



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS.
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA.



**“GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE PARTÍCULAS SIMILARES A SARS-CoV-2
PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE BIOENSAYOS DE ENTRADA VIRAL”.**

TESIS QUE PRESENTA:
Q.F.B. DENISSE CADENA LÓPEZ.

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA VIDA.

CO- DIRECTORES DE TESIS:
DR. MAURICIO COMAS GARCÍA.
DR. SERGIO ROSALES MENDOZA.

SAN LUIS POTOSÍ. S.L.P.
Agosto, 2024.



GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE PARTÍCULAS SIMILARES A SARS-CoV-2 PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE BIOENSAYOS DE ENTRADA VIRAL” © 2024 by Denisse Cadena Lopez is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Agradecimientos.

A mis padres, Ernesto y Juanis por darme una vida llena de libertad donde puedo tomar mis decisiones y apoyan cada una de ellas.

A Susan, Fernanda, María y Lorena, por siempre escucharme, enseñarme y sobre todo por apoyarnos, dentro y fuera del laboratorio.

A Maricela, Astrid, Abril, Karen, Ximena y Daniela por ayudarme a ver la vida de una manera más hermosa.

A María, Xio y Elizabeth por siempre creer en mí, y mantenerse al pendiente.

Al el Dr. Ignacio Lara, Dra. Mayra Colunga y la M. en C. Andrea Romero por compartir sus conocimientos y consejos conmigo.

Al Dr. Mauricio Comas, por permitirme ser parte de su laboratorio, por su apoyo y paciencia durante estos años.

Al Dr. Sergio Rosales, por abrirme las puertas del CICSAB y brindarme su asesoría durante mi proyecto.

Y finalmente a SKZ y SVT por darme una eterna motivación.

Contenido.

| | |
|---|----|
| Índice de tablas. | 9 |
| Índice de figuras. | 9 |
| Glosario. | 10 |
| 1. Resumen. | 11 |
| 2. Abstract..... | 12 |
| 3. Introducción..... | 13 |
| 3.1 SARS-CoV-2..... | 13 |
| 3.2 Ciclo viral..... | 14 |
| 3.3 Partículas similares a virus como herramientas virológicas. | 16 |
| 4. Antecedentes..... | 17 |
| 4.1 Ensamblaje de VLPs a partir de las proteínas estructurales de SARS-CoV-2..... | 17 |
| 5. Justificación..... | 19 |
| 6. Hipótesis. | 19 |
| 7. Objetivos..... | 19 |
| 7.1 Objetivo general..... | 19 |
| 7.2 Objetivos específicos. | 19 |
| 8. Metodología..... | 19 |
| 8.1 Construcción de los plásmidos..... | 19 |
| 8.1.1. Plásmido pCG1- <i>ENMS</i> | 19 |
| 8.1.2. Plásmido pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> | 21 |
| 8.1.3. Plásmido pCG1- <i>ZsGreen-ENMS-PS SARS</i> | 21 |
| 8.2 Cultivo celular..... | 22 |
| 8.3 Transfecciones..... | 23 |
| 8.3.1. Co-transfección de los plásmidos pCG1- <i>ENMS</i> y pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> | 23 |
| 8.3.1.1 Transfección con lipofectamina 3000. | 23 |
| 8.3.1.2. Transfección con fosfato de calcio. | 24 |
| 8.3.1.3. Electroporación. | 24 |
| 8.3.2 Transfección del plásmido pCG1- <i>ZsGreen-ENMS-PS SARS</i> con fosfato de calcio. | 26 |
| 8.4 Purificación y concentración mediante ultracentrifugación. | 26 |

| | |
|--|----|
| 8.4.1. Sobrenadante obtenido de la co-transfección de pCG1- <i>EMNS</i> y pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> con lipofectamina 3000..... | 26 |
| 8.4.2. Sobrenadante obtenido de la co-transfección de pCG1- <i>EMNS</i> y pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> con fosfato de calcio. | 26 |
| 8.4.3. Sobrenadante obtenido de la transfección de pCG1- <i>ZsGreen-ENMS-PS SARS</i> | 27 |
| 8.5 Análisis mediante dispersión de luz dinámica. | 27 |
| 8.6 Dot-blot. | 27 |
| 8.7 Análisis mediante microscopia electrónica de transmisión. | 28 |
| 9. Resultados..... | 29 |
| 9.1 Construcción de los plásmidos..... | 29 |
| 9.2 Co-transfección de los plásmidos pCG1- <i>ENMS</i> y pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> con lipofectamina 3000..... | 31 |
| 9.3 Co-transfección de los plásmidos pCG1- <i>ENMS</i> y pCDNA3.1- <i>ZsGreen PS-SARS</i> con fosfato de calcio. | 32 |
| 9.4 Electroporación del plásmido pCDNA 3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> | 33 |
| 9.5 Transfección del plásmido pCG1- <i>ZsGreen-ENMS-PS SARS</i> | 34 |
| 9.6 Análisis mediante dispersión de luz dinámica. | 35 |
| 9.7 Dot-blot. | 36 |
| 9.8 Análisis mediante microscopia electrónica de transmisión en secciones ultrafinas. .. | 38 |
| 10. Discusión. | 39 |
| 11. Conclusiones..... | 43 |
| 12. Perspectivas | 43 |
| 13. Anexos | 45 |
| 13.1 Anexo 1. Primers..... | 45 |
| 13.1.1 Primers empleados durante las reacciones de PCR, así como secuenciación Sanger..... | 45 |
| 13.2 Anexo 2. Protocolos de PCR usados en la construcción de los plásmidos pCG1- <i>ENMS</i> y pCG1- <i>ZsGreen-ENMS-PS SARS</i> | 46 |
| 13.2.1 Reacción: Amplificación del inserto obtenido a partir de pCG1- <i>EN</i> | 46 |
| 13.2.2 Reacción: Linealización del vector pCG1- <i>SM</i> | 47 |
| 13.2.3 Reacción: InFusion-construcción pCG1- <i>ENMS</i> | 47 |
| 13.2.4 Reacción: Amplificación del inserto <i>ZsGreen-FMV2</i> obtenido a partir de pACNR181..... | 48 |
| 13.2.5 Reacción: Linealización del vector pCG1- <i>ENMS</i> | 49 |

| | |
|--|----|
| 13.2.6 Reacción: InFusion-construcción pCG1- <i>ZsGreen- ENMS</i> | 49 |
| 13.2.7 Reacción: Amplificación del inserto PS SARS obtenido a partir de pCDNA3.1- <i>ZsGreen-PS SARS</i> | 50 |
| 13.2.8 Reacción: Linealización del vector pCG1- <i>ZsGreen-ENMS</i> | 51 |
| 13.2.9 Reacción: InFusion-construcción pCG1- <i>ZsGreen- ENM-PS SARS</i> | 51 |
| 14. Referencias. | 52 |

Índice de tablas.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Partículas similares a virus de SARS-CoV-2 desarrolladas durante la pandemia de COVID-19. | 18 |
| Tabla 2. Buffers de electroporación..... | 25 |
| Tabla 3. Protocolo de preparación de resina EMBED 812. | 29 |

Índice de figuras.

| | |
|--|----|
| Figura 1. Descripción del SARS-CoV-2..... | 14 |
| Figura 2. Ciclo viral del SARS-CoV-2..... | 15 |
| Figura 3. Descripción de las partículas similares a virus. | 17 |
| Figura 4. Empaquetamiento selectivo del RNA genómico de SARS-CoV-2..... | 17 |
| Figura 5. Mapa del plásmido pCG1-ENMS..... | 20 |
| Figura 6. Mapa del plásmido pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS..... | 21 |
| Figura 7. Mapa del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS..... | 22 |
| Figura 8. Mapa del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS... .. | 22 |
| Figura 9. Co-transfección con lipofectamina 3000 del sistema de dos plásmidos.. .. | 23 |
| Figura 10. Electroporación.. .. | 25 |
| Figura 11. Resultados de electroforesis de los productos de PCR. | 25 |
| Figura 12. Plásmido pCG1-ENMS. | 30 |
| Figura 13. Plásmido pCDNA3.1-Zs Green-PS SARS..... | 30 |
| Figura 14. Co-transfección de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y pCG1-ENMS con lipofectamina 3000.. .. | 32 |
| Figura 15. Co-transfección con fosfato de calcio de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y pCG1-ENMS.. .. | 32 |
| Figura 16. Electroporación de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.. .. | 34 |
| Figura 17. Transfección de pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS con fosfato de calcio. | 34 |
| Figura 18. Distribución del tamaño de partícula. G | 36 |
| Figura 19. Detección de epítomos de la proteína Spike en muestras de células transfectadas con pCG1-ENMS. | 37 |
| Figura 20. Detección de epítomos de la proteína Spike en muestras de células transfectadas con pCG1-ENMS.. .. | 37 |
| Figura 21. Señal de epítomos de la proteína Spike en la muestra correspondiente al control positivo, así como una débil señal en el extracto celular de las células transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. s. | 37 |
| Figura 22. Micrografías de células control y transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS.. .. | 39 |

Glosario.

VLP- partícula similar a virus.

SARS-CoV-2- Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo del tipo 2.

E- Proteína de la envoltura del SARS-CoV-2.

N- Proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2.

M- Proteína de la membrana del SARS-CoV-2.

S- Proteína espícula del SARS-CoV-2.

ORF- marco abierto de lectura.

COVID-19- Enfermedad por coronavirus de 2019.

ERGIC- compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi.

ACE2- Enzima convertidora de angiotensina 2.

1. Resumen.

El brote de COVID-19, causado por el virus SARS-CoV-2, fue un evento dramático para la salud mundial desde su origen en Wuhan, China, en diciembre de 2019. La rápida propagación llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declararla una pandemia en marzo de 2020. Desde entonces, diversos esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de vacunas, antivirales y herramientas que permitan conocer al virus en detalle.

En este contexto, las partículas similares a virus (VLPs) representan una herramienta virológica muy atractiva. Las VLPs son complejos macromoleculares autoensamblados, generados a partir de las proteínas estructurales del virus de interés; dichas partículas carecen del material genético necesario para replicarse, lo que permite su manipulación segura en laboratorios BSL-1, además de contar con distintas aplicaciones biomédicas y como potenciales vacunas.

Diversas plataformas de VLPs de SARS-CoV-2 ya han sido reportadas; sin embargo, su producción a menudo requiere la co-transfección de dos hasta cuatro plásmidos, lo que puede ser ineficiente.

El presente trabajo se centra en el desarrollo de un sistema de producción de VLPs de SARS-CoV-2 a partir de un solo plásmido que contiene los genes de las cuatro proteínas estructurales de SARS-CoV-2 (proteínas E, M, N y S), con el objetivo de simplificar y mejorar la eficiencia del proceso de transfección. Dichas VLPs también serían capaces de empaquetar selectivamente el RNA mensajero de un gen reportero.

Los resultados de: transfecciones transitorias en células HEK293-T con los plásmidos diseñados en este trabajo, análisis inmunológicos, análisis de dispersión de luz dinámica y microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas mostraron las dificultades asociadas al ensamblaje y la vía de egreso de las VLPs.

En resumen, este estudio destaca la importancia de la continua investigación en el campo de las VLPs con el fin de desarrollar herramientas que permita el estudio de los virus emergentes como el SARS-CoV-2.

2. Abstract.

The outbreak of COVID-19 that led to a global pandemic in March 2020 led to a rapid development of vaccines, antivirals, and tools that allowed the study of the novel coronavirus SARS-CoV-2.

In this context, virus-like particles (VLPs) represent an attractive tool for studying a virus. Virus-like particles are auto-assembled macromolecular protein complexes generated only from the structural proteins of the wild-type virus of interest. These particles lack the genetic material necessary for viral replication, and in consequence, they can be safely manipulated in BSL-1 laboratories.

SARS-CoV-2 VLPs have already been reported, but in most cases, their assembly requires the co-transfection of 2 up to 4 plasmids which hinders the attainment of high production yields.

In this work, we aimed to generate a system of a single polycistronic plasmid coding for the E, M, N, and S structural proteins of SARS-CoV-2 that allows the production of SARS-CoV-2 VLPs capable of packaging the messenger RNA from a reporter gene.

The results of the transient transfection on HEK-293T cells with the plasmids obtained in this work, as well as the results of the characterization of the VLPs, revealed the difficulties inherent in the assembly and egress of VLPs.

In conclusion, this work highlights the relevance of the ongoing research on the VLP production process, to obtain a virologic tool that allows the study of viruses of interest and emerging viruses.

3. Introducción.

En diciembre de 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó sobre el primer caso de una neumonía atípica y altamente contagiosa en la región de Wuhan, China. Posteriormente, el 12 de febrero de 2020, la OMS designó al agente etiológico como un nuevo coronavirus, inicialmente denominado “2019-nCoV”, el cual finalmente fue catalogado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) como el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) (Gorbalenya et al., 2020).

El SARS-CoV-2 es el agente etiológico de la enfermedad por coronavirus 19 (COVID-19), cuya sintomatología abarca dolor de cabeza, náuseas, tos, vómito, diarrea y fiebre (Wu et al., 2020). Entre febrero y marzo de 2020 la tasa de mortalidad osciló entre el 1.7% y 39% (Horita & Fukumoto, 2023), y debido a la alta transmisibilidad de la enfermedad, el 11 de marzo de 2020 la OMS declaró una pandemia global por COVID-19 (Cucinotta & Maurizio, 2020). Esta declaración impulsó el desarrollo urgente de vacunas, antivirales y herramientas para el estudio del virus.

Hasta el 25 de marzo de 2025, el número de casos totales a nivel mundial asciende a 775,132,086, con 7,042,222 fallecimientos (WHO Coronavirus (COVID-19)). A pesar de contar con vacunas y haber estudiado y descrito ampliamente el virus, la alta cifra de contagios da como resultado el surgimiento de variantes de interés. Por lo tanto, resulta imprescindible disponer de herramientas que faciliten el estudio continuo del virus,

3.1 SARS-CoV-2.

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto, cuyo diámetro promedio oscila entre 75 y 100 nm. En su superficie exhibe la glicoproteína espícula (S), lo que le otorga su característica apariencia de corona (Majumder & Minko, 2021) (Fig.1) Posee un genoma de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva de 29.8 kb de extensión (Fig.1), el cual comparte un 85% de homología con el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave, SARS-CoV-1 (Majumder & Minko, 2021). Dicho genoma cuenta con una caperuza en el extremo 5' y una cola de poli A en el extremo 3'. Después de la región 5'-UTR se encuentran dos marcos abiertos de lectura: ORF1a y ORF1ab, los cuales codifican para 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16) que participan en los procesos de transcripción y replicación del genoma. Cerca del extremo 3' se encuentran los genes de las cuatro proteínas estructurales: proteína espícula (S), de envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), así como una serie de 11 proteínas accesorias (Redondo et al., 2021). Las proteínas accesorias son factores de virulencia, mientras que las proteínas estructurales son las responsables de formar el virión (Banga Ndzouboukou et al., 2021; Li et al., 2023).

