

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE
TRANS-COMPLEMENTACIÓN
DE SARS-COV-2

POR

M.C.P. ULISES EDGARDO DE LEÓN COVARRUBIAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MORFOLOGÍA

JUNIO 2022

**“GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN
DE SARS-COV-2”**

Aprobación de tesis:



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna

Director



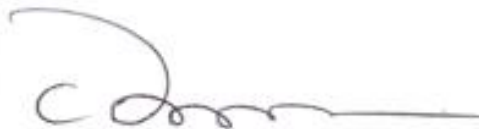
Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Co-Director



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de estudios de posgrado

**“GENERACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN
DE SARS-COV-2”**

Presentado por

M.C.P. ULISES EDGARDO DE LEÓN COVARRUBIAS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna, la co-dirección del Dr. C. José Juan Pérez Trujillo y la valiosa colaboración de la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas miembro de la comisión.

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna

Director

Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Co-Director

Monterrey, Nuevo León

Junio 2022

*Oí decir que la gente viene a nuestras vidas por una razón, trayendo algo que
debemos aprender*

AGRADECIMIENTOS

Quiero ofrecer mi más sincero agradecimiento al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por aceptarme en el departamento, por sembrar en mí el interés en la investigación científica, por todo el conocimiento que me ha brindado en estos 7 años de conocerlo y por la confianza de permitirme continuar en su equipo de trabajo. Así mismo expreso mi agradecimiento a la Dr. Odila Saucedo Cárdenas por todos sus comentarios, valiosas aportaciones y asesorías que permitieron desarrollar este trabajo.

Al Dr. José Juan Pérez Trujillo por co-dirigir este trabajo, por siempre estar disponible ante mis dudas y mis *ataques de ansiedad*. Por siempre tener un buen consejo o una buena broma que me permitiera continuar cuando sentía que ya no había solución. Por brindar su ayuda cada vez que veía que el trabajo o las clases me sobrepasaban. Muchas gracias en general por siempre estar presente.

A mis siempre presentes amigos de laboratorio, el Dr. Christian Alexis Gómez Tristan y a la M.C. Gloria Arely Guillen Meléndez, por siempre estar allí para apoyarme, por brindar *críticas constructivas* y no permitir que las risas faltasen.

A mis *comadres* de laboratorio la Dra. Sheila, la Dra. Abigail, la M.C. Yareth, la M.C. Alejandra y la M.C. Ana Duarte por todos sus comentarios, escapadas de laboratorio y viernes de margaritas. A todo el personal de Departamento de Histología por sus asesorías y por permitirme pertenecer a el.

Así mismo agradecer a mi roomie Ana Duarte por siempre estar al pendiente de mi bienestar durante los meses difíciles, por abrirme las puertas de su casa y siempre tener un buen consejo en mano.

Al estudiante Leonel, por ayudarme a recordar que la enseñanza es mi pasión, que la discusión crítica siempre da perspectivas diferentes y por ayudarme a desarrollar mi paciencia.

Al Dr. Humberto Rodríguez y la Dra. Aracely García por ser mis primeros maestros en el mundo de la investigación, por todas sus enseñanzas y consejos en mis inicios en laboratorio.

A mis padres, Sra. Nohemí Covarrubias y Sr. Antonio de León, por brindarme todo su apoyo y amor en los momentos buenos y malos, por todos sus consejos, palabras y acciones que me permitieron seguir confiando en mí. Por siempre apoyarme en todos mis proyectos a pesar de no comprenderlos en todo. Por siempre mostrar interés y preocupación en mi persona. Por creer en mí. A mis hermanos Félix, Husain y Nyahomi De León Covarrubias, por darme momentos de apoyo y felicidad.

Y a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron en la realización de este trabajo y en la obtención de este grado,

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para realizar mis estudios de Maestría. Así mismo por el apoyo al proyecto registrado en la convocatoria **2020-1 apoyo para proyectos de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación en salud ante la contingencia por COVID-19** bajo el siguiente número de proyecto **313494**

RESUMEN

M.C.P. Ulises Edgardo De León Covarrubias

Fecha de titulación: Junio 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Generación de un sistema de trans-complementación de SARS-CoV-2

**Candidato para obtener el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en Morfología**

Número de páginas: 61

Área de estudio: Morfología

Propósito y método del estudio

En el presente trabajo tiene como finalidad la generación de virus replicativo-deficientes de SARS-CoV-2 por medio de un sistema de trans-complementación dependiente del gen estructural de la Nucleocápside. Debido a su alta capacidad infecciosa, su fácil propagación y su rápida capacidad de mutación, el manejo y estudio de SARS-CoV-2 se ha visto limitado a laboratorios de Bioseguridad nivel 3, lo que ha restringido su estudio en nuestro país. A la fecha se han generado dos sistemas de trans-complementación de SARS-CoV-2, uno dependiente del gen E y otro del gen N, donde utilizando DNAc con la delección del gen ya señalado, posteriormente fue transcrito *in vitro* a ARNm y electroporado a células permisivas; lograron generar partículas virales replicativo deficientes de este virus. Sin embargo, el proceso de transcripción *in vitro* y la electroporación son procesos limitativos en muchos laboratorios. En este trabajo hicimos uso de un genoma de SARS-CoV-2 delatado del gen N incorporado en un genoma bacteriano artificial (BAC), mismo que nos permitiría su manejo y transfección como un plásmido clásico, siendo más económico y de sencillo uso que un transcrito de ARN. Así mismo generamos líneas estables VERO E6 a la expresión de la proteína N de SARS-CoV-2, que nos permitieran el empaquetamiento de la partícula y el análisis de efecto citopático (CPE) debido a su permisividad a la infección viral. Por todo esto, en el presente proyecto se pretende generar partículas virales replicativo deficiente de SARS-CoV-2 haciendo uso de un genoma bacteriano artificial que contenga la secuencia viral junto a la delección del gen N, mismo que será transfectado en células permisivas que expresen la proteína de la Nucleocápside, lo que nos permita generar partículas defectivas de SARS-CoV-2

Conclusiones y contribuciones.

Se generó un vector plasmídico tipo BAC que contiene la secuencia de SARS-CoV-2 con una delección del gen N (SARS-CoV-2- Δ N)

Se generaron líneas estables HEK-293T y VERO E6 que expresan la Nucleoproteína de SARS-CoV-2

Se generó un agente infeccioso capaz de inducir efecto citopático por medio de la trans-complementación del vector SARS-CoV-2- Δ N con células VERO E6 que expresan Nucleoproteína de SARS-CoV-2

CONTENIDO TEMÁTICO

ANTECEDENTES	
COVID-19	1
CORONAVIRUS	2
SARS-CoV-2	2
CICLO VIRAL	6
BIOSEGURIDAD	8
SISTEMAS DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN	9
DESARROLLO DE LINEAS CELULARES PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS HETERÓLOGAS	12
ESTRATEGIAS PARA CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS/MODIFICADO	14
METODOS DE TRANSFECCIÓN	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES	22
LÍNEAS CELULARES	22
BACTERIAS	22
VIRUS	23
VECTORES DE CLONACIÓN	23
ANTICUERPOS	24
OLIGONUCLEÓTIDOS	25
REACTIVOS	26
SOLUCIONES	27
CONSUMIBLES	28
EQUIPO DE LABORATORIO	29
METODOLOGÍA	31
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BAC SARS-COV-2 ΔN-NLUC	31

CULTIVO CELULAR.....	31
CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR BAC SARS-COV-2 ΔN.....	31
DISEÑO Y GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES	
QUE EXPRESEN LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE DE SARS-COV-2.....	32
CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE DE SARS-COV-2.....	33
GENERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES.....	34
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA.....	35
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA	35
ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS POR LAS PARTÍCULAS VIRALES EN UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN.....	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
RESULTADOS.....	37
CROMOSOMA BACTERIANO ARTIFICIAL	
SARS-COV-2-ΔN-Nluc.....	37
CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR.....	38
GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES HEK-293T Y VERO E6 QUE EXPRESEN DE FORMA ESTABLE EL GEN ESTRUCTURAL N DE SARS-COV-2 (HEK-N/VERO-N).....	39
EFFECTO CITOPÁTICO IN VITRO INDUCIDO POR LAS PARTÍCULAS VIRALES PRODUCIDAS POR UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN.....	42
LAS PARTÍCULAS INFECTIVAS GENERADAS POR UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN SIGUEN GENERANDO EFECTO CITOPÁTICO POR LO MENOS DURANTE SEIS PASAJES.....	44
LA INFECCIÓN CON SOBRENADANTE NO PUEDE SER DETECTADA POR MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCENCIA.....	46
LOS SOBRENADANTES INFECTIVOS PROVOCAN ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN CÉLULAS ESTABLES A LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCAPSIDE.....	47
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grado Celsius
AA	Aminoácidos
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico recombinante
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BAC	Cromosoma Bacteriano Artificial
BSA	Albúmina de suero bovino
BSL	Sistema de Bioseguridad
cm^2	Centímetro cuadrado
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 19
CPE	Efecto Citopático
CTD	Dominio C terminal
ER	Retículo endoplásmico
FBS	Suero Fetal Bovino
g	Gramo
ICVT	Comité Internacional de Taxonomía Viral
INF	Interferón
ISG	Genes estimulados por interferón
KCl	Cloruro de Potasio

kB	kiloBase
kDa	kiloDalton
KH_2PO_4	Fosfato mono potásico
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Na_2PO_4	Fosfato de Sodio dibásico
NaCl	Cloruro de Sodio
NanoLuc	Nanoluciferasa
nm	Nanómetro
NTD	Dominio N terminal
RBD	Dominio de unión a receptor
SSA	Secretaria de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco Abierto de Lectura
pb	Pares de base
TMPRSS2	Serin Proteasa transmembrana 2
VLP	Partícula similar a virus
WT	Silvestre
YAC	Cromosoma Artificial de Levadura
μ l	Microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de SARS-CoV-2.	3
Figura 2. Estructura morfológica de SARS-CoV-2.....	4
Figura 3. Organización estructural de la proteína N.....	5
Figura 4. Ciclo viral de SARS-CoV-2.....	8
Figura 5. Sistema de trans-complementación.....	11
Figura 6. Estructura de un vector de clonación.....	13
Figura 7. Estrategias de clonación y generación de partículas virales	16
Figura 8. Métodos de transfección.....	18
Figura 9. BAC SARS-CoV-2-ΔN-NLuc.....	37
Figura 10. Caracterización del BAC SARS-CoV-2-ΔN-NLuc.....	38
Figura 11. Esquema de la composición del vector lentiviral... ..	39
Figura 12. Localización subcelular de la proteína de la Nucleocápside y su producción en tiempo.....	40
Figura 13. Expresión de la proteína de la Nucleocápside en líneas HEK-293T y VERO E6...41	
Figura 14. CPE en células VERO medido por sobrenadante de células transfectadas.....43	
Figura 15. Efecto citopático en HEK medido por sobrenadante de células transfectadas.....44	
Figura 16. Efecto citopático a través del tiempo en células VERO-N expuestas a sobrenadante SN BAC/N.....	45
Figura 17. Medición del reportero quimioluminescente en células infectadas con sobrenadante.....	47
Figura 18. Efecto citopático inducido por el sobrenadante BAC/N en células estables.. ..	49
Figura 19. Porcentaje de células vesiculadas tras exposición a los sobrenadantes.....	50

