) mediante enlaces no covalentes, activando vías como FAK y MAPK para la proliferación y migración.	Forman uniones dinámicas en múltiples direcciones, que facilitan el crecimiento tridimensional y la migración celular que simula mejor el tejido natural, permitiendo interacciones más complejas con la MEC.	Barczyk <i>et al.</i> (2010); Shah <i>et al.</i> , 2023.
<i>Cadherinas</i>	Son proteínas de adhesión célula-célula	Regulan la morfogénesis, diferenciación	Median uniones célula-célula por adhesiones	Forman redes 3D de adhesión	Gumbiner, 1996; R.

	dependientes de calcio.	y mantenimiento de la arquitectura tisular.	homofilicas dependiente de calcio, pero estas son limitadas por la disposición plana de las células.	célula-célula, promoviendo la organización tisular y regulando los procesos de diferenciación celular mediante la activación de vías como Wnt/ β -catenina.	Lin & Chang, 2008.
<i>FAK (quinasas de adhesión focal)</i>	Son cinasas que controlan la migración proliferación y supervivencia.	Implicadas en la señalización mediada por adhesión.	Se activan en puntos focales donde las integrinas se unen a la MEC, pero las señales son bidimensionales, y por lo tanto, limitadas.	Regula señales en múltiples direcciones. Además, FAK facilita procesos de mecano transducción que permiten la adaptación celular al microambiente y activan respuesta como la migración colectiva.	Gumbiner, 1996.
<i>Metaloproteinasas (MMPs)</i>	Son enzimas dependientes de calcio y zinc que degradan componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina.	Median la migración celular en respuesta al daño tisular a través de estas enzimas de la MEC, facilitando la remodelación tisular y migración celular.	Las más comunes son MMP-2 y MMP-9, involucradas en procesos limitados de remodelación y migración celular debido a la dependencia de superficies rígidas.	La MMP-1, MMP-2, MMP-9 están implicadas en la degradación y remodelación dinámica de la MEC. Estas enzimas permiten la migración celular, favoreciendo procesos similares al tejido nativo.	Arvelo & Cotte, 2006; Frantz <i>et al.</i> , 2010; Kinney <i>et al.</i> , 2014.
<i>Factores de crecimiento</i>	Proteínas que funcionan mediante la activación de receptores específicos.	Regulan el crecimiento, diferenciación y proliferación celular.	Los más comunes son EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y FGF (Factor de crecimiento de	Los más comunes son VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) y	González, 2021; Sánchez, 2024.

		fibroblastos), que favorecen la proliferación y migración rápida debido a la alta disponibilidad de nutrientes y oxígeno	TGF- β (Factor de crecimiento transformante Beta), que regulan la diferenciación celular, formación de estructuras vasculares y remodelación tisular debido a los gradientes de oxígeno y nutrientes.	
Metabolismo celular	Proceso mediante el cual las células generan energía y biomoléculas necesarias para su función y crecimiento	Generación de energía y biomoléculas necesarias para la célula.	Favorece un metabolismo más glucolítico, con alta dependencia de la fermentación de glucosa. Esto por la difusión uniforme de oxígeno y nutrientes que crean condiciones artificiales.	Induce zonas hipóxicas, promoviendo un metabolismo oxidativo representativo de los tejidos <i>in vivo</i> . R. Lin & Chang, 2008; Takezawa <i>et al.</i> , 1993.

7.5 Caracterización de microtejidos de células mesenquimales.

Durand-Herrera *et al.* (2018), caracterizaron células mesenquimales cultivadas, utilizando la técnica de micromoldes de hidrogeles para la generación de microtejidos (MT). Para esto realizaron pruebas de citotoxicidad y viabilidad celular, que exhibe las células vivas y las células muertas, así como la actividad de deshidrogenasa mitocondrial. Además, análisis morfométricos y cortes histológicos de los MT se realizaron para tener un panorama de la formación de los MT y la formación de la matriz extracelular, núcleos, fibras de colágeno y proteoglicanos característicos de la matriz extracelular.

Así como, un análisis de la liberación de ADN citoplasmático que provee información cuantitativa del posible daño membranar.

Además, diversos autores han caracterizado cultivos 3D celulares mediante pruebas de citotoxicidad y viabilidad, análisis morfométricos y tinciones histoquímicas (R. Lin &

Chang, 2008; Bhowmick *et al.*, 2018; Charwat & Egger, 2018; Joshi *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020).

7.6 Modelos 3D celulares humanos para estudiar la infección por SARS-CoV-2.

Se ha evidenciado que la proteína S de *SARS-CoV-2* causa una inflamación excesiva en distintos órganos que, parece ser consecuencia de la expresión no regulada de un conjunto de citocinas proinflamatorias, las cuales tienen un papel importante en la reparación tisular, la gravedad de la enfermedad y la mortalidad. Sin embargo, aún no queda muy claro qué citocinas y vías de señalización están involucradas en el daño tisular por la exposición a la infección por *SARS-CoV-2*. Guo *et al.* (2020) diseñaron un modelo biomimético de la infección intestinal por *SARS-CoV-2* con células CaCo-2 y HT-29 en un chip, con la finalidad de que el modelo pueda ser utilizado para conocer las características fisiopatológicas y la respuesta inmune del daño en intestino por *SARS-CoV-2*. Encontraron que la lesión endotelial de CACO-2 podría estar implicada en la patogénesis de la coagulopatía o trombosis vascular.

En este mismo sentido, Azzarone *et al.* (2025) mencionan que se ha demostrado la persistencia de la proteína S en circulación o fracciones de la misma en vesículas extracelulares hasta 1 año después de la infección o la vacunación. Además, esta persistencia está asociada a la activación de múltiples receptores inmunológicos, co-receptores y marcadores de daño tisular como TLR2, TLR4, CD147, CD26, CD209, NRP1, lectinas tipo C, HRH1, SIGLEC1, PS, SR-B1, vimentina, ADAM9, MMP9, P53, promoviendo respuestas inflamatorias exacerbadas y por consecuencia la aparición de secuelas clínicas conocidas (PASC) o efectos adversos postvacunales, lo cual sugiere el posible papel patogénico sostenido por la proteína S, incluso más allá del evento infeccioso agudo.

Han *et al.*, (2022) realizaron una revisión de cultivos 3D elaborados para el estudio del efecto de fármacos de la infección por *SARS-CoV-2*. Para esto se utilizaron co-cultivos de células adultas y pluripotenciales de alveolo pulmonar (ALO), vías respiratorias de pulmón (AWO), células adultas bronquiales (BCU), intestino (IOS) y riñón (KOS), tal y como se muestra en la (Tabla 3).

Tabla 3. Modelos 3D celulares humanos generados para el estudio de la infección por *SARS-CoV-2*,
Modificado de Han *et al.* (2022).

MODELOS 3D COVID-19	CÉLULAS	ORIGEN	CO- CULTIVOS	DESCUBRIMIENTOS
CULTIVOS 3D RESPIRATORIOS	ALO (Pulmonar Alveolar)	Adultas	Epiteliales, AT1, AT2	AT2 son permisivas a la infección. hPSC-AT2 respuesta inmune inflamatoria (Señalización NF- κ B). Fármacos que disminuyen el receptor ACE2 (péptido EK1), que afectan la replicación viral (remdesivir), que intervienen en la entrada viral (25HC y VS Mpro). Respuesta mediada por IFN, apoptosis, pérdida de surfactantes, anticuerpos neutralizantes, etc.
		hPSC		
	AWO (Pulmonar Vías Respiratorias)	Adultas	Ciliadas, basales, secretoras	Fármacos que bloquean la infección (GW6471) (señuelo inmunizado ACE2-Fc), inhibidores de biosíntesis de ác. Grasos (Xanthohumol), 5 (tetradecyloxy)- 2-furoic acid y ND-646 . Cambios metabólicos de glicolisis y lípidos. Estudios de mutaciones en la proteína S. Cambios en citocinas y quimiocinas.
CULTIVOS 3D QUE TAMBIÉN EXPRESAN EL RECEPTOR ACE2	BCO (Bronquiales)	Adultas		
	IOS (Intestino)	Adultas	Enterocitos, caliciformes, entero	Fármacos que rescatan el tejido por deterioro de <i>SARS-CoV-2</i> (Remdesivir).
		hPSC	endocrinas, troncales y amplificador as de tránsito	ACE2, dipeptidil-peptidasa-4 y TMPRSS2 regulan la entrada.
	KOS (Riñón)	hPSC	Epitelio tubular	Lesión renal aguda común en COVID-19
				Comparación de la expresión de ACE2 en cultivos 2D y 3D. Destacando la importancia de aplicar los cultivos 3D como modelo para la enfermedad por COVID-19.

7.7 Estudios de péptidos plasmáticos.

Los péptidos derivados de proteínas asociadas a la vasodilatación, la regulación de la presión arterial y la coagulación, como la bradicinina, angiotensina y fibrinógeno respectivamente, participan en procesos esenciales de la regulación fisiológica. Sin embargo, durante procesos inflamatorios, como la infección por *SARS-CoV-2*, la actividad proteolítica de estas proteínas puede incrementarse. Martucci *et al.*, (2023), analizaron péptidos intracelulares (InPeps) detectados en el suero sanguíneo y la orina de pacientes con COVID-19. Estos péptidos se originan a partir de la degradación de proteínas intracelulares y pueden liberarse al torrente sanguíneo, permitiendo su posterior detección en fluidos biológicos. Encontraron que los péptidos en el suero están asociados a la enfermedad grave o moderada por COVID-19; sin embargo, los péptidos de la orina están asociados a una enfermedad leve. Analizaron 2,466 péptidos plasmáticos distintos, de los cuales el 67.3% son InPeps. De este porcentaje, cuatro de ellos (UniProtKB: P02655, Q04656, Q9UI36 y P02671) son conservados en más del 50% de los pacientes y están asociados a la enfermedad grave por COVID-19. Esto exhibe que las células somáticas mediante sus receptores bradicinina, angiotensina y fibrinógeno poseen regiones conservadas de aminoácidos, que favorecen la entrada celular del virus y podrían estar contribuyendo a los síntomas por *SARS-CoV-2*.

7.8 Integración de métodos experimentales y computacionales en el diseño de péptidos sintéticos.

El diseño de péptidos sintéticos mediante análisis *in silico* como la IEDB es considerada una de las mejores bases de datos para diseñar péptidos derivados de proteínas virales, debido a que la información proviene de estudios experimentales validados y actualizados que predicen mediante algoritmos la conservación de los péptidos entre cepas virales, y la unión de péptidos pequeños a moléculas MHC-I y MHC-II, lo que aumenta la probabilidad de reconocimiento y reduce la posibilidad de mutaciones que evadan la respuesta inmune (IEDB.Org, s. f.). Isea. (2013) identificó péptidos lineales conservados en el virus del dengue específicos de células B para el desarrollo de una vacuna mediante IEDB.

En otra investigación se empleó la base de datos IEDB para predecir y evaluar epítomos inmunogénicos en péptidos sintéticos derivados de secuencias altamente conservadas de la proteína GP5 de diferentes cepas del PRRSV. Con lo anterior encontraron que tres péptidos

elegidos son epítomos de reconocimiento para linfocitos B y T con una antigenicidad de 1.039, 1.165 y 1.105 de acuerdo el análisis *in silico*. Este análisis coincide con las predicciones de antigenicidad y funcionalidad inmunológica, ya que estos péptidos favorecen la expresión de citocinas tales como, *IL-1 β* , *IL-10*, *IL-12*, *INF- α 1*, *INF- α 4* e *INF- β 1* que son capaces de inducir la activación de macrófagos alveolares de ratón (cambio morfológico e inducción de citocinas) importantes en la presentación antigénica a células de memoria como los linfocitos T. Estos hallazgos sugieren que los péptidos diseñados tienen potencial como candidatos para futuras vacunas o inmunoterapias (Piña, 2021). Por lo tanto, la base de datos IEDB no proporciona información sobre la capacidad de los péptidos para inducir una respuesta antigénica de manera segura; sin embargo, los estudios previos han determinado que una antigenicidad superior a 1.05 es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria efectiva. Para ello, es fundamental realizar un análisis de parámetros fisicoquímicos como la capacidad antigénica, hidrofiliidad, peso molecular, punto isoeléctrico, tamaño y pureza de los péptidos.

El Swiss Bioinformatics Resource Portal (ExPasy) y su herramienta ProtParam, determinan parámetros fisicoquímicos como, tamaño, peso molecular y punto isoeléctrico de una secuencia proteica específica. Y la base IEDB utiliza algoritmos de predicción, como BepiPred, para evaluar la antigenicidad mediante patrones característicos de los epítomos de células B de secuencias proteicas experimentales conocidas. Este algoritmo determina la probabilidad que tiene cada residuo de aminoácido para formar parte de un epítomo B. Los valores altos positivos indican que el residuo de aminoácido es un epítomo de células B. Los valores altos negativos indican lo contrario (Collatz *et al.*, 2021; T. Liu *et al.*, 2020). Además, la base IEDB con el mismo algoritmo de predicción (BepiPred) utiliza datos de péptidos experimentales conocidos para generar una escala hidrofílica. Esta escala se obtiene del tiempo de retención de péptidos durante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna de fase reversa (Parker *et al.*, 1986).

7.8.1 Importancia de la evaluación de propiedades fisicoquímicas en péptidos sintéticos.

La antigenicidad: es la capacidad que tiene un antígeno para ser reconocido por el sistema inmune, por ejemplo, células B y provocar una respuesta inmunitaria. Los antígenos pueden

ser proteínas, polisacáridos, lípidos u otras moléculas (Collatz *et al.*, 2021; T. Liu *et al.*, 2020).

La hidrofiliidad: es la capacidad de una molécula para formar puentes de hidrogeno y, en otras palabras, interactuar con moléculas de agua o ser soluble en ella (Parker *et al.*, 1986).

El punto isoeléctrico (PI): es el pH en el cual el péptido tiene una carga neta de cero. El PI puede influir en la conformación estructural de un péptido y, por lo tanto, ocultar o exponer sitios de reconocimiento antigénico. Por esto, el cálculo del PI es crucial para diseñar adecuadamente las condiciones de almacenamiento y formulación peptídica. Además, este parámetro permite predecir la estabilidad de la proteína en exposición a distintos pH (Areo *et al.*, 2021).

El tamaño del péptido: se refiere a la cantidad de aminoácidos que lo componen. Este tamaño influye en su estabilidad y en la forma en que es procesado por el sistema inmunológico. Los péptidos muy largos tienden a ser menos estables y más susceptibles a la degradación en condiciones fisiológicas, mientras que los péptidos muy cortos (< 5-6 aminoácidos) pueden no ser procesados correctamente (Fleri *et al.*, 2017).

El peso molecular de un péptido: es la suma de las masas atómicas de todos los aminoácidos que lo componen. Permite diseñar técnicas adecuadas de purificación y separación de péptidos. Además, este parámetro predice la estabilidad y solubilidad de un péptido. Por ejemplo, los péptidos de bajo peso molecular son más solubles, pero menos estables, mientras que péptidos más grandes pueden formar agregados o precipitarse.

8. JUSTIFICACIÓN.

La pandemia por COVID-19 y la identificación de patologías a largo plazo tras la infección viral, han generado la necesidad de entender con precisión los mecanismos celulares tempranos de distintos epitelios, ya que constituye una de las primeras barreras frente a patógenos virales como *SARS-CoV-2*. Sin embargo, el estudio directo de sus respuestas celulares tempranas en tejido humano representa limitaciones éticas y técnicas, mientras que los cultivos bidimensionales y modelos animales son muy complejos.

Los cultivos tridimensionales (3D) proporcionan una herramienta experimental prometedora al permitir la recreación de interacciones célula-célula-MEC en un microambiente que se aproxima a las condiciones fisiológicas del tejido pulmonar.

Así mismo, la proteína S de *SARS-CoV-2* o fragmentos derivados de la misma son descritos como capaces de interactuar con diversos receptores celulares y activar vías de señalización en células epiteliales, incluso en ausencia de replicación viral. El uso de péptidos virales sintéticos constituye una estrategia experimental segura que posibilita el análisis controlado de respuestas celulares por estímulos virales, sin los riesgos asociados al manejo de virus infecciosos.

9. HIPÓTESIS.

Péptidos derivados de la proteína S inducen la activación de la respuesta inflamatoria controlada en cultivos tridimensionales de células epiteliales.

10. OBJETIVO GENERAL.

Describir la respuesta epitelial a péptidos derivados de la proteína S en un modelo de cultivo 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*.

11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Generar y caracterizar cultivos 3D de células susceptibles a la infección por *SARS-CoV-2*.
- Determinar la expresión de citocinas y moléculas de adhesión celular en cultivos 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2* tras su exposición a péptidos derivados de la proteína S.
- Determinar la correlación de citocinas y moléculas de adhesión celular a la variable tiempo de exposición de péptidos derivados de la proteína S en cultivos 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*.

12. METODOLOGÍA.

12.1 Selección de células para la elaboración de cultivos 3D.

Las líneas celulares de adenocarcinoma humano epitelial alveolar basal de pulmón (A549) y adenocarcinoma epitelial colorrectal humano (CaCo-2) fueron adquiridas de la America Type Culture Collection (ATCC). La línea celular A549 deriva de epitelio alveolar tipo II, mientras que la línea celular CaCo-2 presenta capacidad de diferenciación hacia fenotipos similares al epitelio intestinal. Ambas líneas celulares fueron manejadas bajo condiciones estandarizadas de cultivo y utilizadas para la generación y caracterización de cultivos 3D. Adicionalmente, se realizaron tinciones con Wright y cristal violeta de cultivos en monocapa de ambas líneas celulares, con el objetivo de observar y documentar su morfología celular.

12.2 Elaboración de micromoldes de agarosa para el cultivo en 3D.

Los micromoldes para cultivos 3D se elaboraron disolviendo agarosa tipo I en buffer de fosfato salino (PBS).

1. Disolver la agarosa tipo I en PBS hasta obtener una concentración final de (3.5% p/v) y mantener la temperatura suficiente para evitar su gelificación prematura.
2. Colocar moldes de PDMS (Sigma-Aldrich) con un patrón de 256 pocillos de 400 µm de diámetro y 800 µm de profundidad dentro de la campana de cultivo y desinfectar mediante lavado con etanol al 70% y exposición a luz UV durante 15 min.
3. Adicionar 500 µl de la solución de agarosa al 3.5% en el molde de PDMS, evitando la formación de burbujas.
4. Dejar gelificar la agarosa a temperatura ambiente hasta que el micro molde adquiriera la consistencia suficiente para su manipulación.
5. Recolectar los micromoldes formados y almacenarlos en PBS estéril a 4°C hasta su uso.

12.3 Elaboración de cultivos 3D de células susceptibles a la infección por *SARS-CoV-2*.

Los cultivos 3D de las líneas celulares A549 y CaCo-2 se generaron utilizando la técnica en hidrogeles.

1. Mantener las células A549 y CaCo-2 en cultivo en monocapa bajo condiciones estandarizadas de crecimiento.
2. Temperar los micromoldes previamente elaborados con medio suplementado Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) en placas de cultivo de 6 pocillos a 37.5°C por 30-60 min.
3. Retirar el medio dentro de los micromoldes y adicionar 190 µl de cada densidad celular de siembra por triplicado.
4. Incubar los cultivos a 37.5°C y 5% de CO₂ durante 20 min para permitir que las células se asienten por gravedad.
5. Cubrir los micromoldes con medio de cultivo e incubar a 37.5°C y 5% de CO₂.
6. Registrar el desarrollo de los cultivos 3D mediante fotografías durante un periodo de 7-14 días para las densidades celulares de siembra (1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 , 10×10^4 , 15×10^4 y 20×10^4 células por micro molde) con el fin de realizar el análisis morfométrico.

12.4 Caracterización de cultivos 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*.

12.4.1 Reversión morfológica y reorganización celular de cultivos 3D.

La reversión morfológica de los cultivos 3D se evaluó mediante su transferencia a condiciones de cultivo bidimensionales (2D) para analizar su capacidad de adaptación y reorganización celular.

1. Transferir los agregados celulares con 7-10 días de proliferación a placas Petri estériles.
2. Mantener los cultivos bajo condiciones estándar de incubación (37°C, 5% CO₂).
3. Registrar los cambios morfológicos celulares mediante la captura de fotografías utilizando seis muestras independientes (n=6).

12.4.2 Histología de cultivos 3D.

La evaluación histológica de los cultivos 3D se realizó a partir de cultivos 3D con 7 días de desarrollo.

1. Fijar los cultivos 3D en formaldehído al 10%.
2. Deshidratar las muestras con concentraciones crecientes de etanol tal como se muestra en el Anexo 1, Tabla 1 (Durand-Herrera *et al.*, 2018).
3. Incluir las muestras en parafina.
4. Realizar cortes de las muestras a 5 µm de espesor utilizando un microtomo rotatorio.
5. Expandir los cortes sobre portaobjetos.
6. Realizar la tinción con hematoxilina-eosina (HE), conforme al protocolo descrito en el Anexo 1, Tabla 2.
7. Montar los cortes teñidos con cubreobjetos mediante resinas naturales como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas, cuyos índices de refracción son similares a los de vidrio (Dunn *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2020).

12.4.3 Liberación de ADN celular.

La liberación de ADN total se evaluó como un indicador del posible daño membranar mediante la cuantificación de ADN libre en el sobrenadante, siguiendo protocolos previamente descritos (Desjardins & Conklin, 2010; Durand-Herrera *et al.*, 2018).