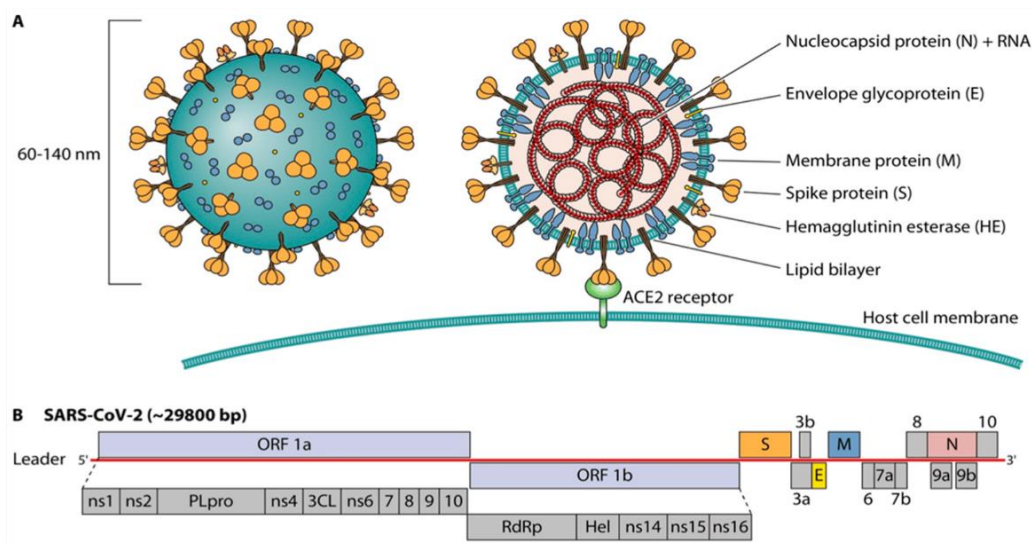


Figura 1. Descripción del SARS-CoV-2.

A) Esquema representativo del virión de SARS-CoV-2, conformado por cuatro proteínas estructurales (E, N, M y S) y un genoma viral que consiste en una hebra sencilla de RNA. B) Esquema representativo del genoma viral de SARS-CoV-2, conformado por dos marcos abiertos de lectura (ORF), ORF1a y 1b codifican para las proteínas no estructurales, el último tercio del genoma codifica para las proteínas estructurales y proteínas accesorias. Figura tomada de Safiabadi Tali et al., 2021.

3.2 Ciclo viral.

Los virus envueltos pueden ingresar a las células huésped mediante dos vías distintas: endocitosis o fusión. En el caso del SARS-CoV-2 ambos mecanismos han sido reportados, siendo el tipo de proteasas expresadas por la célula huésped, el principal determinante de la vía de ingreso. En ambos casos la entrada viral requiere que la proteína S interactúe con el receptor ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) expresado en la superficie de la célula huésped, posteriormente la proteína S es activada, dicha activación involucra la escisión de la proteína S en dos subunidades: S1 y S2 (Fig.2) (Li et al., 2023).

Una vez que la nucleocápside alcanza el citoplasma, y esta se desensambla para que el ARN genómico sea liberado, los ORF1a y ORF1b son traducidos, generando las poliproteínas PP1a y PP1ab que se someten a una escisión postraduccional, generando proteínas no estructurales (nsp) individuales, las cuales formarán el complejo replicasa-transcriptasa (RTC), que se localiza dentro de vesículas de doble membrana (DMV) generadas a partir del retículo endoplásmico (Fig. 2) (Patrián-Soto, 2020).

El complejo replicasa-transcriptasa es el encargado de traducir las proteínas estructurales y accesorias a partir de ARNm subgenómicos. El nuevo ARN genómico sintetizado interactúa con la proteína N para formar la nucleocápside, mientras que las proteínas S, M y E son transportadas al retículo endoplásmico (RE) para formar el ERGIC

(compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi). Posteriormente la nucleocápside es trasladada al ERGIC donde interacciona con la proteína M para formar nuevos viriones que abandonaran la célula vía exocitosis (Fig.2) (Hillary & Ceasar, 2023; Majumder & Minko, 2021; V'kovski et al., 2021).

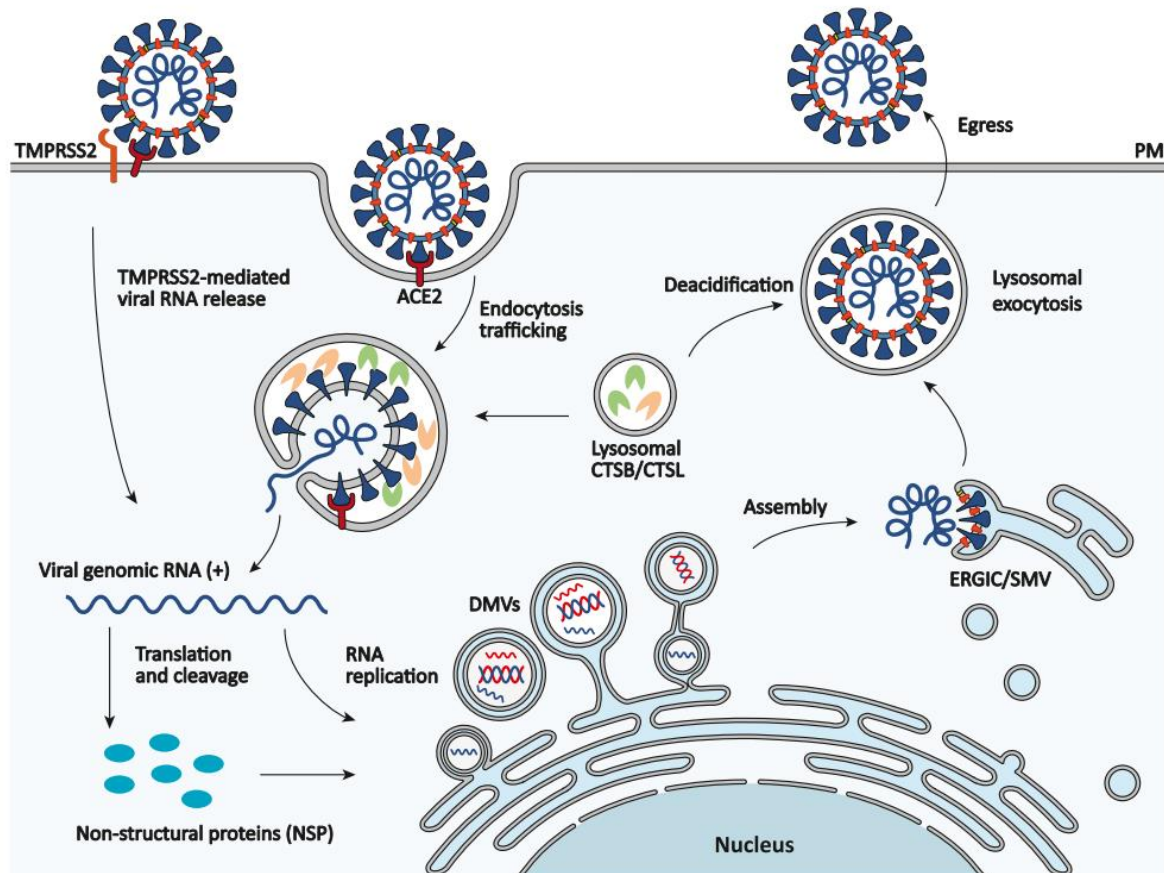


Figura 2. Ciclo viral del SARS-CoV-2

Los viriones de SARS-CoV-2 se unen a la célula huésped mediante la interacción de la proteína S con el receptor celular ACE2. Posteriormente la proteasa TMPRSS2 activa la proteína S lo que desencadena la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Los viriones también pueden ingresar a la célula mediante endocitosis, en este caso, la proteína S es escindida por las proteasas CTSB y CTSL. Una vez que el genoma viral ha ingresado a la célula huésped, son traducidas las poliproteínas PP1a y PP1ab, y mediante un procesamiento postraducciona se generan las 16 proteínas no estructurales (nsp) que formarán el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) dentro de vesículas de doble membrana, dentro de estos complejos se traducen el resto de las proteínas estructurales y accesorias y se lleva a cabo la síntesis del nuevo genoma viral. El RNA genómico sintetizado es transportado al ERGIC para interaccionar con las proteínas estructurales y formar nuevos viriones que egresaran la célula por exocitosis o mediante la vía lisosomal. Figura tomada de (Chen et al., 2022).

3.3 Partículas similares a virus como herramientas virológicas.

Las partículas similares a virus (VLPs) son complejos macromoleculares autoensamblados (Fig. 3), generados a partir de las proteínas estructurales del virus de interés. A diferencia de los virus silvestres, las VLPs carecen del material genético necesario para su replicación, lo que las hace partículas no infecciosas y permite su manipulación en laboratorios BSL-1 (Xu et al., 2020).

La producción de VLPs puede llevarse a cabo de manera *in vivo* empleando líneas celulares de mamífero, plantas, insectos, levaduras y bacterias (Mejía-Méndez et al., 2022) y de manera *in vitro* utilizando extractos libres de células.

En el caso de las VLPs producidas en líneas celulares, la estrategia general implica la co-transfección con plásmidos que codifican para las proteínas estructurales del virus de interés. La transfección puede realizarse mediante métodos químicos, haciendo uso de liposomas, fosfato de calcio, polímeros catiónicos o mediante métodos físicos, como electroporación, sonoporación, magnetofección y microinyección genética (Zeltins, 2013). Convencionalmente, a cada proteína estructural le corresponde un plásmido (Boson et al., 2021a; Plescia et al., 2021; Syed et al., 2021; Xu et al., 2020), lo que dificulta la obtención de una alta eficiencia de transfección. Por lo tanto, contar con un sistema que permita obtener VLPs a partir de dos o incluso un solo plásmido representaría una gran ventaja.

En cuanto a la producción de manera *in vitro*, la obtención de VLPs se fundamenta en controlar las condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de proteínas estructurales del virus de interés para permitir el autoensamblaje de las cápsides (Zeltins, 2013).

Las principales ventajas de los sistemas de VLPs incluyen su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, su capacidad de internalización celular, inmunogenicidad, así como la posibilidad de modificarlas química o genéticamente de manera que expresen o sean capaces de transportar moléculas de interés y mejorar su biodisponibilidad (Cho et al., 2008; Mejía-Méndez et al., 2022).

En cuanto a sus aplicaciones abarcan desde el estudio del ensamblaje, entrada y egreso viral, hasta el desarrollo de vacunas, ensayos de neutralización, terapia génica, construcción de nano biorreactores y administración de medicamentos (Mejía-Méndez et al., 2022).

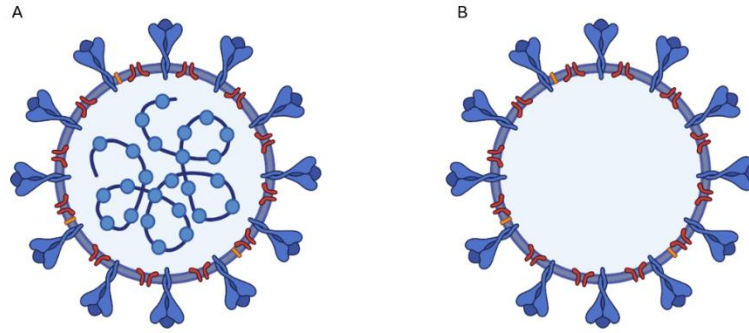


Figura 3. Descripción de las partículas similares a virus.

A) Esquema representativo de un virión, compuesto de proteínas estructurales y genoma viral. B) Esquema representativo de una partícula similar a un virus, compuesta únicamente de las proteínas estructurales. Ilustración generada con Biorender.com.

4. Antecedentes

4.1 Ensamblaje de VLPs a partir de las proteínas estructurales de SARS-CoV-2.

Durante la pandemia de COVID-19 se emplearon diversas plataformas de VLPs de SARS-CoV-2 para el estudio del ensamblaje y estructura de los viriones (Swann et al., 2020; Xu et al., 2020), así como para analizar su potencial uso como vacuna (Yilmaz et al., 2022) y para evaluar la capacidad neutralizante de anticuerpos (Syed et al., 2021) (Tabla 1).

Así mismo se reportó la generación de un sistema de VLPs de SARS-CoV-2, capaces de empaquetar el RNA mensajero del gen reportero de la luciferasa (Syed et al., 2021), esto fue posible al acoplamiento del gen reportero a una señal de empaquetamiento del SARS-CoV-2 (T20). Dichas señales de empaquetamiento (PS) son secuencias conservadas dentro de los genomas de los beta coronavirus, cuya función es interaccionar con la proteína de la nucleocápside (N) y llevar a cabo un empaquetamiento selectivo del genoma que contine estas secuencias, excluyendo de esta manera el empaquetamiento de transcritos subgenómicos y de la célula huésped (Fig. 4) (Syed et al., 2021).

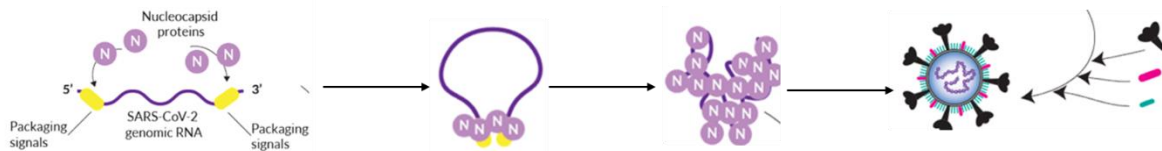


Figura 4. Empaquetamiento selectivo del RNA genómico de SARS-CoV-2. El genoma de SARS-CoV-2 es empaquetado selectivamente a partir del reconocimiento de las señales de empaquetamiento contenidas entre los ORF1a y 1ab. El reconocimiento y la interacción de la proteína de la nucleocápside (N) con estas señales excluye el empaquetamiento de transcritos virales subgenómicos, así como de transcritos de la célula huésped en los nuevos viriones ensamblados. Figura tomada de Model for Nucleocapsid-mediated RNA packaging-InvivoGen.

La mayoría de los sistemas para la obtención de VLPs de SARS-CoV-2 que expresan las cuatro proteínas estructurales emplean cuatro plásmidos (Tabla 1), lo que podría dificultar el obtener una alta eficiencia de co-transfección. En cuanto a VLPs que expresen solo una porción de las proteínas estructurales, se ha reportado que los requisitos mínimos para su producción son las proteínas M y E (Xu et al., 2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Partículas similares a virus de SARS-CoV-2 desarrolladas durante la pandemia de COVID-19.

| Plataforma de expresión | Proteínas expresadas | No. de plásmidos necesarios para el ensamblaje | Aplicación | Referencia |
|---|-----------------------------|---|--|-------------------------|
| HEK293T y VeroE6. | E, N, M, S. | 4 | Estudios de ensamblaje viral y egreso de proteínas. | (Xu et al., 2020) |
| HEK293T. | E, N, M, S. | 4 | Estudios de ensamblaje viral. | (Boson et al., 2021) |
| HEK293. | E, N, M, S. | 4 | Estudios de ensamblaje y gemación de VLPs. | (Plescica et al., 2021) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae.</i> | E, M, S. | 2 | Vacuna. | (Arora et al., 2020) |
| <i>Nicotiana benthamiana.</i> | E, N, S. | 2 | Vacuna. | (Moon et al., 2022) |
| HEK293T. | E, M, S. | 3 | Estudios de ensamblaje de VLPs. | (Swann et al., 2020) |
| HEK293T. | E, N, M S. | 4 | Ensayos de neutralización y análisis de mutaciones en las proteínas estructurales. | (Syed et al., 2021) |
| Expi293. | E, N, M, S. | 2 | Vacuna. | (Yilmaz et al., 2022) |

5. Justificación.

La presente investigación busca ofrecer una herramienta virológica para el estudio del virus SARS-CoV-2 en un laboratorio BSL-2.

La investigación atiende la falta de un sistema para la generación de VLPs que contengan las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV-2 a partir de solo un plásmido y que sean capaces de empaquetar un RNA mensajero (RNAm) que exprese un gen reportero.