ANTECEDENTES

COVID-19

A finales del 2019, en la provincia de Wuhan, China, surgieron casos de neumonía de origen desconocido asociados a la asistencia a un mercado de comidas provenientes de especies exóticas(1,2). Tras la secuenciación masiva de lavados bronquioalveolares provenientes de pacientes con esta enfermedad desconocida, se encontró el agente causal, un nuevo coronavirus que posteriormente se nombró por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICVT) como SARS-CoV-2(3). Bastaron cuatro meses del primer caso reportado para que la enfermedad denominada COVID-19 (Coronavirus disease 2019) se extendiera por todo el mundo y que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara oficial la pandemia. COVID-19 es una enfermedad caracterizada por síntomas típicos como fiebre, tos, astenia, adinamia, mialgias, artralgias, entre otros síntomas menores; sin embargo, en casos severos se puede llegar a presentar dificultad respiratoria, tormenta de citocinas y falla renal aguda, lo que propicia a la muerte(4-6).

De acuerdo con cifras de la OMS, a la fecha existen 524 millones de casos de COVID-19 reportados en el mundo, con 6.2 millones de fallecidos por esta enfermedad (Mayo, 2022). La Secretaría de Salud de México (SSA) reporta al día 6 millones de casos estimados de COVID-19 en la población, con una tasa estimada de defunciones de 338 mil y una tasa de mortalidad cercana al 10% en nuestro país, siendo una de las cifras de mortalidad más altas en el mundo.

CORONAVIRUS

Los *Orthocoronavirinae* o coronavirus, son una subfamilia de la familia *Coronaviridae* cuyos integrantes son virus de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario positivo de 26 a 32 kilobases (kB), siendo los más grandes dentro de los virus de ARN, envueltos de un tamaño que puede variar de los 50 a los 200 nanómetros (nm). (7,8) Los coronavirus tienen como huéspedes naturales a las aves y mamíferos, donde pueden causar enfermedades respiratorias y digestivas que pueden ser leves o inclusive graves. Hasta la fecha se han descrito treinta y nueve especies de coronavirus, mismas que han sido divididas en los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*.

SARS-CoV-2

El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo o SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) fue descubierto como el causante de la enfermedad COVID-19 tras la secuenciación de los primeros casos positivos. Pertenece al género de los *Betacoronavirus* y se detectó por primera vez en noviembre del 2019. Igual a otros virus de la misma familia, su material genético es de ARN monocatenario de sentido positivo y sus viriones van de 50 a 200 nm de diámetro. Tiene un ARN de aproximadamente 30 kb que codifica 4 proteínas estructurales y varias proteínas no estructurales contenidas en marcos abiertos de lecturas u ORF (Open Reading Frame) (**Figura 1**) (9,10).

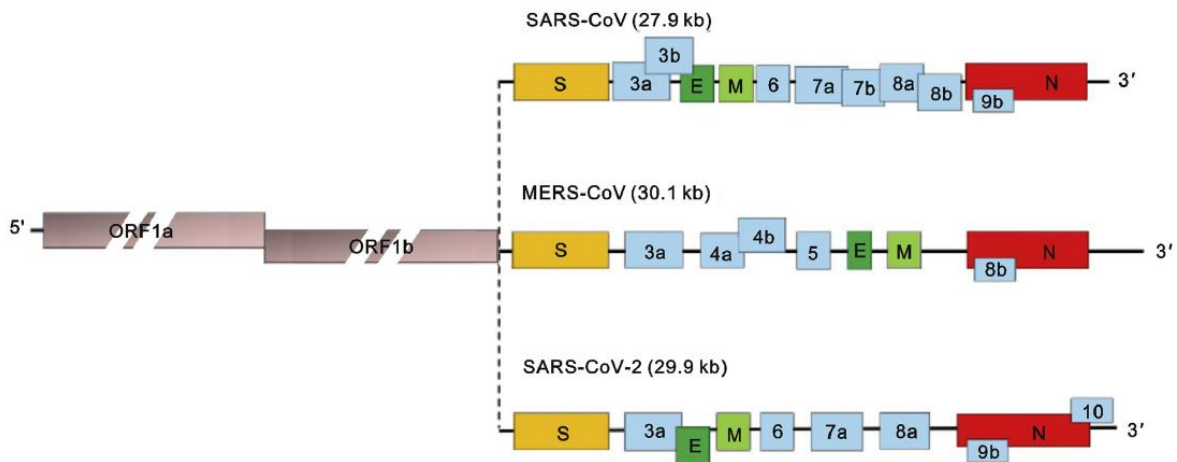


Figura 1. Genoma de SARS-CoV-2. Similar a otros coronavirus, SARS-CoV-2 tiene un genoma de aproximadamente 30 kb, dos tercios de su genoma codifican proteínas no estructurales (nsp) por medio de ORF1a y ORF1b, mientras que en el tercio 3' se localizan las regiones codificantes para proteínas estructurales y accesorias(11).

Las proteínas estructurales de este virus consisten en la proteína de la Espiga o *Spike* (*S*) que permite la interacción del virión con las células del hospedero gracias a su acoplamiento con la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2). Así mismo cuenta con la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N), siendo esta última la que permite el empaquetamiento del material genético viral con el virión en formación(12) (**Figura 2**).

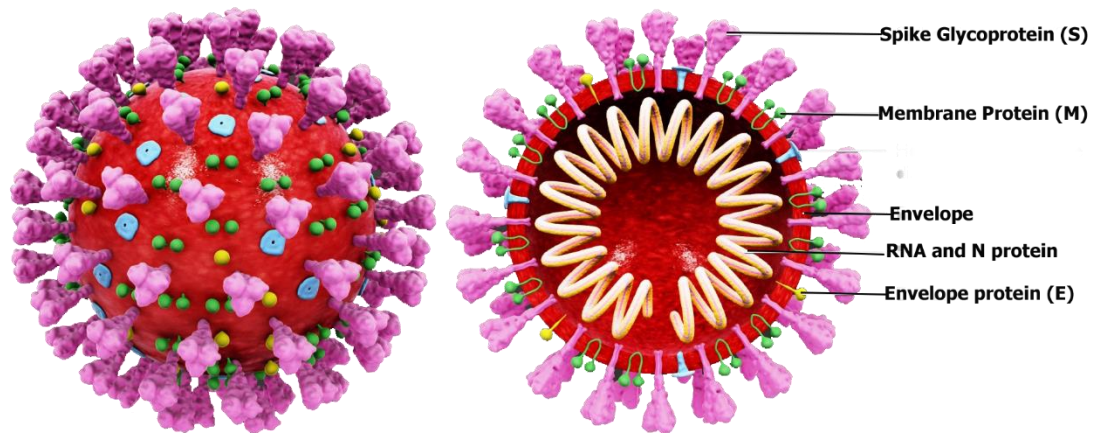


Figura 2. Estructura morfológica de SARS-CoV-2. Se trata de un virus envuelto que cuenta con tres proteínas transmembrana, la proteína S permite su interacción con el receptor en el hospedero(2).

La proteína N es una de las proteínas más abundantes en el virus, donde varias copias de este péptido interactúan con las moléculas de ARN durante el ciclo de replicación viral. La proteína N tiene un peso molecular que va de los 45 a los 60 kilodaltones (kDa)(13), mismo que puede variar por modificaciones postraduccionales; tiene como característica la presencia de abundantes aminoácidos (AA) básicos del tipo arginina y lisina que permiten su interacción con el ARN(14).

Estudios en SARS-CoV-2 y otros coronavirus han demostrado que la proteína N se encuentra conformada por una región altamente desordenada (IDR), un dominio N terminal (NTD), una región de unión (LKR), un dominio C terminal (CTD), una señal de localización nuclear (NLS) y una IDR terminal (**Figura 3**). (15) De acuerdo con estudios bioquímicos, son las regiones NTD y CTD de la proteína las que permiten la interacción del ARN viral, siendo

también la región CTD la que interacciona con la proteína M para el empaquetamiento del genoma con la cápside; esto para su posterior liberación y propagación (15,16).

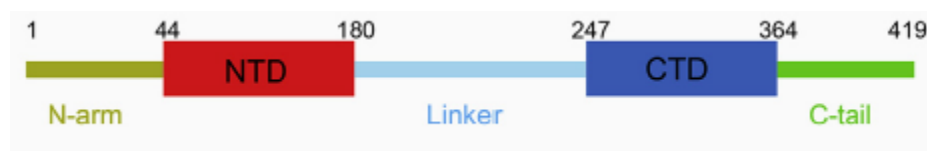


Figura 3. Organización estructural de la proteína N. Se destacan los dominios N terminal (NTD) y C terminal (CTD) que permiten la interacción con el genoma viral y la proteína M, respectivamente(14).

Además de su función estructural, se han descrito otras funciones de la proteína N que permiten perpetuar la replicación viral. Una de ellas es su capacidad de antagonizar las respuestas del tipo interferón (IFN)(17). Los interferones, principalmente I y III, median las respuestas antivirales innatas que permiten contener o eliminar la replicación de virus dentro de las células; esto tras la activación del promotor de genes de respuesta a interferón (ISG)(18,19). Se ha visto una respuesta disminuida de los efectos de los IFN en los pacientes de COVID19, esto llevó al descubrimiento de la capacidad de la proteína N y su capacidad antagonista al interferón. Se observó que esta proteína disminuye la fosforilación de proteínas clave en la activación de los ISG, lo que lleva a una menor respuesta antivírica en el hospedero y una replicación viral prolongada.