1. Establecer tres condiciones experimentales en cultivos 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*: sin estímulo (SE), estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con péptidos (PEP).
2. Cambiar el medio de cultivo cada 3 días y adicionar los estímulos correspondientes el día 7 de formación del cultivo.
3. Incubar los cultivos durante 24 y 48 h en condiciones estándar de cultivo.
4. Recolectar el sobrenadante de cada cultivo en tubos Eppendorf en los tiempos correspondientes de exposición al estímulo.
5. Utilizar como control positivo de muerte celular cultivos 3D con siete días de cultivo, lisados con Tritón X-100 1X.
6. Cuantificar el ADN libre en el medio utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific) 2000 a 260 nm.
7. Analizar cada condición experimental utilizando tres muestras independientes (n=3) para cada tiempo de exposición.

8. Normalizar los valores obtenidos respecto a los controles positivos (células muertas) con mayor liberación de ADN, equivalente 100% de liberación de ADN.

12.4.4 Prueba metabólica de cultivos 3D.

La viabilidad y actividad metabólica celular de los cultivos 3D se evaluó utilizando el kit Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y protocolos previamente descritos (Durand-Herrera *et al.*, 2018; Turrioni *et al.*, 2021).

1. Establecer tres condiciones experimentales en cultivos 3D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*: sin estímulo (SE), estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con péptidos (PEP).
2. Sembrar los cultivos 3D con una densidad celular de 10×10^4 - 15×10^4 células por micro molde, realizando los análisis por triplicado.
3. Cambiar el medio de cultivo cada 3 días y adicionar los estímulos correspondientes el día 7 de formación del cultivo, mientras que los controles se mantuvieron sin estímulo.
4. Incubar los cultivos durante 24 y 48 h bajo condiciones estándar de cultivo.
5. Adicionar el reactivo CCK-8 al 10% en todas las condiciones experimentales e incubar durante 4 h bajo condiciones estándar de cultivo.
6. Recolectar 100 μ l de sobrenadante de cada tratamiento y transferir a una placa de 96 pocillos. Utilizar como control negativo medio de cultivo suplementado con reactivo CCK-8 10%.
7. Medir la absorbancia a 450 nm mediante un espectrofotómetro (VARIOSCAN LUX) y el software Thermo Scientific™ SkanIt™ Software for Microplate Readers del mismo fabricante.
8. Normalizar los valores obtenidos para cada grupo experimental y tiempo de exposición (24 y 48 h), tomando como referencia los valores medios por los controles positivos equivalentes al 100% de actividad deshidrogenasa mitocondrial (ADM) y los controles negativos equivalentes a 0% de ADM.

12.5 Péptidos.

Los péptidos se obtuvieron y generaron a través de síntesis química por un tercero certificado GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). El diseño de los péptidos se realizó previamente por el equipo de trabajo a partir de análisis *in silico* mediante Immune Epitope Data Base (IEDB) y se generaron ocho péptidos que poseen una longitud de 30-32 aminoácidos, derivados de secuencias conservadas de la proteína S del virus *SARS-CoV-2* de aproximadamente 1,273 aminoácidos (Tabla 6), los cuales indujeron la producción de anticuerpos protectores en roedores, Tabla 3.

Tabla 6. Secuencias de péptidos.

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño (aa)</i>	<i>Antigenicidad</i>
<i>S1a</i>	FSNVTWFHAIHVSGTNDPFLGVYYHKNNKSWC	32	1.146
<i>S2a</i>	NCTEVPVAIHADQLTLLHAPATVCGPKKSK	30	1.17
<i>SFa</i>	FPNITNLCPFGEVFNATRFASVCVACYFPLQS	32	1.27
<i>SFb</i>	GFNCYFPLQSYGNLDSKVGGYQAGSTPCNGV	31	1.14
<i>S1b</i>	SQCTRTQLPPAYTVYKHTPINLVRDLPOGFS	31	1.12
<i>S2b</i>	ASYQTQTNSSVASQSCCKFDEDDSEPV LKG	30	1.19
<i>S2c</i>	SNKKFLPFRVYSTGSNVFQRVYSTGSNVFQC	31	1.13
<i>S1SF</i>	DPFLGVYYHKNNGGLCPFGEVFNATRFASVC	31	1.15

Para este estudio se seleccionaron los péptidos de las regiones S1b, S2c, SFa y SFb, debido a su capacidad de inducción de anticuerpos y de la expresión de citocinas proinflamatorias con base en trabajos previos por el equipo de investigación, tal y como se muestra en la Tabla 3. Para los cuatro péptidos seleccionados se analizaron parámetros fisicoquímicos utilizando el Swiss Bioinformatics Resource Portal (ExPASy) mediante la herramienta ProtParam para tamaño, peso molecular y punto isoelectrico. Para la antigenicidad se utilizó el algoritmo BepiPred de epítomos de células B experimentalmente conocidos en IEDB y la hidrofiliidad se evaluó con el mismo algoritmo BepiPred mediante datos de la media aritmética de 7 residuos, según el método descrito por (Parker *et al.*, 1986).

12.6 Determinación de la expresión de citocinas y moléculas de adhesión celular en cultivos 3D.

12.6.2 Exposición de cultivos 3D a péptidos virales y LPS.

1. Preparar una mezcla equimolar de los péptidos seleccionados (S1b, S2c, SFa y SFb). Preparar una solución de lipopolisacáridos (LPS) en medio DMEM hasta obtener una concentración final de 1 µg/µl.
2. Disolver inicialmente los péptidos en DMSO y posteriormente en medio de cultivo DMEM hasta una concentración final de 5 µg/µl.
3. Establecer tres condiciones experimentales: cultivos 3D tratados con péptidos (PEP), control positivo con LPS (LPS) y control sin estímulo (C), con el fin de asegurar la comparabilidad entre condiciones experimentales.
4. Adicionar de manera independiente la mezcla de péptidos o LPS a los cultivos 3D previamente obtenidos, según la condición experimental correspondiente.
5. Mantener los cultivos 3D del grupo control (C) únicamente en medio de cultivo DMEM.
6. Incubar todos los grupos experimentales bajo condiciones estándar (37°C, 5% CO₂) durante 24 y 48 h (Piña, 2021; Zannella *et al.*, 2022).

12.6.3 Extracción de ARN de cultivos 3D.

La extracción de ARN total a partir de los cultivos 3D se realizó mediante el método de tiocianato ácido de guanidinio-fenol-cloroformo (TRIzol), de acuerdo con lo descrito por Chomczynski & Sacchi (1987).

1. Recuperar cuidadosamente los cultivos 3D previamente estimulados de sus respectivos micromoldes en tubos Eppendorf y centrifugar a 1600 rpm durante 5 min hasta obtener el pellet celular.
2. Retirar el medio de cultivo con el fin de eliminar residuos de los estímulos.
3. Disgregar el pellet celular mediante la adición de 1000 µl del reactivo TRIzol y adicionar 200 µl de cloroformo al 99%.
4. Incubar la mezcla TRIzol-cloroformo durante 3 min a 25°C y centrifugar a 12,000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Transferir cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo libre de RNAsas.

6. Adicionar un volumen equivalente de isopropanol (300-500 μ l) a la fase acuosa transferida y mezclar vigorosamente.
7. Incubar durante 4 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4°C para precipitar el ARN.
8. Lavar el pellet de ARN mediante la adición de 1000 μ l de etanol frío a 4°C.
9. Centrifugar a 7,000 rpm durante 5 min a 4°C y desechar el sobrenadante.
10. Resuspender el ARN obtenido en 20-50 μ l de agua libre de RNAsas para su posterior análisis.

12.6.4 Retrotranscripción.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se obtuvo mediante el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2, Tablas 4 y 5).

1. Mezclar 1 μ g de ARN total con 1 μ l de Oligo (dT)₂₀ a una concentración de 50 μ M, 1 μ l de dNTP mezcla a una concentración de 10 mM y agua DEPC hasta un volumen final de 10 μ l, en tubos de 0.2 ml para PCR.
2. Incubar a 65°C durante 5 min y, posteriormente, colocar en hielo durante al menos 1 min.
3. Adicionar la mezcla de síntesis de ADNc, el cual incluye 2 μ l de 10X RT buffer, 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DTT 0.1 M, y 1 μ l de RNA_{SE}OUT a una concentración de 40 U/ μ l, hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l.
4. Incubar a 50°C por 50 min e inactivar la enzima incubando a 85°C por 5 min.
5. Remover el ARN residual adicionando 1 μ l de RNA_{SE}H e incubar a 37 °C por 20 min.
6. Ajustar la concentración de ADNc a 1 μ g/ μ l, almacenar a -20 °C hasta su uso.

12.6.5 Diseño de oligonucleótidos de los genes de interés.

Los oligonucleótidos específicos para los genes de interés se diseñaron utilizando la base de datos del NCBI, considerando criterios de especificidad, eficiencia de amplificación y ausencia de estructuras secundarias. Para este estudio se diseñaron 18 pares de oligonucleótidos dirigidos a secuencias humanas, los cuales se seleccionaron de acuerdo con las regiones génicas reportadas y se validaron para su uso en ensayos de RT-qPCR:

1. Longitud del oligonucleótido entre 18-24 bases (b).
2. Contenido de guanina y citosina (G:C) entre 40-60%
3. Temperaturas de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos directos (Forward, F) y reversos (Reverse, R) entre 55-65 °C.
4. Inicio de la secuencia con 1 o 2 bases púricas (A o G)
5. Ausencia de dímeros entre los pares de oligonucleótidos.

Posteriormente, se elaboró una tabla con las características de cada oligonucleótido diseñado que se muestra en el (Anexo 3, Tabla 6). Aquellos que cumplieron de manera más adecuada con los criterios establecidos fueron seleccionados para su síntesis, y se muestran en la Tabla 11.

12.6.6 Estandarización de la temperatura de oligonucleótidos por gradiente.

Los oligonucleótidos se sintetizaron por el INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT), conforme a las secuencias seleccionadas. Después, cada vial se resuspendió siguiendo las recomendaciones especificadas en la ficha técnica del proveedor.

1. Resuspender cada vial de oligonucleótidos en agua libre de DNAsas hasta obtener una concentración stock de 100 μ M.
2. Preparar diluciones de trabajo a 5 μ M mediante la transferencia de 10 μ l de cada par de oligonucleótidos (Forward, F; Reverse, R) a tubos con el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas.
3. Realizar una PCR por gradiente en un rango de temperaturas de 56-64°C empleando una reacción de SYBR Green, cada par oligonucleótidos a una concentración final de 0.5 μ M, una mezcla de ADNc obtenido de cultivos 3D estimulados con LPS, PEP y SE, y agua libre de nucleasas.
4. Determinar la temperatura óptima de alineamiento para cada par de oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, y correr el gel durante 45 min a 120 V, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Fig. 19).

Tabla 11. Características de oligonucleótidos.

No .	Nombre	Longitud	% GC	Secuencia 5'-3'		Especie	Amplificación (pb)	T °C Exp.	T °C Blast	Referencias
1	<i>IL-8 (CXCL8)</i>	20	60	F	GAGCCAGGAAGAAA CCACCG	<i>Homo Sapiens</i>	340	58	60.9 6	NM_000584 .4
		24	41.67	R	TTCTCAGCCCTCTTC AAAAACTTC				59.4 2	
2	<i>TNF-α</i>	20	60	F	ACTTTGGAGTGATCG GCCCC	<i>Homo Sapiens</i>	311	---	61.5 0	NM_000594 .4
		20	60	R	GGTGTGGGTGAGGA GCACAT				61.7 9	
3	<i>IL-10</i>	20	55	F	ACACATCAGGGGCTT GCTCT	<i>Homo Sapiens</i>	361	---	61.5 0	NM_000572 .3
		20	55	R	TGGTTCTCAGCTTGG GGCAT				61.7 9	
4	<i>CCL-2</i>	21	57.14	F	AGCCACCTTCATTCC CCAAGG	<i>Homo Sapiens</i>	199	62	62.3 7	NM_002982 .4
		21	57.14	R	CTGCTTGGGGTCAGC ACAGAT				62.6 7	
5	<i>MMP-3</i>	20	55	F	TTCCCTCCAACCGTG AGGAA	<i>Homo Sapiens</i>	399	---	60.7 7	NM_002422 .5
		20	55	R	CACAGCACAGGCAG GAGAAA				60.5 4	
6	<i>MMP-9</i>	20	65	F	GAGGTGGACCGGAT GTTCCC	<i>Homo Sapiens</i>	148	62	62.2 5	NM_004994 .3
		20	60	R	TCACGTAGCCCACTT GGTCC				61.8 2	
7	<i>MMP-2</i>	18	66.67	F	AAACCCAGGCCAC CGAG	<i>Homo Sapiens</i>	397	---	61.9 7	NM_004530 .6
		20	60	R	CCTGTCTGGGGCAGT CCAAA				62.0 7	
8	<i>IL-6</i>	20	60	F	TCCAGTTGCCTTCTC CCTGG	<i>Homo Sapiens</i>	231	62	61.4 9	NM_000600 .5
		20	55	R	TCTGCCAGTGCCTCT TTGCT				62.0 6	
9	<i>MMP-3</i>	20	55	F	TTCCCTCCAACCGTG AGGAA	<i>Homo Sapiens</i>	399	---	60.7 7	NM_002422 .5
		20	55	R	CACAGCACAGGCAG GAGAAA				60.5 4	
10	<i>Integrina-α</i>	22	54.55	F	AGGAGAAGGTGCCT ACGAAGCT	<i>Homo Sapiens</i>	105	64	63.1 4	NM_002210 .5/(CD51 (ITGAV) Human qPCR Primer Pair (NM_002210), s. f.)
		23	52.17	R	GCACAGGAAAGTCT TGCTAAGGC				62.2 1	

11	<i>uPA</i>	20	60	F	CCTTGAGGGAACA GACGAG	<i>Homo Sapiens</i>	92	64	59.7 5	NM_001441 157.1
		20	50	R	ACCACCAAAATGCT GTGTGC				59.9 0	
12	<i>IL-1β</i>	21	47.62	F	ACAGATGAAGTGCT CCTTCCA	<i>Homo Sapiens</i>	73	60	59.0 2	NM_000576 .3/(Grimm <i>et al.</i> , 2017)
		21	52.38	R	GTCGGAGATTCGTAG CTGGAT				59.3 9	
13	<i>IFN-β</i>	20	45	F	AAACTCATGAGCAG TCTGCA	<i>Homo Sapiens</i>	168	62- 64	57.4 4	NM_002176 .4
		22	50	R	AGGAGATCTTCAGTT TCGGAGG				59.2 4	
14	<i>GAPDH</i>	20	45	F	CGAGATCCCCTCCAAA ATCAA	<i>Homo Sapiens</i>	170	62	55.1 3	NM_001289 746.2
		20	45	R	TTCACACCCATGACG AACAT				57.4 4	
15	<i>PCNA</i>	25	40.00	F	CAAGTAATGTCGATA AAGAGGAGGA	<i>Homo Sapiens</i>	132	60	58.1 9	NM_002592 .2/(Primer, s. f.)
		21	47.62	R	TACTGAGTGTCACCG TTGAAG				57.6 4	
16	<i>uPAR</i>	21	52.38	F	CAGACTTGCTGTGTG ACCTCA	<i>Homo Sapiens</i>	183	62	60.2 0	NM_001005 377.3 /(Mendieta <i>et al.</i> , 2019)
		22	40.91	R	AATAACAACAACAC AACAGCGG				58.3 0	
17	<i>NFκB</i>	22	54.55	F	GCAGCACTACTTCTT GACCACC	<i>Homo Sapiens</i>	130	64	61.4 4	NM_003998 .4/(Darwish <i>et al.</i> , 2021; Harb <i>et al.</i> , 2024; Khalaf <i>et al.</i> , 2013)
		22	54.55	R	TCTGCTCCTGAGCAT TGACGTC				62.6 0	
18	<i>B-Catenina</i>	25	48.00	F	CAACTAAACAGGAA GGGATGGAAGG	<i>Homo Sapiens</i>	239	62	61.3 3	NM_001904 .4/(Z. Huang <i>et al.</i> , 2024)
		23	52.17	R	CAGATGACGAAGAG CACAGATGG				61.2 8	

12.6.7 Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR.

1. Evaluar la expresión génica de citocinas, quimiocinas, factores de transcripción, y marcadores de proliferación y remodelación tisular mediante PCR tiempo real (RT-qPCR) conforme a las guías MIQE, asegurando la calidad y reproducibilidad de los datos (Bustin *et al.*, 2009).
2. Diseñar la disposición de la placa de RT-qPCR para cada grupo experimental una vez obtenido el ADNc y determinada la temperatura óptima de alineamiento, como se describe en el Anexo 3 y 4.

3. Preparar una mezcla de reacción que contenga ADNc correspondiente a cada condición experimental, el reactivo SYBR Green, el par de oligonucleótidos específico para cada gen a una concentración final de 0.5 μ M y agua libre de nucleasas, hasta completar el volumen final de reacción de 10 μ l por reacción.
4. Programar la amplificación en un sistema de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, EUA), acoplado al software CFX Manager™, bajo las condiciones de ciclado descritas en la Figura 6.
5. Ajustar la temperatura de alineamiento de manera independiente para cada par de oligonucleótidos de acuerdo con la optimización previamente realizada, con el fin de garantizar la especificidad y eficiencia de amplificación.
6. Analizar los siguientes genes: *Integrina- α* , *uPAR*, *NF-kB1*, *MCP-1/CCL-2*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* , *PCNA*, *β -Catenina* e *IFN- β* , con objetivo de explorar la inflamación y reparación tisular.

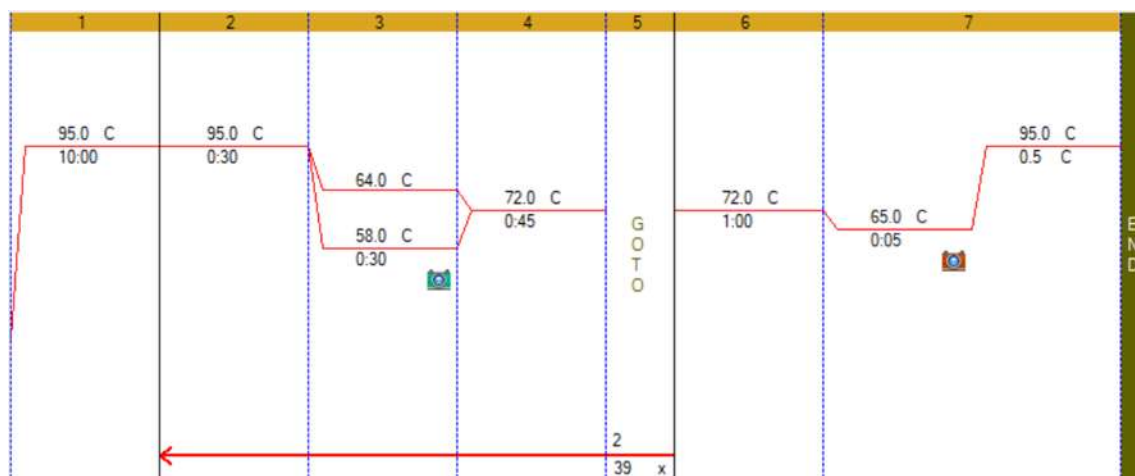


Figura 6. Programa de ciclos de amplificación utilizado en la qPCR.

12.6.8 Diseño experimental y análisis de datos.

1. Evaluar cada condición experimental utilizando dos réplicas biológicas independientes (n=2), correspondientes a cultivos 3D generados de manera independiente y evaluados en los mismos puntos temporales.
2. Realizar tres corridas independientes de RT-qPCR, en las cuales cada réplica biológica se analizó en una o más ocasiones con el fin de asegurar la reproducibilidad técnica.
3. Procesar las muestras en duplicados técnicos en cada corrida y obtener los valores finales de expresión a partir del promedio de los duplicados técnicos.
4. Normalizar la expresión génica utilizando GAPDH como gen endógeno y calcular la expresión relativa mediante el método ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), tomando como referencia el control sin estímulo (Schmittgen & Livak, 2008).
5. Comparar las condiciones experimentales mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$), empleando GraphPad Prism v10 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) (Schmittgen & Livak, 2008; Bustin *et al.*, 2009).

13. RESULTADOS.

13.1 Caracterización morfológica de cultivos 2D de células susceptibles a *SARS-CoV-2*.

Las tinciones celulares mediante Wright y Cristal violeta de cultivos en monocapa permiten observar su morfología epitelial. Las líneas celulares A549 y CaCo-2 suelen tener una forma poligonal o alargada dependiendo de su densidad de proliferación en monocapa. Las células A549 presentan aproximadamente de 16-21 μm de diámetro y son células de epitelio alveolar tipo II. Las células CaCo-2 presentan un largo aproximado de 20-40 μm . Esta caracterización morfológica se utiliza como referencia para confirmar la identidad y condiciones de crecimiento celular, previo al establecimiento y formación de los cultivos tridimensionales. El cultivo de células en monocapa teñidas con Wright y Cristal violeta se obtuvo tal y como se muestra en la (Fig. 7).