6. Hipótesis.

La expresión de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 a partir de un solo plásmido generará partículas similares a virus capaces de empaquetar un ARN mensajero de un gen reportero y de ingresar a células blanco, expresando así el gen reportero de interés.

7. Objetivos.

7.1 Objetivo general.

Desarrollar un sistema de producción de partículas similares a virus (VLPs) de SARS-CoV-2, basado en un plásmido que codifique las cuatro proteínas estructurales del virus, dichas partículas serán capaces de empaquetar un gen reportero.

7.2 Objetivos específicos.

1. Construir un plásmido para la expresión en células de mamífero que contenga los genes de las proteínas estructurales E, N, M y S de SARS-CoV-2.
2. Construir un plásmido que codifique para un ARN mensajero (ARNm) de un gen reportero, que será empaquetado por las VLPs.
3. Producir VLPs de SARS CoV-2 en líneas celulares de mamífero, utilizando los plásmidos que contienen las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 y el ARNm del gen reportero.

8. Metodología.

8.1 Construcción de los plásmidos.

8.1.1. Plásmido pCG1-ENMS.

Se diseñó y clonó un plásmido (Fig. 5) que contiene los genes de las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV-2 del aislado original de Wuhan.

Para lograrlo, se sintetizó mediante GeneScript una secuencia de ADN, correspondiente al inserto, que contenía la secuencia Kozak, los genes de las proteínas E y N del SARS-CoV-2, el péptido autocatalítico P2A, un intrón quimérico y la secuencia de cambio ribosomal del virus de la fiebre aftosa (FMV2). Posteriormente, este fragmento se ligó a un vector, el plásmido (pCG1) que ya contenía los genes de las proteínas M y S de SARS-CoV-2, junto con el promotor CMV para permitir la transcripción en células de mamífero (Ortega-Palestino, K.A. Tesis de Licenciatura). Para la clonación del inserto, la secuencia de interés se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la enzima Phusion II Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific) y empleando los oligonucleótidos: FP-EN y RP-EN.

Paralelamente a la clonación del inserto, el vector pCG1 fue linealizado mediante PCR inversa (Phusion II Hot Start DNA Polymerase, Thermo Scientific), utilizando los primers FP-OpSM y RP-OpenS

Las secuencias de los primers empleados, así como los detalles técnicos de todas las PCRs que se realizaron en esta tesis se pueden consultar el Anexo 1 y Anexo 2.

Ambos productos de PCR fueron digeridos con la enzima *DpnI* (10 U/ μ L, ThermoFisher Scientific), y el tamaño del amplicón fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el inserto y vector fueron purificados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), finalmente ambos fragmentos fueron ligados usando la técnica de InFusion Cloning (Takara Bio) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

El plásmido resultante fue transformado en células competentes Stellar (Takara Bio) siguiendo un protocolo estándar. Las bacterias transformadas se crecieron en 10 mL de medio LB [NaCl (0.5 g/L), Triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L)] con ampicilina (100 μ g/mL) durante 18 horas a 37°C y en agitación (230 rpm), al finalizar este periodo, el ADN plasmídico (ADNp) fue extraído y purificado usando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

La secuencia del plásmido obtenido (Fig.5) fue confirmada mediante secuenciación Sanger realizada por el laboratorio LAMBAMA del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, empleando los primers: FP-SeqN y RP-SeqM

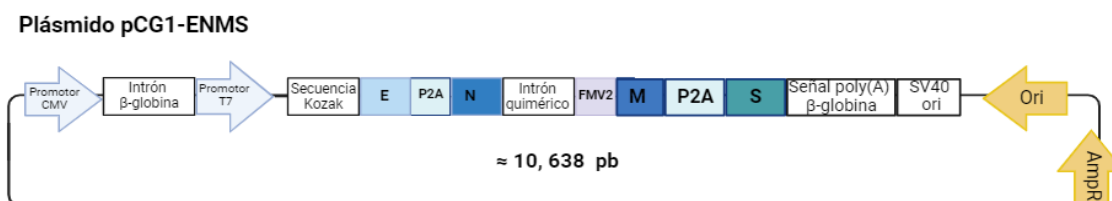


Figura 5. Mapa del plásmido pCG1-ENMS. La construcción de 10,638 pb contiene las secuencias nucleotídicas que codifican para las cuatro proteínas estructurales E, N, M y S del SARS-CoV-2, así como secuencias (P2A) que permitirán la escisión de la poliproteína. Ilustración creada con BioRender.com.

8.1.2. Plásmido pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.

Se diseñó un plásmido que codifica para la señal de empaquetamiento de SARS-CoV-2 (PS SARS) y la proteína verde fluorescente ZsGreen dentro del vector pCDNA3.1. La construcción fue sintetizada por GeneScript.

El plásmido resultante fue transformado en células competentes *E. coli*, siguiendo un protocolo estándar. Las bacterias transformadas se crecieron en 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) durante 18 horas a 37°C y en agitación (230 rpm). Al finalizar dicho periodo, el ADNp fue extraído y purificado usando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System.

La secuencia nucleotídica del plásmido (Fig.6) fue confirmada mediante secuenciación Sanger realizada por el laboratorio LAMBAMA del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

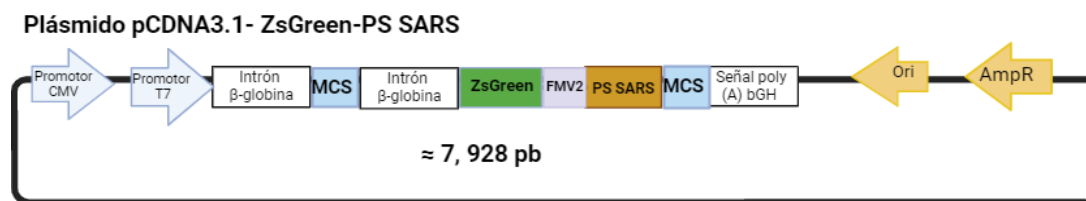


Figura 6. Mapa del plásmido pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS. La construcción de 7,928 pb comprende la secuencia del gen reportero *ZsGreen* junto con la señal de empaquetamiento del SARS-CoV-2 (PS SARS). Ilustración creada con BioRender.com.

8.1.3. Plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS.

La construcción se realizó en dos etapas. La primera de ellas consistió en generar un plásmido que codificara para la proteína reportera *ZsGreen* y las cuatro proteínas estructurales. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

El gen de la proteína *ZsGreen* junto con la secuencia de cambio ribosomal FMV2 fueron amplificados a partir del plásmido pACNR181 (datos sin publicar), mediante PCR empleando los primers: FP-ZsGreen 2 y RP-ZsGreen 2.

Paralelamente a la amplificación del gen *ZsGreen*, el plásmido pCG1-EMNS fue linealizado por PCR inversa usando los siguientes oligonucleótidos: FP-OpENMS y RP-OpENMS.

Tras obtener ambos productos de PCR, se siguió la metodología de purificación, ligación, extracción de ADNp y secuenciación del plásmido (Fig. 7) descrita anteriormente.

Para la secuenciación se utilizó el primer: FP-ZsGreenRT



Figura 7. Mapa del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS. La construcción de 11,383 pb incorporó la secuencia del gen reportero *ZsGreen* y la secuencia FMV2 al plásmido pCG1-ENMS construido anteriormente. Esta nueva construcción, funcionara como vector en la siguiente etapa. Las flechas rojas indican la región donde el vector fue linealizado en la segunda etapa. Ilustración creada con BioRender.com.

Después de verificar que el plásmido resultante contenía los genes de la proteína *ZsGreen* y proteínas estructurales de SARS-CoV-2, se realizó una segunda PCR para amplificar la secuencia nucleotídica *PS SARS* a partir del plásmido pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* (Fig.6), en este caso, los primer empleados fueron FP-PS 2 y RP-PS 2.

Paralelamente el plásmido pCG1-*ZsGreen-ENMS* fue linealizado por medio de una PCR inversa usando los primers FP-Op-ENMS 2 y RP-OpENMS 2.

Finalmente, se llevó a cabo una segunda reacción InFusion Cloning para ligar inserto y vector. El resultado de la reacción fue clonado en células competentes Stellar, extraído y purificado. La secuencia nucleotídica del plásmido final (pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*, Fig. 8) fue confirmada mediante secuenciación Sanger, empleando el primer: RP-Seq-ENMS-PS

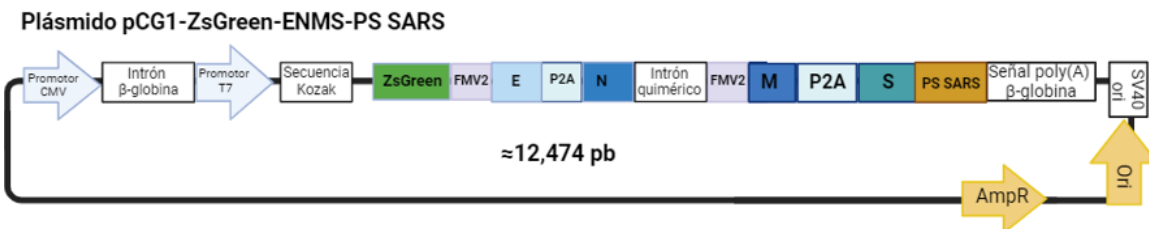


Figura 8. Mapa del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. El plásmido final comprende las secuencias nucleotídicas del gen reportero *ZsGreen*, proteínas estructurales y señal de empaquetamiento del SARS-CoV-2, así como secuencias que permitirán la escisión de la poliproteína generada. Ilustración creada con BioRender.com.

8.2 Cultivo celular.

La línea celular de epitelio de riñón humano HEK93T (ATCC lote: 70041165 CRL-3216), fue utilizada para la transfección de los plásmidos generados. El cultivo celular fue mantenido en medio DMEM Gibco™ (Dulbecco's Modified Eagle Medium, compuesto de L-glutamina (4mM), glucosa (4500 mg/L), piruvato de sodio (1 mM) y bicarbonato de sodio (1500 mg/L)) adicionado al 10% v/v con suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich) e incubado a 37°C en un ambiente de 95% de humedad con una concentración de 5% de CO₂.

8.3 Transfecciones.

8.3.1. Co-transfección de los plásmidos pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.

8.3.1.1 Transfección con lipofectamina 3000.

24 h previas a la transfección, se sembró una placa para cultivo celular de 6 pozos (P6) con 150,000 células HEK293T/pozo, las células se mantuvieron en 2 mL de medio DMEM adicionado al 10% v/v SFB bajo las condiciones de incubación descritas anteriormente. Posterior a este periodo se llevó a cabo la transfección con el reactivo Lipofectamina 3000 (Invitrogen. Número de catalogo: L3000001) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células se mantuvieron en incubación durante 72 horas bajo las condiciones estándar de temperatura, humedad y concentración de CO₂.

Las cantidades de ADNp utilizadas se especifican en la figura 9. En el caso de las células que sirvieron como control negativo de la transfección, se siguió el mismo procedimiento descrito, omitiendo la adición de ADNp.

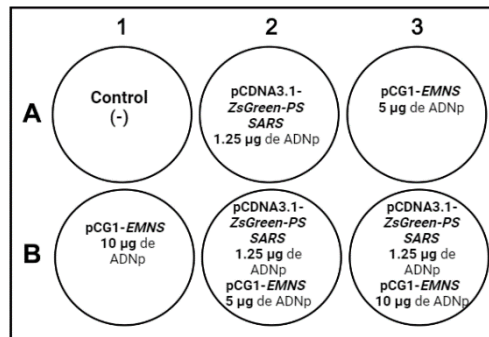


Figura 9. Co-transfección con lipofectamina 3000 del sistema de dos plásmidos. Cantidades de ADNp transfectadas con lipofectamina 3000 y su ubicación en la placa P6. El pozo A1 sirvió como control negativo al ser una transfección simulada, es decir una transfección sin ADNp para monitorear el efecto potencial del reactivo de transfección en las células. Ilustración creada con BioRender.com.

La progresión de la transfección fue monitoreada cada 24 horas post-transfección (hpt) mediante la captura de micrografías en campo claro y GFP con el objetivo 4X usando el microscopio de fluorescencia invertido Lionheart FX (Biotek).

Al finalizar el periodo de incubación, el medio de cultivo celular fue recuperado, centrifugado a 1500 rpm durante 5 min y filtrado usando un filtro Millex de membrana de PVDF con un poro de 0.22 µm, el sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C hasta su posterior uso. La monocapa de células transfectadas se levantó mediante pipeteo con PBS 1X estéril, las células resuspendidas fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet celular almacenado a -80°C.

8.3.1.2. Transfección con fosfato de calcio.

24 h previas a la transfección, se sembraron 3 matraces de cultivo celular T75 con 4×10^6 células HEK293T, las cuales se mantuvieron en 8 mL de medio DMEM adicionado al 10% v/v de SFB, y en incubación a condiciones estándar hasta el momento de la transfección.

Al siguiente día se preparó la solución de transfección, la cual consistió en una solución de CaCl_2 (1M), ADNp (8 μg de ADNp de pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y 32 μg de ADNp de pCG1-*EMNS*), agua estéril y buffer salino de fosfatos: 2X HBS (HEPES (50 mM), NaCl (280 mM), Na_2HPO_4 (1.5 mM), pH: 7.02), la solución fue incubada a 37 °C durante 30 min y posteriormente agregada a las células. El cultivo celular se mantuvo en incubación durante 72 h totales, cada 24 horas, el medio de cultivo fue recuperado y reemplazado con 15 mL de medio DMEM adicionado al 10% v/v son SFB. El medio recuperado fue centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos y filtrado usando un filtro Millex de membrana de PVDF con un poro de 0.22 μm , el sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

Al finalizar el periodo de incubación, la monocapa de células transfectadas fue levantada mediante pipeteo con PBS 1X estéril, las células resuspendidas fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet celular almacenado a -80°C. En cuanto al sobrenadante este fue recuperado, centrifugado, filtrado y almacenado siguiendo el procedimiento descrito previamente.

8.3.1.3. Electroporación.

Se resuspendieron 2×10^6 células HEK293T en 100 μL de buffer de electroporación (Tabla 2), al cual se le añadieron 4 μg del plásmido pCNA3.1-*ZsGreen-PS SARS*. Posteriormente, esta suspensión celular fue transferida a una cubeta de electroporación de 0.4 cm de grosor (Biorad. Número de catalogo: 1652081). Las células fueron sometidas a 2 pulsos de 200 V durante 15 ms, con intervalos de 1 s entre cada pulso, utilizando el electroporador Gene Pulser Xcell.

En el caso de las células que sirvieron como control negativo de la transfección, se siguió el procedimiento descrito, omitiendo la adición de ADNp. Al finalizar los pulsos eléctricos, a cada cubeta le fueron agregados 2.9 mL de medio DMEM adicionado al 10% v/v de SFB, el volumen final fue dividido en dos partes iguales y cada una de ellas fue transferida a un pozo de una placa P6 (Fig. 10). Las células se mantuvieron en incubación bajo condiciones estándar durante 72 horas. El avance de la transfección fue monitoreado cada 24 hpt de la manera descrita anteriormente.