CICLO VIRAL

El genoma de SARS-CoV-2 se encuentra conformado por 10 ORF'S. Del extremo 5' al 3', se encuentran en orden ORF1a y ORF1b que abarcan casi dos tercios del genoma total. Posteriormente continua con la secuencia codificante a la proteína S, proteína E, proteína M y proteína N; encontrándose entre ellas ORF's extra de proteínas accesorias. Su genoma comparte hasta un 77% de similitud al código genético descrito para SARS-CoV, teniendo una mayor similitud con el genoma del coronavirus de murciélago RaTG13(20).

SARS-CoV-2, igual a SARS-CoV, tiene tropismo hacia al receptor ACE2 esto por medio de la proteína S que cuenta con un dominio de unión a receptor (RBD) en su porción S1. Posterior a su unión al receptor, la escisión enzimática de la porción S2 por parte de la serin proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) permite la entrada del virión a la célula por medio de una endocitosis mediada por receptor (10,11). Posterior a su endocitosis, existe una fusión de la membrana del endosoma a la envoltura del virus, lo que permite la salida del material genético viral al citoplasma.

Una vez que el ARN viral se encuentra en el citosol, se inicia la traducción utilizando los ribosomas del hospedero. La traducción inicia con ORF1a y ORF1b donde se producen hasta 16 proteínas no estructurales (nsp) en dos polipéptidos grandes que sufren una autoescisión enzimática por medio de proteasas producidas por el mismo virus y contenidas en estas regiones codificadas(21,22). La síntesis de estas proteínas no estructurales permite la formación del complejo replicasa-transcriptasa (RTC) que forma un ambiente favorable para la síntesis de ARN, lo que lleva a la replicación y transcripción del ARN para su posterior traducción y formación de nuevos viriones.

El RTC forma ARN genómicos y subgenómicos, estos últimos sirviendo como ARN's mensajeros (ARNm) para la producción de las proteínas estructurales y accesorias del extremo 3'. Posterior a la formación de ARN's genómicos y subgenómicos, se inicia la síntesis de las proteínas estructurales S, E y M las cuales son translocadas al retículo endoplásmico (RE) para seguir la vía del retículo endoplásmico- compartimiento intermedio de Golgi (ERGIC); es en esta región donde los genomas virales formados previamente interaccionan con las proteínas estructurales, esto gracias a la interacción de ambas estructuras dadas por la proteína N(10,20).

La interacción del genoma viral y de las proteínas virales viene dado por la proteína N, donde su región NDT se une a los ARN virales por interacción iónica y su región CTD que es afín a la región N terminal de la proteína M. Una vez que los viriones se encuentran formados, estos son transportados a la superficie celular y liberados en vesículas por medio del mecanismo de la exocitosis, donde pueden continuar con ciclos de infecciones en células cercanas (**Figura 4**) (21).

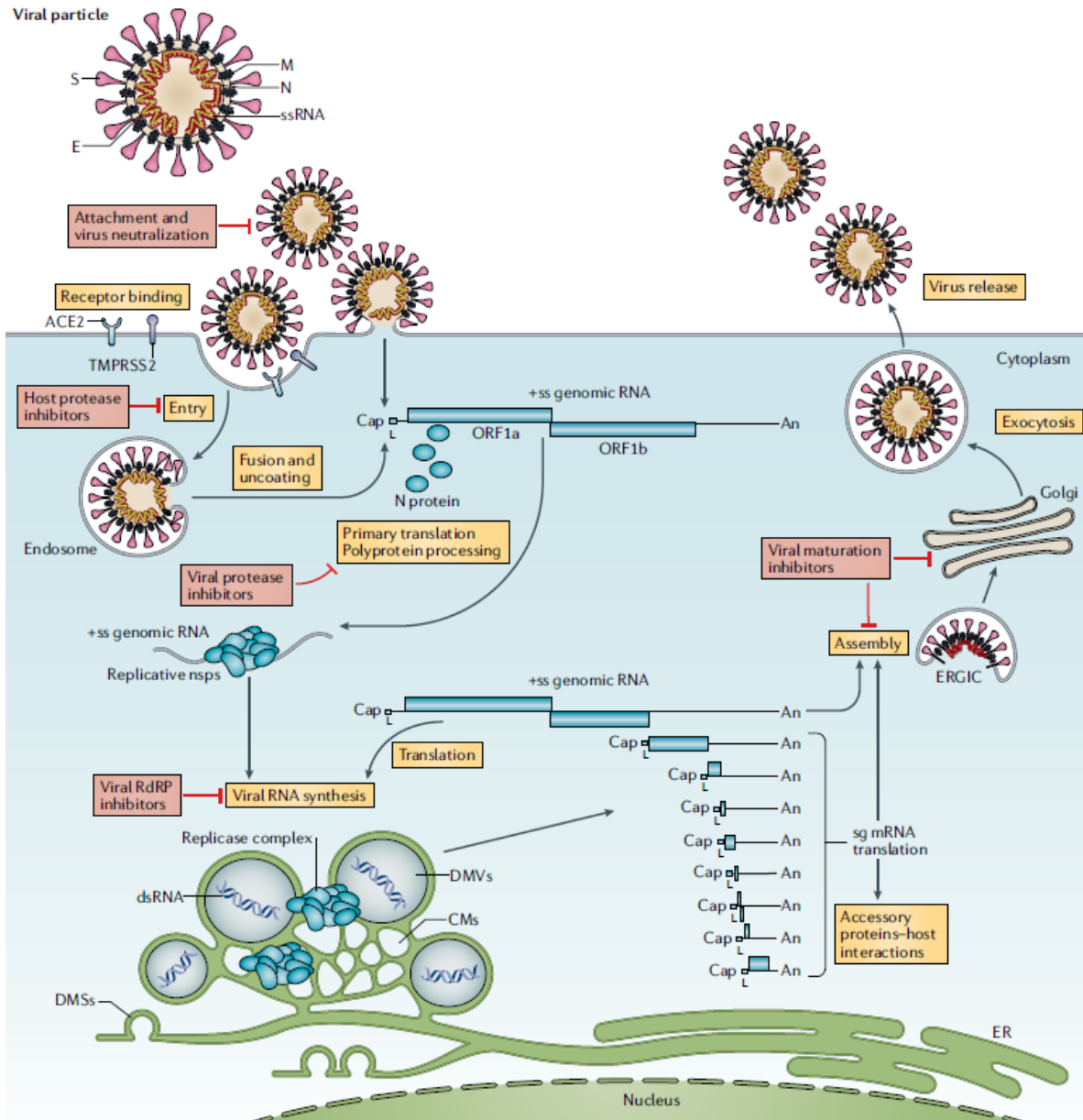


Figura 4. Ciclo viral de SARS-CoV-2. Representación esquemática del ciclo viral descrito para SARS-CoV-2(21).

BIOSEGURIDAD.

Para el estudio de microorganismos patógenos, diferentes países y sociedades han desarrollado guías y estándares necesarias que rigen la protección personal y del laboratorio para el manejo de estos microorganismos(23). En general, los patógenos se dividen en cuatro

grupos de riesgo basados en su patogenicidad, su método y facilidad de transmisión, su rango de hospedadores y la existencia de medidas preventivas y de tratamiento(24). Los grupos de riesgo de un organismo se categorizan de forma ascendente en niveles de bioseguridad (BSL) del 1 al 4.

Debido a su patogenicidad, su método de propagación y a la carencia de tratamientos adecuados para su contención, SARS-CoV-2 se ha clasificado como un organismo de manejo en BSL nivel3(25,26); similar a lo establecido para SARS-CoV y MERS-CoV. A causa de esta clasificación, el estudio de este patógeno se ha visto limitado en países en vías de desarrollo que cuentan con limitados laboratorios que cumplan con los estándares de BSL-3, lo que restringe en número de investigaciones que se pueden realizar y que ha obligado a la búsqueda de estrategias que permitan disminuir su peligrosidad. Todo esto en aras de estudiar a más profundidad su ciclo de replicación, el desarrollo de antivirales que disminuyan el riesgo y la mortalidad de COVID-19 y el desarrollo de vacunas que prevengan el desarrollo de la enfermedad.

SISTEMAS DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN

La necesidad de estudiar el ciclo de SARS-CoV-2 y la búsqueda de nuevos tratamientos ha llevado a la generación de distintas estrategias que disminuyan la peligrosidad de contagio que propicia el manejo de este microorganismo, y que por ende disminuya el nivel de bioseguridad necesario. Entre las estrategias surgidas han salido a flote la utilización de pseudovirus que porten proteínas estructurales de SARS-CoV-2 (27–29), el uso de mRNA o ADN complementario (ADNc) en forma parcial o completa(30) y los sistemas de trans-complementación.

La complementación es un mecanismo genético natural que permite el rescate de genomas defectivos o mutantes al utilizar regiones génicas o proteicas que suplan las funciones de aquellas que han sufrido algún daño; esto permitiendo la generación de organismos funcionales(31,32). Este tipo de fenómeno se puede replicar *in vitro* en cultivos virales y bacterianos, proceso que se denomina trans-complementación. Convencionalmente en virus, los sistemas de trans-complementación utilizan genomas defectivos que codifica todas las proteínas virales salvo algunas que son esenciales para la formación de una partícula viral viable, esto es, se elimina o trunca los genes para eliminar la funcionalidad de las proteínas objetivo. Este genoma defectivo se puede rescatar utilizando una copia nativa (wt, del inglés “wild type”) de la(s) proteína(s) faltante(s) suplementada de forma exógena o por medio de la expresión transitoria o permanente de la misma en una célula, nombrada célula permisiva. La interacción de las proteínas producidas por el genoma viral defectuoso con la proteína wt suplementada permite la formación de la partícula viral completa, sin embargo, la mutación o delección de ese genoma se mantiene durante el proceso de replicación viral. Por lo tanto, la progenie viral presenta el mismo genoma defectuoso limitando las posteriores rondas de replicación en células no permisivas, es decir aquellas que no producen la proteína faltante (**Figura 5**) (33).