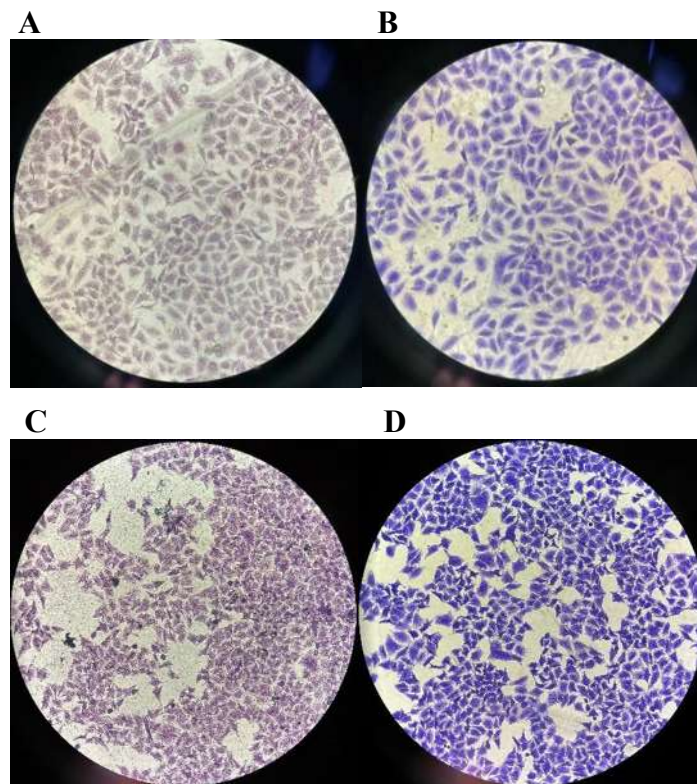


Figura 7. Tinciones de cultivos celulares en monocapa, (objetivo 20x). (A) Wright A549; (B) Cristal violeta A549; (C) Wright CaCo-2; (D) Cristal violeta CaCo-2.

13.2 Elaboración de micromoldes de agarosa y formación de cultivos 3D.

Los micromoldes de agarosa se obtuvieron con patrones perfectos de 256 pocillos y se mantuvieron estériles hasta su uso. Estos permitieron formar agregados celulares en cada uno de los pocillos, tal y como se muestra en la (Fig. 8).

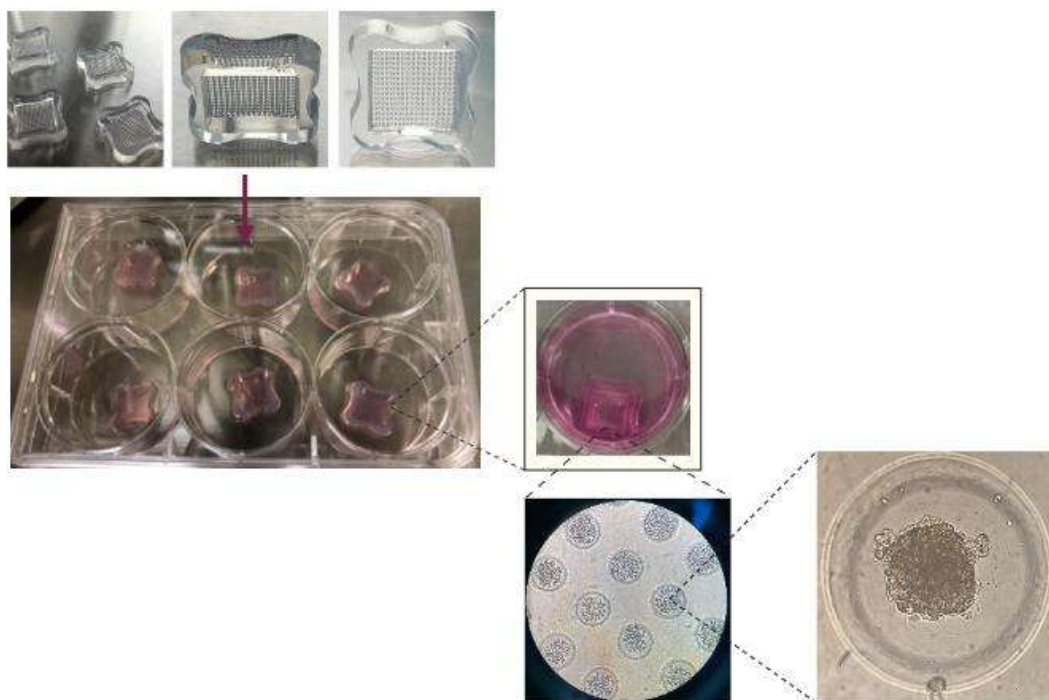


Figura 8. Elaboración de micromoldes de agarosa y formación de cultivos 3D de A549, (objetivo 10-40x). Modificado de (Durand-Herrera *et al.*, 2018).

Los cultivos 3D para la línea celular A549 se obtuvieron con la capacidad de formar agregados. Empleando esta técnica de hidrogeles, se ha observado que a una mayor densidad celular mayor tamaño del organoide, lo que podría impedir que los nutrientes lleguen al centro del agregado y se desintegre el cultivo 3D, como se muestra a partir del día 12 en una densidad de 15×10^4 células. Al contrario, si el agregado es muy pequeño, se observa dificultad para agruparse de forma esférica, característica de las interacciones célula-célula-matriz extracelular. Los cultivos 3D de A549 exhiben un cambio morfológico adecuado a partir del día 4; sin embargo, el crecimiento de los cultivos 3D se continuó para corroborar la consistencia y estabilidad del cultivo 3D. La densidad óptima de siembra del cultivo 3D de A549 se conformó de forma esférica a partir de la densidad 10×10^4 células tal y como se

muestra en las Figs. 9 y 10. Para los cultivos 3D de CaCo-2 no fue posible determinar una densidad óptima de siembra. Durante los días de cultivo para estas células no se observó la formación de interacciones celulares estrechas ni la organización de estructuras esféricas características de agregados celulares. A lo largo del tiempo, las células mostraron una proliferación dispersa sin evidencia clara de ensamblaje por cohesión celular como en una matriz extracelular que le otorga estabilidad estructural, como se observa en la Fig. 11. Por lo anterior, análisis posteriores de caracterización y evaluación de expresión génica de cultivos 3D de CaCo-2 no se continuaron bajo estas condiciones experimentales.

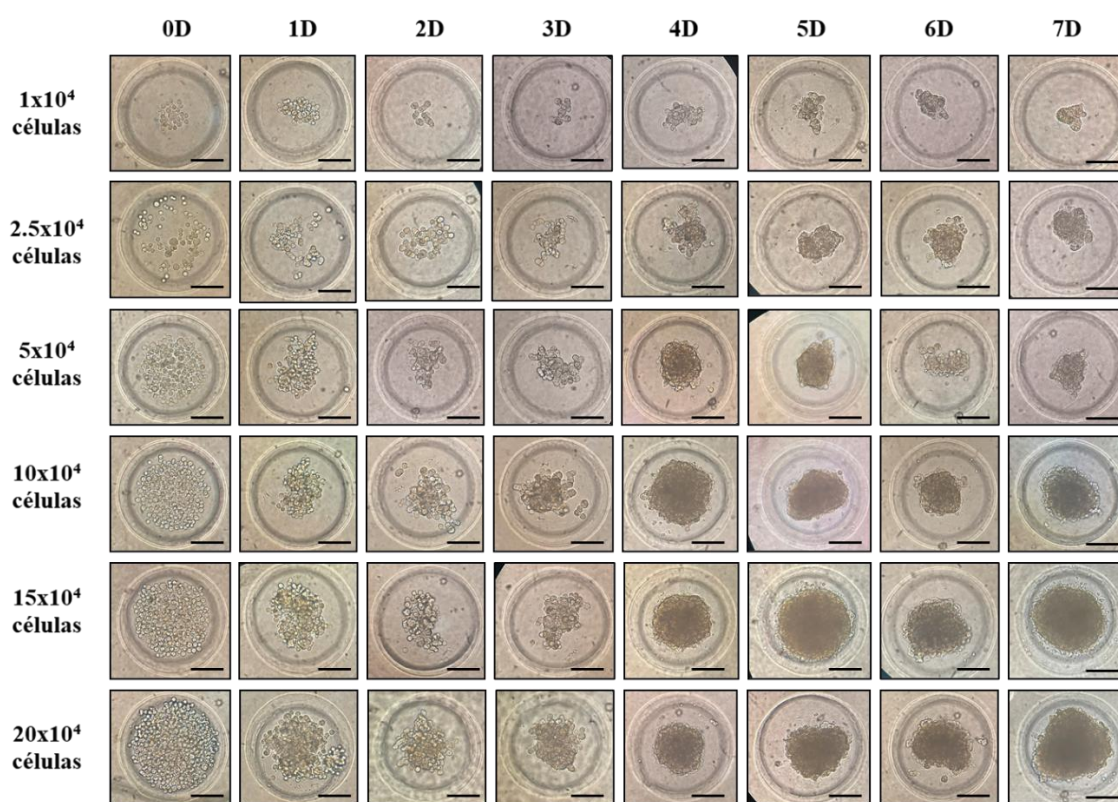


Figura 9. Formación de cultivos 3D de células de epitelio pulmonar (A549) de 0 a 7 días (D) de siembra, observados mediante microscopia invertida (objetivo 20x). Del lado horizontal se observan los días de proliferación y del lado vertical las diferentes densidades de siembra. Barra de escala: 100 μ m.

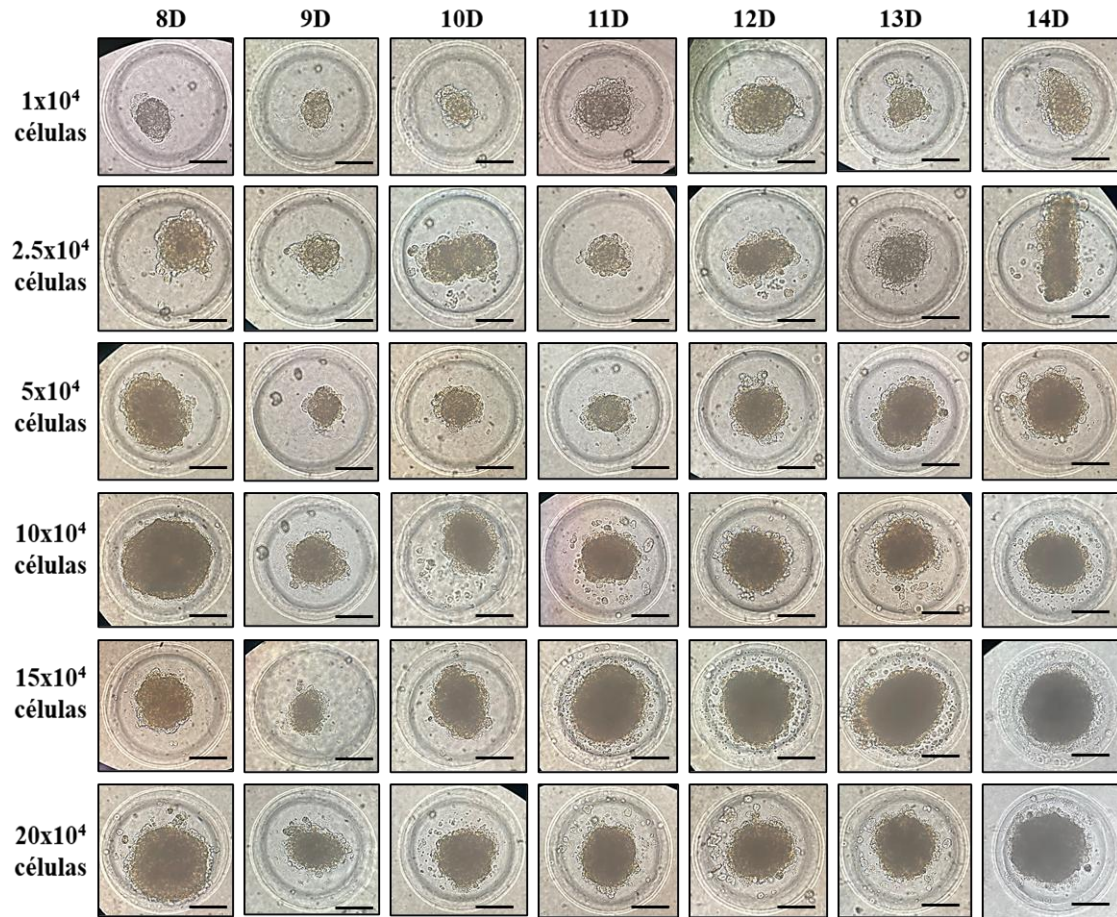


Figura 10. Formación de cultivos 3D de células de epitelio pulmonar (A549) de 8 a 14 días (D) de siembra, observados mediante microscopia invertida (objetivo 20x). Del lado horizontal se observan los días de proliferación y del lado vertical las diferentes densidades de siembra. Barra de escala: 100 μ m.

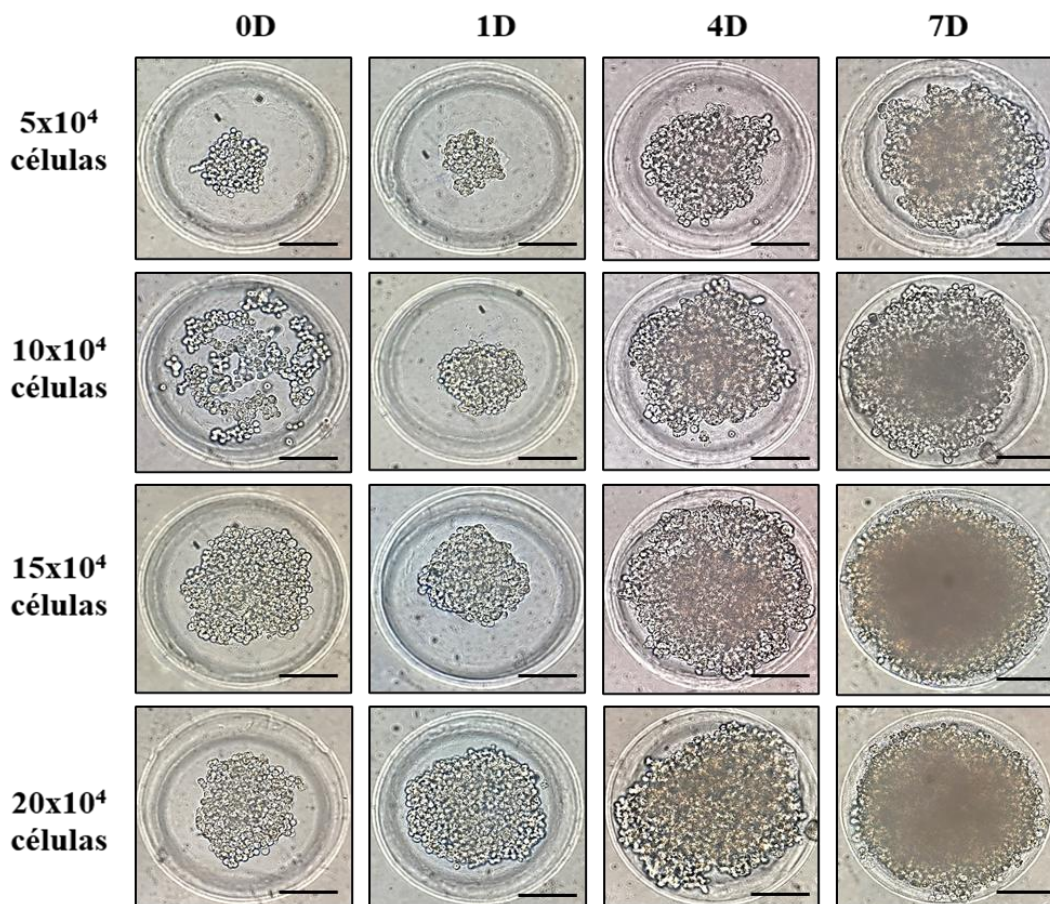


Figura 11. Formación de cultivos 3D de células de epitelio intestinal (CaCo-2) de 0 a 7 días (D) de siembra, observados mediante microscopia invertida (objetivo 20x). Del lado horizontal se observan los días de proliferación y del lado vertical las diferentes densidades de siembra. Barra de escala: 100 μ m.

13.3 Caracterización de cultivos 3D de A549.

13.3.1 Reversión morfológica y reorganización celular de cultivos 3D.

Las células A549 mantienen alta viabilidad y capacidad proliferativa. El día 0, las células adoptan una estructura esferoidal típica de cultivos 3D, mientras que los días siguientes (3 a 6 días) muestran una transición progresiva hacia una morfología más elongada y dispersa, adaptándose a las condiciones bidimensionales. En las fases posteriores (9-18 días), las células proliferan, formando monocapas organizadas y alcanzando confluencia en 2D. Esta transición evidencia la capacidad y viabilidad de las células para adaptarse a ambas condiciones de cultivo, según la técnica aplicada, tal como se muestra en la (Fig.12).

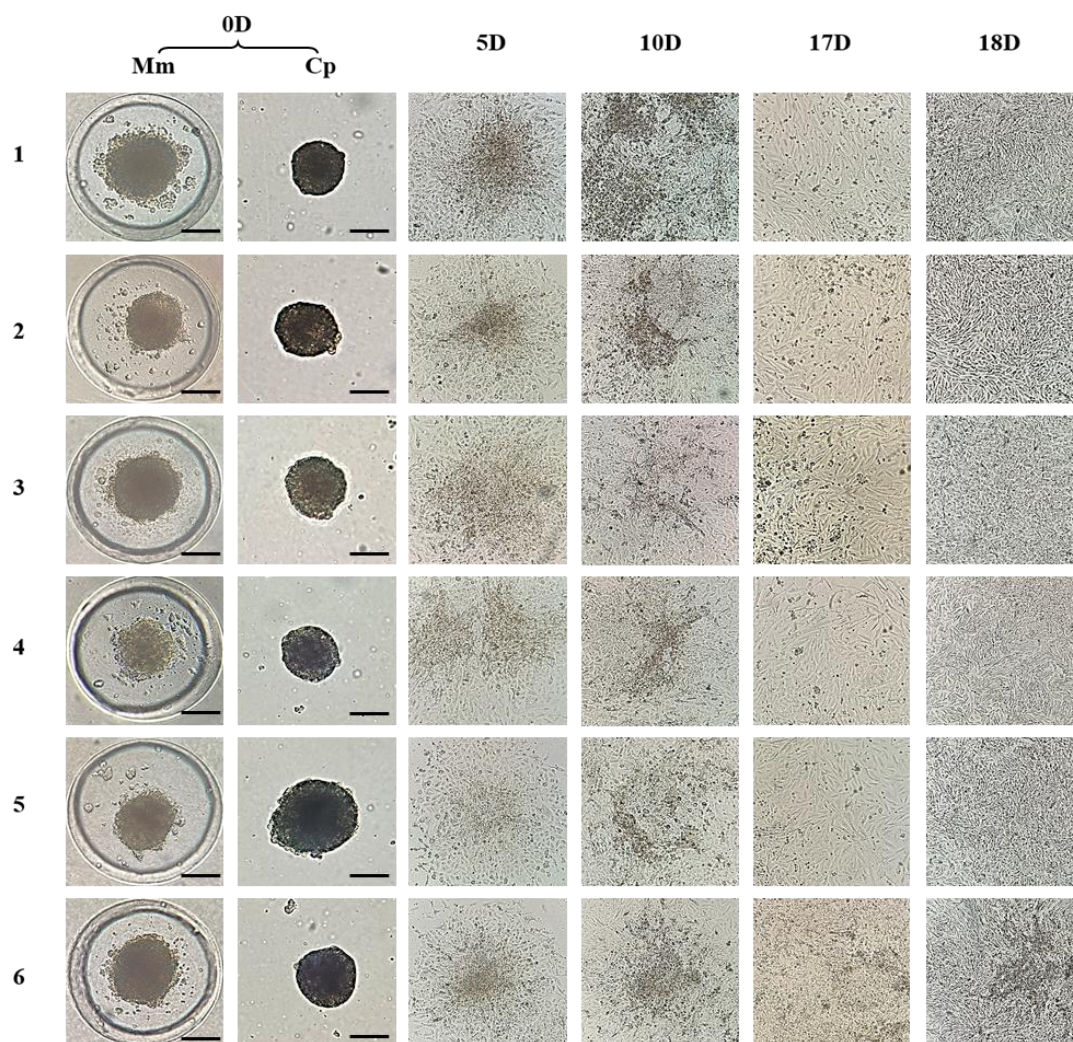


Figura 12. Transición morfológica de cultivos 3D a cultivos 2D de 0 a 18 días (D) de siembra en células A549, observados mediante microscopia invertida (objetivo 20x). Del lado horizontal se observan los días de proliferación y del lado vertical los diferentes cultivos (n=6), a una densidad de siembra 10×10^4 . Barra de escala: 50 μm .

13.3.2 Estandarización de densidad celular de siembra en micromoldes para cultivos 3D de A549.

La tinción de cultivos 3D con Hematoxilina y Eosina (HE) muestra que el agregado de A549 tiene una conformación uniforme o compacta. Esta permite observar los núcleos celulares en tonalidades azules o violetas y el citoplasma teñido de rosa, esto exhibe que las células que se encuentran en los micromoldes están vivas; sin embargo, más pruebas de viabilidad celular

son necesarias. De acuerdo a estas características estructurales observadas, se seleccionó la densidad de siembra de 10×10^4 células para los cultivos 3D de A549 (Fig.13).