Tabla 2. Buffers de electroporación.

| Buffer | Composición |
|---|---|
| Medio RPMI 1640 (medio Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco. Número de catalogo: 11875-093). | Glutación. Biotina. Vitamina B12. Ácido paraaminobenzoico (PABA). Inositol Colina. |
| 1SM (Chicaybam et al., 2017). | KCl (5mM), MgCl ₂ (15mM), Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (120mM), pH 7.2, HEPES (15mM), Manitol (25mM). |
| RPMI 1640 adicionado con HEPES (Sigma Número de catálogo: R6504-50L). | *** Medio adicionado con HEPES (10 mM). |
| 3P (Chicaybam et al., 2017). | KCl (5mM), MgCl ₂ (15mM), NaCl (90mM), Glucose (10mM), Ca(NO ₃) ₂ (0,4Mm), Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (40mM), pH 7,2. |
| PBS 1X. | NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na ₂ HPO ₄ (10 mM), KH ₂ PO ₄ (1.8mM). |

***= información no publicada por el fabricante.

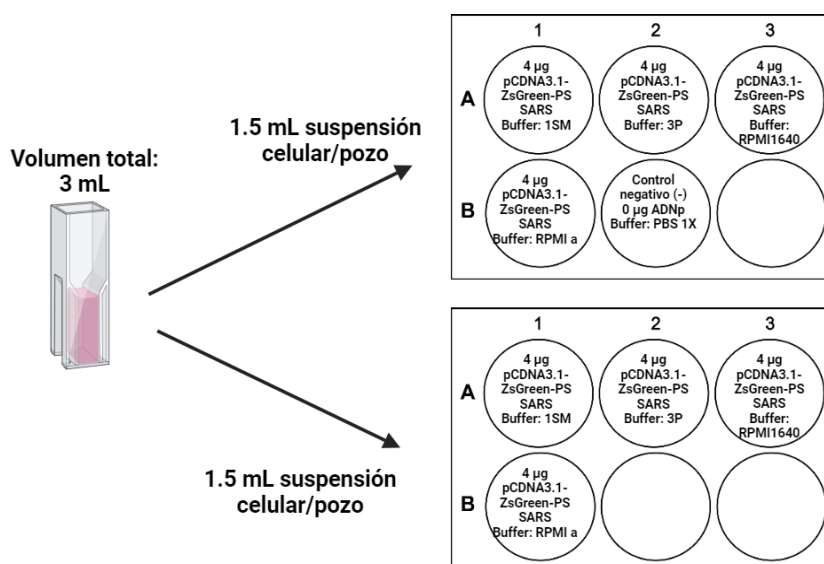


Figura 10. Electroporación. Esquema representativo que muestra la distribución de las células electroporadas, así como la cantidad de ADNp y los buffers empleados en la electroporación. El volumen final de células electroporadas fue dividido en partes iguales y cada una de ellas se sembró en 1 pozo de una placa P6. Ilustración creada con BioRender.com.

8.3.2 Transfección del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS con fosfato de calcio.

Utilizando la metodología de transfección con fosfato de calcio descrita previamente, se transfectaron 3 matraces de cultivo celular T75 (1.75×10^6 células HEK293T/matraz) con 12.5 μg de pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. A manera de control negativo, un Matraz T25 que fue sembrado con 0.5×10^6 células HEK293T fue sometido al procedimiento de transfección, omitiendo la adición de ADNp. Las células se mantuvieron en incubación por 72 h, durante las cuales cada 24 h se realizó la captura de micrografías con el microscopio de fluorescencia invertido Lionheart FX.

Al finalizar el periodo de incubación, el medio de cultivo fue recuperado y centrifugado a 1000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se sometió a una centrifugación adicional a 2000 RCF por 10 min a 4°C, seguido de filtración mediante un filtro Millex de membrana de PVDF con un poro de 0.22 μm . El medio filtrado se almacenó en alícuotas a -80°C. La monocapa celular fue levantada cuidadosamente utilizando PBS 1X estéril. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular obtenido se almacenó a -80°C.

Se llevó a cabo una segunda transfección a menor escala con el objetivo de fijar las células y posteriormente analizarlas empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para este fin, dos pozos de una placa P6 fueron sembrados con 200,000 células HEK293T. Un pozo sirvió como control negativo, por lo que fue sometido a una transfección simulada, es decir, sin la presencia del plásmido. Mientras tanto, el pozo restante fue transfectado con 2.5 μg del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. Las células se mantuvieron en incubación durante 72 h a las condiciones previamente establecidas. Al finalizar este periodo, el medio celular fue retirado, y la monocapa celular se cubrió con 2 mL de solución fijadora (2% glutaraldehído y 0.05% ácido pícrico en 0.1 M de buffer de cacodilato pH 7.2), posteriormente las células se mantuvieron a 4°C en un ambiente protegido de la luz natural, hasta el momento de su procesamiento químico.

8.4 Purificación y concentración mediante ultracentrifugación.

8.4.1. Sobrenadante obtenido de la co-transfección de pCG1-EMNS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS con lipofectamina 3000.

Muestras de 3 mL de sobrenadante correspondientes a cada condición de transfección (Fig. 9) fueron sometidas a ultracentrifugación a 28,000 rpm durante 4 h y 4°C utilizando un rotor SW28 (Beckman) y la ultracentrífuga XL-100 (Beckman). El pellet resultante fue resuspendido en 50 μL de PBS 1X estéril, lo que resultó en una concentración final de muestra 60 veces mayor (60X). Posteriormente, el sobrenadante concentrado fue almacenado a -80°C.

8.4.2. Sobrenadante obtenido de la co-transfección de pCG1-EMNS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS con fosfato de calcio.

90 mL de sobrenadante fueron sometidos a ultracentrifugación a 28,000 rpm durante 2 h utilizando el mismo equipo que la sección previa. El pellet resultante fue resuspendido en

900 μ L de PBS 1X estéril, lo que resultó en una concentración final de muestra 100 veces mayor (100X). Posteriormente, el sobrenadante concentrado fue almacenado a -80°C .

8.4.3. Sobrenadante obtenido de la transfección de pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS.

45 mL de sobrenadante fueron sometidos a ultracentrifugación a 28,000 rpm durante 2 h. El pellet resultante fue resuspendido en 45 μ L de PBS 1X estéril, lo que resultó en una concentración final de muestra 100 veces mayor (100X). Posteriormente, el sobrenadante concentrado se almacenó a 4°C .

8.5 Análisis mediante dispersión de luz dinámica.

Se analizaron por dispersión de luz dinámica 100 μ L del sobrenadante concentrado 100X proveniente de la co-transfección de pCG1-EMNS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS con fosfato de calcio y control negativo (10 μ L de medio DMEM adicionado al 10% v/v con SFB diluido en relación 1:10 en PBS 1X). Para ello se utilizó el equipo Zetasizer Pro de Malvern Panalytical.

8.6 Dot-blot.

Con el objetivo de detectar la presencia de la proteína S, se analizaron muestras de sobrenadante recuperado a las 72 horas post-transfección, así como sobrenadante concentrado y la fracción insoluble de los pellets celulares, utilizando la técnica de Dot-Blot.

Para este análisis se emplearon sueros contra la proteína la proteína Ltbp50 (proteína quimérica que contiene múltiples epítomos de la proteína S del SARS-CoV-2) (Wong-Arce et al., 2024), así como la proteína Ltbp50 como control positivo.

En primer lugar, los pellets celulares obtenidos al concluir las transfecciones fueron sometidos a un proceso de lisis celular. Para ello, los pellets fueron descongelados a 37°C en baño María, y resuspendidos en 300 μ L de agua MiliQ, posteriormente se les agregaron 30 μ L de buffer de lisis [Na_3HPO_4 (0.2 M), NaCl (0.1 M), EDTA (10 mM), pH 6.0], 2.5 μ L de PMSF (100 mM) y 6 μ L de Triton X-100. La suspensión celular se sometió a un ciclo de congelación-descongelación a -80°C / 37°C respectivamente, seguida de 4 ciclos de sonicación (35% de amplitud, duración de 5 s con intervalos de 30 s entre cada ciclo). Finalmente, algunas muestras de fracción insoluble fueron diluidas en relación 1:10 y 1:20 en PBS 1x estéril.

Las muestras de sobrenadante recuperadas en las transfecciones, así como las muestras de sobrenadante concentrado obtenidas mediante el proceso de ultracentrifugación mencionado en la sección 8.4, fueron descongeladas o atemperadas, según fuera necesario a 37°C en un baño María.

Posteriormente, se cargaron 8 μ L de muestras y 300 ng de la proteína Ltbp50 en una membrana de nitrocelulosa. Una vez seca, la membrana fue sumergida en una solución de 5% de leche desnatada en PBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente. Al concluir el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (0.05% Tween en PBS 1X),

al finalizar los lavados, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (Anti-Ltbp50) diluido en relación 1:500 en PBS 1X durante 90 min. a 37°C. Se continuó con 3 lavados con PBS-T seguidos de una incubación durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) diluido 1:2000 en PBS 1X. Finalmente se repitieron los lavados con PBS-T, y al concluir, la membrana fue revelada utilizando el kit de inmunotransferencia de Thermofisher.

8.7 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión.

Las células fijadas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido. Previo al análisis con TEM las células deben pasar por un procesamiento químico, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera.

Primero, la solución fijadora que cubría la monocapa celular fue descartada y reemplazada con una solución de cacodilato de sodio (CS) $C_2H_6AsNaO_2$ (0.1 M), pH 7.4, la cual se incubó durante 10 min, proceso que fue repetido dos veces más. Posteriormente, fue agregada una solución de OsO_4 al 1% en CS y las células se mantuvieron en incubación con esta solución durante 60 min bajo un ambiente protegido de luz natural. Concluida la incubación, la solución de OsO_4 fue retirada y descartada, y se realizaron cuatro lavados, tres de ellos con CS, mientras que el último se realizó con una solución de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$ (0.1 M), pH 4.5). A continuación, las muestras fueron teñidas con una solución de acetato de uranilo ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) al 0.5% diluido en acetato de sodio (0.1 M), pH 4.5 y las muestras teñidas se mantuvieron en incubación durante 60 min en un ambiente protegido de la luz natural. Para finalizar se realizaron cuatro lavados: tres de ellos con $C_2H_3NaO_2$ (0.1 M), pH 4.5 y el restante con agua ultrapura.

Al día siguiente, las células son sometidas a un proceso de deshidratación, el cual consiste en realizar dos incubaciones de dos minutos con soluciones de etanol a las siguientes concentraciones: 35%, 50%, 70%, 95% y 100%. A continuación, las muestras son lavadas en tres ocasiones con resina EMBED 812 (Tabla 3). Después de 24 h, la resina es reemplazada y las muestras son sometidas a un proceso de polimerización a 55 °C durante 48 h.

Una vez polimerizada la resina se cortaron los discos en secciones de entre 70 a 80 nm de espesor utilizando una navaja de diamante en un ultramicrotomo LEICA EM UC7. Los cortes fueron colocados en rejillas de cobre para su tinción con acetato de uranilo ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) al 0.5% y citrato de plomo ($Pb_3(C_6H_5O_7)_2$) al 0.5%. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión mod. JEM-JEOL-2100 a 200 kV.

Tabla 3. Protocolo de preparación de resina EMBED 812.

| | | | | | |
|-------------------|---------|---------|----------|----------|----------|
| EMBED 812 | 53.5 g | 40.0 g | 26.7 g | 13.3 g | 5.35 g |
| DDSA | 20.7 g | 15.6 g | 10.4 g | 5.20 g | 2.05 g |
| NMA | 26.0 g | 19.5 g | 13.0 g | 6.50 g | 2.60 g |
| DMP-30 | 1.40 mL | 1.05 mL | 0.700 mL | 0.350 mL | 0.140 mL |
| MASA TOTAL | 100 g | 75.0 g | 50.0 g | 25.0 g | 10.0 g |

9. Resultados.

9.1 Construcción de los plásmidos.

Los productos de PCR obtenidos en la construcción del plásmido pCG1-*ENMS* fueron analizados mediante electroforesis para determinar el tamaño de los amplicones. Se esperaba un amplicón de aproximadamente 1,821 pb para el inserto que contine los genes de las proteínas E y N y 8,909 pb para el vector que contiene los genes de las proteínas M y S. En ambos casos, se observaron bandas a la altura esperada (Fig. 11). Una vez confirmado el tamaño de los amplicones, estos fueron purificados, cuantificados y ligados utilizando la metodología InFusion. La secuencia de los plásmidos resultantes fue confirmada mediante secuenciación Sanger, empleando dos primers distintos: FP-SeqN, el cual se une a la porción final del gen de la proteína N, perteneciente al inserto, y el primer RP-SeqM, el cual fue diseñado para unirse a una región perteneciente al gen de la proteína M, correspondiente al vector. De esta manera, se confirma que ambos fragmentos, vector e inserto están presentes en el plásmido pCG1-*ENMS* (Fig. 12).

En relación con el plásmido pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*, los resultados de las electroforesis mostraron la presencia de una banda cercana a las 750 pb, coincidiendo con el tamaño esperado del amplicon del gen *ZsGreen-FMV2* (767 pb). Además, se observó otra banda aproximadamente a la altura de 1,000 pb, correspondiente con el tamaño previsto del amplicon de la secuencia PS SARS (1,117 pb) (Fig.11). A lo largo de su construcción la secuencia del plásmido fue confirmada en dos ocasiones, la primera empleando el primer FP-*ZsGreen*, el cual fue diseñado para unirse a una región del gen *ZsGreen*. Finalmente, el plásmido fue secuenciado empleando el primer PR-Seq-*ENMS-PS* el cual es complementario a una región del gen PS (Fig.13).