El uso de sistemas de trans-complementación permite la generación de partículas similares a virus (VLP, virus-like particles)(33). Las VLP son moléculas que se asemejan a los virus, mas no son infecciosas PROPAGACIÓN? al carecer de genoma o al contener mutaciones en este que impiden la formación de la partícula vírica. El uso de estos permite el estudio de patógenos de alta infectividad que pertenecen a BSL3, esta estrategia se ha utilizado con

virus como Zika(31), Chikungunya(34), Citomegalovirus(35), Cocksakie(32), Influenza(36), SARS-CoV, MERS-CoV(37), entre otros virus clasificados de manejo en BSL-3.

Es debido a los sistemas de trans-complementación, que la generación de VLP's de SARS-CoV-2 es tan ventajosa y puede permitir el estudio de este virus en laboratorios BSL-2.

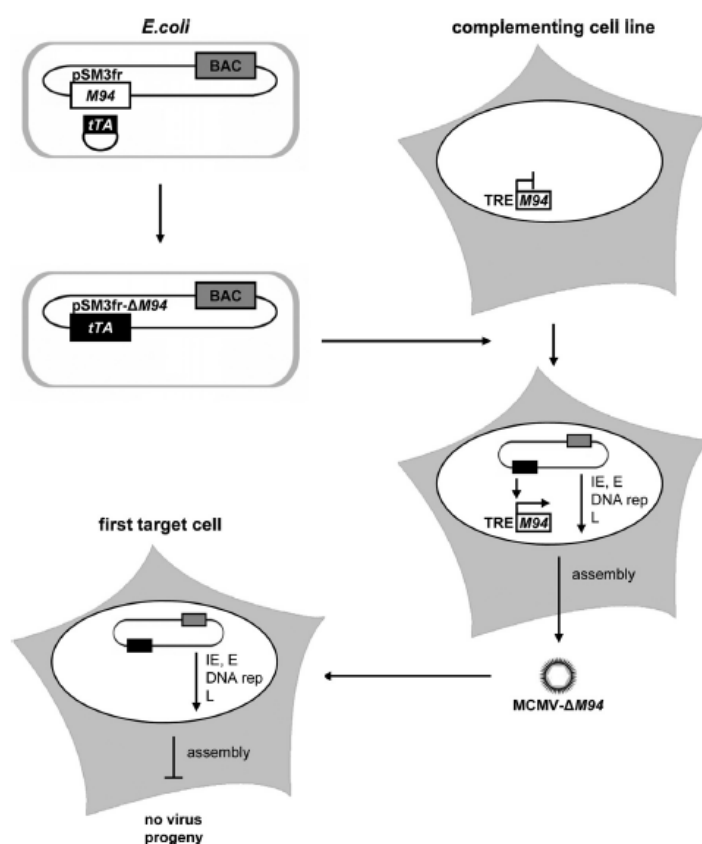


Figura 5. Sistema de trans-complementación. El uso de un vector genético como un BAC o un plásmido que contenga la secuencia de un virus con una mutación en una de sus proteínas junto a una célula permisiva o complementaria que contenga la proteína WT permite la generación de VLP's. Sin embargo, al utilizar estas VLP's en una célula no permisiva, no se generará progenie viral al carecer de la proteína necesaria para la formación del virión(35).

DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Los sistemas de expresión de proteínas consisten en estrategias que permiten generar proteínas tanto propias de un organismo o célula (homóloga), tanto como proteínas que no se producen de forma normal en esa célula (heteróloga) o que pertenecen a otra estirpe celular o inclusive a otro reino. Este tipo de sistemas aprovechan el uso de ADN recombinante (ADNr) para introducir las secuencias de estas proteínas por medio de acarreadores que permite el ingreso de este ADN sintético a la célula para su posterior traducción y generación de la proteína de interés(38). Para la expresión de proteínas heterólogas se han utilizado bacterias, hongos, células de mamífero, células de insectos, algas, modelos animales, entre otros; cada uno con sus respectivas limitaciones en cuanto a la expresión correcta de la proteína, la versatilidad en su manejo y el costo de mantenimiento(39).

Transfección, se refiere al procedimiento de introducir ADN extraño dentro de una célula para producir células modificadas genéticamente. La transfección puede ser estable, cuando el ADN se integra al genoma permitiendo la expresión permanente en la progenie de esa célula, o transitoria cuando solo se expresan por un periodo de tiempo limitado al no integrarse al genoma y perderse en las consiguientes divisiones celulares(40,41).

La transfección de ácidos nucleicos se puede realizar por medio de vectores de clonación que carguen en su secuencia el código codificante para la proteína de interés junto a secuencias complementarias que permitan su correcta expresión. Los vectores de clonación que se pueden utilizar consisten en plásmidos, vectores virales, cósmidos y cromosomas artificiales; siendo los primeros los mayormente utilizados. Las características típicas de un vector de clonación consisten en un origen de replicación, un promotor, un sitio de multiclonaje, donde

se coloca la secuencia de interés, y un marcador de selección para aislar a las células que obtuvieron el vector de clonación (**Figura 6**)(42).

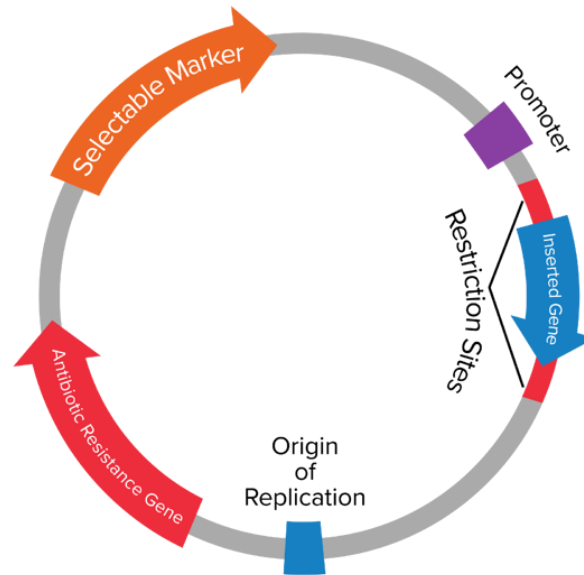


Figura 6. Estructura de un vector de clonación. Se pueden observar las cuatro características básicas del vector: (1) origen de replicación , (2) marcador de selección, (3) promotor y (4) sitio de multiclonaje(43).

Los vectores de clonación mayormente utilizados son los plásmidos y los vectores virales. Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extra cromosómico que son capaces de replicarse utilizando la maquinaria celular; la ventaja en el uso de este tipo de vectores recae en su rápida replicación en bacterias y su sencilla edición en laboratorio, sin embargo su transfección eficiente requiere el uso de métodos físicos o químicos para permitir su entrada a la célula, de igual manera la transfección obtenida es normalmente transitoria(44).

Los vectores virales consisten en virus genéticamente modificados para acarrear una secuencia de interés para su posterior traducción y carentes de su capacidad infectiva. Entre sus ventajas están la generación de transfecciones estables y el no necesitar de agentes de transfección, sin embargo, su limitante más importante es el tamaño del gen que pueden portar, mismo que está relacionado con la longitud del propio genoma viral. Entre los vectores virales se encuentran los adenovirus y adeno-asociados, que permiten transfecciones transitorias, y los retrovirus/lentivirus que permiten transfecciones estables(45,46).

ESTRATEGIAS PARA CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS/MODIFICADOS

Debido al tamaño de los genomas de ciertos virus, el uso clásico de vectores del tipo plasmídico y viral se ha visto limitado al no ser capaces de contener la secuencia viral completa. Para sopesar esta limitante, se han desarrollado sistemas que permiten la contención de secuencias largas de nucleótidos lo suficientemente extensas para contener la secuencia completa de un virus de genoma largo. Entre estas estrategias se encuentra el uso de cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC, Bacterial Artificial Chromosome), cromosomas artificiales de levadura (YAC, Yeast Artificial Chromosome), el uso de ADNcc por medio de ligación *in vitro* y el uso de ARNm completos(47).

Los BAC son constructos de ADN basados en el plásmido F de *Escherichia coli* capaces de contener insertos de 150 a 350 kb, lo que permite el manejo y estudio de secuencias completas de virus o productos génicos grandes(48,49). Existen antecedentes del uso de BAC en el empaquetamiento y generación de distintos coronavirus utilizando el esqueleto de pBeloBAC11, donde el ADNc completo se encuentra bajo el control del promotor temprano

del citomegalovirus (CMV) en su extremo 5' y flanqueado en el extremo 3' por una secuencia de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH, Bovine Growth Hormone)(50). Estas modificaciones permiten la generación de virus infectivos al contar con su capuchón de metilguanósina en 5' y cola de poliadenina en 3'. Entre las ventajas del uso de BAC se encuentra una alta estabilidad, su capacidad ilimitada de producción de clones de ADNc y su alta eficiencia de transfección en células de mamífero(48).

El uso de ADNc por medio de ligación *in vitro* consiste en el ensamblaje de un ADNc completo. Esto es realizado por medio de un panel de fragmentos de ADNc que codifican el genoma viral entero y que son flanqueados por sitios de restricción, ya sean nativos o generados, que permitan el ensamblaje sistémico y preciso de un ADNc completo por medio de una ligación *in vitro*(51). Esta estrategia se ha utilizado para la generación de ADNc de SARS-CoV y MERS-CoV, esto haciendo uso de fragmentos de ADNc generados por RT-PCR e introduciendo sitios de restricción de BglI en los extremos 5' y 3' que permitieran su ligación para la formación de un ADNc completo de ambos virus(52,53).

Además del uso de ADNc, otra estrategia que ha surgido es el uso de mRNA desnudo o por medio de agentes de transfección para la generación de partículas virales. Este mRNA se genera a partir de ADNc y su transcripción es realizada *in vitro*, para posteriormente realizar la transfección en la célula u organismo de interés(54,55). El uso de ARN como agente de transfección tiene como ventajas el no necesitar ingresar al núcleo para ser expresado, su incapacidad de integrarse al genoma y su sencilla transfección; sin embargo cuenta con el inconveniente de que su vida media es corta al ser fácilmente degradado por ribonucleasas extra e intracelulares (**Figura 7**) (56).