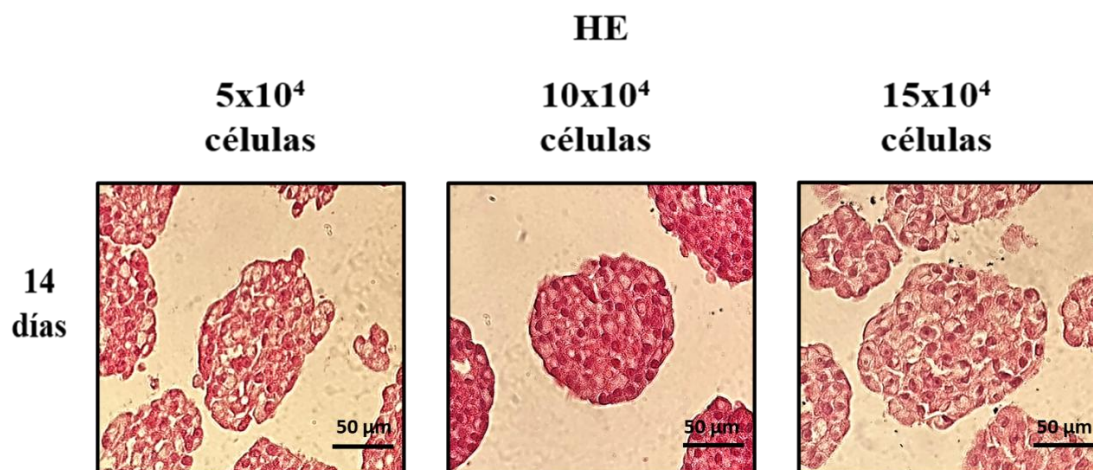


Figura 13. Análisis histológicos de tres distintas densidades de cultivos 3D de células de epitelio pulmonar A549 de 14 días de proliferación, observados mediante microscopia óptica (objetivo 40x). La tinción HE muestra el patrón morfológico. Los nucleos ácidos teñidos con hematoxilina en color violeta y citoplasma, colágeno y tejido conjuntivo teñido de rosa. Se tomaron las mejores densidades de siembra para cortes histológicos. En el eje horizontal se observan las diferentes densidades de siembra y en el eje vertical los días de proliferación.

13.3.3 Análisis de péptidos *in silico*.

La longitud, el peso molecular, punto isoelectrico, capacidad de solubilidad (hidrofilicidad) y antigenicidad de los cuatro péptidos seleccionados se obtuvo en IEDB mediante Analysis Resource y Expasy con la herramienta ProtParam. En la Tabla 13 se muestran algunos parámetros fisicoquímicos que ayudan a predecir el comportamiento de estos péptidos. Estos resultados exhiben la capacidad de solubilidad de los péptidos al contener regiones hidrofóbicas (verde) e hidrofílicas (amarillo) mediante el algoritmo BepiPred que utiliza datos de péptidos experimentales conocidos para generar una escala hidrofílica que indica el tiempo de retención de péptidos durante HPLC como se muestra en la Tabla 13 y Fig. 14. Además, los péptidos tienen la capacidad de provocar una respuesta inflamatoria debido a su

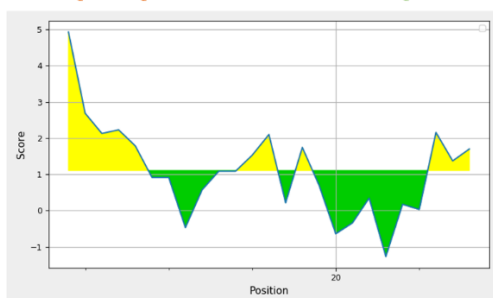
nivel de antigenicidad evaluado por el mismo algoritmo, ya que trabajos previos han reportado que una antigenicidad superior a 1.05 es suficiente para causar una respuesta de tipo antigénica. Sin embargo, este algoritmo determina la probabilidad que tiene cada residuo de aminoácido para formar parte de un epítipo B. Esta probabilidad se obtuvo mediante péptidos experimentales conocidos que tienen la capacidad de unión a moléculas MHC-I y MHC-II (Tabla 13 y Fig. 15).

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de péptidos diseñados *in silico* mediante IEDB y sintetizados por un tercero certificado GenScript (Piscataway, New Jersey, USA).

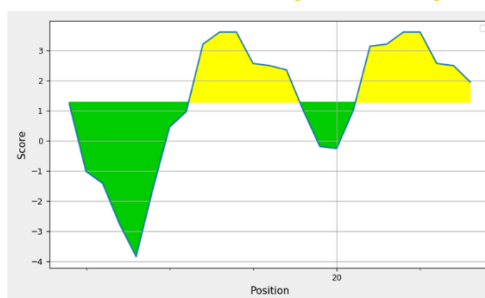
PÉPTIDO	SECUENCIA	LONG	MW	P. I	SB	Ag	P
S1b	SQCTRTQLPPAYTVYK HTPINLVRDLPQGFS	31 aa	3532.03 Da	9.18	DMSO y H ₂ O	1.12	96%
S2c	SNKKFLPFRVYSTGSNV FQRYSTGSNVFQC	31 aa	3562.02 Da	10.03	DMSO y H ₂ O	1.13	96%
SFa	FPNITNLCPFGEVENAT RFASVCVACYFPLQS	32 aa	3557.12 Da	5.98	DMSO y H ₂ O	1.27	96%
SFb	GFNCYFPLQSYGNLDSK VGGYQAGSTPCNGV	31 aa	3244.56 Da	5.82	DMSO y H ₂ O	1.14	96%

Regiones proteicas = S1b, S2c, SFa, SFb; LONG = longitud; MW = peso molecular; P. I = punto isoeléctrico; SB = solubilidad; Ag = Antigenicidad; P = pureza.

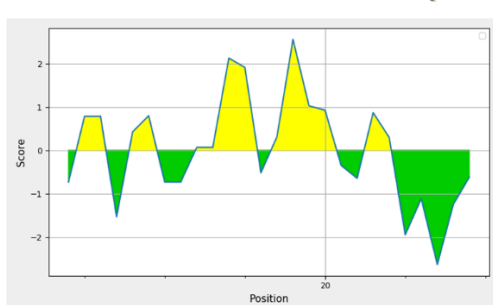
A) S1b - SQCTRTQLPPAYTVYKHTPINLVRDLPQGFS



B) S2c - SNKKFLPFRVYSTGNSNVFQRVYSTGNSNVFQC



C) Sfa - FPNITNLCPFGEVFNATRFASVCVACYFPLQS



D) Sfb - GFNCYFPLQSYGNLDSKVGGYQAGSTPCNGV

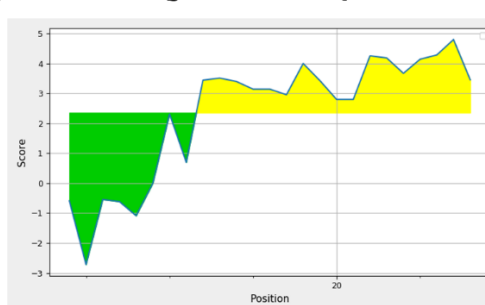
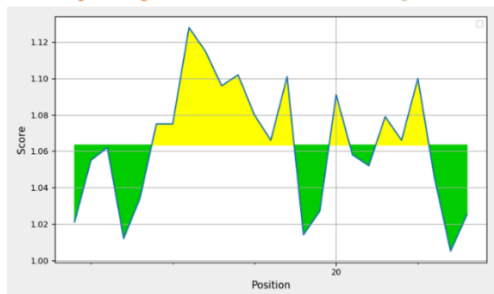
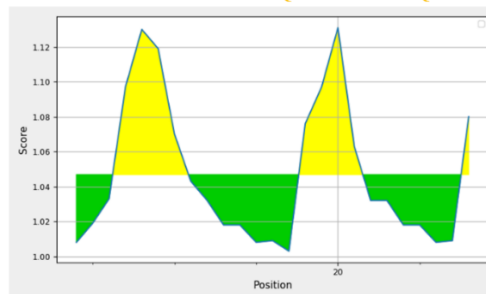


Figura 14. Solubilidad de péptidos diseñados *in silico* IEDB y sintetizados por un tercero certificado GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). La posición de aminoácidos de los péptidos: A) S1b- SQCTRTQLPPAY-TVYKHTPINLVRDLPQGFS; B) S2c- SNKKFLPFRVYSTGNSNVFQRVYSTGNSNVFQC; C) Sfa- FPNITNLCPFGEVFNATRFASVCVACYFPLQS; D) Sfb- GFNCYFPLQSYGNLDSKVGGYQAGST-PCNGV, se observa de forma horizontal la posición de cada uno de los aminoácidos de cada figura, y el cálculo mediante el algoritmo BepiPred se observa de forma vertical en cada figura. La separación por colores indica dos péptidos distintos derivados de una misma región proteica continua.

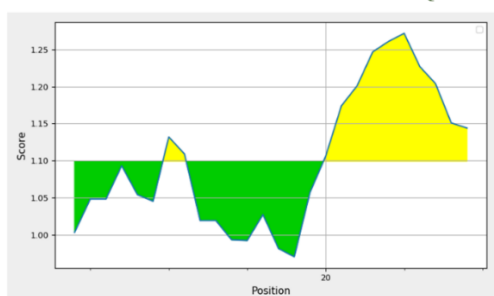
A) S1b - SQCTRTQLPPAYTVYKHTPINLVRDLPQGFS



B) S2c - SNKKFLPFRVYSTGNSNVFQRVYSTGNSNVFQC



C) Sfa - FPNITNLCPFGEVFNATRFASVCVACYFPLQS



D) Sfb - GFNCYFPLQSYGNLDSKVGGYQAGSTPCNGV

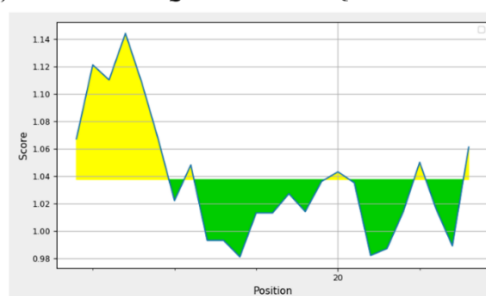


Figura 15. Antigenicidad de péptidos diseñados *in silico* IEDB y sintetizados por un tercero certificado GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). La posición de aminoácidos de los péptidos: A) S1b- **SQCTRTQLPPAYTVYKHTPINLVRDL**PQGFS; B) S2c- **SNKKFLPFRVYSTGSNVFQ**RVYSTGSNVFQC; C) SFa- FPNITNLCPFGEVFNATRFASVCVACYFPLQS; D) SFb-*GFNCYFPLQSYGNLDSKVGGYQAGS*-TPCNGV, se observa de forma horizontal la posición de cada uno de los aminoácidos de cada figura, y el cálculo mediante el algoritmo BepiPred se observa de forma vertical en cada figura. La separación por colores indica dos péptidos distintos derivados de una misma región proteica continua.

13.3.4 Extracción de ARN de cultivos 3D tras la estimulación con péptidos virales y estandarización de la temperatura de oligonucleótidos.

La Fig. 16 muestra la integridad del ARN total obtenido a partir de cultivos 3D a las 24 h (A) y 48 h (B). En ambos tiempos se observaron bandas definidas correspondientes a los ARN ribosomales 28S, 18S y 5.8S, lo que indica una adecuada integridad del ARN extraído. No se evidenció un patrón de degradación, en ninguno de los tratamientos evaluados. Así mismo, los perfiles de migración fueron comparables entre los cultivos 3D sin estímulo, los estimulados con LPS y aquellos tratados con péptidos, lo cual confirma que el ARN obtenido presentó calidad e integridad comparables entre las condiciones experimentales. En consecuencia, la Fig. 17 muestra los productos de amplificación obtenidos a partir de cultivos 3D estimulados con LPS y péptidos, empleando un gradiente de temperaturas de alineamiento. En los geles de agarosa se observaron bandas definidas y específicas para cada uno de los genes analizados, incluyendo *IL-8*, *PCNA*, *IL-1 β* , *IL-6*, *CCL-2*, *MMP-9*, *Integrin- α* , *uPA*, *NF κ B1*, *uPAR*, *β -Catenina*, *IFN- β* y *GAPDH*, con tamaños de amplicón concordantes con los valores teóricos esperados en la Tabla 11. La variación en la intensidad y definición de las bandas a lo largo del gradiente permitió identificar la temperatura de alineamiento óptima para cada gen, caracterizada por la presencia de un único producto específico y ausencia de amplificación inespecífica. Además, estos resultados confirman que la retrotranscripción fue eficiente y que el ADNc obtenido presentó la calidad necesaria para la estandarización de las condiciones de PCR, permitiendo su posterior empleo en los análisis de expresión génica.

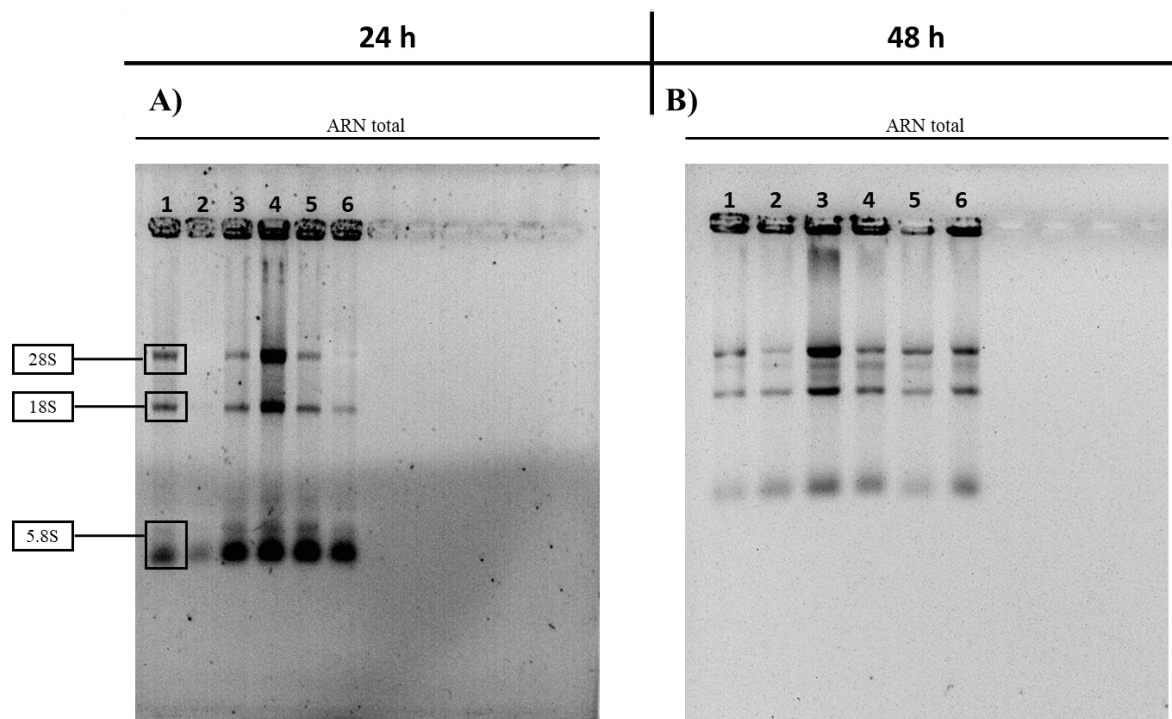


Figura 16. ARN total en geles de agarosa al 1 % corrido por 30 min a 120 V. Tiempo de exposición **(A)** 24 h; **(B)** 48 h, pozos **1 y 2** cultivos 3D sin estimulo; pozos **3 y 4** cultivos 3D con LPS; pozos **5 y 6** cultivos 3D con péptidos.

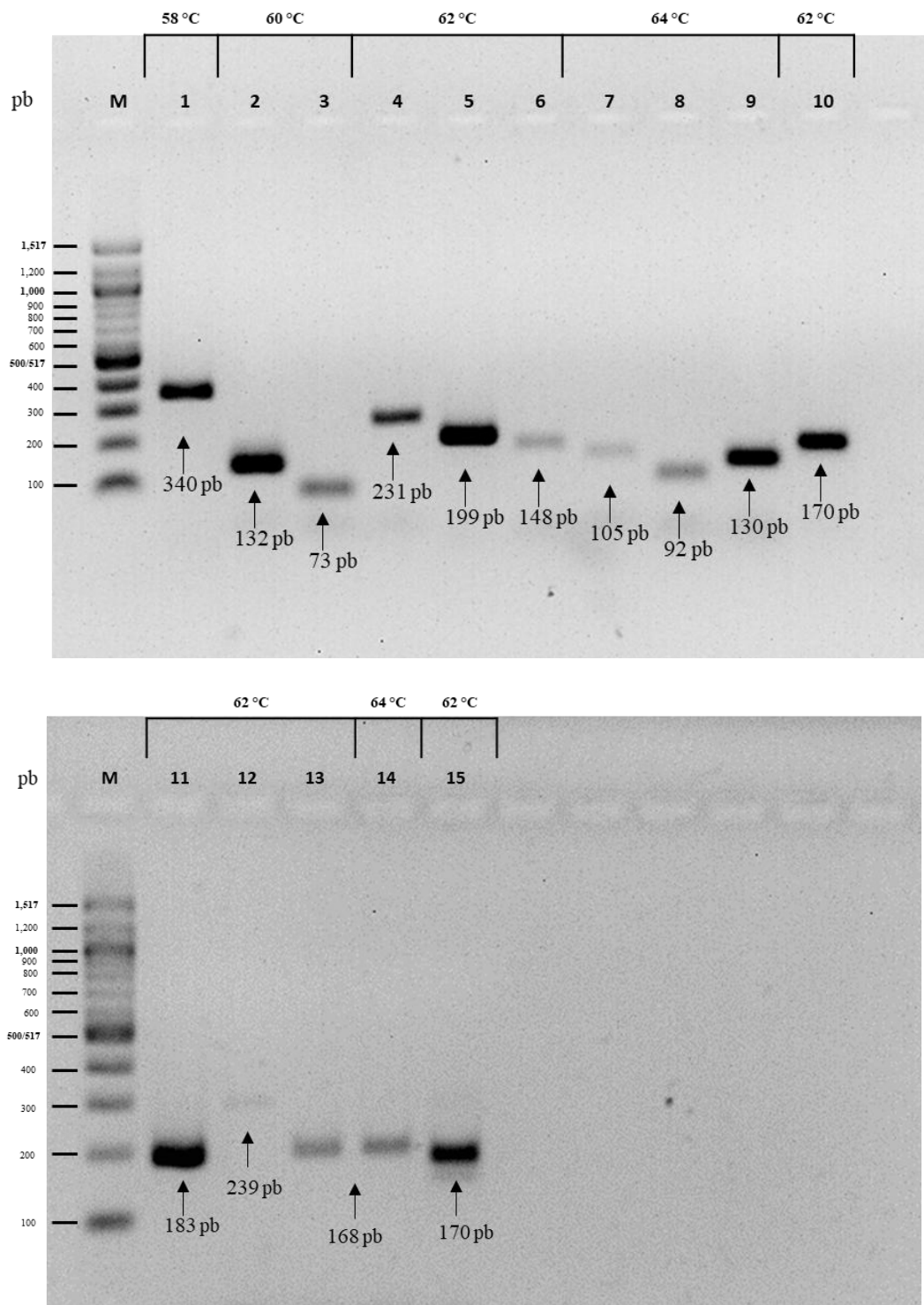


Figura 17. Productos de la amplificación de cultivos 3D con estímulos (LPS y PEP) de una porción de los genes (1) *IL-8*; (2) *PCNA*; (3) *IL-1 β* ; (4) *IL-6*; (5) *CCL-2*; (6) *MMP-9*; (7) *Integrina- α* ; (8) *uPA*; (9) *NF κ B1*; (10) *GAPDH*; (11) *uPAR*; (12) *β -Catenina*; (13) *IFN- β* ; (14) *IFN- β* ; (15) *GAPDH*. Gel de agarosa al 1.5 % corrido durante 45 min a 100 V.

13.3.5 Integridad tridimensional de A549 tras la estimulación con péptidos virales.

11.3.5.1 Histología.

El análisis histológico mediante hematoxilina-eosina reveló que los cultivos 3D de células A549 mantuvieron una arquitectura esferoidal compacta y organizada bajo todas las condiciones experimentales, tanto a las 24 h como a las 48 h después de la estimulación. Los dos tratamientos LPS y PEP no indujeron alteraciones morfológicas severas, pérdida de cohesión celular o signos evidentes de daño tisular irreversible, en comparación con los cultivos sin estímulo. Por lo tanto, la integridad estructural del epitelio alveolar 3D se conserva durante las primeras 48 h de exposición. No obstante, si bien el análisis histológico permite evaluar cambios morfológicos generales, no es suficiente para discriminar entre procesos celulares específicos, como apoptosis temprana, daño subletal o activación de genes de supervivencia. En este sentido, la ausencia de alteraciones estructurales evidentes no excluye la activación de vías moleculares subyacentes, por lo que estudios complementarios que incluyan análisis proteicos, inmunohistoquímica o marcadores específicos de muerte celular y daño tisular serán útiles para caracterizar con mayor precisión el estado funcional de los cultivos 3D bajo estas condiciones (Fig. 18).

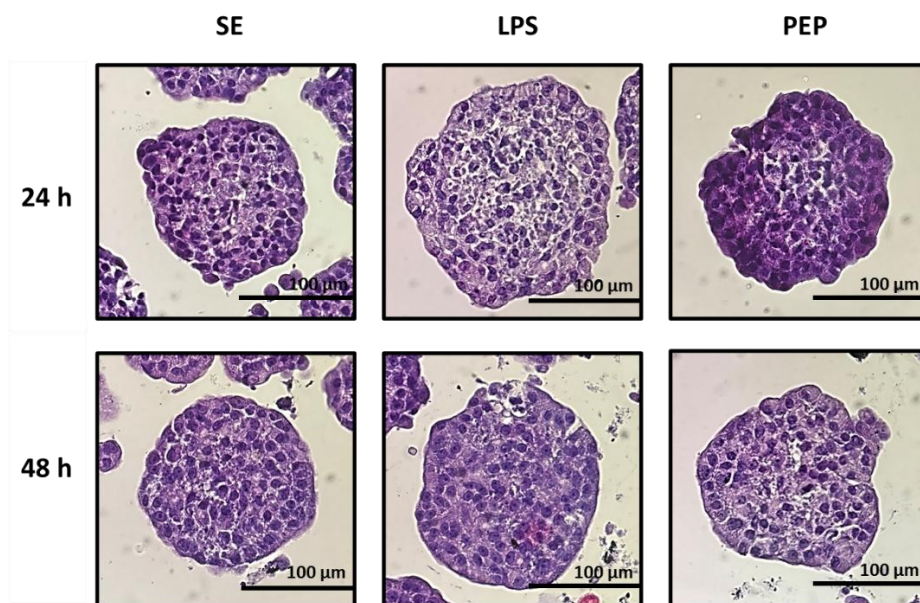


Figura 18. Análisis histológicos de cultivos 3D de células epiteliales pulmonares A549 durante ocho días de proliferación, observados mediante microscopía óptica (objetivo 40x). Los cultivos fueron expuestos a tres

estímulos distintos y examinados a las 24 y 48 h, empleando una densidad inicial de 15×10^4 células. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) muestra el patrón morfológico. Los nucleos ácidos teñidos con hematoxilina en color violeta y citoplasma, colágeno y tejido conjuntivo teñido de rosa. En el eje horizontal se muestran los diferentes estímulos, y en el eje vertical, los tiempos de exposición.