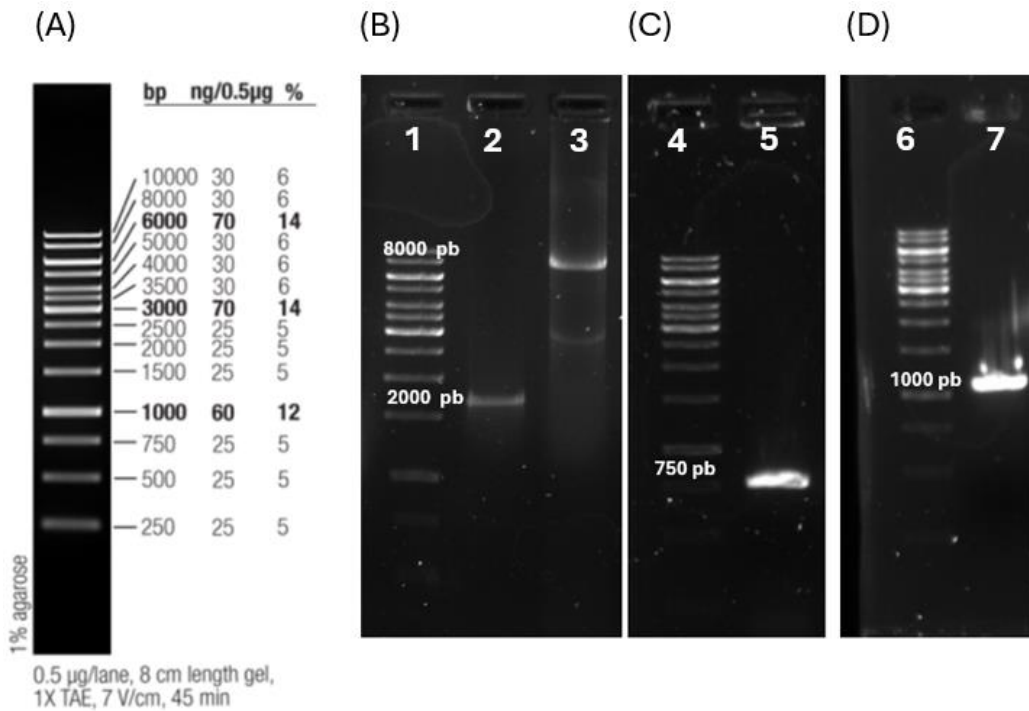


Figura 11. Resultados de electroforesis de los productos de PCR. (A) Referencia del marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder. (B) Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amplicón del inserto que contiene los genes de las proteínas E y N (tamaño esperado 1, 821 pb). Carril 3: Vector linealizado que contiene los genes de las proteínas M y S (tamaño esperado: 8, 909 pb). (C) Carril 4: Marcador de peso molecular. Carril 5: Amplicón del inserto que contiene el gen de la proteína ZsGreen-FMV2 (tamaño esperado 762 pb). (D) Carril 6: Marcador de peso molecular. Carril 7: Amplicón del inserto PS- SARS (tamaño esperado 1,117 pb)

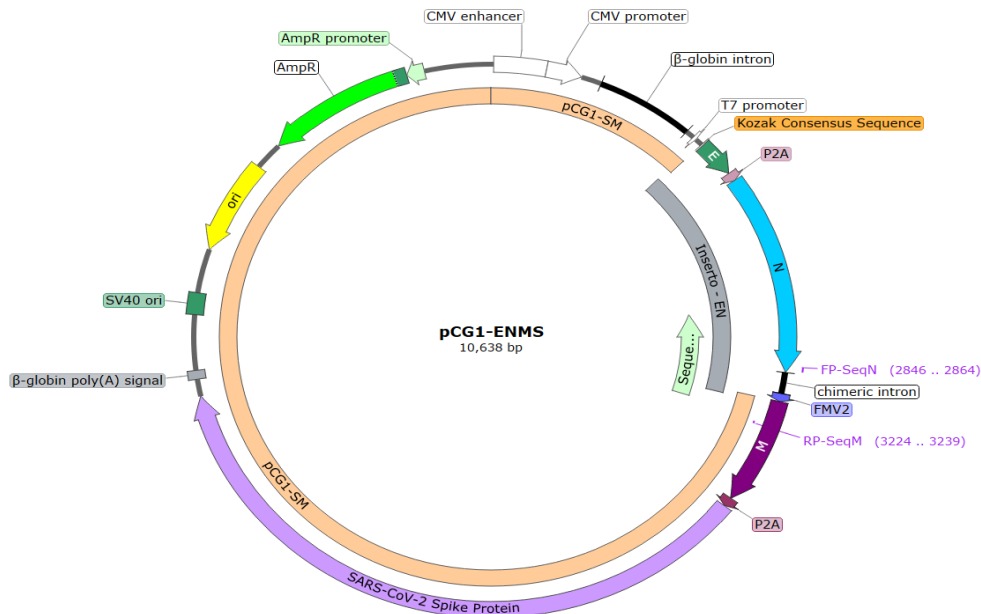


Figura 12. Plásmido pCG1-ENMS. Esquema representativo en el cual se muestran los sitios de unión de los primers FP-SeqN y RP-SeqM en la región 2846-2864 y 3224-3239 respectivamente, los cuales fueron empleados para confirmar la secuencia nucleotídica del plásmido.

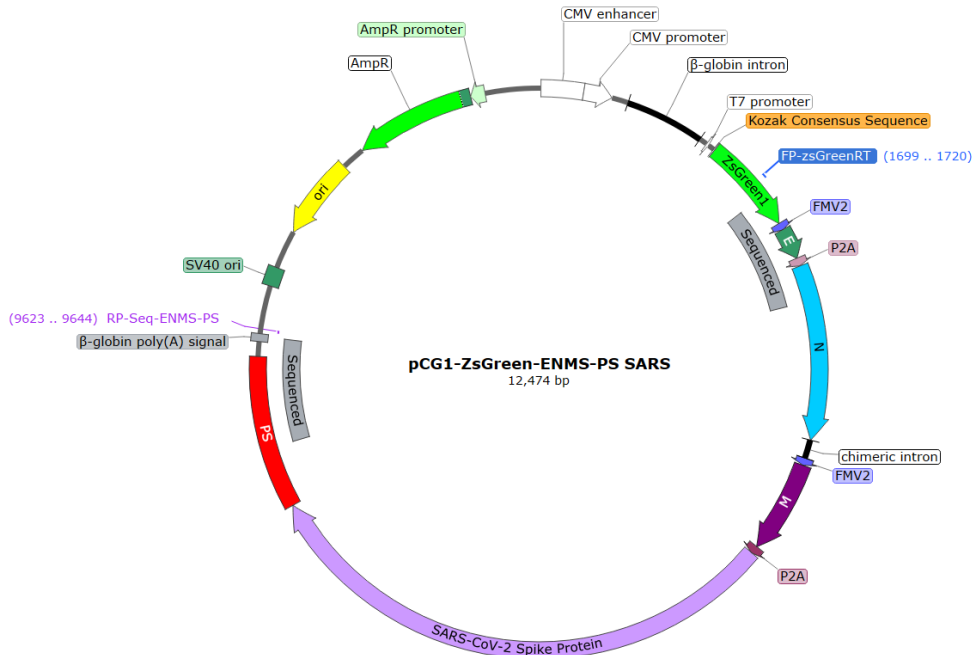


Figura 13. Plásmido pCDNA3.1-Zs Green-PS SARS. Esquema representativo en el cual se muestran los sitios de unión de los primers FP-ZsGreenRT y RP-Seq-ENMS-PS en las regiones 1699-1720 y 9623- 9644, respectivamente, los cuales fueron empleados para confirmar la secuencia nucleotídica del plásmido.

9.2 Co-transfección de los plásmidos pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS con lipofectamina 3000.

Mediante microfografías capturadas con el microscopio Lionheart FX se observaron células HEK93T expresando la proteína ZsGreen (Fig.14). De manera cualitativa se observó una disminución en el número de células verdes fluorescentes en aquellos casos donde el plásmido pCDNA 3.1-ZsGreen-PS SARS fue co-transfectado con el plásmido pCG1-ENMS (Fig.12 Pozo B2 y B3) con respecto a la condición donde solo fue transfectado el plásmido pCDNA3.1 ZsGreen-PS SARS (Pozo A2) (Fig.14).

La presencia de células verdes indica que tanto el proceso de introducción del plásmido a la célula, como la transcripción y traducción de los genes contenidos en el plásmido pCDNA 3.1-Zs Green-PS SARS fueron llevados a cabo de manera exitosa. Dichos resultados también se pueden extrapolar al plásmido PCG1-ENMS, aunque en este caso el plásmido no incluye un gen reportero. La transcripción y traducción de la proteína S del SARS-CoV-2 fue confirmada mediante Dot-Blot (ver sección 8.6).

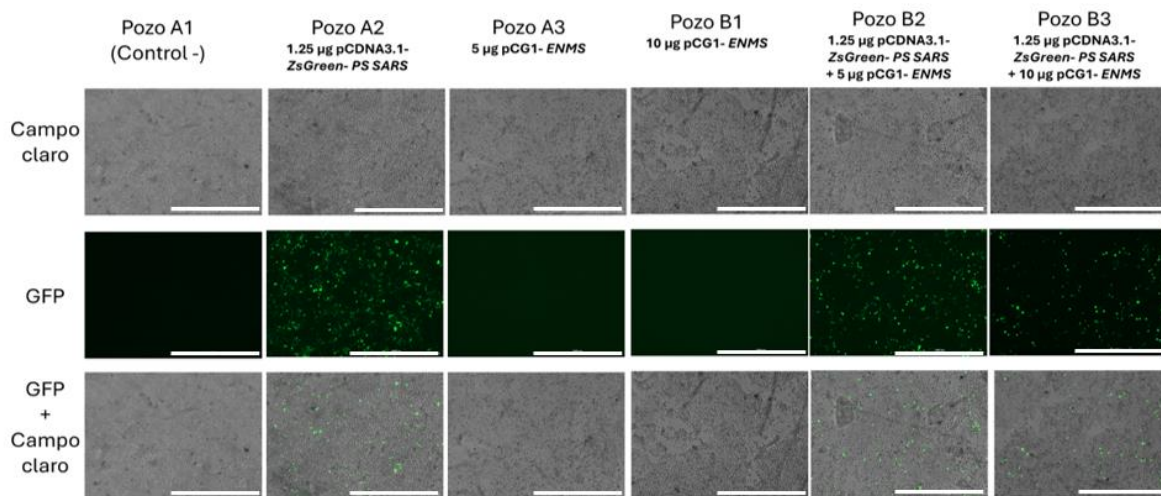


Figura 14. Co-transfección de pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y pCG1-*ENMS* con lipofectamina 3000. Micrografías tomadas 72 h post-transfección muestran la expresión de la proteína *ZsGreen* en las células que fueron transfectadas con el plásmido pCDNA 3.1-*ZsGreen-PS SARS* (Pozo A2, B2 y B3). Micrografías tomadas con el objetivo 4X. La barra de escala corresponde a 1000 µm.

9.3 Co-transfección de los plásmidos pCG1-*ENMS* y pCDNA3.1- *ZsGreen PS-SARS* con fosfato de calcio.

Debido a que se presentó una escases del reactivo lipofectamina 3000 y los tiempos de espera de los proveedores eran bastante largos, se optó por probar un método distinto de transfección, en particular la transfección con fosfato de calcio. En esta ocasión, el experimento fue realizado a mayor escala con el propósito de recuperar un volumen mayor de sobrenadante que después sería concentrado mediante ultracentrifugación. De igual manera se confirmó la correcta introducción a las células y la traducción del gen reportero contenido en el plásmido pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS*. En las micrografías obtenidas se pueden apreciar células verdes fluorescentes HEK393T expresando la proteína *ZsGreen* (Fig. 15).

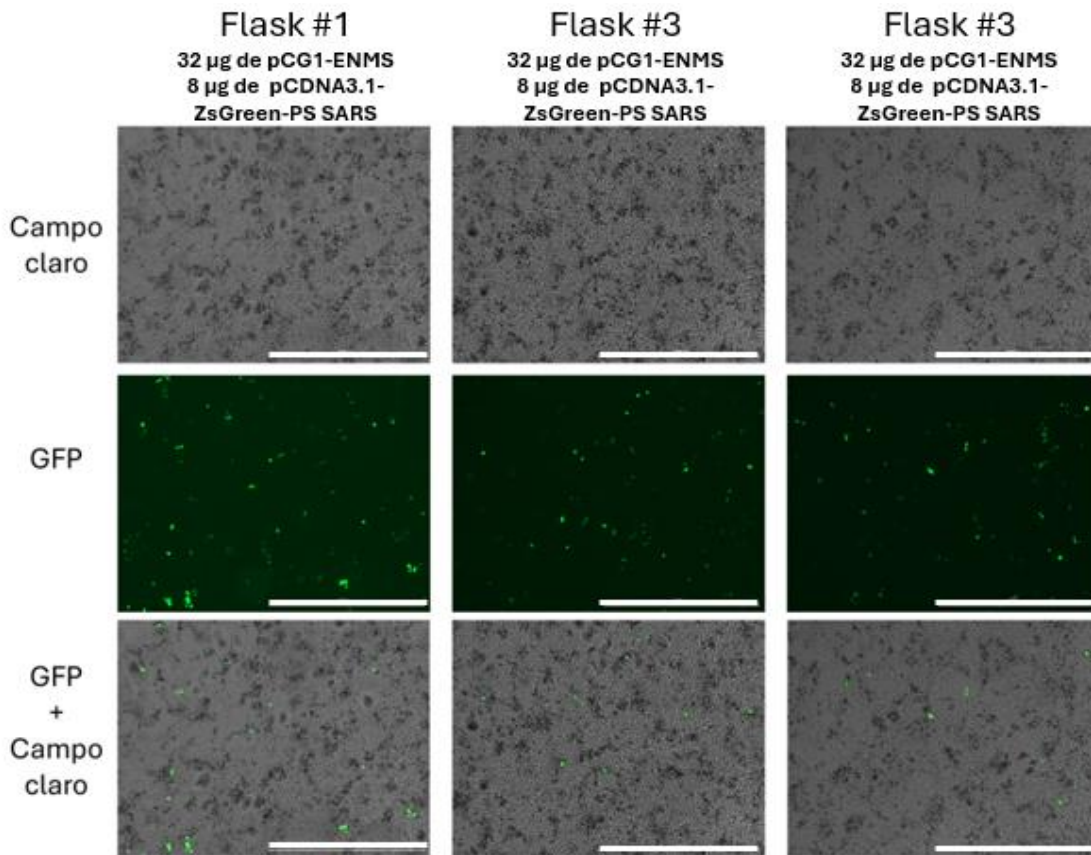


Figura 15. Co-transfección con fosfato de calcio de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y pCG1-ENMS. Micrografías tomadas 72 horas post-transfección muestran células expresando la proteína ZsGreen. Todos los flasks fueron co-transfectados bajo las mismas condiciones. Objetivo 4X. La barra de escala corresponde a 1000 µm.

9.4 Electroporación del plásmido pCDNA 3.1-ZsGreen-PS SARS.

De manera adicional, se optó por electroporar células HEK93T empleando solo el plásmido pCDNA 3.1-ZsGreen-PS SARS con el objetivo de determinar la eficiencia de transfección de este método. Las micrografías a las 72 hpt demostraron la baja eficiencia de transfección, al observarse de manera cualitativa un menor número de células verdes fluorescentes (Fig.16), en comparación con el método de transfección con fosfato de calcio (Fig. 15). Debido a estos resultados, se decidió no continuar con las electroporaciones.

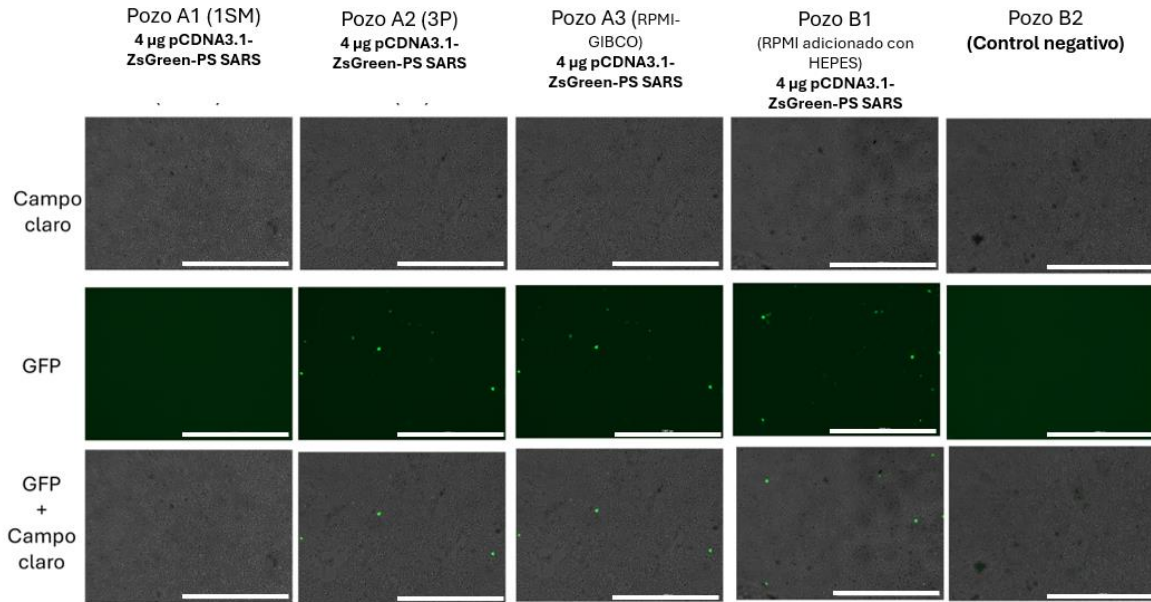


Figura 16. Electroporación de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS. Micrografías tomadas 72 h post-transfección, se observa la presencia de células expresando la proteína ZsGreen en los pozos A2, A3 y B1, mientras que en los pozos A1 y B2 no se logró observar células expresando el gen reportero. De manera cualitativa, la electroporación es el método con la eficiencia de transfección más baja. Objetivo 4X. La barra de escala corresponde a 1000µm.