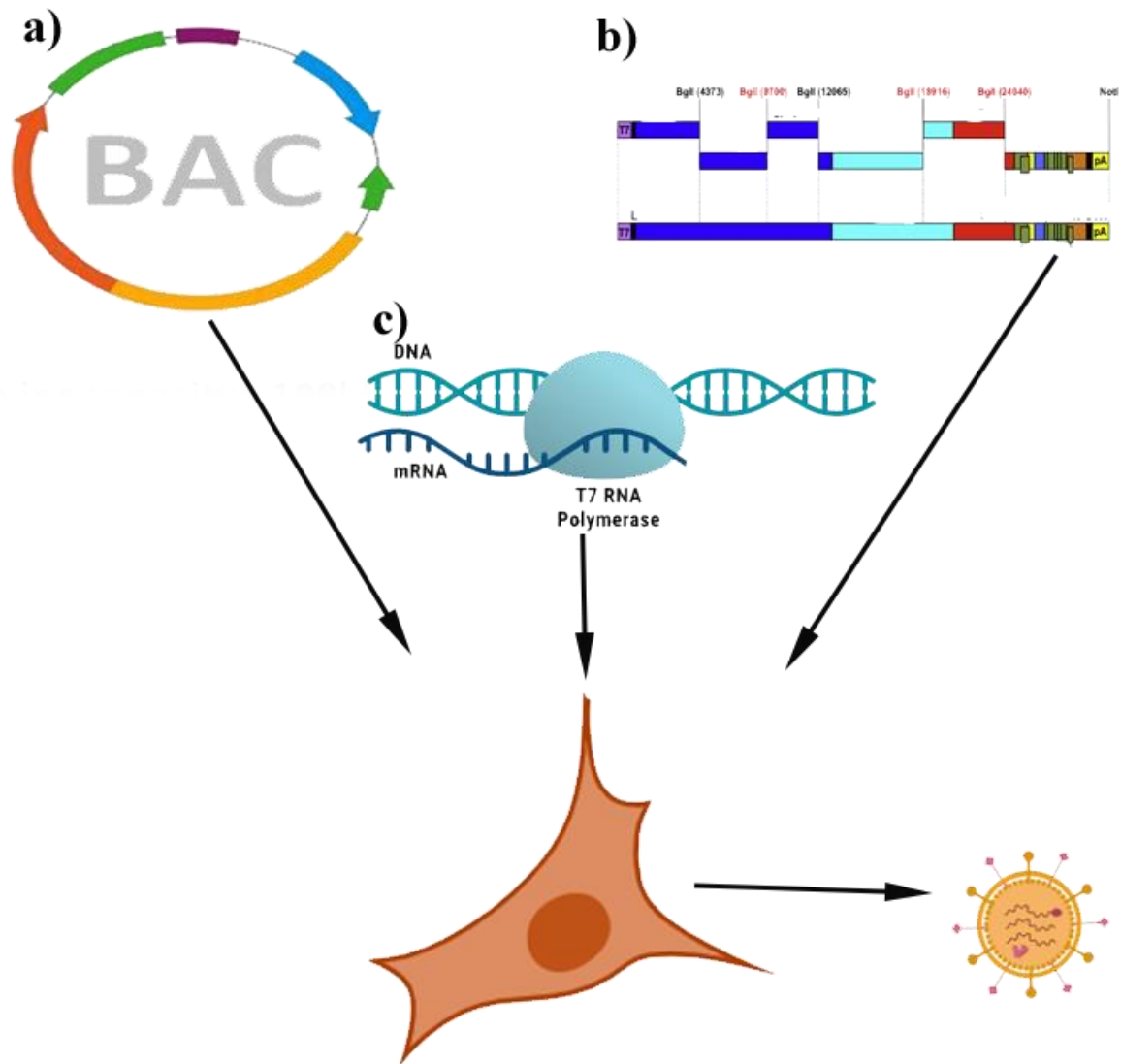


Figura 7. Estrategias de clonación y generación de partículas virales. El uso de vectores del tipo (a) BAC, (b) cDNA generado por ligación *in vitro*, y de (c) mRNA permiten sopesar la limitante de tamaño que existe con otros vectores de transfección.

MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

Los métodos de transfección más utilizados en la investigación clínica son las transfecciones virales, también conocido como transducción. Se trata de transfecciones de alta eficiencia y de sencillo manejo, además de contar con la ventaja de realizar transfecciones estables al utilizar retrovirus. Sin embargo, cuenta con desventajas como la inmunogenicidad y el efecto citotóxico del vector viral, además del tamaño limitado del gen a introducir(40,57).

Los métodos químicos son los mayormente utilizados en la investigación contemporánea y los primeros en ser utilizados para la transfección de líneas de mamífero. Entre los métodos químicos se encuentran el uso de polímeros catiónicos, de fosfato de calcio, lípidos y aminoácidos catiónicos(58); el principio de estos reactivos consiste en la formación de complejos con el ácido nucleico por la diferencia de carga, positivo para el agente de transfección y negativo para el ácido nucleico. El complejo reactivo-ácido nucleico cuenta con una carga positiva, misma que le permite interactuar con la membrana plasmática de carga negativa; empero, se desconoce el mecanismo exacto por el cual el complejo se introduce en la célula, se considera que la endocitosis y la fagocitosis están involucradas(59).

La eficiencia de los métodos químicos es dependiente de varios factores como el radio de los complejos reactivo-ácido nucleico, el pH y las condiciones de la membrana plasmática; esto puede resultar en bajas eficiencias de transfección. Sin embargo, a comparación con las transfecciones virales, estos métodos presentan baja citotoxicidad, carecen de efecto mutagénico y no tienen limitante de tamaño del ácido nucleico(40).

Los métodos físicos son los más recientes y diversos, entre ellos se encuentran la microinyección, la biobalística, la transfección por láser, la sonoporación y la

electroporación(60). De todos estos, la electroporación es el método físico más utilizado, no se conoce su fundamento exacto, sin embargo, se hipotetiza que el pulso eléctrico causa disrupción en la membrana en forma de poros que permite el paso de los ácidos nucleicos. Sus ventajas recaen en su capacidad de transfectar un alto número de células en un corto periodo de tiempo, mas primero es necesario encontrar las condiciones óptimas de electroporación (**Figura 8**) (59,61).

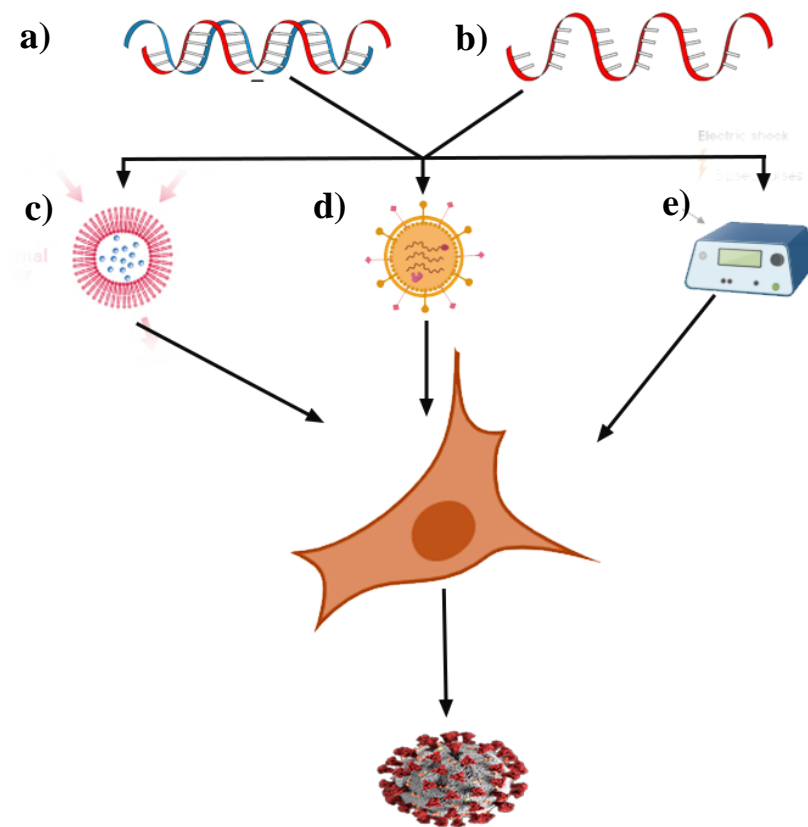


Figura 8. Métodos de transfección. El uso de (a) ADN o (b)ARN se ve facilitada haciendo uso de métodos de transfección que facilitan su entrada a la célula. Entre los métodos de transfección se encuentran (c) los químicos, (d) los virales y (e) los físicos.

JUSTIFICACIÓN

SARS-CoV-2 ha tenido una gran propagación a nivel mundial debido a su adaptación para la transmisión en humanos y a las mutaciones que aumentan su afinidad al receptor. Debido a su método de transmisión, el manejo y estudio de este virus solamente puede ser llevado a cabo en laboratorios de Bioseguridad nivel 3, lo que restringe su estudio en la mayoría de los laboratorios existentes al país por su costosa infraestructura y su poca existencia.

Debido a esto, resulta imperante desarrollar estrategias que permitan el estudio seguro del SARS-CoV-2 en la mayoría de los laboratorios del país, mismos que facilitarían el manejo para el desarrollo de vacunas y el estudio potencial de medicamentos contra COVID-19.

Por ello, en el presente proyecto se propone realizar un sistema de trans-complementación *in vitro* empleando el genoma del SARS-CoV-2. Que implica la generación de una delección en un gen esencial que impida la formación de partículas virales y por ende la propagación viral, estrategia que permitirá el estudio en condiciones *in vitro* en laboratorios de bioseguridad nivel 2.

HIPÓTESIS

Se pueden generar partículas virales de SARS-Cov-2 por medio de un sistema de trans-complementación dependiente del gen estructural N utilizando un vector plasmídico.