11.3.5.2 Expresión de moléculas asociadas a la adhesión celular en cultivos 3D mediante qPCR.

La expresión relativa de los receptores *integrina- α* y *uPAR* en cultivos 3D estimulados con péptidos virales aumento respecto al control sin estímulo a las 24 h. De ello se obtuvo que los cultivos 3D estimulados con péptidos mostraron un aumento significativo en la expresión de *Integrina- α* , en comparación con el control ($p < 0.05$), mientras que LPS no mostró diferencias frente al control. En el caso de *uPAR*, la expresión fue significativamente mayor en el grupo PEP en comparación con el control ($P < 0.001$) y con LPS ($P < 0.01$). A las 48 h, *uPAR* se mantuvo con respecto al control ($P < 0.05$) y en LPS se mantuvo un ligero aumento respecto al control ($P < 0.01$). Sin embargo, aunque la expresión de *integrina- α* disminuyó, está permaneció elevada con diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control, mientras que LPS no mostró diferencias frente al grupo control. Además, *uPA* incrementó su expresión a las 48 h respecto a su control ($P < 0.05$) y LPS ($P < 0.05$). En concordancia con la integridad estructural observada mediante H&E, el incremento del eje uPA/uPAR e *integrina- α* sugiere una posible contribución de este eje al mantenimiento de la cohesión celular en cultivos 3D de A549 (Fig. 19).

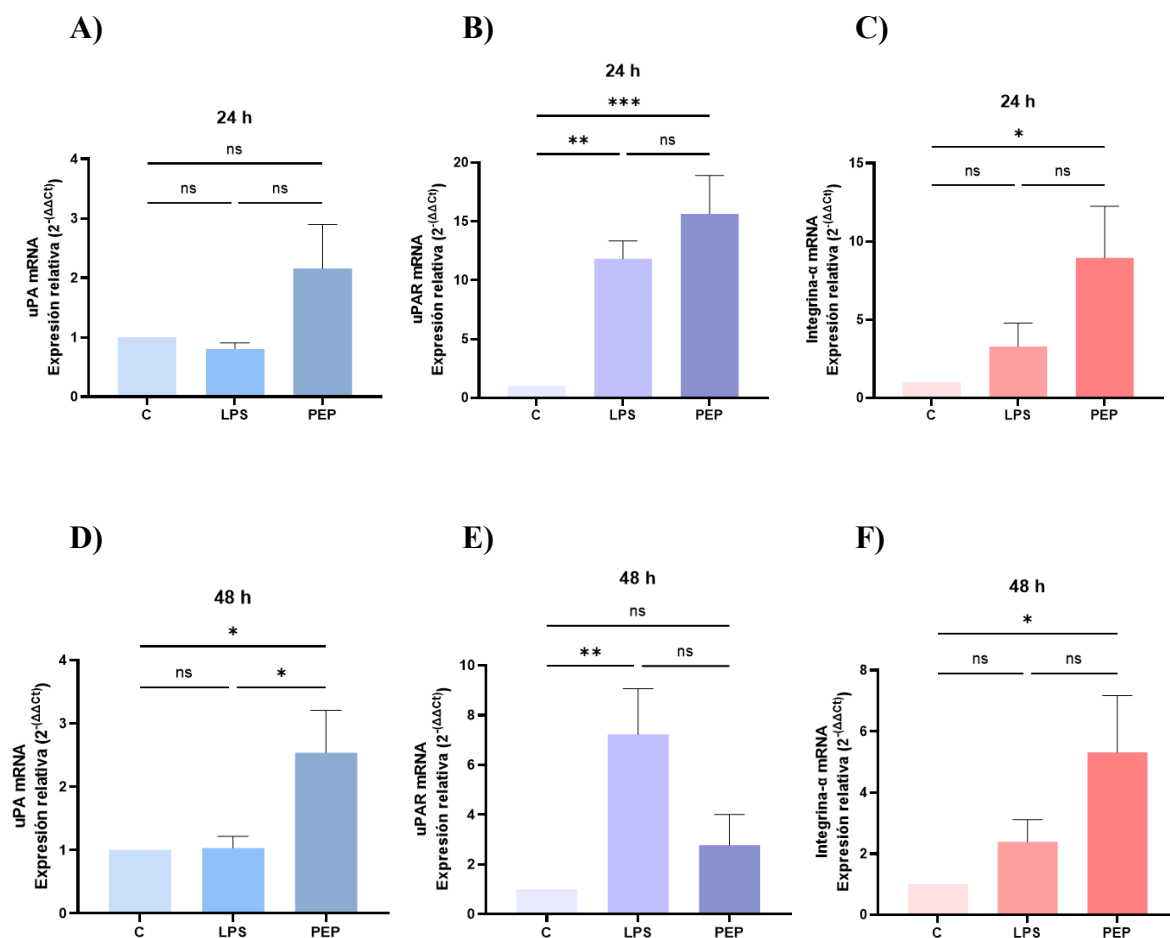


Figura 19. Expresión relativa de genes de mantenimiento tisular por PCR tiempo real (qPCR) con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a las 24 h y 48 h de los grupos: cultivos 3D sin estímulo (Control, C); cultivos 3D con LPS (LPS); y cultivos 3D con péptidos (PEP), de los genes (A, D) *uPA*; (B, E) *uPAR*; (C, F) *Integrina-α*. Los datos se normalizaron respecto a GAPDH y al grupo control. Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, respectivamente. ($\pm$ S.E.M, $n=3$ en cada grupo).

13.3.6 Viabilidad tisular, metabolismo y proliferación celular.

13.3.6.1 Liberación de ADN total.

En un modelo de cultivo 3D se encuentra una baja liberación de ADN en comparación con un control de un cultivo celular de células muertas, las cuales fueron lisadas con Tritón X-100 1X). Las células muertas representan un 100% de liberación de ADN al medio, debido a un daño en sus membranas celulares. En la Fig. 20 se observa que los cultivos 3D tienen una

baja liberación de ADN con respecto a las células muertas, lo que permite deducir que existen células vivas. En los tratamientos con exposición a estímulos inflamatorios, correspondientes a cultivos 3D con péptidos (PEP) y cultivos 3D con lipopolisacárido (LPS) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control positivo (cultivos 3D sin estímulo). Este resultado sugiere que, en el contexto 3D, la organización espacial de las células permite una disposición indistinta a los estímulos, sin afectar de forma diferencial su viabilidad. Además, la ausencia de citotoxicidad observable en los cultivos tratados con la mezcla de péptidos indica que estos no comprometen la integridad de las membranas celulares bajo las condiciones evaluadas. No obstante, estos hallazgos deben ser confirmados mediante estudios complementarios específicos.

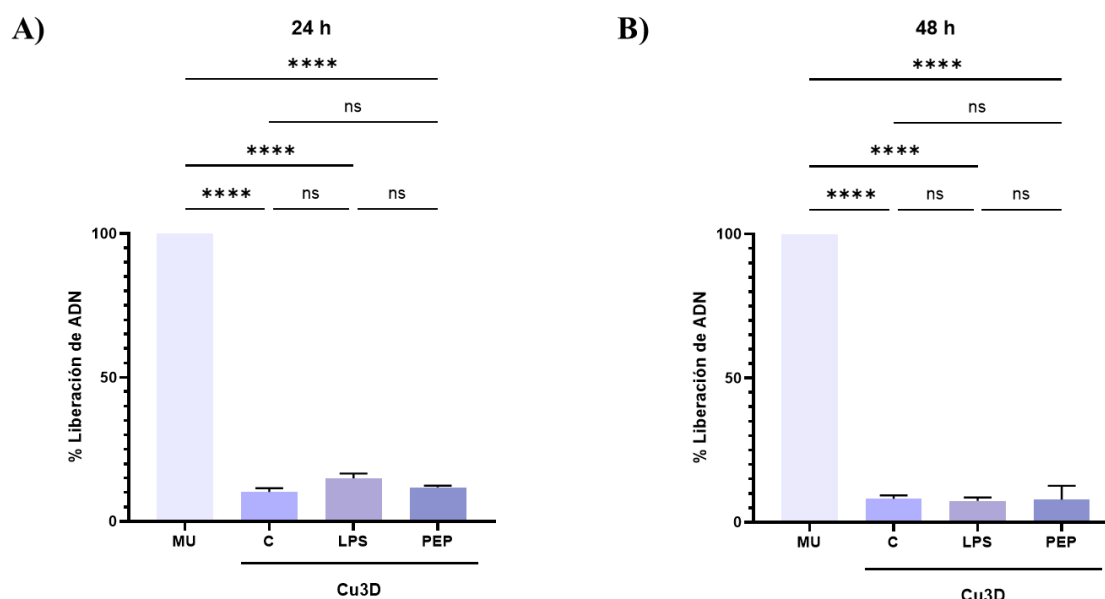


Figura 20. Porcentaje de liberación de ADN total de diferentes grupos celulares. **(A)** Porcentaje de liberación de ADN total por grupo a 24 h de estímulo; **(B)** Porcentaje de liberación de ADN total por grupo a 48 h de estímulo. Los resultados muestran Anova de una vía pertenecientes a los grupos: MU = Células muertas; C = Cultivo 3D; LPS= Cultivo 3D expuesto a LPS; PEP = Cultivo 3D expuesto a péptidos ($\pm$ S.E.M, $n=3$ en cada grupo), durante el desarrollo experimental. Todos los valores se normalizaron respecto a los controles negativos (células muertas) equivalente 100% de liberación de ADN y los controles positivos (cultivos 3D). Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas, **** $P<0.0001$, respectivamente.

13.3.6.2 Proliferación celular/viabilidad.

La actividad metabólica en sistemas de cultivo 3D está controlada por las interacciones célula-célula-MEC que les permite adoptar diferentes estados de diferenciación celular según la disposición de los nutrientes. Este fenómeno se corrobora con el cambio colorimétrico (actividad ADM) de la prueba de CCK8, tal y como se muestra en la Fig. 22. La viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico WST-8 (CCK8) se evaluó en los grupos de cultivos 3D sin estímulo (control, C); cultivos 3D con LPS (LPS); cultivos 3D con péptidos (PEP). A las 48 h de exposición, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre los grupos experimentales ($p < 0.05$). Sin embargo, a las 24 h los cultivos 3D tratados con LPS mostraron un incremento significativo en la actividad metabólica en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Estos resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas, ninguno de los estímulos aplicados tuvo un efecto citotóxico evidente ni comprometió la integridad o la función metabólica celular durante las primeras 48 h de exposición (Fig. 21). No obstante, el incremento observado en la actividad metabólica posterior a la estimulación con LPS sugiere una posible activación de procesos asociados a la proliferación celular, la cual será validada mediante el análisis de expresión de genes relacionados con este mecanismo. Además, estos hallazgos son consistentes con el porcentaje de liberación de ADN observado en la prueba anterior, lo que respalda la ausencia de daño celular.

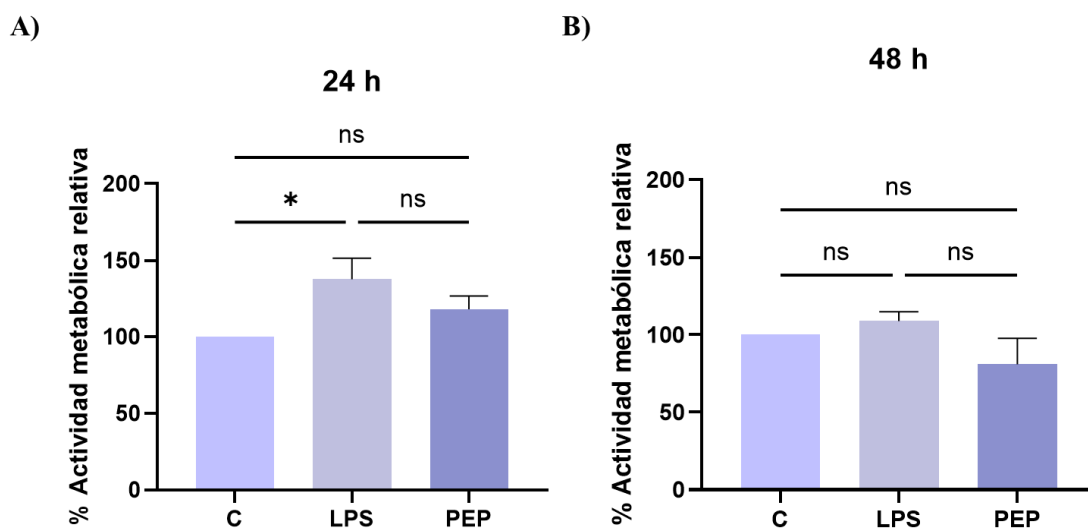


Figura 21. Porcentaje de actividad metabólica relativa a partir de la ADM de diferentes grupos celulares. **(A)** Actividad metabólica relativa por grupo a 24 h de estímulo; **(B)** Actividad metabólica relativa por grupo a 48 h de estímulo. Los resultados muestran Anova de una vía pertenecientes a los grupos: Blanco = Medio; Control (-) = Medio con reactivo CCK8, C = Cultivo 3D; PEP = Cultivo 3D estimulado con péptidos; LPS = Cultivo 3D estimulado con LPS ($\pm$ S.E.M, n=3 en cada grupo), durante el desarrollo experimental. Los datos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

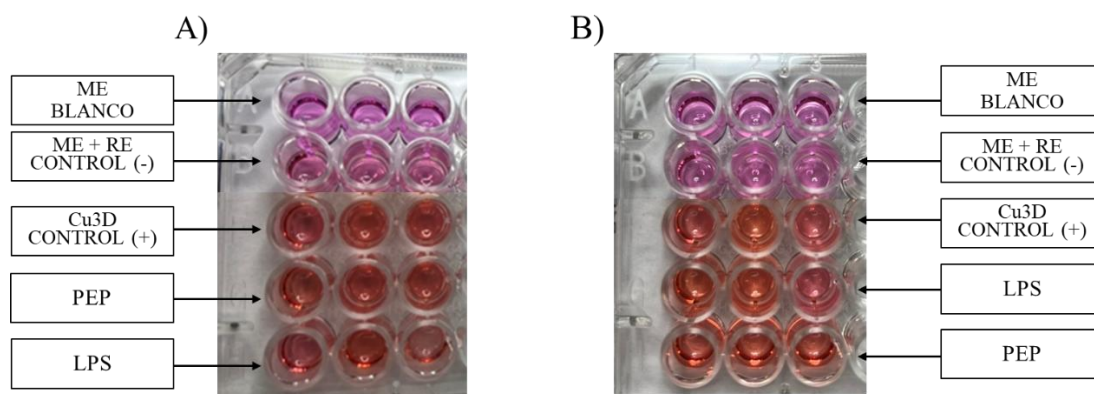


Figura 22. Alteraciones cromáticas de la prueba de citotoxicidad CCK8 como indicador de viabilidad celular. **(A)** Alteraciones cromáticas por grupo a 24 h de estímulo; **(B)** Alteraciones cromáticas por grupo a 48 h de estímulo. Los grupos se observan del lado izquierdo y derecho respectivamente: Blanco = Medio; Control (-) = Medio con reactivo CCK8; Control (+) (Cu3D) = Cultivo 3D; PEP = Cultivo 3D estimulado con péptidos; LPS = Cultivo 3D estimulado con LPS.

13.3.6.3 Expresión génica de marcadores de proliferación y cohesión celular mediante qPCR.

La expresión relativa de *PCNA* en cultivos 3D con péptidos aumento respecto al control sin estímulo a las 24 h. De ello, se obtuvo que la expresión de *PCNA* indujo diferencias estadísticamente significativas en PEP ($P<0.01$) y en LPS ($P<0.0001$) en comparación con el control, con un aumento significativo en LPS ($P<0.01$) respecto a los PEP. De manera consistente, se observaron cambios en la actividad metabólica evaluada mediante CCK-8, correlacionados con la proliferación celular del tejido mediante este marcador, el cual suele interpretarse como un indicador de activación celular y adaptación al estrés. Por otro lado, aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de β -Catenina entre los

grupos experimentales, se identificó un incremento marcado en su expresión (aproximadamente 40 veces) a las 24 h, acompañado de una alta variabilidad, lo que podría reflejar una respuesta heterogénea de las células ante los estímulos. No obstante, el mantenimiento en la expresión de β -Catenina sugiere la permanencia de uniones celulares estrechas, independiente al estímulo. Así como, la integridad de este cultivo tridimensional al menos de las células centrales del tejido (Fig. 23).

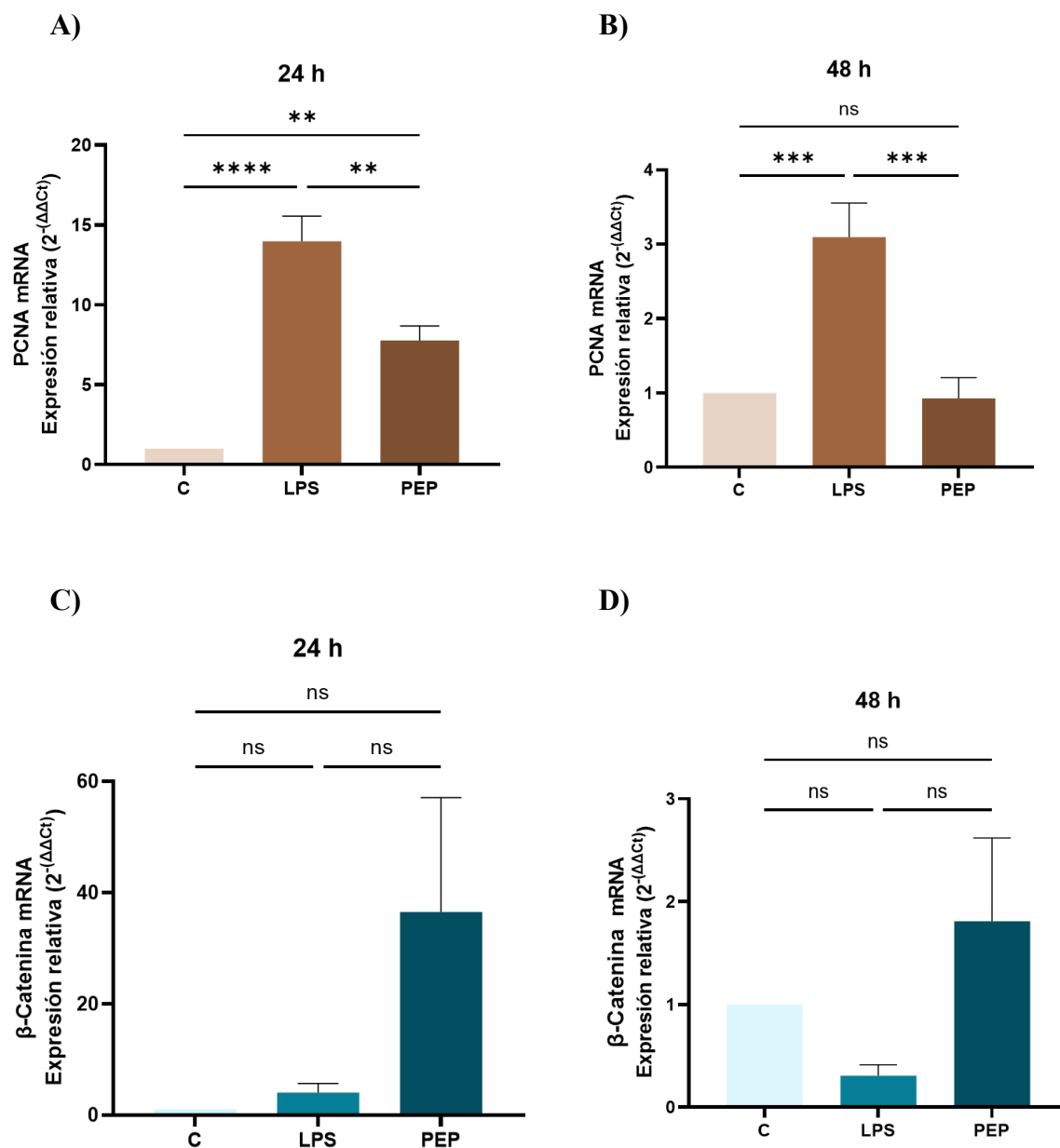


Figura 23. Expresión relativa de genes de mantenimiento tisular por PCR tiempo real (qPCR) con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a las 24 h y 48 h de los grupos: cultivos 3D sin estímulo (Control, C); cultivos 3D con LPS (LPS); y cultivos 3D con péptidos (PEP), de los genes **(A, C)** PCNA; **(B, D)** β -Catenina. Los datos se normalizaron respecto a GAPDH y al grupo control. Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, respectivamente. ($\pm$ S.E.M, $n=3$ en cada grupo).

13.4 Determinación de la respuesta inflamatoria de cultivos 3D de A549 tras su exposición a péptidos derivados de la proteína S.