9.5 Transfección del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS.

Las micrografías obtenidas a las 72 hpt demostraron que la transfección con el sistema de un plásmido: pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS resultó en un incremento en la eficiencia de transfección. Dicho incremento se observó de manera cualitativa al aumentar el número de células verdes fluorescentes. El correcto funcionamiento del plásmido fue confirmado al detectarse señal de la proteína reportera ZsGreen (Fig.17).

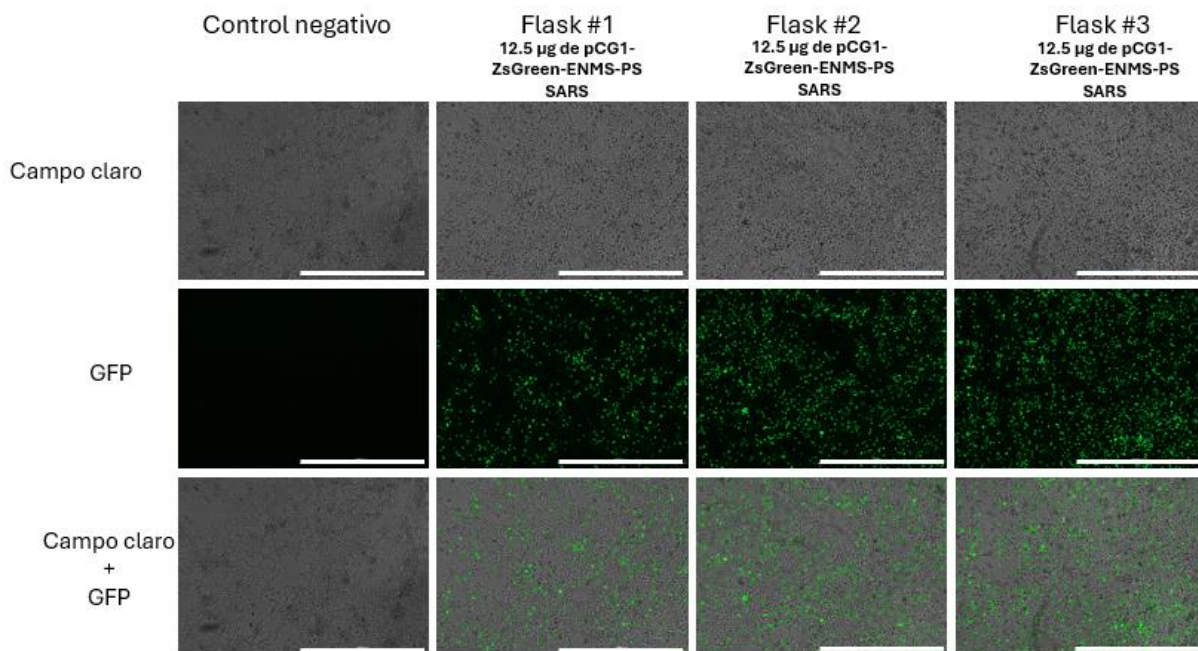


Figura 17. Transfección de pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS con fosfato de calcio. Micrografías tomadas 72 h post-transfección. La transfección del plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS con fosfato de calcio resultó en un aumento cualitativo en el número de células expresando la proteína ZsGreen con respecto a las transfecciones con el sistema de dos plásmidos. Objetivo 4X. La barra de escala corresponde a 1000 µm.

9.6 Análisis mediante dispersión de luz dinámica.

Los resultados del análisis a la muestra correspondiente al sobrenadante concentrado 100X proveniente de la co-transfección de pCG1-EMNS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS mostraron la presencia de partículas de aproximadamente 100 nm (Fig. 18), lo cual concuerda con el diámetro reportado para viriones de SARS-CoV-2 de entre 60 a 140 nm (Bar-On et al., 2020). Mientras que el análisis del control negativo mostró una variedad de partículas con diámetros heterogéneos desde 10 hasta 100 nm (Fig. 18), dichos resultados pueden explicarse debido a la presencia de distintas proteínas provenientes del suero fetal bovino con el que el medio DMEM está adicionado.

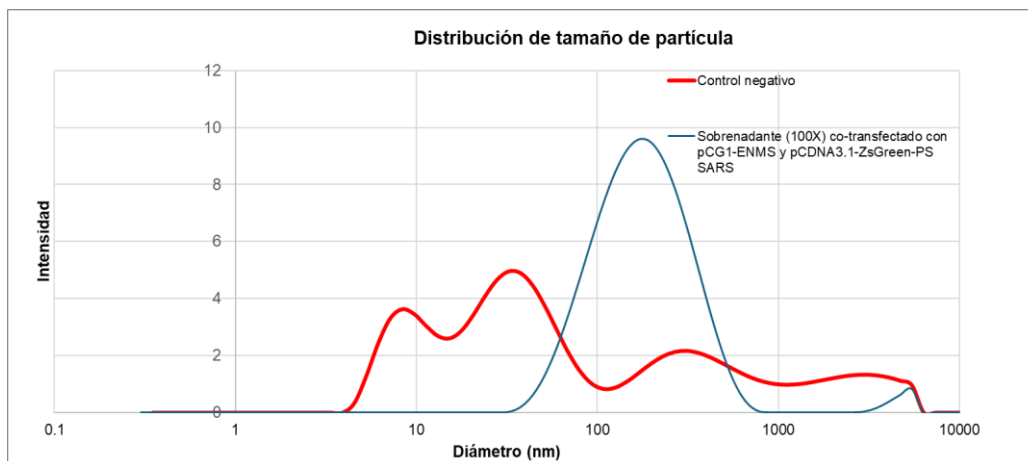


Figura 18. Distribución del tamaño de partícula. Gráfico comparativo de los tamaños de partícula encontrados en la muestra de sobrenadante co-transfectado con los plásmidos pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y la muestra correspondiente al control negativo. Únicamente se detectó la presencia de partículas de aproximadamente 100 nm en la muestra de sobrenadante concentrado, lo que concuerda con el tamaño de partícula esperado para VLPs de SARS-CoV-2.

9.7 Dot-blot.

Las muestras correspondientes al lisado celular (extracto celular), sobrenadante y sobrenadante concentrado obtenidas de las co-transfecciones con lipofectamina 3000 y fosfato de calcio del sistema de dos plásmidos, así como las muestras obtenidas en la transfección de pCG1-ZsGreen-ENMS- PS SARS fueron analizadas mediante dot-blot.

En el caso de las muestras obtenidas en la co-transfección de pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS con lipofectamina 3000 (Fig.9), el dot-blot indica señal de epítomos de la proteína S solo en el control positivo y las muestras del lisado celular proveniente de los pozos A3 (5 µg de pCG1-ENMS), B1 (10. µg pCG1-ENMS), B2 (1.25 µg de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y 5 µg pCG1-ENMS) y B3 (1.25 µg de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS y 10 µg de pCG1-ENMS) (Fig.19); mientras que los pozos A1(control negativo) y A2 (1.25 µg de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS), así como el control positivo (Spike Ómicron) no registraron señal alguna (Fig.19).

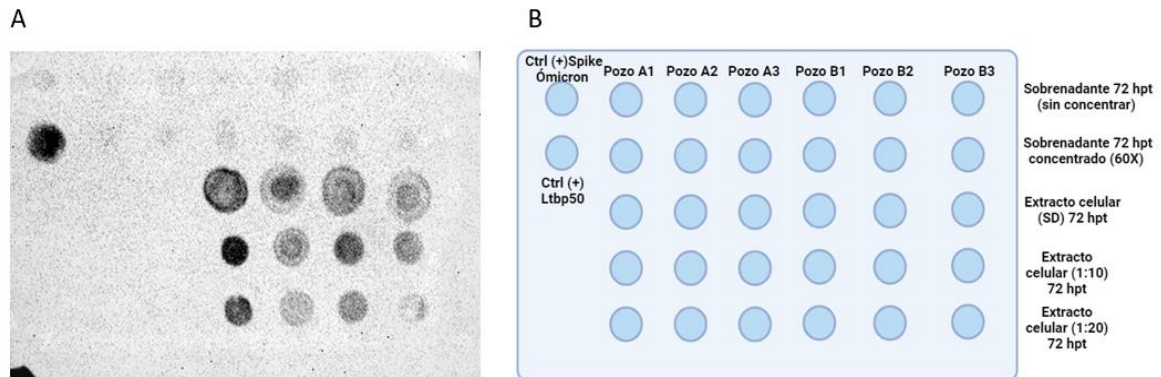


Figura 19. Detección de epítomos de la proteína Spike en muestras de células transfectadas con pCG1-ENMS. (A) Se muestra la membrana de Dot-blot revelada, la señal del control (+): Ltp50, valida el ensayo. Señales de epítomos de la proteína S solo fueron detectadas en los lisados celulares de las células que fueron transfectadas con el plásmido pCG1-ENMS (pozos A3, B1, B2 y B3). (B) esquema representativo que describe el acomodo de las muestras en la membrana de nitrocelulosa. hpt: horas post-transfección. SD: sin diluir. 1:10, 1:20: indica la dilución de los extractos celulares.

Un segundo dot-blot fue realizado para analizar las muestras correspondientes a la co-transfección de pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y pCG1-ENMS con fosfato de calcio. En este caso, como control positivo se cargaron 300 ng de la proteína Ltp50. Los resultados indican que solo se detectó presencia de epítomos de la proteína S en las muestras que corresponden al control positivo y fracción insoluble del pellet celular sin diluir (SD) de las células co-transfectadas. En el resto de las muestras no se percibe señal (Fig.20).

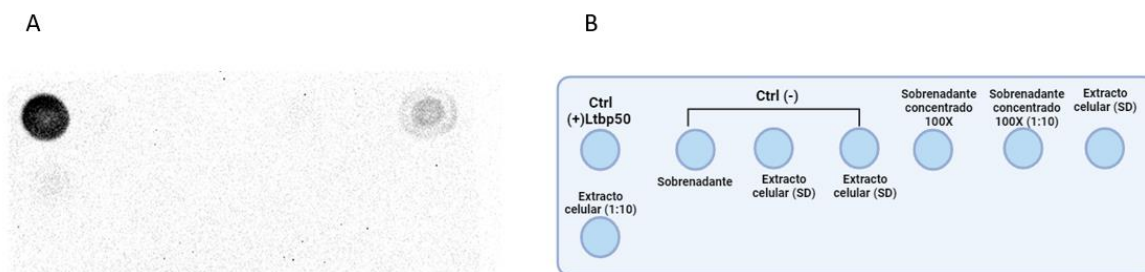


Figura 20. Detección de epítomos de la proteína Spike en muestras de células transfectadas con pCG1-ENMS. Dot-blot. (A) se muestra la membrana de Dot-blot revelada, señales de epítomos de la proteína S solo fueron detectadas en el control positivo y muestra de la fracción insoluble del pellet celular (co-transfectado con 8 μ g de pCDNA3.1 *ZsGreen-PS SARS* y 32 μ g de pCG1-ENMS). (B) esquema representativo que describe el acomodo de las muestras en la membrana de nitrocelulosa. hpt: horas post-transfección. SD: sin diluir. 1:10, 1:20: indica la dilución de los extractos celulares.

Finalmente, en el análisis de las muestras recuperadas de la transfección con 12.5 μ g de pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*, se detectó señal de epítomos de la proteína S en la muestra del control positivo, así como una débil señal correspondiente a la muestra de la

fracción soluble del pellet celular (Fig.21), sin embargo, podría tratarse de un falso positivo generado por la viscosidad de la muestra, por lo que es necesario repetir el análisis.

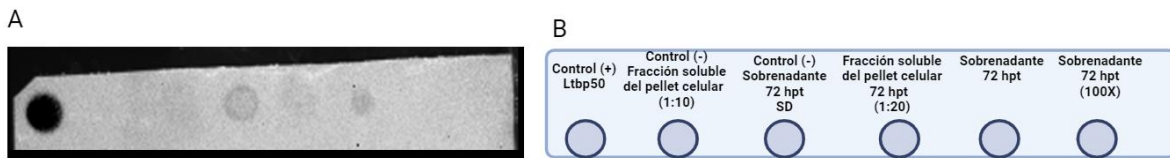


Figura 21. Señal de epítomos de la proteína Spike en la muestra correspondiente al control positivo, así como una débil señal en el extracto celular de las células transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. (A) Se detectó una fuerte señal de la proteína Ltp50 en el control positivo, en cuanto a las muestras obtenidas de la transfección se detectó una señal débil en el lisado celular, lo que podría indicar la presencia de la proteína S en el extracto celular., sin embargo, es necesario un segundo análisis para su confirmación. (B) esquema representativo que describe el acomodo de las muestras en la membrana de nitrocelulosa. hpt: horas post-transfección. SD: sin diluir. 1:10, 1:20: indica la dilución de los extractos celulares

9.8 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión en secciones ultrafinas.

Las micrografías obtenidas mediante TEM en secciones ultrafinas revelaron la presencia de vesículas de doble membrana, similares a las generadas a partir del retículo endoplásmico durante la infección con SARS-CoV-2 (Patrián-Soto, 2020). En el interior de dichas vesículas se observaron partículas con una morfología similar a la de viriones de SARS-CoV-2. Sin embargo, estas partículas carecen de la densidad electrónica y la corona de la proteína S características de los viriones de SARS-CoV-2 (Fig. 22).

A pesar de estas diferencias, las vesículas de doble membrana solo fueron observadas en las células que fueron transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS y no en las células control (no transfectadas). Este resultado sugiere el posible ensamblaje de VLPs a partir de la traducción de los genes contenidos en el plásmido (Fig. 22).

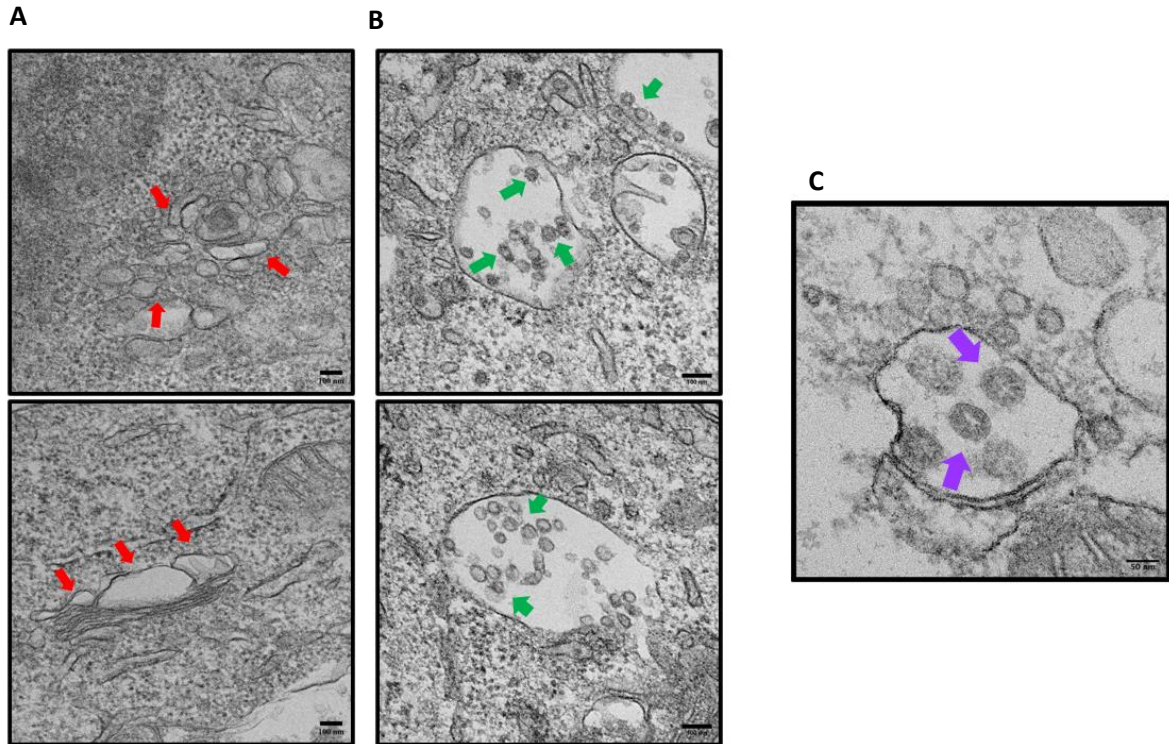


Figura 22. Micrografías de células control y transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS. Micrografías representativas de células HEK293T utilizadas como control negativo y transfectadas con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS, a las 72 horas-post transfección. (A y B, respectivamente) La barra de escala corresponde a 100 nm. (A) Células HEK293T que fueron sometidas a un proceso de transfección con fosfato de calcio en ausencia de plásmido. Las flechas rojas señalan vesículas vacías del aparato de Golgi (B) Se observan vesículas de doble membrana que contienen partículas morfológicamente similares a viriones de SARS-CoV-2, indicadas con flechas verdes (C). Células VeroE6 infectadas con la variante Delta del SARS-CoV-2. Se observa una vesícula de doble membrana que contiene viriones de SARS-CoV-2 indicados con flechas moradas, en dichos viriones se observa una alta densidad electrónica, correspondiente a la proteína N, así como se aprecia, la corona de proteína S, característica de los coronavirus (archivo privado del CICSaB/IndRE). La barra de escala corresponde a 50 nm.

10. Discusión.

El 5 de mayo de 2023 la OMS declaró el fin de la emergencia sanitaria internacional por la COVID-19; sin embargo, se resaltó que tanto la enfermedad como el virus siguen representando una amenaza para la salud mundial (Cheng et al., 2023). A pesar de la disponibilidad de vacunas contra SARS-CoV-2 el surgimiento de nuevas variantes de interés resalta la necesidad de profundizar el conocimiento sobre el virus. Por consiguiente, las VLPs de SARS-CoV-2 representan una herramienta esencial para la comprensión de los mecanismos de entrada viral, ensamblaje y egreso, así como para la evaluación de fármacos antivirales y como potenciales vacunas.

El objetivo de este trabajo fue producir VLPs de SARS-CoV-2 a partir de las cuatro proteínas estructurales del virus silvestre y que dichas VLPs fueran capaces de empaquetar un gen reportero. A diferencia de los sistemas ya publicados (Arora et al., 2020; Boson et al.,

2021; Gourdelier et al., 2022; Moon et al., 2022; Plescia et al., 2021; Swann et al., 2020; Syed et al., 2021; Xu et al., 2020; Yilmaz et al., 2022), nuestro sistemas de producción de VLPs se caracterizarían por emplear el menor número de plásmidos posible. El objetivo de contar con este sistema es simplificar y eficientar la producción de VLPs. Para este propósito fueron diseñados y clonados de manera exitosa dos sistemas: el primero que comprendía los plásmidos pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y pCG1-*ENMS* y el segundo correspondiente al plásmido pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*.

Los resultados obtenidos a partir de la transfecciones transitorias en células HEK293T con ambos sistemas de plásmidos sugieren que en caso de ensamblarse las VLPs éstas no son liberadas al sobrenadante, no contienen cantidades significativas de la proteína Spike, o la proteína Spike no se encuentra en una conformación detectable por los sueros hiperinmunes utilizados para los dot blots. Además, se detectó la presencia de la proteína Spike solo en las células transfectadas con el sistema de dos plásmidos, en el caso del sistema pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*, es necesario repetir el dot-blot. En cuanto a la expresión del gen reportero esta se confirmó en ambos sistemas de plásmidos transfectados.

Hasta la fecha no se ha informado sobre el ensamblaje de VLPs de SARS-CoV-2 que expresen las cuatro proteínas estructurales a partir de un solo plásmido policistrónico. Lo más similar a este enfoque es el trabajo realizado por Chang et al. (2022), donde generaron VPLs marcadas con una etiqueta fluorescente a partir de un plásmido tricistrónico que codifica para los genes de las proteínas S, E y M.

En cuanto a sistemas de VLPs capaces de empaquetar ARN solo se ha reportado por Syed et al. (2021) quienes lograron ensamblar VLPs a partir de un sistema de cuatro plásmidos, los cuales contenían los genes de las cuatro proteínas estructurales, así como el gen reportero de la luciferasa acoplado a una de las señales de empaquetamiento del SARS-CoV-2 (T20). Sin embargo, en este estudio las partículas no fueron caracterizadas por TEM, y adicionalmente al emplear la proteína GFP como gen reportero en lugar de luciferasa la eficiencia de expresión de GFP fue solo del 3%.

Como ya se mencionó antes, los resultados del análisis mediante dot-blot, así como las microscopías de fluorescencia obtenidas a partir de las células co-transfectadas con pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y pCG1-*ENMS* demostraron que ambos plásmidos fueron exitosamente introducidos y traducidos por las células HEK293T. Adicional a esto, los resultados del análisis mediante dispersión de luz dinámica mostró la presencia de partículas con un tamaño aproximado de 100 nm en las muestras de sobrenadante concentrado (100X), lo que en caso de ser VLPs que no incorporan la proteína S, concordaría con el resultado de Gourdelier et al. (2022) que reportó VLPs conformadas de las proteínas M, N y E de 100–110 nm de tamaño, mismo trabajo donde se demuestra que la proteína S es dispensable para la producción de VLPs de SARS-CoV-2. Aunque se logró detectar la proteína Spike en la fracción insoluble de las células co-transfectadas, no se observó esta señal en las fracciones correspondientes al sobrenadante. Dicha ausencia de señal puede deberse a varios escenarios: i) el ensamblaje de las VLPs es incorrecto por lo cual las partículas no son liberadas al medio y/o son liberadas VLPs que no logran incorporar la proteína S; ii) es necesario modificar la

relación estequiométrica de los plásmidos empleados en la transfección para asegurar el ensamblaje de VLPs; iii) la ausencia de la proteína ORF3a resulta en una ruta de egreso de VLPs incorrecta.

El primer escenario se apoya en las conclusiones de Gourdelier et al. (2022) quienes reportaron que aproximadamente solo el 25% de las VLPs secretadas al medio lograban incorporar la proteína S.

Con respecto al segundo escenario es importante recapitular el mecanismo más probable de ensamblaje de los coronavirus. (CoV). Este tiene lugar en la luz del compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC)(Stertz et al., 2007), desde donde la proteína M recluta a las otras proteínas estructurales mediante señales de tráfico intracelular (Boson et al., 2021). Durante este proceso, las cantidades relativas de las cuatro proteínas estructurales varían, siendo las proteínas N, M y E la más abundantes, y finalmente la proteína S en menor cantidad (Boson et al., 2021b; Savastano et al., 2020; Syed et al., 2021). Esta variabilidad en la cantidad de proteínas estructurales durante la replicación viral ha llevado a diferentes enfoques en cuanto a las proporciones de los plásmidos empleados para la producción de VLPs. Por ejemplo, Gourdelier et al. (2022) encontraron que la relación óptima de plásmidos que codifican para las proteínas M, E y N es de 1:12:2, mientras que para las VLPs que incorporan la proteína Spike, la relación ideal es de 3:12:2:5 (M, E, N y S), dichas diferencias entre las cantidades de plásmidos concuerdan con distintos reportes (Boson et al., 2021b; Kumar et al., 2021; Swann et al., 2020; Syed et al., 2021; Xu et al., 2020; Yilmaz et al., 2022) en donde la relación entre las cantidades de los plásmidos que fueron transfectadas son distintas entre sí.

Sin embargo, también se ha reportado que es posible producir VLPs utilizando la misma cantidad de plásmidos durante la transfección, independientemente del número de plásmidos involucrados. Por ejemplo Plescia et al. (2021) utilizaron 6 µg de cada uno de los cuatro plásmidos que codificaban para las cuatro proteínas estructurales, mientras que Chang et al. (2022) emplearon 2 µg de un vector tricistrónico que portaba los genes de las proteínas S, E y M. Estos reportes indican que es posible producir VLPs utilizando distintos enfoques en la proporción de plásmidos transfectados.

Adicionalmente, en el trabajo de Syed et al. (2021) el cual es el único reporte de VLPs de SARS-CoV-2 capaces de empaquetar ARNm y entrar a células que expresan el receptor ACE2, se concluyó que la sola coexpresión de las proteínas estructurales es capaz de producir VLPs, así como partículas defectuosas y que el empaquetamiento de ARNm por estas requiere condiciones más específicas.

Finalmente, con respecto al tercer escenario, se conoce que los viriones de los beta-coronavirus transitan desde el lumen del retículo endoplasmático y el ERGIC hacia la red trans-Golgi (TGN) para llegar a los lisosomas y finalmente egresar de la célula mediante exocitosis celular (Fung & Liu, 2019). En el caso del SARS-CoV-2 estos pueden egresar siguiendo la ruta secretoria o por exocitosis mediada por lisosomas(Chen et al., 2021).

Chen et al., (2021) demostró que la proteína ORF3a de SARS-CoV-2, una viroporina conservada en los coronavirus que participa en los procesos de replicación y egreso viral, es la encargada de promover la exocitosis mediada por lisosomas, al mismo tiempo que inhibe la autofagia. Dicha proteína está ausente en los plásmidos diseñados en este trabajo, lo que plantea la posibilidad de que las posibles VLPs ensambladas durante la co-transfección de los plásmidos pCDNA3.1-*ZsGreen-PS SARS* y pCG1-*ENMS*, no puedan egresar de la célula o sean fagocitadas, lo que explicaría la ausencia de la proteína S en el sobrenadante.

En cuanto a los resultados obtenidos de la transfección del plásmido pCG1-*ZsGreen-ENMS-PS SARS*, fue posible detectar señal del gen reportero en las células transfectadas, así como una débil señal de la proteína S en los extractos celulares, por lo que es necesario repetir el análisis de dot-blot para confirmar o refutar la transcripción y traducción del gen correspondiente. A pesar de esto, las micrografías obtenidas del análisis mediante microscopía electrónica de transmisión en secciones ultrafinas mostraron la presencia de vesículas de doble membrana que contenían partículas similares a VLPs, y que estaban ausentes en las células control.

A través de una comunicación privada con el Prof. Marcus Kaul de la Universidad de California, Riverside, se discutieron algunas problemáticas relacionadas con el ensamblaje de VLPs. En su trabajo, ellos fusionaron las proteínas estructurales de SARS con proteínas fluorescentes y, aunque observaron fluorescencia en las células HEK-293T después de 7 días, no lograron detectar VLPs en los sobrenadantes. Además, tras eliminar las proteínas fluorescentes y realizar inmunotinción (N y S), observaron que estas se expresaban en HEK-293T, pero no han pudieron detectar la presencia de VLPs en el sobrenadante.

En conjunto, los hallazgos de este estudio no son suficientes para confirmar el ensamblaje de VLPs de SARS-CoV-2 compuestas por las cuatro proteínas estructurales y capaces de incorporar un gen reportero. Se plantea la posibilidad de que se hayan formado VLPs defectuosas que no lograron incluir la proteína S (o que está ha sido cortada exponiendo así solo el péptido fusión), o que estas partículas no lograron salir de la célula. La primera situación podría corroborarse mediante técnicas inmunológicas, como dot-blot o western-blot, para detectar la presencia de otras proteínas estructurales; sin embargo, el laboratorio carece de anticuerpos específicos contra las proteínas E, M o N, por lo que esta hipótesis no fue viable de explorar. Respecto a la posibilidad de una alteración en la vía lisosomal de egreso y esta teoría podría someterse a prueba mediante la inclusión de los genes de ORF3a en los plásmidos diseñados en este trabajo.

11. Conclusiones.

Los resultados obtenidos a partir de las transfecciones y caracterización de las VLPs muestran la complejidad y desafíos asociados a la producción de estas partículas.

Aunque se logró confirmar la expresión de la proteína ZsGreen y la expresión de la proteína Spike, la ausencia de señal de la proteína Spike en los sobrenadantes sugiere problemas en el ensamblaje o vía de egreso de las partículas. Estos hallazgos resaltan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y optimizar el sistema de producción de VLPs de SARS-CoV-2.

En conclusión, el presente trabajo proporcionó un enfoque significativo al intentar generar VLPs de SARS-CoV-2 a partir de un solo plásmido; sin embargo, los resultados obtenidos plantean preguntas sobre la eficacia de producción e integridad de las partículas ensambladas. Dichos hallazgos resaltan la importancia de la continua investigación para en el área de las partículas similares a virus, con el fin de aumentar el conocimiento y comprensión de virus de interés, así como de virus emergentes.

12. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no permitieron confirmar ni descartar el ensamblaje de VLPs de SARS-CoV-2 a partir de un plásmido policistrónico para la expresión de las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV-2.

Dicho ensamblaje podría confirmarse en trabajos a futuro de la siguiente manera:

1.- Realizar análisis de extractos celulares provenientes de células transfectadas y sobrenadantes mediante técnicas inmunológicas como ELISA o Western-Blot que empleen anticuerpos específicos para la detección de las proteínas estructurales: E, N o M.

2.- Llevar a cabo análisis de microscopia electrónica de transmisión de células co-transfectadas con el sistema de dos plásmidos: pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.

3.- Realizar transfecciones con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS y pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS y posteriormente analizar los extractos células, así como los sobrenadantes mediante dot-blot para detectar la presencia de la proteína S. De igual manera, analizar las células transfectadas con microscopia electrónica de transmisión.

4.- Repetir el análisis de dispersión de luz dinámica realizado a la muestra de sobrenadante concentrado 100X de la co-transfección del sistema de dos plásmidos: pCG1-ENMS y pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS, empleando un control negativo adecuado: Sobrenadante obtenido de las células que corresponden al control negativo.

5.- Repetir el análisis mediante dot-blot de los extractos celulares provenientes de la transfección con el plásmido pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS cargando una cantidad menor

proteína Ltp50 como control positivo con el objetivo de comparar la señal obtenida entre el control positivo y la muestra de extracto celular.

En caso de que se quiera explorar la ruta de egreso de las VLPs de SARS-CoV-2 se sugiere la adición del gen ORF3a a los vectores que codifican para las cuatro proteínas estructurales del SARS-CoV-2, con el objetivo de inducir la ruta de egreso vía lisosomal (Chen et al., 2021) y al mismo tiempo evitar la escisión de la proteína S que es generado al seguir un egreso mediante exocitosis.