La expresión relativa de *NFkB*, un factor de transcripción clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, aumentó en respuesta a péptidos virales respecto al control sin estímulo a las 24 h, así como la citocina proinflamatoria *IL-6*, el quimioatrayente de monocitos y macrófagos *IL-8* y el interferón antiviral *IFN- β* , posiblemente reguladas por dicha vía. De ello se obtuvo que los cultivos 3D estimulados con péptidos mostraron un aumento significativo en la expresión de *NFkB*, *IL-6* e *IFN- β* , en comparación con el control ($p < 0.05$), mientras que LPS no mostró diferencias frente al control. Para *IL-8*, se observó una elevación significativa en los grupos tratados con LPS ($P < 0.001$) y PEP ($p < 0.05$) respecto al control, siendo mayor para LPS. Para *CCL-2*, la expresión mostró un aumento significativo en el grupo PEP y LPS ($P < 0.01$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la expresión de *IL-1 β* entre los grupos experimentales (Fig. 24).

A las 48 h, no se observaron diferencias significativas en la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *CCL-2*, *IL-1 β* e *IFN- β* entre los grupos experimentales, lo cual sugiere que los genes se regularon negativamente posiblemente en PEP respecto al control, mientras que *IL-1 β* no se expresó respecto al control (Fig. 25). Esto permite deducir que, aunque los péptidos se reportan como inductores de citocinas, en este modelo 3D no se observó una respuesta sostenida generalizada por *IL-6*, *IL-8*, *CCL-2*, *PCNA* y el factor de transcripción NFkB. Además, la ausencia de citotoxicidad en análisis paralelos de los grupos tratados refuerza la posibilidad de que los péptidos induzcan una activación de la expresión temporal controlada (Fig. 24 y 25).

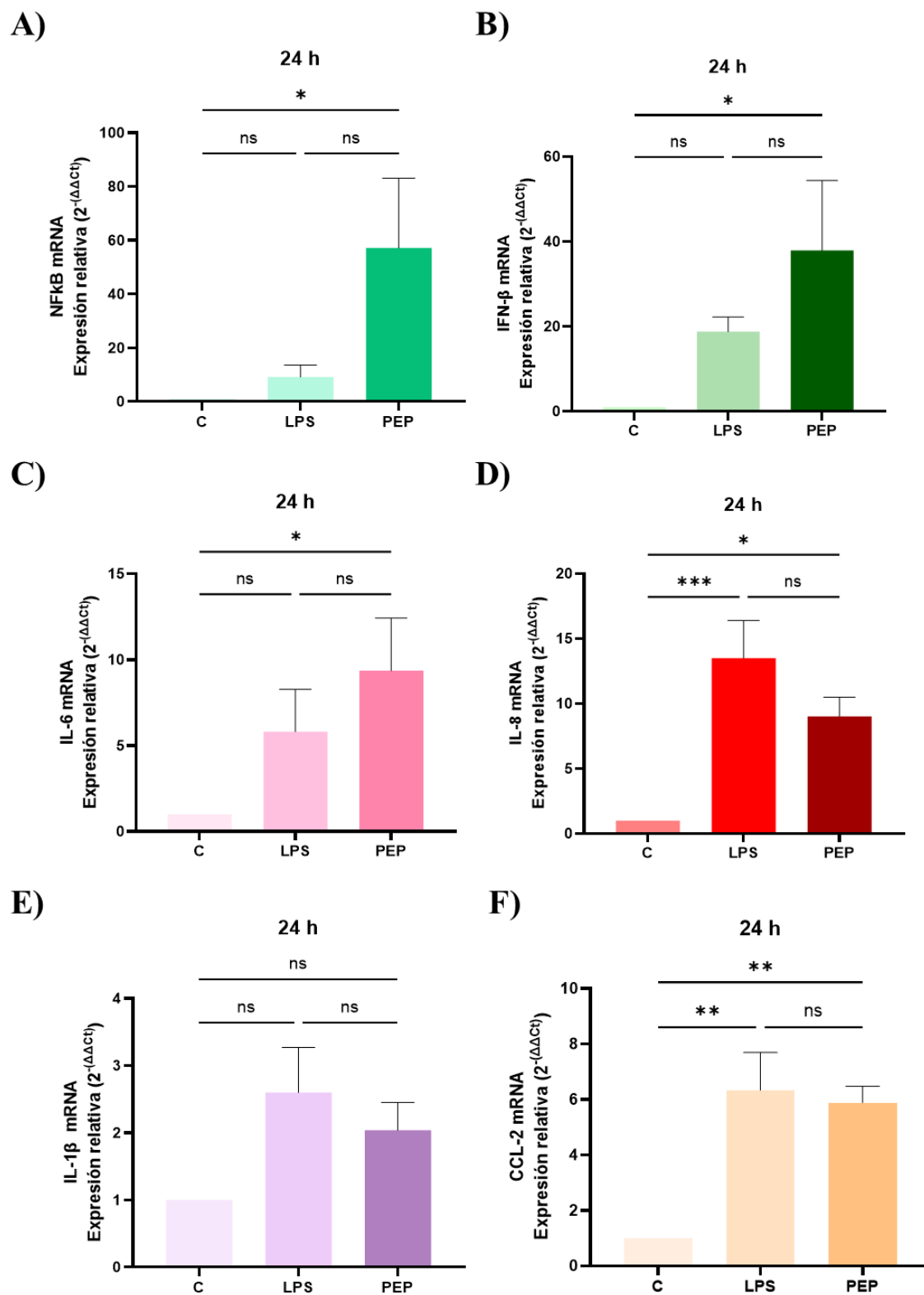


Figura 24. Expresión relativa de citocinas por PCR tiempo real (qPCR) con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a las 24 h de los grupos: cultivos 3D sin estímulo (Control, C); cultivos 3D con LPS (LPS); y cultivos 3D con péptidos (PEP),

de los genes **(A)** *NFkB*; **(B)** *IFN-β*; **(C)** *IL-6*; **(D)** *IL-8*; **(E)** *IL-1β*; **(F)** *CCL-2*. Los datos se normalizaron respecto a GAPDH y al grupo control. Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, respectivamente. (± S.E.M, n=3 en cada grupo).

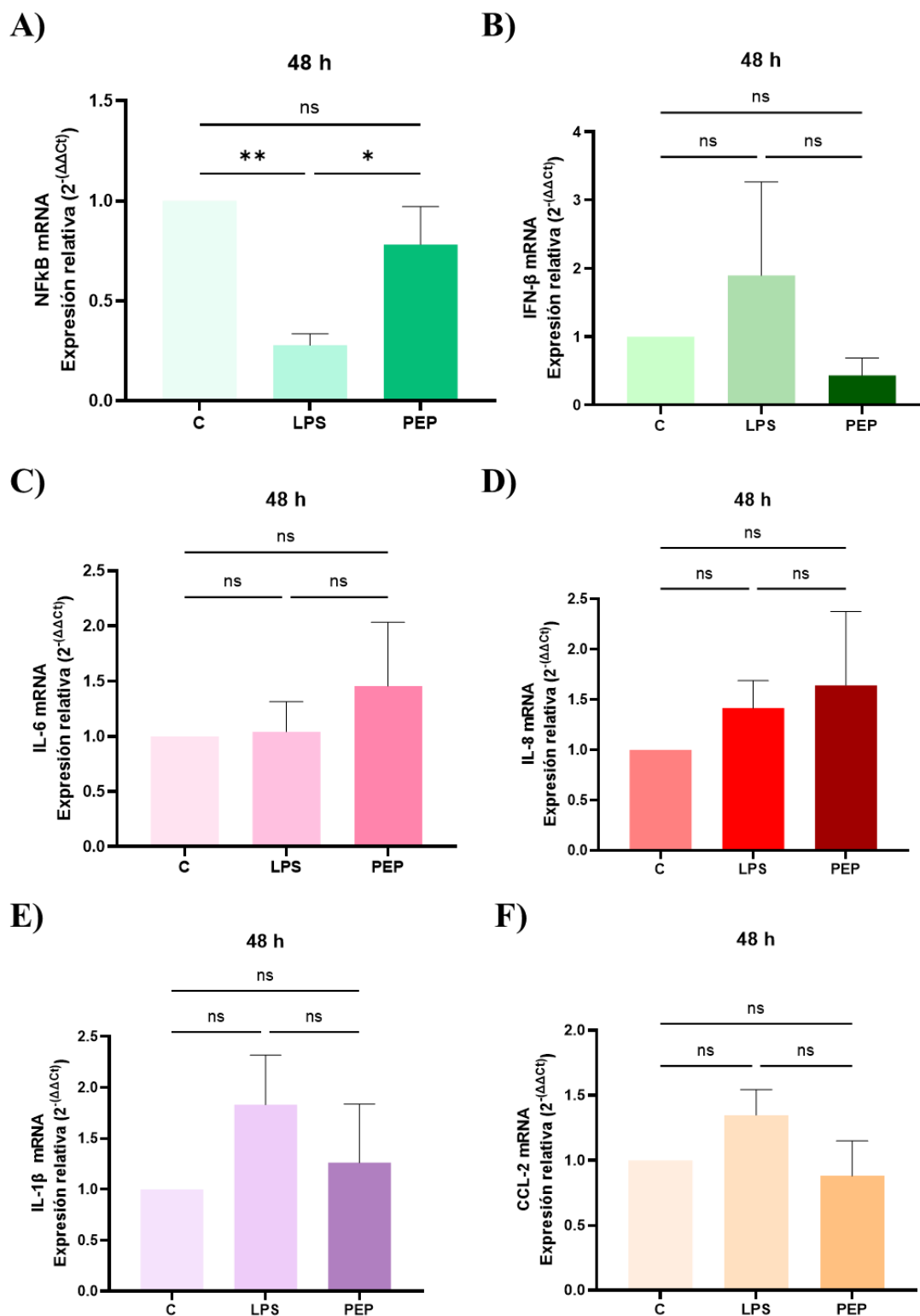


Figura 25. Expresión relativa de citocinas por PCR tiempo real (qPCR) con el método 2^{-ΔΔCt} a las 48 h de los grupos: cultivos 3D sin estímulo (Control, C); cultivos 3D con LPS (LPS); y cultivos 3D con péptidos (PEP), de los genes (A) *NFκB*; (B) *IFN-β*; (C) *IL-6*; (D) *IL-8*; (E) *IL-1β*; (F) *CCL-2*. Los datos se normalizaron respecto

a GAPDH y al grupo control. Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, respectivamente. ($\pm$ S.E.M, $n=3$ en cada grupo).

14. Discusión.

La caracterización morfológica y funcional de los cultivos 3D representa un paso esencial para validar la viabilidad del modelo, así como para definir si un tipo celular tiene la capacidad de formar estructuras adherentes y organizadas, como esferas o agregados. En este estudio se logró estandarizar una densidad de siembra óptima para la línea celular A549 a través de un esquema de cultivo temporal y tinción histológica con hematoxilina y eosina, se determinó que una densidad de 10×10^4 - 15×10^4 células por micromolde es adecuada para favorecer la formación de agregados y mantener la viabilidad celular de 4-10 días durante el tiempo de cultivo. De acuerdo con trabajos previos, la adecuada compactación celular favorece la producción de la MEC y por lo tanto, la adquisición de un fenotipo más fisiológico, para estudios posteriores como evaluación de citotoxicidad o expresión génica (Fang & Eglen, 2017).

En contraste, los cultivos 3D realizados con células CaCo-2 no mostraron formación de agregados definidos, a pesar de ser evaluados con distintas densidades celulares: las células se observaban con capacidad de división, pero sin establecer interacciones estables que permitieran la autoorganización en estructuras esféricas. Esto sugiere que, a diferencia de A549, las CaCo-2 podrían requerir condiciones específicas para adquirir una respuesta morfogénica tridimensional, como factores de crecimiento o estímulos mecánicos que simulen las condiciones del epitelio intestinal *in vivo* (Edmondson *et al.*, 2014; Eglen & Klein, 2017; X. Huang *et al.*, 2022). En conjunto, estos resultados respaldan la selección de la línea A549 como un modelo epitelial alveolar adecuado para el análisis funcional de respuestas inducidas por estímulos asociados a *SARS-CoV-2*.

En este estudio se evaluó la expresión de citocinas, quimiocinas y marcadores de remodelación celular en un modelo 3D de células tratadas con péptidos derivados de secuencias conservadas de la proteína S, previamente descritos por su potencial inmunoestimulante en el desarrollo de vacunas (Calderon-Rico *et al.*, 2023; Piña, 2021). Los resultados muestran que, a las 24 horas, los péptidos virales inducen un aumento significativo en la expresión de *Integrina- α* , *uPAR*, *NF- κ B*, *CCL-2*, *IL-6*, *IL-8*, *PCNA* e *IFN- β* . Las cuales

se mantienen a las 48 h con un aumento en la expresión de *uPA*, lo cual integra una respuesta inicial de los cultivos 3D como mecanismo de supervivencia, compatible con un estímulo peptídico viral.

El uso de lipopolisacárido (LPS) como control positivo permitió validar la capacidad funcional del modelo tridimensional de células A549 para montar una respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B. El LPS es un agonista clásico del receptor TLR4 y su señalización converge en la activación del complejo IKK y la translocación nuclear del heterodímero p50/p65, promoviendo la expresión de citocinas como IL-6, IL-8 y CCL-2 (J. Liu *et al.*, 2011; T. Liu *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2021). En este estudio, la respuesta inducida por LPS confirmó que los cultivos en 3D conservan una señalización inflamatoria, lo cual resulta esencial para interpretar de manera adecuada los efectos observados tras la exposición a péptidos derivados de la proteína S. A diferencia del estímulo bacteriano, los péptidos virales indujeron una respuesta modulada, consistente con un estímulo viral, lo que sugiere que los cultivos 3D discriminan entre distintos grados de intensidad y modalidades de activación inflamatoria. Esto permitió establecer un punto de referencia para interpretar la magnitud y el perfil de la respuesta inducida por los péptidos virales (Shirato & Kizaki, 2021; Do *et al.*, 2022; Latifi-Pupovci, 2022).

Desde una perspectiva estructural, estos cambios transcripcionales se reflejaron en la preservación de la arquitectura tridimensional del modelo. La evaluación histológica mediante tinción de hematoxilina y eosina evidenció agregados celulares compactos, con preservación de la arquitectura tridimensional y ausencia de desorganización celular hasta las 48 h. Estos hallazgos sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas, los estímulos evaluados no comprometieron la integridad estructural del modelo 3D. Esta conservación de cohesión celular y de la MEC podría estar relacionada con la activación controlada de mecanismos de remodelación tisular, en los que el sistema *uPA/uPAR* e integrinas desempeñan un papel relevante. En condiciones fisiológicas, la interacción de *uPA* con su receptor *uPAR* favorece la proteólisis de plasminógeno a plasmina, lo que permite una degradación regulada de componentes de la MEC. Este proceso no solo facilita la reorganización tisular, sino que también puede liberar factores de crecimiento previamente

secuestrados en la matriz, los cuales pueden interactuar con receptores tirosina-cinasa o serina/treonina-cinasa e inducir la activación de vías de señalización asociadas a la proliferación, supervivencia y mantenimiento tisular.

Uno de los hallazgos de activación temprana más relevantes fue el incremento en la expresión de *uPAR*, tanto en respuesta a LPS como a péptidos virales. *uPAR* es un receptor anclado a la membrana mediante un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que actúa como plataforma multifuncional de señalización al asociarse con integrinas como $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$. A través de estas interacciones, *uPA-uPAR* e integrinas favorecen la activación de múltiples vías de señalización, incluyendo PI3K/AKT, JAK/STAT y MAPK/ERK, las cuales podrían converger en la translocación de NF- κ B al núcleo, y en la regulación de la expresión de distintos genes, contribuyendo al mantenimiento de la integridad estructural del tejido. Incluso, diversas revisiones han establecido que la señalización mediada por *uPAR* y co-receptores como las integrinas (*uPAR-integrinas*) puede activarse de forma independientemente de la proteólisis mediada por *uPA*. *uPAR* es escindido proteolíticamente desde la superficie celular, dando lugar a su forma soluble (*suPAR*), la cual se asocia a la severidad clínica en la enfermedad por COVID-19, así como con el desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y procesos de fibrosis post-viral (Iftikhar *et al.*, 2025). En este contexto, es plausible considerar que los péptidos virales podrían modular de manera temprana estos receptores (*uPAR-integrinas*), preparando al cultivo 3D para integrar señales dependientes de *uPA-uPAR* e integrinas a las 48 h, lo que podría favorecer un estado de mantenimiento celular más que un proceso de daño o desorganización tisular.

En este mismo sentido, la expresión del conjunto *uPAR-integrinas* sugieren que podrían converger con rutas clásicas de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), particularmente aquellos mediados por los receptores tipo Toll (TLRs). La proteína S de SARS-CoV-2, incluso en ausencia de replicación viral, es capaz de activar predominantemente TLR2 y TLR-4, desencadenando cascadas de señalización que culminan en la activación del factor de transcripción NF- κ B (Azzarone *et al.*, 2025; Kesika *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2021).

En concordancia, en este estudio se observó un incremento en la expresión de la subunidad *NFkB1* (P50) a las 24 h, particularmente en respuesta a los péptidos derivados de la proteína S. Si bien este análisis no permite distinguir la formación de dímeros específicos de NFkB, es importante destacar que la cuantificación de NFkB por PCR tiempo real (RT-qPCR) refleja cambios a nivel transcripcional y no constituye una medida directa de su activación funcional. No obstante, los perfiles de citocinas, quimiocinas y marcadores de reparación observados al alza (*CCL-2*, *IL-6*, *IL-8*, *PCNA* e *IFN-β*) son producto de una posible señalización mediada predominantemente por el heterodímero canónico p50/p65, más que por homodímeros de p50/p50. En el epitelio pulmonar, este heterodímero se asocia típicamente con la inducción de genes proinflamatorios, mientras que el homodímero p50/p50 suele vincularse con funciones represoras o de resolución inflamatoria. Desde este punto de vista, la ausencia de un perfil antiinflamatorio en el presente modelo resulta consistente con estudios previos realizados en células A549, donde la expresión de genes inflamatorios depende de manera predominante de la activación de NFkB (Holden *et al.*, 2004).

En línea con la activación de NFkB, las citocinas IL-6 e IL-8 son componentes centrales de la inflamación pulmonar en COVID-19 y se han correlacionado con la severidad clínica cuando su producción se amplifica en presencia del sistema inmune. IL-6 es una citocina proinflamatoria que participa en la inducción de la fiebre y en la respuesta de fase aguda. Por su parte, IL-8 funciona como una quimiocina que dirige y promueve el reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, el presente modelo demuestra que el epitelio alveolar por sí solo es capaz de iniciar esta respuesta, lo que sugiere que el tejido pulmonar podría contribuir de manera temprana al entorno proinflamatorio previo a la infiltración de células inmunes. Este hallazgo concuerda con estudios que indican que la proteína S puede inducir directamente la producción de IL-6 e IL-8 a través de la activación de NFkB, de forma independiente de la replicación viral, reforzando la idea de que componentes estructurales del virus actúan como estímulos inflamatorios directos sobre el epitelio pulmonar (Khan *et al.*, 2021).

En fases tempranas, la activación coordinada de uPAR-integrinas actúa como un sistema sensor que integra señales de estrés y favorece la translocación de NFkB, así como la inducción de genes inflamatorios. Sin embargo, esta activación es transitoria y se encuentra sujeta a mecanismos de regulación negativa. En concordancia, la estabilización de la expresión *NFkB* a las 48 h, junto con la disminución de mediadores inflamatorios, es consistente con un estado de supervivencia celular y adaptación tisular, en el que las células epiteliales reducen la señalización inflamatoria sostenida y activan genes asociados al mantenimiento de la integridad estructural del tejido (Blasi & Carmeliet, 2002; Holden *et al.*, 2004; Croasdell Lucchini *et al.*, 2021; Kanno, 2023; Kesika *et al.*, 2024; Iftikhar *et al.*, 2025).

Además, la baja liberación de ADN observada en los cultivos 3D, en conjunto con los resultados obtenidos mediante el ensayo CCK-8, respalda la viabilidad celular del modelo bajo las condiciones experimentales evaluadas. La ausencia de incrementos marcados en la liberación de ADN sugiere que no ocurrió daño significativo de membrana ni muerte celular, lo cual es consistente con la preservación estructural observada histológicamente.

Desde el punto de vista funcional, la actividad metabólica se conservó en todos los grupos experimentales, con un incremento evidente en los cultivos estimulados con LPS. Este aumento podría reflejar una activación celular asociada a procesos de proliferación o aumento en la demanda energética, más que un efecto citotóxico. En el caso de los cultivos 3D estimulados con péptidos virales, si bien se observaron cambios compatibles con un aumento de la actividad metabólica, estos no fueron tan consistentes ni marcados como los inducidos por LPS, lo que sugiere una respuesta más modulada (Zhu *et al.*, 2017).

Los resultados anteriores se correlacionan con la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*) como parte de la reparación y proliferación celular, más que a daño irreversible, ya que se sugiere que el estímulo LPS favorece una activación proliferativa evidente en este modelo 3D. *PCNA* actúa como un cofactor esencial en la replicación del ADN y en la coordinación de mecanismos de reparación genómica, por lo que su incremento suele interpretarse como un indicador de activación celular y adaptación al estrés (Huh *et al.*, 2018).

En conjunto, estos datos permiten inferir que, tras una fase inflamatoria inicial mediada por *NFkB*, el cultivo epitelial en 3D estimulados con LPS o péptidos virales podrían transitar hacia un estado de adaptación y reorganización tisular, consistente con la activación de mecanismos orientados al mantenimiento de la integridad del tejido (Moldovan *et al.*, 2007).

Desde una perspectiva fisiopatológica, diversos virus han sido descritos como capaces de modular mecanismos de proliferación y supervivencia celular durante etapas tempranas de la infección, favoreciendo la conservación del tejido del hospedero hasta completar su ciclo replicativo (Han *et al.*, 2022; Jamison *et al.*, 2022; Lam Cabanillas *et al.*, 2021; Latifi-Pupovci, 2022).

En este sentido, los resultados obtenidos en relación con la expresión de β -Catenina podrían interpretarse como indicativos del mantenimiento de las uniones de adherencia y de la integridad del epitelio tridimensional. La β -Catenina se asocia con cadherinas en la membrana plasmática, formando complejos que conectan el citoesqueleto de actina y contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural del epitelio, así como de las uniones intercelulares, lo cual es esencial para preservar la arquitectura del cultivo 3D. La conservación de esta expresión, independientemente del estímulo aplicado, sugiere que el modelo mantiene mecanismos de adhesión que favorecen la cohesión tisular (Mantilla *et al.*, 2015; Z. Huang *et al.*, 2024)

Además, el incremento de *CCL-2 (MCP-1)*, una quimiocina clave en el reclutamiento de monocitos y macrófagos, sugiere que, este cultivo 3D de la línea celular A549, como representación de tejido alveolar pulmonar, podría desempeñar un papel activo en la atracción temprana de células inmunes. Estas observaciones refuerzan la noción de que el epitelio alveolar no solo responde a estímulos inflamatorios, sino que también prepara el microambiente para una respuesta inmunitaria posterior, aun en ausencia de células del sistema inmune en el modelo experimental. En concordancia con estos resultados, Khan *et al.* (2021) demostraron que la proteína S, en particular las subunidades S1 y S2 inducen potentemente la expresión de *CCL-2 (MCP-1)* en células pulmonares epiteliales, incluyendo

A549 y Calu-3, y que la elevación de esta quimiocina también está implicada en la severidad clínica de la enfermedad.

Por otro lado, la expresión de *IFN-β* mostró un aumento, particularmente a las 24 h tras la estimulación con péptidos derivados de la proteína S, mientras que la señal se atenuó a las 48 h. Este patrón temporal resulta de especial interés, dado que se ha documentado ampliamente que la infección por SARS-CoV-2 bloquea o retrasa activamente la respuesta de interferones tipo I (*IFN-α* e *IFN-β*) en diversas células, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, mediante la acción de las proteínas no estructurales virales (NSPs) que interfieren con la señalización aguas arriba de la inducción de *IFN-β* (Khan *et al.*, 2021).

Sin embargo, en el presente modelo 3D, la ausencia de replicación viral y de proteínas no estructurales con función antagonista permitiría que los péptidos derivados de la proteína S conserven su capacidad de activar vías antivirales tempranas en el epitelio alveolar. En este sentido, la inducción de *IFN-β* observada a las 24 h sugiere que el epitelio pulmonar posee la capacidad intrínseca de generar una respuesta antiviral inicial cuando el estímulo antigénico no posee la maquinaria de replicación. Así mismo, la disminución de *IFN-β* a las 48 h podría reflejar mecanismos de regulación negativa del entorno, como una adaptación del cultivo en 3D al estímulo, más que a la ausencia de activación antiviral. Estos datos en su totalidad resaltan el potencial de estos péptidos derivados de la proteína S como herramientas experimentales, por su potencial interés en el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a promover la activación de IFN tipo I sin los efectos inmunosupresores asociados a la replicación viral.

A pesar de la activación inflamatoria observada, no se detectaron evidencias claras de daño tisular severo ni de desorganización estructural irreversible en los cultivos en 3D estimulados con LPS o con péptidos derivados de la proteína S, en comparación con cultivos 3D sin estímulos, de acuerdo con el análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina. Esta observación es consistente con la ausencia de una respuesta proinflamatoria sostenida, la cual, en escenarios *in vivo* contribuye de manera significativa a la amplificación del daño tisular durante la denominada “tormenta de citocinas”. De igual forma, la ausencia de

citotoxicidad en los cultivos 3D tratados, evidenciada mediante pruebas de viabilidad WST-8 (CCK8) y la falta de liberación de ADN al medio en comparación con un control de células lisadas, respalda la integridad celular y la viabilidad del modelo en 3D bajo las condiciones evaluadas. Además, la combinación de la expresión de *NFkB*, citocinas, quimiocinas, y la modulación de vías asociadas a la adhesión celular como β -*Cateninas*, proliferación como *PCNA*, migración y señalización intracelular como el complejo *uPA-uPAR* e *integrinas*, permiten inferir que el epitelio podría encontrarse en un estado pre-inflamatorio. En este estado, el tejido epitelial sería capaz de interactuar funcionalmente con el sistema inmune en un contexto fisiológico, aun cuando este componente no esté presente en el modelo experimental. Además, esto indica que el modelo tridimensional de células alveolares pulmonares, tales como A549, es capaz de discriminar entre activación inflamatoria controlada y daño tisular manifiesto. No obstante, será útil complementar estos estudios con la expresión de otros mediadores inmunes y validación *in vivo* para confirmar su utilidad inmunológica.

En conjunto, los resultados apoyan la utilidad del modelo en 3D de la línea celular A549 como una herramienta para estudiar respuestas epiteliales frente a estímulos asociados a SARS-CoV-2. Los datos sugieren una secuencia plausible en la que la preparación de las células mediante receptores como *uPAR/integrinas* y TLRs podrían converger en *NFkB*, desencadenando una respuesta protectora inicial dominada por citocinas y quimiocinas, seguida de una respuesta antiviral y una transición hacia la proliferación, migración y mantenimiento tisular por *uPA-uPAR* e *integrinas* y *PCNA*. Adicionalmente, estudios futuros que incorporen análisis proteicos, activación funcional de *NFkB* y la interacción con células del sistema inmune serán útiles para definir con mayor precisión el papel del epitelio alveolar en la patogénesis de COVID-19.

15. Conclusión.

Este trabajo describe la respuesta de un modelo de cultivo tridimensional de células A549 frente a péptidos derivados de la proteína S de *SARS-CoV-2*, evidenciando cambios transcripcionales asociados a inflamación, señalización y mantenimiento tisular, sin comprometer la viabilidad ni la integridad estructural del modelo. Estos resultados posicionan al cultivo 3D como herramienta experimental útil en el análisis de respuestas epiteliales tempranas ante estímulos virales no replicativos, y evidencian su capacidad para discriminar respuestas específicas frente a distintos estímulos, como péptidos virales en comparación con estímulos bacterianos como el LPS.

16. BIBLIOGRAFÍA.

- Achilli, T.-M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(10), 1347-1360. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
- Acosta, P. L., Byrne, A. B., Hijano, D. R., & Talarico, L. B. (2020). Human Type I Interferon Antiviral Effects in Respiratory and Reemerging Viral Infections. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1372494. <https://doi.org/10.1155/2020/1372494>
- Antezana Llaveta, G., & Arandia-Guzmán, J. (2020). SARS-CoV-2: Estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Medica Boliviana*, 43(2), 172-178. <https://doi.org/10.47993/gmb.v43i2.85>
- Areo, O., Joshi, P. U., Obrenovich, M., Tayahi, M., & Heldt, C. L. (2021). Single-Particle Characterization of SARS-CoV-2 Isoelectric Point and Comparison to Variants of Interest. *Microorganisms*, 9(8), 1606. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081606>
- Arvelo, F., & Cotte, C. (2006). Metaloproteasas en la progresión tumoral: Revisión. *Investigación Clínica*, 47(2), 185-205.
- Azzarone, B., Landolina, N., Mariotti, F. R., Moretta, L., & Maggi, E. (2025). Soluble SARS-CoV-2 Spike glycoprotein: Considering some potential pathogenic effects. *Frontiers in Immunology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1616106>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Berg, J., Hiller, T., Kissner, M. S., Qazi, T. H., Duda, G. N., Hocke, A. C., Hippenstiel, S., Elomaa, L., Weinhart, M., Fahrenson, C., & Kurreck, J. (2018). Optimization of

- cell-laden bioinks for 3D bioprinting and efficient infection with influenza A virus. *Scientific Reports*, 8(1), 13877. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31880-x>
- Bhowmick, R., Derakhshan, T., Liang, Y., Ritchey, J., Liu, L., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2018). A Three-Dimensional Human Tissue-Engineered Lung Model to Study Influenza A Infection. *Tissue Engineering Part A*, 24(19-20), 1468-1480. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0449>
- Blasi, F., & Carmeliet, P. (2002). uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 932-943. <https://doi.org/10.1038/nrm977>
- Boehm, E. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2016). The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *The Enzymes*, 39, 231-254. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Calderon-Rico, F., Bravo-Patiño, A., Mendieta, I., Perez-Duran, F., Zamora-Aviles, A. G., Franco-Correa, L. E., Ortega-Flores, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2023). Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses*, 16(1), 14. <https://doi.org/10.3390/v16010014>
- Calvo García, S. (2013). Cultivo de células en 3D: La nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás*, (5), 215-232.

- Cambier, S., Gouwy, M., & Proost, P. (2023). The chemokines CXCL8 and CXCL12: Molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(3), 217-251. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-00974-6>
- CD51 (ITGAV) Human qPCR Primer Pair (NM_002210)*. (s. f.). Recuperado 4 de enero de 2026, de <https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp205944-cd51-itgav-human-qpcr-primer-pair-nm-002210>
- Charwat, V., & Egger, D. (2018). The Third Dimension in Cell Culture: From 2D to 3D Culture Formats. En C. Kasper, V. Charwat, & A. Lavrentieva (Eds.), *Cell Culture Technology* (pp. 75-90). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2_5
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020, mayo 1). *Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019*. American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Collatz, M., Mock, F., Barth, E., Hölzer, M., Sachse, K., & Marz, M. (2021). EpiDope: A deep neural network for linear B-cell epitope prediction. *Bioinformatics*, 37(4), 448-455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa773>

- Croasdell Lucchini, A., Gachanja, N. N., Rossi, A. G., Dorward, D. A., & Lucas, C. D. (2021). Epithelial Cells and Inflammation in Pulmonary Wound Repair. *Cells*, 10(2), 339. <https://doi.org/10.3390/cells10020339>
- Darwish, N. M., Elnahas, Y. M., & AlQahtany, F. S. (2021). Diabetes induced renal complications by leukocyte activation of nuclear factor κ -B and its regulated genes expression. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.039>
- De March, M., Merino, N., Barrera-Vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F. J., & De Biasio, A. (2017). Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nature Communications*, 8(1), 13935. <https://doi.org/10.1038/ncomms13935>
- Decerf, B., Friedman, J., Mendes, A., Pennings, S., & Yonzan, N. (2024). *Understanding the global impact of the COVID-19 pandemic on well-being*. World Bank Blogs. <https://blogs.worldbank.org/en/developmenttalk/understanding-the-global-impact-of-the-covid-19-pandemic-on-well>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, (1), 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Do, T., Synan, L., Ali, G., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2022). 3D tissue-engineered lung models to study immune responses following viral infections of the small airways. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 464. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03134-1>
- Dunn, C., Brettle, D., Cockroft, M., Keating, E., Revie, C., & Treanor, D. (2024). Quantitative assessment of H&E staining for pathology: Development and clinical evaluation of a novel system. *Diagnostic Pathology*, 19(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13000-024-01461-w>

- Durand-Herrera, D., Campos, F., Jaimes-Parra, B. D., Sánchez-López, J. D., Fernández-Valadés, R., Alaminos, M., Campos, A., & Carriel, V. (2018). Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(4), 379-393. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1685-6>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207-218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Eglen, R. M., & Klein, J.-L. (2017). Three-Dimensional Cell Culture: A Rapidly Emerging Approach to Cellular Science and Drug Discovery. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, 22(5), 453-455. <https://doi.org/10.1177/2472555217702448>
- Fang, Y., & Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *Slas Discovery*, 22(5), 456-472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S. K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., & Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00278>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195-4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- González, M. V. C. (2021). Síntesis y caracterización de esferoides como estrategia para la regeneración de tejidos 3D. Tesis de Doctorado. Maestría y doctorado en ciencias

- médicas, odontológicas y de la salud. Universidad Nacional Autónoma de México. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 5 pp.
- González-Magaña, A., & Blanco, F. J. (2020). Human PCNA Structure, Function, and Interactions. *Biomolecules*, 10(4), 570. <https://doi.org/10.3390/biom10040570>
- Grimm, I., Weinstock, M., Birschmann, I., Dreier, J., Knabbe, C., & Vollmer, T. (2017). Strain-dependent interactions of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Gallolyticus* with human blood cells. *BMC Microbiology*, 17(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1116-1>
- Gschwandtner, M., Derler, R., & Midwood, K. S. (2019). More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02759>
- Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Polinova, A. I., & Drutskaya, M. S. (2020). IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 53, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.009>
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345-357. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81279-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81279-9)
- Guo, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T., & Zhang, J. (2024). NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>
- Guo, Y., Luo, R., Wang, Y., Deng, P., Zhang, M., Wang, P., Zhang, X., Cui, K., Tao, T., Li, Z., Chen, W., Zheng, Y., & Qin, J. (2020). *Modeling SARS-CoV-2 infection in vitro*

- with a human intestine-on-chip device* [Preprint]. Bioengineering.
<https://doi.org/10.1101/2020.09.01.277780>
- Han, Y., Yang, L., Lacko, L. A., & Chen, S. (2022). Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection. *Nature Methods*, 19(4), 418-428.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01453-y>
- Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science*, 122(11), 1713-1721.
<https://doi.org/10.1242/jcs.033951>
- Harb, I., Medhat, E., Samir, M., Abdel Fattah, S., Badawy, H. A. A., Gamal, S. M., & Ateyya, H. (2024). Assessment of IV albumin and ringer lactate on the acute oral toxicity of acetylsalicylic acid in albino rats. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00714-1>
- Hillyer, P., Shepard, R., Uehling, M., Krenz, M., Sheikh, F., Thayer, K. R., Huang, L., Yan, L., Panda, D., Luongo, C., Buchholz, U. J., Collins, P. L., Donnelly, R. P., & Rabin, R. L. (2018). Differential Responses by Human Respiratory Epithelial Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Reflect Distinct Patterns of Infection Control. *Journal of Virology*, 92(15), e02202-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02202-17>
- Holden, N. S., Catley, M. C., Cambridge, L. M., Barnes, P. J., & Newton, R. (2004). ICAM-1 expression is highly NF- κ B-dependent in A549 cells. *European Journal of Biochemistry*, 271(4), 785-791. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03982.x>
- Huang, X., Huang, Z., Gao, W., Gao, W., He, R., Li, Y., Crawford, R., Zhou, Y., Xiao, L., & Xiao, Y. (2022). Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. *Gels*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/gels8120829>

- Huang, Z., Meng, F.-Y., Lu, L.-Z., Guo, Q.-Q., Lv, C.-J., Tan, N.-H., Deng, Z., Chen, J.-Y., Zhang, Z.-S., Zou, B., Long, H.-P., Zhou, Q., Tian, S., Mei, S., & Tian, X.-F. (2024). Calculus bovis inhibits M2 tumor-associated macrophage polarization via Wnt/ β -catenin pathway modulation to suppress liver cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 30(29), 3511-3533. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i29.3511>
- Huh, J. W., Kim, W. Y., Park, Y. Y., Lim, C.-M., Koh, Y., Kim, M.-J., & Hong, S.-B. (2018). Anti-inflammatory Role of Mesenchymal Stem Cells in an Acute Lung Injury Mouse Model. *Acute and Critical Care*, 33(3), 154-161. <https://doi.org/10.4266/acc.2018.00619>
- IEDB.org: Free epitope database and prediction resource. (s. f.). Recuperado 3 de enero de 2025, de <http://www.iedb.org>
- Iftikhar, A., Mahmood, N., & Rabbani, S. A. (2025). The Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) as a Mediator of Physiological and Pathological Processes: Potential Therapeutic Strategies. *Cancers*, 17(20), 3309. <https://doi.org/10.3390/cancers17203309>
- Isea, R. (2013). Mapeo computacional de epítomos de células B presentes en el virus del dengue. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 44(1), 25-29.
- Jamison, D. A., Anand Narayanan, S., Trovão, N. S., Guarnieri, J. W., Topper, M. J., Moraes-Vieira, P. M., Zaksas, V., Singh, K. K., Wurtele, E. S., & Beheshti, A. (2022). A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Human Genetics*, 30(8), 889-898. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>

- Joshi, P., Kang, S.-Y., Datar, A., & Lee, M.-Y. (2019). High-throughput assessment of mechanistic toxicity of chemicals in miniaturized 3D cell culture. *Current protocols in toxicology*, 79(1), e66. <https://doi.org/10.1002/cptx.66>
- Kanno, Y. (2023). The uPA/uPAR System Orchestrates the Inflammatory Response, Vascular Homeostasis, and Immune System in Fibrosis Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1796. <https://doi.org/10.3390/ijms24021796>
- Kesika, P., Thangaleela, S., Sisubalan, N., Radha, A., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2024). The Role of the Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) Pathway in SARS-CoV-2 Infection. *Pathogens*, 13(2), 164. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020164>
- Khalaf, H., Demirel, I., & Bengtsson, T. (2013). Suppression of inflammatory gene expression in T cells by *Porphyromonas gingivalis* is mediated by targeting MAPK signaling. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(5), 413-422. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.23>
- Khan, S., Shafiei, M. S., Longoria, C., Schoggins, J. W., Savani, R. C., & Zaki, H. (2021). SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. *eLife*, 10, e68563. <https://doi.org/10.7554/eLife.68563>
- Kinney, M. A., Hookway, T. A., Wang, Y., & McDevitt, T. C. (2014). Engineering Three-Dimensional Stem Cell Morphogenesis for the Development of Tissue Models and Scalable Regenerative Therapeutics. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 352-367. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0953-9>
- Kombe Kombe, A. J., Fotoohabadi, L., Gerasimova, Y., Nanduri, R., Lama Tamang, P., Kandala, M., & Kelesidis, T. (2024). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Viral Respiratory Infections. *Microorganisms*, 12(12), 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122526>

- Kretzschmar, K., & Clevers, H. (2017). Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Developmental Biology, Hubrecht Institute centennial, from embryos to stem cells*, 428(2), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.015>
- Kumar, M., Allison, D. F., Baranova, N. N., Wamsley, J. J., Katz, A. J., Bekiranov, S., Jones, D. R., & Mayo, M. W. (2013). NF- κ B Regulates Mesenchymal Transition for the Induction of Non-Small Cell Lung Cancer Initiating Cells. *PLoS ONE*, 8(7), e68597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068597>
- Lam Cabanillas, E. R., León Risco, A. O., León Risco, K. B., Llamas Hoyos, G. L., López Zavaleta, R. M., Luzuriaga Tirado, E. D. R., Mendoza Blas, A. M., & Huamán Saavedra, J. J. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417-432. <https://doi.org/10.25176/RFMH.v21i1.3327>
- Latifi-Pupovci, H. (2022). Molecular mechanisms involved in pathogenicity of SARS-CoV-2: Immune evasion and implications for therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113368. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113368>
- Lee, A. J., & Ashkar, A. A. (2018). The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>
- Lin, R., & Chang, H. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10), 1172-1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
- Lin, Z., Shi, J.-L., Chen, M., Zheng, Z.-M., Li, M.-Q., & Shao, J. (2023). CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1053457>

- Liu, J., Abate, W., Xu, J., Corry, D., Kaul, B., & Jackson, S. K. (2011). Three-dimensional spheroid cultures of A549 and HepG2 cells exhibit different lipopolysaccharide (LPS) receptor expression and LPS-induced cytokine response compared with monolayer cultures. *Innate Immunity*, 17(3), 245-255.
<https://doi.org/10.1177/1753425910365733>
- Liu, T., Shi, K., & Li, W. (2020). Deep learning methods improve linear B-cell epitope prediction. *BioData Mining*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13040-020-00211-0>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lokau, J., Schoeder, V., Haybaeck, J., & Garbers, C. (2019). Jak-Stat Signaling Induced by Interleukin-6 Family Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 11(11), 1704. <https://doi.org/10.3390/cancers11111704>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9-26.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Mantilla, C., Mellado, I. S., Jaramillo, A. D., & Navas, M. C. (2015). *Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis*. (1).
- Martucci, L. F., Eichler, R. A. S., Silva, R. N. O., Costa, T. J., Tostes, R. C., Busatto, G. F., Seelaender, M. C. L., Duarte, A. J. S., Souza, H. P., & Ferro, E. S. (2023). Intracellular peptides in SARS-CoV-2-infected patients. *iScience*, 26(9), 107542.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107542>
- Maury, P., Porcel, E., Mau, A., Lux, F., Tillement, O., Mahou, P., Schanne-Klein, M.-C., & Lacombe, S. (2021). Rapid Evaluation of Novel Therapeutic Strategies Using a 3D

- Collagen-Based Tissue-Like Model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 574035. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.574035>
- Mendieta, I., Nuñez-Anita, R. E., Nava-Villalba, M., Zambrano-Estrada, X., Delgado-González, E., Anguiano, B., & Aceves, C. (2019). Molecular iodine exerts antineoplastic effects by diminishing proliferation and invasive potential and activating the immune response in mammary cancer xenografts. *BMC Cancer*, 19, 261. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5437-3>
- Mendieta Trejo, I. (2011). El yodo como agente antimetastático de células de cáncer mamario humano. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Querétaro, México. 16 pp.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129(4), 665-679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Moreno Brea, M. a R., & Micó, J. A. (2009). TNF y citocinas y dolor: Más allá de la inflamación tisular. *Reumatología Clínica*, 5, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.05.001>
- Moscoso-Mujica, G., Rocha, G. G., & Marcos, M. de S. (2022). Biochemical mechanisms in the severe prognosis of patients with diabetes mellitus infected by SARS-CoV-2 virus: Literature review. 2022.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 839-845.
- Parker, J. M. R., Guo, D., & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of

predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites.