13. Anexos

13.1 Anexo 1. Primers.

13.1.1 Primers empleados durante las reacciones de PCR, así como secuenciación Sanger.

| Primer | Secuencia |
|----------------------------------|--|
| Forward primer FP-EN | GATCCGCCACCATGTTTCTGCTGAC |
| Reverse primer RP-EN | CAGCTCCTCTACAGTAATGGTCCCATTG |
| Forward primer FP-OpSM | ATGGCCGACTCAAATGGGACCATTACT. |
| Reverse primer RP-OpenS | GGTCCGCTTGGTGGTCAGCAG. |
| Forward primer FP-SeqN | CAACAGTCCATGAGCTCAG. |
| Reverse primer RP-SeqM | GGAAACCCAGGACACC. |
| Forward primer FP-ZsGreen 2 | ATGGCCCAGTCCAAGCAC. |
| Reverse primer RP-ZsGreen 2 | TGGGCCCAGGGTTGGACTCAACGTCTCC |
| Forward primer FP-OpENMS | GGGCCCATGTACAGCTTCGTATCAGAAGAAACCGGGACA. |
| Reverse primer RP-OpENMS | GCCATGGTGGCGGCGGTCCGCTTGGTG. |
| Forward primer FP-ZsGreenRT | CTGCATGTACCACGAGTCCAAG |
| Forward primer FP-PS 2 | CTGCACTACACCTAATCTGTAGGTCCCAAACAAGCTAG. |
| Reverse primer RP-PS 2 | CTGCACTACACCTAATCTGTAGGTCCCAAACAAGCTAG |
| Forward prime FP-Op-ENMS 2 | GGCTATAAAGATATCTAGAGTCGACTGTTTAAACCTGC |
| Reverse primer RP-OpENMS 2 | GGACCTACAGATTAGGTGTAGTGCAGTTTCACGCC |
| Reverse primer RP-Seq-ENMS-PS | GTTTAAATGATTTGCCCTCCC. |

13.2 Anexo 2. Protocolos de PCR usados en la construcción de los plásmidos pCG1-ENMS y pCG1-ZsGreen-ENMS-PS SARS.

13.2.1 Reacción: Amplificación del inserto obtenido a partir de pCG1-EN.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/ μ L) ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-EN y RP-EN.

Templado: pCG1-EN.

Volumen de la reacción: 80 μ L.

| Componente | Vol. final: 80 μ L |
|--|------------------------|
| NFW | 49.2 μ L |
| 5x Phusion GC buffer | 16 μ L |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μ L |
| FP-EN (10 μ M) | 4 μ L |
| RP-EN (10 μ M) | 4 μ L |
| pCG1-EN (10 ng/ μ L) | 4 μ L |
| DMSO | 1 μ L |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/ μ L) | 0.2 μ L |

*NFW=agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 72°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 4:30 min | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.2 Reacción: Linealización del vector pCG1-SM.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/ μ l)
ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-OpSM y RP-OpenS.

Templado: pCG1-SM.

Volumen de la reacción: 80 μ L.

| Componente | Vol. final: 80 μ L |
|--|------------------------|
| NFW | 46.2 μ L |
| 5x Phusion GC buffer | 16 μ L |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μ L |
| FP-EN (10 μ M) | 4 μ L |
| RP-EN (10 μ M) | 4 μ L |
| pCG1-EN (10 ng/ μ L) | 4 μ L |
| DMSO | 4 μ L |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/ μ L) | 0.2 μ L |

*NFW= agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 68°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 5 min | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.3 Reacción: InFusion-construcción pCG1-ENMS.

Enzima empleada: In-Fusion HD Cloning Kits. Takara Bio. Número de catálogo: 639649

Volumen de la reacción: 10 μ L.

| Componente | Vol. final: 10 μ L |
|---|------------------------|
| Vector linealizado: pCG1-SM (47.7 ng/ μ L) | 2.23 μ L |
| Inserto purificado: pCG1-EN (61.6 ng/ μ L) | 1.62 μ L |
| 5X In-Fusion HD Enzyme Premix | 2 μ L |
| NFW | 4.15 μ L |

La reacción InFusion es posteriormente incubada a 50 °C durante 15 min.

13.2.4 Reacción: Amplificación del inserto *ZsGreen-FMV2* obtenido a partir de pACNR181.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/ μ l) ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-ZsGreen 2 y RP-ZsGreen.

Templado: pACNR181.

Volumen de la reacción: 80 μ L.

| Componente | Vol. final: 80 μ L |
|--|------------------------|
| NFW | 50.2 μ L |
| 5x Phusion HF buffer | 16 μ L |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μ L |
| FP-ZsGreen 2 (10 μ M) | 4 μ L |
| RP-ZsGreen 2 (10 μ M) | 4 μ L |
| pACNR181 (10 ng/ μ L) | 4 μ L |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/ μ L) | 0.2 μ L |

*NFW=agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 69°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 30 s | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.5 Reacción: Linealización del vector pCG1-ENMS.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/μl) ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-OpENMS y RP-OpENMS.

Templado: pCG1-ENMS.

Volumen de la reacción: 80 μL.

| Componente | Vol. final: 80 μL |
|--|-------------------|
| NFW | 50.2 μL |
| 5x Phusion HF buffer | 16 μL |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μL |
| FP-OpENMS (10 μM) | 4 μL |
| RP-OpENMS (10 μM) | 4 μL |
| pCG1-ENMS (10 ng/μL) | 4 μL |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/μL) | 0.2 μL |

*NFW=agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 70°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 5 min | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.6 Reacción: InFusion-construcción pCG1-ZsGreen- ENMS.

Enzima empleada: In-Fusion HD Cloning Kits. Takara Bio. Número de catalogo: 639649.

Volumen de la reacción: 10 μL.

| Componente | Vol. final: 10 μL |
|--|-------------------|
| Vector linealizado: pCG1-ENMS (44.7 ng/μL) | 1.11 μL |
| Inserto purificado: ZsGreen-FMV2 (40 ng/μL) | 5 μL |
| 5X In-Fusion HD Enzyme Premix | 2 μL |
| NFW | 1.9 μL |

La reacción InFusion es posteriormente incubada a 50 °C durante 15 min.

13.2.7 Reacción: Amplificación del inserto PS SARS obtenido a partir de pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/ μ l).

ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-PS 2 y RP-PS 2.

Templado: pCDNA3.1-ZsGreen-PS SARS.

Volumen de la reacción: 80 μ L.

| Componente | Vol. final: 80 μ L |
|---|------------------------|
| NFW | 50.2 μ L |
| 5x Phusion HF buffer | 16 μ L |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μ L |
| FP-PS 2 (10 μ M) | 4 μ L |
| RP-PS 2 (10 μ M) | 4 μ L |
| pCDNA3.1 ZsGreen-PS SARS (10 ng/ μ L) | 4 μ L |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/ μ L) | 0.2 μ L |

*NFW=agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 66°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 45 s | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.8 Reacción: Linealización del vector pCG1-ZsGreen-ENMS.

Enzima empleada: ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (2 U/μl). ThermoFisher Scientific. Número de catálogo: F549L.

Primers: FP-OpENMS-2 y RP-OpENMS-2.

Templado: pCG1-ZsGreen-ENMS.

Volumen de la reacción: 80 μL.

| Componente | Vol. final: 80 μL |
|--|-------------------|
| NFW | 50.2 μL |
| 5x Phusion HF buffer | 16 μL |
| 10 mM dNTPs | 1.6 μL |
| FP-OpENMS-2 (10 μM) | 4 μL |
| RP-OpENMS-2 (10 μM) | 4 μL |
| pCG1-ENMS (10 ng/μL) | 4 μL |
| Phusion Hot Start II DNA polymerase (2 U/μL) | 0.2 μL |

*NFW=agua libre de nucleasas.

| Protocolo | | | |
|----------------------------------|-------------|----------|---------------|
| | Temperatura | Tiempo | No. de ciclos |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 30 s | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 10 s | 35 |
| Anidamiento | 70°C | 30 s | |
| Extensión | 72°C | 5:30 min | |
| Extensión final | 72°C | 10 min | 1 |
| Paso final | 4°C | Infinito | 1 |

13.2.9 Reacción: InFusion-construcción pCG1-ZsGreen- ENM-PS SARS.

Enzima empleada: In-Fusion HD Cloning Kits. Takara Bio. Número de catalogo: 639649

Volumen de la reacción: 10 μL.

| Componente | Vol. final: 10 μL |
|--|-------------------|
| Vector linealizado: pCG1-ZsGreen-ENMS (89 ng/μL) | 0.56 μL |
| Inserto purificado: PS-SARS (154.6 ng/μL) | 1.3 μL |
| 5X In-Fusion HD Enzyme Premix | 2 μL |
| NFW | 6.14 μL |

La reacción InFusion es posteriormente incubada a 50 °C durante 15 min.

14. Referencias.

- Arora, K., Rastogi, R., Arora, N., Parashar, D., Pailwal, J., Naqvi, A., & Kundu, P. (2020). Multi-Antigenic Virus-like Particle of SARS CoV-2 produced in *Saccharomyces cerevisiae* as a vaccine candidate. *BioRxiv*, 05.
- Banga Ndzouboukou, J.-L., Zhang, Y., & Fan, X. (2021). Recent Developments in SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Detection Methods. *Current Medical Science*, 41(6), 1052–1064. <https://doi.org/10.1007/s11596-021-2470-7>
- Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R., & Milo, R. (2020). SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>
- Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F.-L., Lavillette, D., & Denolly, S. (2021a). The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100111. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>
- Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F.-L., Lavillette, D., & Denolly, S. (2021b). The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100111. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>
- Chang, Y.-S., Chu, L.-W., Chen, Z.-Y., Wu, J.-S., Su, W.-C., Yang, C.-J., Ping, Y.-H., & Lin, C.-W. (2022). Development of Fluorescence-Tagged SARS-CoV-2 Virus-like Particles by a Tri-Cistronic Vector Expression System for Investigating the Cellular Entry of SARS-CoV-2. *Viruses*, 14(12), 2825. <https://doi.org/10.3390/v14122825>
- Chen, D., Zhao, Y. G., & Zhang, H. (2022). Endomembrane remodeling in SARS-CoV-2 infection. *Cell Insight*, 1(3), 100031. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2022.100031>
- Chen, D., Zheng, Q., Sun, L., Ji, M., Li, Y., Deng, H., & Zhang, H. (2021). ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Developmental Cell*, 56(23), 3250-3263.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.006>
- Cheng, K., Wu, C., Gu, S., Lu, Y., Wu, H., & Li, C. (2023). WHO declares the end of the COVID-19 global health emergency: lessons and recommendations from the perspective of ChatGPT/GPT-4. *International Journal of Surgery*, 109(9), 2859–2862. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000000521>
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. (Georgia), & Shin, D. M. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>
- Cucinotta, D., & Maurizio, V. (2020). *WHO Declares COVID-19 a Pandemic*.
- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 529–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

- Gourdelier, M., Swain, J., Arone, C., Mouttou, A., Bracquemond, D., Merida, P., Saffarian, S., Lyonnais, S., Favard, C., & Muriaux, D. (2022a). Optimized production and fluorescent labeling of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Scientific Reports*, *12*(1), 14651. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18681-z>
- Gourdelier, M., Swain, J., Arone, C., Mouttou, A., Bracquemond, D., Merida, P., Saffarian, S., Lyonnais, S., Favard, C., & Muriaux, D. (2022b). Optimized production and fluorescent labeling of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Scientific Reports*, *12*(1), 14651. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18681-z>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2021). Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *Npj Vaccines*, *6*(1), 104. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>
- Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*, *9*(3), e13952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13952>
- Horita, N., & Fukumoto, T. (2023). Global case fatality rate from COVID-19 has decreased by 96.8% during 2.5 years of the pandemic. *Journal of Medical Virology*, *95*(1). <https://doi.org/10.1002/jmv.28231>
- Kumar, B., Hawkins, G. M., Kicmal, T., Qing, E., Timm, E., & Gallagher, T. (2021). Assembly and Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV2): Evaluation Using Virus-Like Particles. *Cells*, *10*(4), 853. <https://doi.org/10.3390/cells10040853>
- Li, X., Yuan, H., Li, X., & Wang, H. (2023). Spike protein mediated membrane fusion during SARS-CoV-2 infection. *Journal of Medical Virology*, *95*(1). <https://doi.org/10.1002/jmv.28212>
- Majumder, J., & Minko, T. (2021). Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *The AAPS Journal*, *23*(1), 14. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-00532-2>
- Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2022). Virus-like Particles: Fundamentals and Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8579. <https://doi.org/10.3390/ijms23158579>
- Moon, K.-B., Jeon, J.-H., Choi, H., Park, J.-S., Park, S.-J., Lee, H.-J., Park, J. M., Cho, H. S., Moon, J. S., Oh, H., Kang, S., Mason, H. S., Kwon, S.-Y., & Kim, H.-S. (2022). Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles in plant. *Scientific Reports*, *12*(1), 1005. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04883-y>
- Pastrian-Soto, G. (2020a). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International Journal of Odontostomatology*, *14*(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Pastrian-Soto, G. (2020b). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International Journal of Odontostomatology*, *14*(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Plescica, C. B., David, E. A., Patra, D., Sengupta, R., Amiar, S., Su, Y., & Stahelin, R. V. (2021). SARS-CoV-2 viral budding and entry can be modeled using BSL-2 level virus-like particles. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100103. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016148>

- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>
- Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, *34*(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>
- Savastano, A., Ibáñez de Opakua, A., Rankovic, M., & Zweckstetter, M. (2020). Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. *Nature Communications*, *11*(1), 6041. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19843-1>
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martínez-Sobrido, L., García-Sastre, A., Weber, F., & Kochs, G. (2007). The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology*, *361*(2), 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.027>
- Swann, H., Sharma, A., Preece, B., Peterson, A., Eldredge, C., Belnap, D. M., Vershinin, M., & Saffarian, S. (2020). Minimal system for assembly of SARS-CoV-2 virus like particles. *Scientific Reports*, *10*(1), 21877. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78656-w>
- Syed, A. M., Taha, T. Y., Tabata, T., Chen, I. P., Ciling, A., Khalid, M. M., Sreekumar, B., Chen, P.-Y., Hayashi, J. M., Soczek, K. M., Ott, M., & Doudna, J. A. (2021). Rapid assessment of SARS-CoV-2-evolved variants using virus-like particles. *Science*, *374*(6575), 1626–1632. <https://doi.org/10.1126/science.abl6184>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wong-Arce, A., Gonzalez-Ortega, O., Romero-Maldonado, A., Miranda-López, A., García-Soto, M., Farfán-Castro, S., Betancourt-Mendiola, L., Teeravechyan, S., Srisutthisamphan, K., Comas-García, M., Solís Andrade, K. I., & Rosales-Mendoza, S. (2024). Production and Immunogenicity Assessment of LTP50: An Escherichia coli-Made Chimeric Antigen Targeting S1- and S2-Epitopes from the SARS-CoV-2/BA.5 Spike Protein. *Pharmaceuticals*, *17*(3), 302. <https://doi.org/10.3390/ph17030302>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Xu, R., Shi, M., Li, J., Song, P., & Li, N. (2020). Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00862>
- Yilmaz, I. C., Ipekoglu, E. M., Bulbul, A., Turay, N., Yildirim, M., Evcili, I., Yilmaz, N. S., Guvencli, N., Aydin, Y., Gungor, B., Saraydar, B., Bartan, A. G., Ibibik, B., Bildik, T., Baydemir, İ., Sanli, H. A., Kayaoglu, B., Ceylan, Y., Yildirim, T., ... Gursel, M. (2022). Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy*, *77*(1), 258–270. <https://doi.org/10.1111/all.15091>
- Zeltins, A. (2013). Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, *53*(1), 92–107. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>