Biochemistry, 25(19), 5425-5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>

Piña, M. D. (2021). Estudio de la respuesta inmune adaptativa celular a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 23 pp.

Primer. (s. f.). Recuperado 4 de enero de 2026, de

<https://www.origene.com/catalog/others/others/primer-primer>

Qiao, W., Lau, H. E., Xie, H., Poon, V. K.-M., Chan, C. C.-S., Chu, H., Yuan, S., Yuen, T. T.-T., Chik, K. K.-H., Tsang, J. O.-L., Chan, C. C.-Y., Cai, J.-P., Luo, C., Yuen, K.-Y., Cheung, K. M.-C., Chan, J. F.-W., & Yeung, K. W.-K. (2022). SARS-CoV-2 infection induces inflammatory bone loss in golden Syrian hamsters. *Nature Communications*, 13(1), 2539. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30195-w>

Rajan, D., Gaston, K. A., McCracken, C. E., Erdman, D. D., & Anderson, L. J. (2013).

Response to Rhinovirus Infection by Human Airway Epithelial Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells in an In Vitro Two-Chamber Tissue Culture System.

PLOS ONE, 8(6), e66600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066600>

Ramirez, Y. A. L., & Castillo, M. R. R. (2005). IMPACTO CLÍNICO DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO EN LA INVASIÓN Y METÁSTASIS DEL TUMOR: PRONÓSTICO Y TERAPIA. 2005.

Sánchez, J. I. G. (2024). Establecimiento de un modelo de cultivo celular en 3D para el estudio del glioblastoma. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Fac. de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 17 pp.

- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Shah, D. D., Raghani, N. R., Chorawala, M. R., Singh, S., & Prajapati, B. G. (2023). Harnessing three-dimensional (3D) cell culture models for pulmonary infections: State of the art and future directions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(11), 2861-2880. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02541-2>
- Shirato, K., & Kizaki, T. (2021). SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon*, 7(2), e06187. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06187>
- Slade, D. (2018). Maneuvers on PCNA Rings during DNA Replication and Repair. *Genes*, 9(8), 416. <https://doi.org/10.3390/genes9080416>
- Smith, H. W., & Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), 23-36. <https://doi.org/10.1038/nrm2821>
- Sun, G., Ding, B., Wan, M., Chen, L., Jackson, J., & Atala, A. (2020). Formation and optimization of three-dimensional organoids generated from urine-derived stem cells for renal function in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 309.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01822-4>
- Sundström, K. B., Hoang, A. T. N., Gupta, S., Ahlm, C., Svensson, M., & Klingström, J. (2016). Andes Hantavirus-Infection of a 3D Human Lung Tissue Model Reveals a Late Peak in Progeny Virus Production Followed by Increased Levels of Proinflammatory Cytokines and VEGF-A. *PLOS ONE*, 11(2), e0149354.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149354>

- Takezawa, T., Mori, Y., Yonaha, T., & Yoshizato, K. (1993). Characterization of Morphology and Cellular Metabolism during the Spheroid Formation by Fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 208(2), 430-441.
<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1265>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Turrioni, A. P., Oliveira Neto, N. F. D., Xu, Y., Morse, L., Costa, C. A. D. S., Battaglino, R., & Hebling, J. (2021). Proliferation rate and expression of stem cells markers during expansion in primary culture of pulp cells. *Brazilian Oral Research*, 35, e128.
<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0128>
- Vorobyeva, D. A., Potashnikova, D. M., Maryukhnich, E. V., Rusakovich, G. I., Tvorogova, A. V., Kalinskaya, A. I., Pinegina, N. V., Kovyrshina, A. V., Dolzhikova, I. V., Postnikov, A. B., Rozov, F. N., Sotnikova, T. N., Kanner, D. Yu., Logunov, D. Yu., Gintsburg, A. L., Vasilieva, E. J., & Margolis, L. B. (2024). Cytokine production in an ex vivo model of SARS-CoV-2 lung infection. *Frontiers in Immunology*, 15, 1448515. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1448515>
- Wang, Q. W., & Kim, J. K. (2024). Cytokine Expression During the Early Response of A549 Cells to Infection with Influenza Virus, *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 20(2), 151-158. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2024.151.158>
- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735-6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>

- WHO. (2025a). *COVID-19 cases* | *WHO COVID-19 dashboard*. Datadot.
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
- WHO. (2025b). *Exceso mundial de muertes asociado a la pandemia de COVID-19*.
<https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/global-excess-deaths-associated-with-the-COVID-19-pandemic>
- Wittling, M. C., Cahalan, S. R., Levenson, E. A., & Rabin, R. L. (2021). Shared and Unique Features of Human Interferon-Beta and Interferon-Alpha Subtypes. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.605673>
- Xiong, C. Y., Cheng, X. G., Dong, P. a. N., Rong, D. Y., Li, P. L., Dong, S. J., Jun, D. Z., & Rong, H. B. (2018). Three-dimensional Culture of Human Airway Epithelium in Matrigel for Evaluation of Human Rhinovirus C and Bocavirus Infections. *Biomedical and Environmental Sciences*, 31(2), 136-145.
<https://doi.org/10.3967/bes2018.016>
- Yoshimura, T., Li, C., Wang, Y., & Matsukawa, A. (2023). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 is a promoter of breast cancer metastasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(7), 714-738. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01013-0>
- Zannella, C., Chianese, A., Greco, G., Santella, B., Squillaci, G., Monti, A., Doti, N., Sanna, G., Manzin, A., Morana, A., De Filippis, A., D'Angelo, G., Palmieri, F., Franci, G., & Galdiero, M. (2022). Design of Three Residues Peptides against SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*, 14(10), 2103. <https://doi.org/10.3390/v14102103>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>

Zhu, Z., Zhang, D., Lee, H., Menon, A. A., Wu, J., Hu, K., & Jin, Y. (2017). Macrophage-derived apoptotic bodies promote the proliferation of the recipient cells via shuttling microRNA-221/222. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(6), 1349-1359.
<https://doi.org/10.1189/jlb.3A1116-483R>

17. ANEXOS.

Anexo 1. Protocolos de fijación, deshidratación, inclusión en parafina y tinción de cultivos 3D

Tabla 1. Protocolo de procesamiento de deshidratación en cultivos 3D modificado de Durand-Herrera *et al.* (2018).

REACTIVO	TIEMPO	REPETICIONES
Etanol 30% + azul de toluidina 1%	5 min (centrífuga 1000 rpm)	1
Etanol 50%	5 min (centrífuga 1000 rpm)	3
Etanol 70%	5 min (centrífuga 1000 rpm)	3
Etanol 96%	5 min (centrífuga 1000 rpm)	3
Etanol 100%	5 min (centrífuga 1000 rpm)	3
Xilol	5 min (centrífuga 1000 rpm)	3
Impregnación en parafina	14 min y 1 min (centrífuga)	1

Tabla 2. Protocolo de tinción mediante hematoxilina-eosina modificado de Dunn *et al.* (2024).

REACTIVO	TIEMPO	REPETICIONES	OBJETIVO
Xilol	3 min	2	Desparafinar
Etanol 100%	3 min	2	Hidratar
Etanol 95%	3 min	2	Hidratar
Etanol 70%	3 min	1	Hidratar
Agua corriente	5 min	1	Hidratar
Agua desionizada	1 min	2	Hidratar
Hematoxilina	3-20 min	1	Coloración
Agua desionizada	1 min	2	Lavado
Sustancias alcalinas: agua amoniacal, bicarbonato de sodio 2% o carbonato de litio 1%	5 min	1	Virar
Agua corriente	5 min	1	Lavado
Agua desionizada	1 min	2	Lavado
Eosina	5 min	1	Coloración
Etanol 70%	10 seg	1	Deshidratar
Etanol 95%	10 seg	2	Deshidratar
Etanol 100%	10 seg	2	Deshidratar

Xilol	1 min	1	Diafanizar o aclarar
Xilol	-	1	Diafanizar o aclarar

Anexo 2. Composición de las mezclas de reacción para la síntesis de ADNc.

Tabla 4. Mezcla de desnaturalización.

COMPONENTES	CANTIDAD
RNA [1 pg - 5 µg]	<i>n</i> µl
Oligo (dT) ₂₀ [50 µM]	1 µl
dNTP mezcla [10 mM]	1 µl
H ₂ O DEPC	Para 10 µl

Tabla 5. Mezcla de síntesis de ADNc.

COMPONENTES	CANTIDAD
10X RT buffer	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	4 µl
DTT [0.1 M]	2 µl
RNA _{SE} OUT [40 U/µl]	1 µl
SuperScript III RT [200 U/µl)	1 µl

Anexo 3. Elección de oligonucleótidos para su síntesis.

Tabla 6. Diseño de oligonucleótidos.

No	Nombre	Longitud	% GC	Secuencia 5'-3'		Especie	Amplicón (pb)	T °C Blast	Referencias
				Sentido (F)	Antisentido (R)				
1	IL-8 (CXCL8)	20	60	F	CATGACTTCCAAGCTG GCCG	<i>Homo Sapiens</i>	294	61.65	NM_000584 .4
		24	41.67	R	TTCTCAGCCCTCTTCA AAAAC TTC			59.42	
2	IL-8 (CXCL8)	20	60	F	CATGACTTCCAAGCTG GCCG	<i>Homo Sapiens</i>	295	61.65	NM_000584 .4
		25	40	R	ATTCTCAGCCCTCTTC AAAAAC TTC			59.76	
3	IL-8 (CXCL8)	20	60	F	GAGCCAGGAAGAAAC CACCG	<i>Homo Sapiens</i>	340	60.96	NM_000584 .4
		24	41.67	R	TTCTCAGCCCTCTTCA AAAAC TTC			59.42	
4	IL-8 (CXCL8)	20	60	F	GCCAGGAAGAAACCA CCGGA	<i>Homo Sapiens</i>	339	62.41	NM_000584 .4
		25	40	R	ATTCTCAGCCCTCTTC AAAAAC TTC			59.76	
5	IL-8 (CXCL8)	20	60	F	GCTCTCTTGGCAGCCT TCCT	<i>Homo Sapiens</i>	379	62.20	NM_001354 840.3
		25	40	R	CAAAAAGGCAGATAC CTAATGACGA				
6	TNF- α	20	60		ACTTTGGAGTGATCGG CCCC	<i>Homo Sapiens</i>	311	61.50	NM_000594 .4
		20	60		GGTGTGGGTGAGGAG CACAT			61.79	
7	IL-10	20	55	F	ACACATCAGGGGCTTG CTCT	<i>Homo Sapiens</i>	361	61.50	NM_000572 .3
		20	55	R	TGGTTCTCAGCTTGGG GCAT			61.79	
8	CCL-2	21	57.14	F	ACCTTCATTCCCCAAG GGCTC	<i>Homo Sapiens</i>	236	62.09	NM_002982 .4
		21	57.14	R	GTTTGCTTGTCAGGT GGTCC			61.69	
9	CCL-2	21	57.14	F	AGCCACCTTCATTCCC CAAGG	<i>Homo Sapiens</i>	199	62.37	NM_002982 .4
		21	57.14	R	CTGCTTGGGGTCAGCA CAGAT			62.67	
10	MMP-3	20	55	F	AGGTTTCCCTCCAACC GTGA	<i>Homo Sapiens</i>	399	61.06	NM_002422 .5
		20	55	R	GCACAGGCAGGAGAA AACGA			60.88	

11	MMP-3	21	57. 14	F	AGGTTTCCCTCCAACC GTGAG	Homo Sapiens	400	61.99	NM_002422 .5
		21	52. 38	R	AGCACAGGCAGGAGA AAACGA			62.26	
12	MMP-3	20	55	F	TCCCTCCAACCGTGAG GAAA	Homo Sapiens	399	60.77	NM_002422 .5
		21	52. 38	R	TCACAGCACAGGCAG GAGAAA			61.93	
13	MMP-3	20	55	F	TTCCCTCCAACCGTGA GGAA	Homo Sapiens	399	60.77	NM_002422 .5
		20	55	R	CACAGCACAGGCAGG AGAAA			60.54	
14	MMP-9	20	65	F	GAGGTGGACCGGATG TTCCC	Homo Sapiens	148	62.25	NM_004994 .3
		20	60	R	TCACGTAGCCCACTTG GTCC			61.82	
15	MMP-2	18	66. 67	F	AAACCCAGGCCACC GAG	Homo Sapiens	397	61.97	NM_004530 .6
		20	60	R	CCTGTCTGGGGCAGTC CAAA			62.07	
16	IL-6	20	60	F	TCCAGTTGCCTTCTCC CTGG	Homo Sapiens	231	61.49	NM_000600 .5
		20	55	R	TCTGCCAGTGCCTCTT TGCT			62.06	
17	IL-6	20	60	F	GCCTTCGGTCCAGTTG CCTT	Homo Sapiens	238	63.03	NM_000600 .5
		20	60	R	CTGCCAGTGCCTCTTT GCTG			61.86	
18	IL-6	20	60	F	TGGTGTTCCTGCTGC CTTC	Homo Sapiens	203	63.60	NM_000600 .5
		20	55	R	TTCTGCCAGTGCCTCT TTGC			61.17	
19	Integrin -α	22	54. 55	F	AGGAGAAGGTGCCTA CGAAGCT	Homo Sapiens	105	63.14	NM_002210 .5/(CD51 (ITGAV) Human qPCR Primer Pair (NM_002210), s. f.)
		23	52. 17	R	GCACAGGAAAGTCTT GCTAAGGC			62.21	
20	uPA	20	60	F	CCTTGGAGGGAACAG ACGAG	Homo Sapiens	92	59.75	NM_001441 157.1
		20	50	R	ACCACCAAAATGCTGT GTGC			59.90	
21	IL-1β	21	47. 62	F	ACAGATGAAGTGCTCC TTCCA	Homo Sapiens	73	59.02	NM_000576 .3/(Grimm et al., 2017)
		21	52. 38	R	GTCGGAGATTCGTAGC TGGAT			59.39	
22	IFN-β	20	45	F	AAACTCATGAGCAGTC TGCA	Homo Sapiens	168	57.44	NM_002176 .4

		22	50	R	AGGAGATCTTCAGTTT CGGAGG			59.24	
23	GAPDH	20	45	F	CGAGATCCCTCCAAAA TCAA	<i>Homo Sapiens</i>	170	55.13	NM_001289 746.2
		20	45	R	TTCACACCCATGACGA ACAT			57.44	
				R					
24	PCNA	25	40. 00	F	CAAGTAATGTCGATAA AGAGGAGGA	<i>Homo Sapiens</i>	132	58.19	NM_002592 .2/(Primer, s. f.)
		21	47. 62	R	TACTGAGTGTACCGT TGAAG			57.64	
25	uPAR	21	52. 38	F	CAGACTTGCTGTGTGA CCTCA	<i>Homo Sapiens</i>	183	60.20	NM_001005 377.3 /(Mendieta <i>et al.</i> , 2019)
		22	40. 91	R	AATAACAACAACACA ACAGCGG			58.30	
26	NFkB	22	54. 55	F	GCAGCACTACTTCTTG ACCACC	<i>Homo Sapiens</i>	130	61.44	NM_003998 .4/(Darwish <i>et al.</i> , 2021; Harb <i>et al.</i> , 2024; Khalaf <i>et al.</i> , 2013)
		22	54. 55	R	TCTGCTCCTGAGCATT GACGTC			62.60	
27	B- Catenina	25	48. 00	F	CAACTAAACAGGAAG GGATGGAAGG	<i>Homo Sapiens</i>	239	61.33	NM_001904 .4/(Z. Huang <i>et al.</i> , 2024)
		23	52. 17	R	CAGATGACGAAGAGC ACAGATGG			61.28	

Anexo 4. Diseño de placas RT-qPCR

Tabla 7. Diseño de placa para IL-6 y CCL-2 a 62 °C.

	Oligos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IL-6	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2
B	CCL-2	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2
C	GAPDH	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2
D	IL-6	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1
E	CCL-2	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1
F	GAPDH	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1
G	NTC	NTC	NTC	GAPDH +	GAPDH +	GAPDH-	GAPDH-						
H	Controles	CCL-2 +	CCL-2 +	CCL-2 -	CCL-2 -	IL-6 +	IL-6 +	IL-6 -	IL-6 -				

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Tabla 8. Diseño de placa para MMP-9 y uPAR a 62 °C.

	Oligos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MMP-9	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1
B	uPAR	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1
C	GAPDH	SE.24.1	SE.24.1	SE.48.1	SE.48.1	LPS.24.1	LPS.24.1	LPS.48.1	LPS.48.1	PEP.24.1	PEP.24.1	PEP.48.1	PEP.48.1
D	CONTROLES	NTC	NTC	GAPDH +	GAPDH +	GAPDH-	GAPDH-						
E	MMP-9	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2
F	uPAR	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2
G	GAPDH	SE.24.2	SE.24.2	SE.48.2	SE.48.2	LPS.24.2	LPS.24.2	LPS.48.2	LPS.48.2	PEP.24.2	PEP.24.2	PEP.48.2	PEP.48.2
H	CONTROLES	MMP-9 +	MMP-9 +	MMP-9 -	MMP-9 -	uPAR +	uPAR +	uPAR -	uPAR -				

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Tabla 9. Diseño de placa por gradiente para uPA e integrina- α .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura	64 °C								62 °C			
Oligos	uPA			CONTROLES	Integrina- α			CONTROLES	GAPDH			CONTROLES
A	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC
B	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC
C	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	uPA +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	Integrina- α +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +
D	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	uPA +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	Integrina- α +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +
E	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	uPA-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	Integrina- α -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-
F	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	uPA-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	Integrina- α -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-
G	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	
H	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Tabla 10. Diseño de placa por gradiente para PCNA e IL-1 β .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura	60 °C								62 °C			
Oligos	PCNA			CONTROLES	IL-1 β			CONTROLES	GAPDH			CONTROLES
A	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC
B	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC
C	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	PCNA +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IL-1B +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +
D	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	PCNA +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IL-1B +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +
E	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	PCNA-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IL-1B-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-
F	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	PCNA-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IL-1B-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-
G	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	
H	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Tabla 11. Diseño de placa por gradiente para β -Catenina y NFkB.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura	62 °C								64 °C			
Oligos	B-Catenina			CONTROLES	GAPDH			CONTROLES	NFkB			CONTROLES
A	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	
B	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2		SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	
C	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	B-Catenina +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	NFkB +
D	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	B-Catenina +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	NFkB +
E	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	B-Catenina -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	NFkB -
F	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	B-Catenina -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	NFkB -
G	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	
H	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Tabla 12. Diseño de placa por gradiente para IL-8 e IFN- β .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura	58 °C				62 °C				64 °C			
Oligos	IL-8			CONTROLES	GAPDH			CONTROLES	IFN-B			CONTROLES
A	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	
B	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	NTC	SE.24.1	PEP.24.1	SE.24.2	
C	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IL-8 +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IFN-B +
D	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IL-8 +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	GAPDH +	SE.48.1	PEP.48.1	SE.48.2	IFN-B +
E	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IL-8 -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IFN-B -
F	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IL-8 -	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	GAPDH-	LPS.24.1	PEP.24.2	LPS.24.2	IFN-B -
G	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	
H	LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2		LPS.48.1	PEP.48.2	LPS.48.2	

SE.24= Cultivos 3D sin estímulo a las 24 h; SE.48= Cultivos 3D sin estímulo a las 48 h; LPS.24= Cultivos 3D con LPS a las 24 h; LPS.48= Cultivos 3D con LPS a las 48 h; PEP.24= Cultivos 3D con mezcla de péptidos a las 24 h; PEP.48= Cultivos 3D con péptidos a las 48 h; NTC= No template control (por sus siglas en inglés). Los sufijos “.1” y “.2” corresponden a dos muestras biológicas independientes obtenidas para cada tratamiento, las cuales fueron procesadas y analizadas de manera independiente en la RT-qPCR.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	“Descripción de la respuesta a péptidos derivados de la proteína S en un modelo de cultivo 3D de células susceptibles a SARS-CoV-2”	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	LIC. BT. Xally Gerónimo Urtiz	1587020h@umich.mx
Director	Dr. Alejandro Bravo Patiño	alejandro.bravo@umich.mx
Codirector	Dr. Daniel Durand Herrera	Daniel.durand@umich.mx
Coordinador del programa	Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita	rosa.anita@umich.mx

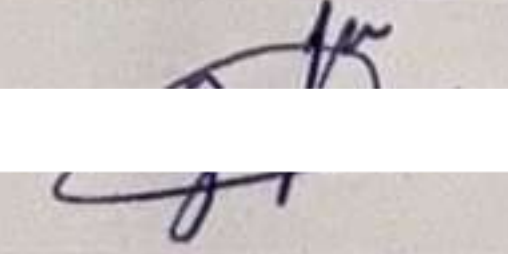
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	Sí	Traducción al inglés
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro		

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Xally Gerónimo Urtiz 
Lugar y fecha	Morelia Michoacán a 22 de febrero del 2026

Xally Gerónimo Urtiz

Descripción de la respuesta a péptidos derivados de la proteína S en un modelo de cultivo 3D de células susceptibles ...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:582768681

Fecha de entrega

24 abr 2026, 4:54 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

24 abr 2026, 8:19 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

Descripción de la respuesta a péptidos derivados de la proteína S en un modelo de cultivo 3D depdf

Tamaño del archivo

7.4 MB

115 páginas

28.659 palabras

157.886 caracteres

14% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 14%  Fuentes de Internet
- 10%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
81 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.