OBJETIVO GENERAL

Generar un sistema de trans-complementación de SARS-CoV-2 dependiente del gen estructural N.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un ADNc de SARS-CoV-2 con la delección del gen estructural N y la inserción del gen de NanoLuc (SARS-CoV-2 Δ N)
2. Generar líneas estables HEK-293T y VERO E6 que expresen el gen estructural N del SARS-CoV-2 (HEK-N/VERO-N)
3. Determinar la presencia de partículas virales con actividad citolítica y expresión de NanoLuciferasa
4. Analizar las alteraciones morfológicas inducidas por las partículas virales en un sistema de trans-complementación

MATERIAL Y EQUIPO

LÍNEAS CELULARES

- HEK-293T (CRL-3216, ATCC), células embrionarias de riñón humano.
- HEK-N, línea estable derivada de HEK-293T que expresa la proteína humana TMPRSS2 y la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2.
- HEK-293T hACE2-hTMPRSS2 (HEK 2G) (CL0015, Vector Builder), subclona de HEK-293 que expresa de forma constitutiva las proteínas humanas ACE2 y TMPRSS2.
- HEK-293T hACE2-hTMPRSS2- SARS-CoV-2-Nucleocapsid (HEK-3G), subclona de HEK-293T que expresa de forma constitutiva las proteínas humanas ACE2 y TMPRSS2, además de la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2.
- VERO E6 CoronaGrow (CL0001, Vector Builder), subclona de VERO E6 derivadas de riñón del mono verde americano.
- VERO-N, línea estable derivada de VERO-E6 que expresa la proteína humana TMPRSS2 y la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2, esto derivado de la transducción con lentivirus SARS-CoV-2-N-hTMPRSS2 y seleccionada con Puromicina.

BACTERIAS

- *Escherichia coli* de la cepa DH5 α , bacterias utilizadas para la clonación de los plásmidos de interés.

VIRUS

- Lentivirus de la familia de los retrovirus, contienen las secuencias codificantes del gen TMPRSS2 humano y de la Nucleocápside de SARS-CoV-2 (Vector Builder).

VECTORES DE CLONACIÓN

Tabla 1. Vectores de clonación utilizados para la expresión de las proteínas de interés.

Nomenclatura	Significado
SARS-CoV-2-ΔN-NLuc	BAC que porta la secuencia completa de SARS-CoV-2 que incluye la delección del gen de la Nucleocápside, y la inserción del gen NanoLuc
SARS-CoV-2-N	Plásmido que porta la secuencia codificante de la Nucleocápside.
Lentivirus- SARS-CoV-2-N-hTMPRSS2	Lentivirus que porta la secuencia completa del gen de la Nucleocápside de SARS-CoV-2 junto a la secuencia codificante de la proteína humana TMPRSS2. Así mismo cuenta con el gen de resistencia para el antibiótico de selección Puromicina.

ANTICUERPOS

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el análisis de las proteínas de interés.

Anticuerpo	Compañía	#Catálogo	Dilución
Anti-N policlonal de conejo IgG	Thermo Fisher Scientific Inc	MA5-36268	Western Blot: 1:1000 Inmunofluorescencia: 1:250
Anti-S policlonal de conejo IgG	Thermo Fisher Scientific Inc	MA5-36247	Western Blot: 1:1000 Inmunofluorescencia: 1:250
Anti α enolasa monoclonal de ratón IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc	SC-100812	Western Blot: 1:2000
Anti-mouse IgG HRP	Thermo Fisher Scientific Inc	31460	Western Blot: 1:5000
Anti-mouse Alexa 488 IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific Inc	A32731	Inmunofluorescencia: 1:250

Oligonucleótidos

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las secuencias de interés.

Primer	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
ORF8- ORF10	CCCATTCAGTACATCGATATC GG	TCTACTTGTGCTATGTAGTTACG AG
NLuc	CTGGACCAAGTCCTTGAACAG G	CACTCCGTTGATGGTTACTCGG
Nucleocápsid e Externa	GCTCTCACTCAACATGGCAAG G	TTGTTCTGGACCACGTCTGCCG
Nucleocápsid e Interna	GACGAATTCGTGGTGGTGACG G	CTCTCAAGCTGGTTCAATCTGTC

CULTIVO BACTERIANO

- Medio LB Broth Miller (USBio)
- Glicerol (Sigma-Aldrich)
- Ampicilina
- Cloranfenicol

CULTIVO CELULAR

- Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)
- Medio Avanzado Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM Advanced)
- Glutamina:GlutaMAX
- Piruvato
- Antibiotico-Antimicótico: Penicilina-Streptomina

REACTIVOS

- Plasmid Midi kit (100) (QIAGEN ® Venlo, Limburgo, Paises Bajos)
- TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent (Fermientas Inc, USA)
- Targefect-BAC (Targeting Systems, El Cajon, USA)
- Virofect (Targeting Systems, El Cajon, USA)
- Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega)
- GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific)
- MagMAX™ Viran RNA Isolation Kit
- MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline)
- Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR with dsDNase (Thermo Fisher Scientific)
- Sybr Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- GelRed Nucleic Acid 10,000 X (Biotium)
- Coctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Halt Thermo Fisher Scientific)
- 4',6-Diamidino-2-Fenilindol DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific)
- Acrilamida/Bis-Acrilamida 30% (A3699, Sigma-Aldrich)
- Agua bidestilada (Laboratorios Monterrey)
- Azul de tripano (15250061, Gibco)
- BSA (B90015, NEB)
- Buffer de carga para proteínas 4X (Gibco)
- Cloruro de Sodio, NaCl (746398, Sigma-Aldrich)
- Ditiotreitól, DTT (3483-12-3, Sigma-Aldrich)
- DMSO “Dimetilsulfóxido” (D8418, Sigma-Aldrich)

- Dodecilsulfato sódico, SDS (9602L, Probiotek)
- Etanol (CTR)
- Isopropanol (9095, JT. Baker)
- Leche descremada (Svelty)
- Metanol 100% (M6125, Jalmek)
- Persulfato de amonio (A3678, Sigma-Aldrich)
- Supersignal West Pico (34080, Thermo Fisher Scientific)
- Tetrametiletilendiamina, TEMED (T7024, Sigma-Aldrich)
- Tripsina (9002-07-7, Gibco)
- Tris-base (93352, Sigma-Aldrich)
- Tris-HCl pH 6.8, 0.5 M (210001627, Bio-Rad)
- Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M (2014-06, Gibco)
- Tween-20 (91379, Sigma-Aldrich)

SOLUCIONES

- Buffer de carga para proteínas 1X: 600 μ L del buffer de carga 4X, 400 μ l de DTT, 1 μ L de PMSF y 10 μ l del inhibidor de proteasas
- Buffer de carga para ADN 6X (New England BioLabs)
- Buffer de corrida 10x: 30 g de Tris-Base, 144 g de glicina, 10 g de SDS y aforar en 1 L de agua bidestilada
- Buffer de corrida 1X: 100 mL del buffer de corrida 10X y 900 mL de agua bidestilada
- Buffer de lisis: 500 μ L de ProteoJet, 1 μ L de PMSF y 5 μ L de inhibidor de proteasas

- Buffer de transferencia: 6.05 g Tris-Base, 28.7 g de glicina, 1 mL de SDS 10%, 200 mL de metanol 100% y aforar en 1 L de agua bidestilada
- Buffer TBS 10X: 308 g de NaCl, 43.35 g de Tris-Base y aforar en 3 L de agua bidestilada
- Buffer TBST 1X: 100 mL de TBS 1X, 900 mL de agua bidestilada y 500 μ L de Tween-20
- Ditioneitol (DTT): 75 mg de DTT y 500 μ L de agua bidestilada
- Dodecilsulfato sódico 10% (SDS): 10 g de SDS Y 100 mL de agua bidestilada
- Leche descremada 10%: 3 g de leche descremada y 30 mL de TBST
- PBS 10X: 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 4.4 g de Na₂HPO₄, 2.4 g de KH₂PO₄ y
- aforar en 1 L de agua bidestilada a un pH 7.4
- PBS 1X: 100 mL de PBS 10X y 900 mL de agua bidestilada
- Persulfato de amonio 10%: 50 mg de persulfato de amonio y 500 μ L de agua bidestilada

CONSUMIBLES

- Cajas de cultivo celular de 75 y 25
- Criotubos de 2 ml (Corning)
- Matraces de 1000 mL y 250 mL (Kimax)
- Membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GVS FilterTechnology)
- Pipetas serológicas 10 mL y 5 mL
- Pipetor para cultivo celular (Labnet)
- Placas de 6 y 24 pozos (Corning)

- Platos de 100 mm (Corning)
- Tubo eppendorf de 1.7 mL y 600 μ L (Costar y Corning)
- Tubos Falcón de 50 mL y 15 mL (Corning)

EQUIPO

- Autoclave (FE-397, Felisa)
- Balanza analítica (GR-120, AND)
- Baño de perlas para cultivo celular (74300-714, LabArmor)
- Cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida (Mini-Protean, Bio-Rad)
- Cámara de Neubauer (BBC, Propper)
- Cámara de transferencia (TransBlot SD Semi-Dry, Bio-Rad)
- Campana de flujo laminar nivel II (UN-425-400, LabGard)
- Centrífuga para tubos eppendorf (A1-15K, Sigma)
- Centrífuga para tubos falcón (Sorval STR 16R, ThermoScientific)
- Transiluminador (Bio-Rad)
- Fuente de poder (300 Plus, Labnet)
- Incubadora de CO₂ para cultivo celular (370, ThermoElectronCorporation)
- Incubadora refrigerada (LM-570, MRC)
- Lector de placas ELISA (iMARK, Bio-Rad)
- Lector de placas BioTek TM Flx800 (Fisher Scientific)
- Escáner de quimioluminiscencia para Western Blot (LI-COR)
- Espectrofotómetro NanoDrop TM Lite (Thermo scientific)
- Termociclador StepOne TM Sistema de PCR en tiempo real (Applied Biosystems)

- Micropipetas 1000 μL , 200 μL , 20 μL , 10 μL (Labnet)
- Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)
- Microscopio de fluorescencia (Leica)
- Refrigerador 4°C/ -20°C (RS25J5008SP, Samsung)
- Software para gráficas y análisis estadísticos (GrapPadPrism 8)
- Ultracongelador -80°C (RevcoValue Plus, Thermo Fisher Scientific)
- Vortex (Genie 2, Daigger & CO, Inc.)

METODOLOGÍA

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR BAC SARS-COV-2 Δ N-NLUC

Se diseñó y mandó sintetizar un vector de clonación que contiene la secuencia completa de SARS-CoV-2 cepa Wuhan-Hu-1 (NC_0445512.2) que fue insertado en el vector pBACYAC-Human CoV-OC43 para su propagación en cultivo bacteriano y mamario. Al genoma completo de SARS-CoV-2 se le realizó una delección completa del gen estructural de la Nucleocápside (28274-29553 pb) y se sustituyó por la secuencia codificante del reportero quimioluminescente NanoLuc (NLuc) (GenBank: JQ437370)

CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares HEK-293T y sus derivados fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con FBS 10%, glutamax 2mM, piruvato 1X, aminoácidos no esenciales 1X y antibiótico-antimicótico 1X. Las células VERO E6 se cultivaron en medio DMEM Advanced suplementado con FBS 2%, glutamax 2mM y antibiótico-antimicótico 1X. Ambas líneas celulares fueron incubadas a 37°C bajo una atmosfera de CO₂ al 5%.

CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR BAC SARS-COV-2 Δ N

Previo a su uso en las líneas celulares, el vector de clonación fue caracterizado por medio de la amplificación de los productos de interés. Para corroborar la correcta eliminación del gen de la Nucleocapside y la incorporación del reportero de Nanoluciferasa, además de su correcta colocación en la región, se realizó una PCR punto final utilizando los primers mostrados en la **Tabla 3**. Para la reacción de PCR se utilizó el kit de MyTaq™ DNA polymerase siguiendo lo recomendado por el proveedor. De forma breve se utilizó 100 ng

del BAC como plantilla para la reacción, a esto se le añadió 5 ul de Reaction Buffer 5X, 20 uM del respectivo primer forward y reverse y 0.5 ul de MyTaq DNA Polymerase, para posteriormente ser llevado a 25 ul de volumen final. Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos, donde cada ciclo consta de 3 pasos: una desnaturalización temperatura 95°C por 15 segundos, un alineamiento o hibridación 60°C por 15 segundos y una extensión a 72°C por 10 segundos. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel agarosa al 1% a 80V por 1 hora y teñido con GelRed®.

DISEÑO Y GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES QUE EXPRESEN LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE.

Para la generación de líneas estables que expresen la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2 que sirvieran como células permisivas a la replicación, se utilizaron las células VERO E6 y HEK-293T, mismas que fueron transducidas con vectores lentivirales. Previo a la transducción, se llevaron a cabo curvas de resistencia a puromicina, antibiótico a utilizar como medio de selección; se obtuvo como concentración mínima necesaria para selección 1 µg/ml y 8 µg/ml por X hrs para #(NUMERO DE CÉLULAS PLAQUEADAS) células HEK-293T y VERO E6 respectivamente. Teniendo estandarizada la concentración de antibiótico, se realizó la transducción viral con lentivirus que contienen la secuencia codificante de TMPRSS2 humano y la Nucleocápside de SARS-CoV-2, esto bajo el control del promotor EF1A y con Puromicina como antibiótico de selección. En cajas de 24 pozos se sembraron 2×10^4 células, mismas que fueron transducidas a una concentración de 1, 5 y 10 MOI. 24 horas posterior a la transducción, se realizó el cambio de medio y se añadió puromicina a las concentraciones ya mencionadas.; A los 7 días de incubación, se aislaron las colonias

resistentes a puomicina y se realizó la propagación de estas células manteniéndolas en el medio de selección hasta su propagación masiva en T25 y T75.

CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDE DE SARS-COV-2.

Para la verificación de la expresión de las proteínas de interés se realizaron dos métodos de comprobación. El primero de ellos consistió en el inmunomarcaje por inmunofluorescencia de la proteína N. Para esto se sembraron 5×10^4 y 2×10^4 células HEK-N y VERO-N respectivamente, en placas de 24 pozos donde previamente se habían colocado cubreobjetos redondos de 15mm Pasadas 24 horas las células fueron fijadas con 200 μ l de metanol durante 20 minutos a 4°C, permeabilizadas con 200 μ l de acetona durante un minuto y bloqueadas con suero bovino fetal al 1% durante una hora. Posterior a esto se dejaron incubando toda la noche con 200 μ l anticuerpo primario anti-Nucleocápside a una concentración de 1:250. Pasadas las 12 horas se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PSB 1X; se prosiguió con una incubación por dos horas en oscuridad con anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con Alexa Flúor 495 a una concentración 1:500. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con PBS1X, para la posterior tinción nuclear con DAPI 1:10000 por 10 minutos y otros 3 lavados con PBS 1X. Los cubreobjetos fueron levantados de los pozos de cultivos y montados en laminillas utilizando glicerol. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

Como segundo método de comprobación se realizó un Western Blot. Para esto se sembraron 1×10^6 células HEK-N y VERO-N en placas de 6 pozos, pasadas las 24 horas fueron cosechadas y lisadas utilizando el reactivo de ProteoJet. Se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford, para posteriormente realizar la electroforesis

SDS.-PAGE con 30 μ g de muestra en un gel de acrilamida al 12% a 80 V durante 2 horas. Se procedió a la transferencia de proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 120 mA durante 1 hora; se bloqueó la membrana con leche baja en grasa al 10% durante 1 hora y se dejó incubando durante 12 horas con anticuerpo primario anti-Nucleocápside a una dilución de 1:1000. Pasadas las 12 horas se recuperó el anticuerpo y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, donde se prosiguió con una incubación de 2 horas con un anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con HRP a una concentración de 1:5000. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron otros 3 lavados con TBS-T y se prosiguió al revelado de la membrana utilizando el kit de Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, sc-2048) y su lectura en un lector de membranas.

GENERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

Para la generación de las partículas virales se siguió la siguiente metodología de transfección. Se realizó la transfección química por medio del reactivo Targefect-BAC siguiendo lo recomendado por el proveedor. Para esto se sembraron 4×10^5 células HEK-N y VERO-N, mismas que fueron transfectadas con 1 μ g del BAC SARS-CoV-2- Δ N por un periodo de 12 horas; el medio de transfección fue retirado por completo y se restituyó por medio fresco. Durante un periodo de 7 días se analizaron las células por medio de microscopía óptica para el análisis de efecto citopático (CPE) y se recolectaron los sobrenadantes cada 3 días, mismos que fueron criopreservados con glicerol al 10% a -80°C . Al séptimo día, las células restantes fueron recolectadas y preservadas para su inclusión en resina epóxica, análisis de ácidos nucleicos o western blot.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA

Se utilizó el marcador quimioluminescente Nluc para determinar la expresión y rastreo del BAC en los cultivos celulares, esto como un marcador indirecto de la expresión de las proteínas de SARS-CoV-2. Para esto, al momento de recolectar las células del ensayo de generación de partículas, se tomaron 2×10^5 células de cada cultivo, se centrifugaron a máxima velocidad por 5 minutos, se retiró el medio y se lavó en dos ocasiones con PBS 1X. Posteriormente le fue añadido reactivo de trabajo NanoGlo, compuesto de una mezcla de NanoGlo Buffer y NanoGlo Reagent en una proporción de 50:1. La mezcla de células y reactivo fue colocada en un pozo por triplicado de una placa de 96 pozos de fondo oscuro y leída por medio del fluorómetro BioTek TM Flx800 a una longitud de onda de 460 nm.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA

Para la determinación de la capacidad infectiva se sembraron 5×10^5 células VERO E6, VERO-N, HEK-293T o HEK-N en placas de 6 pozos. Estas células, posterior a un periodo de aclimatación, fueron expuestas a los sobrenadantes de ensayo de generación de partículas virales por 24 horas, para posteriormente ser removido este sobrenadante y sustituido por medio nuevo. Las células fueron observadas por medio de microscopía óptica hasta la aparición de efecto citopático (CPE), para posteriormente ser cosechadas y utilizadas para determinar la infección por medio de la metodología ya señalada para la NanoLuciferasa. Los sobrenadantes recolectados fueron utilizados para infectar a las mismas líneas celulares durante varios pasajes (P0 a P6) para demostrar la capacidad de las partículas generadas de seguir propagándose en la célula adecuada.

ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES MORFÓLOGICAS INDUCIDAS POR LAS PARTÍCULAS VIRALES EN UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN

Posterior a los 7 días o cuando el CPE se mostraba de forma abundante, las células fueron cosechadas con tripsina 1X y fijadas con glutaraldehído al 2.5% para su procesamiento por la técnica clásica de microscopía electrónica. La deshidratación de las pastillas se llevó a cabo por un gradiente ascendente de acetonas, para subsiguientemente ser embebidas en resina epóxica. Posteriormente se realizaron cortes de 300 nm de grosor en el ultramicrotómo, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y observados en un microscopio de campo claro a 100X. Se obtuvieron imágenes digitales de mínimo 8 campos que fueron analizados en busca de marcadores de cpe de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Americana de Microbiología (ASM, 2017).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados y graficados haciendo uso del software GraphPad Prism 9 utilizando la prueba de ANOVA de 2 factores. Se tomaron los valores de $P < 0.05$ como estadísticamente significativos.

CARACTERIZACIÓN DEL VECTOR

Como se mencionó previamente, se decidió la caracterización del vector de clonación previo a su utilización. Para ello se obtuvieron los productos de PCR de los genes de la Nucleocápside, Nanoluciferasa y ORF8-ORF10 (**Figura 10**). Utilizando los oligos que amplifican la región de la nucleocápside logramos identificar la correcta eliminación de este gen de acuerdo con lo observado en el carril 9 y 11 del gel. El producto de amplificación del carril 5, de 424 pares nos muestra la correcta incorporación del gen de la Nanoluciferasa en el vector, mientras que el carril 7 y su producto nos indica el correcto posicionamiento del gen reportero donde anteriormente se encontraba el gen de la Nucleocápside.

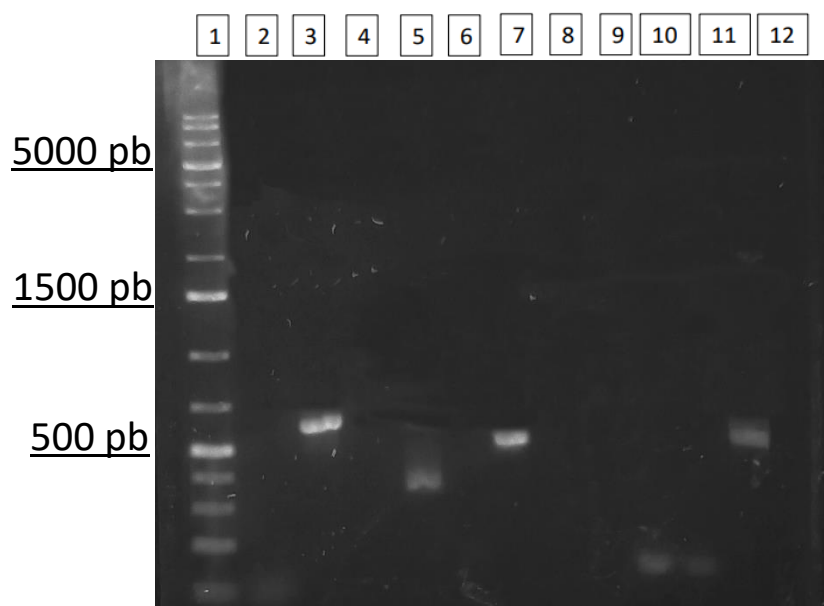


Figura 10. Caracterización del BAC SARS-CoV-2-ΔN-Nluc. Se muestran los productos de PCR tras su electroforesis en gel de agarosa. Se muestran la presencia del gen de OR8-ORF10 y NLuc, carriles 3, 5 y 7; además de la ausencia del producto del gen de la Nucleocápside en el carril 9 y 11.

GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES HEK-293T Y VERO E6 QUE EXPRESEN DE FORMA ESTABLE EL GEN ESTRUCTURAL N DE SARS-COV-2 (HEK-N/VERO-N)

Para la generación de las líneas estables que expresan de forma *trans* la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2 se decidió utilizar la transducción viral como método de generación debido a su alta eficiencia y fácil manejo. Para esto se utilizó un lentivirus que contenía la secuencia codificante de la proteína humana TMPRSS2 y la Nucleocápside de SARS-CoV-2, ambas separadas por un sitio de entrada interna del ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) que permitiese la producción independiente de ambos péptidos; así mismo, ambas secuencias se encontraban reguladas por un promotor del factor de elongación alpha humano (EF1A, *Elongation factor 1-apha1*) (**Figura 11**). Así mismo este vector lentiviral contaba con la secuencia de resistencia al antibiótico puromicina que permitió la selección y aislamiento de colonias transducidas.

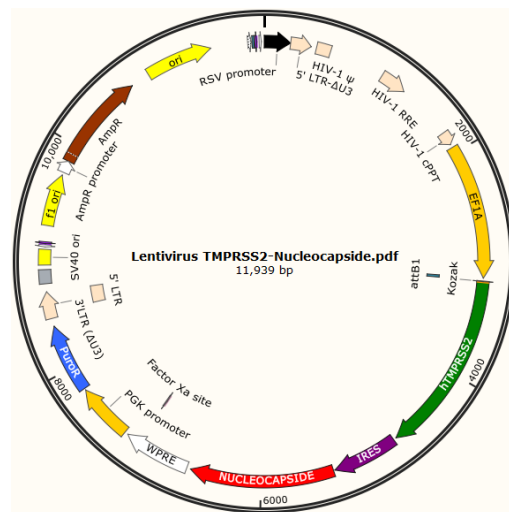
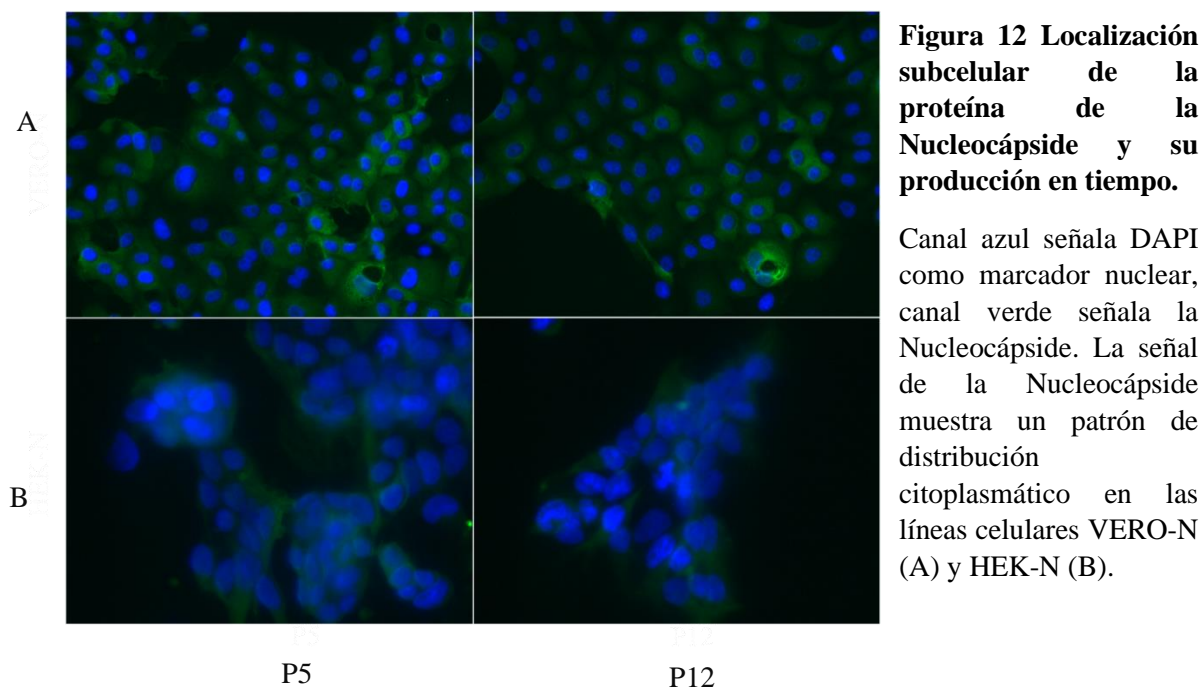


Figura 11. Esquema de la composición del vector lentiviral. Este cuenta con la secuencia codificante de la Nucleocápside de SARS-CoV-2 bajo un promotor humano.

Para la caracterización de las líneas celulares estables se realizó dos métodos de comprobación que permitieran conocer la localización y la cantidad de proteína producida. El primero método consistió en una detección por inmunofluorescencia utilizando anticuerpo primario contra la proteína N y anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488 que nos permitió observar la inmunolocalización en verde. De acuerdo a la literatura, la proteína N de SARS-CoV-2 se expresa en el citoplasma de la célula infectada donde interacciona con la RNA viral en síntesis. Como resultado se obtuvo señal en el canal verde, correspondiente al anticuerpo anti-N, que muestra una localización citoplasmática que concuerda con lo reportado anteriormente (**Figura 12**). Así mismo, con este inmunomarcaje se logró demostrar la eficiencia de las células estables para la expresión de la proteína N a través del tiempo, donde células de pase temprano como pase 5 (P5) a células de pase tardío (P12) siguen expresando la proteína de interés.



Como segundo método de comprobación de expresión se realizó un Western blot donde se detectó la proteína utilizando un anticuerpo específico contra la proteína N. Como resultado

se obtuvo una banda de 55 kDa en los extractos celulares de las líneas estables, mismo que corresponde a lo reportado al peso molecular de la proteína de interés. Sin embargo, también en encontramos diferencia en la expresión de la proteína N en las diferentes colonias obtenidas (CI-CIII), notando una mayor expresión en la colonia I de las células HEK-N y en la colonia II de las células VERO-N (**Figura 13**), mismas que fueron utilizadas para los siguientes ensayos.

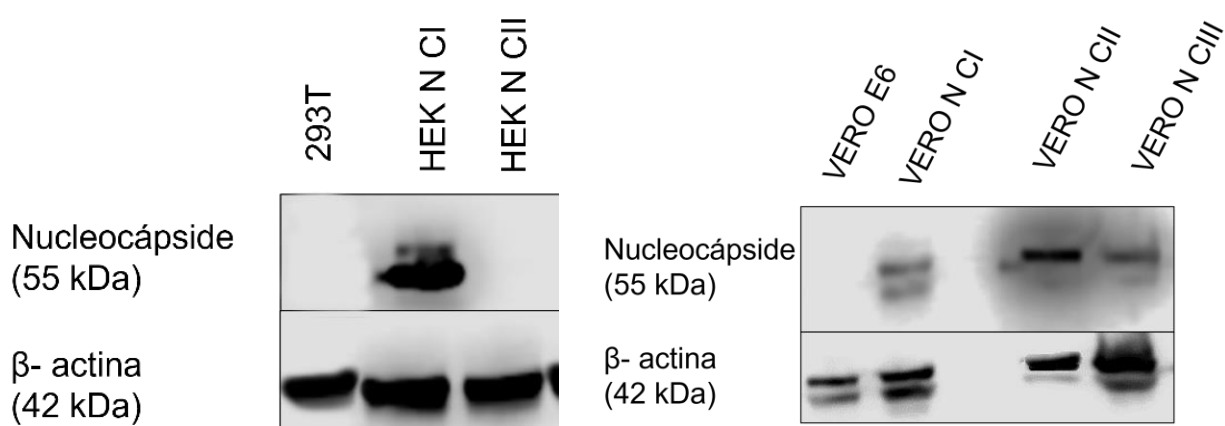


Figura 13. Expresión de la proteína de la Nucleocápside en líneas HEK-293T y VERO E6. Todas las líneas infectadas con los lentivirus TMRSS2-Nucleocápside mostraron expresión de la proteína de interés, aunque en diferente proporción entre ellas.

EFFECTO CITOPÁTICO IN VITRO INDUCIDO POR LAS PARTÍCULAS VIRALES PRODUCIDAS POR UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN

Para demostrar la funcionalidad de nuestro sistema, las líneas estables fueron transfectadas con el vector de clonación SARS-CoV-2- Δ N-Nluc y, tras 72 horas post-transfección o al observarse cambios morfológicos, los sobrenadantes fueron recolectados para posteriores ensayos. Estos sobrenadantes fueron utilizados en células VERO E6, HEK-293T, VERO-N Y HEK-N las cuales fueron monitorizadas diariamente en busca de disminución de la densidad y la aparición de un efecto citopático (CPE).

A la finalización de los ensayos, tras 72 horas de ensayo, no se observó cambio alguno en los grupos testigos VERO E6 y VERO-N, los cuales solamente fueron expuestos a medio de cultivo. Ambos grupos mantuvieron una densidad celular similar entre ellos, con células de forma poligonal bien definida, y sin la presencia de inclusiones características.

A partir de las 72 horas post-infección, en las células VERO-N expuestas a sobrenadante de células N transfectadas (SN BAC/N) se logró observar una disminución marcada de la densidad celular, además de cambios morfológicos caracterizados por el redondeamiento de las células y la formación de sincitios; efecto no observado en las células VERO E6 expuestas al mismo sobrenadante (**Figura 14**). No se observaron cambios morfológicos en las células testigo y en las células expuestas a sobrenadante control (SN CTRL).

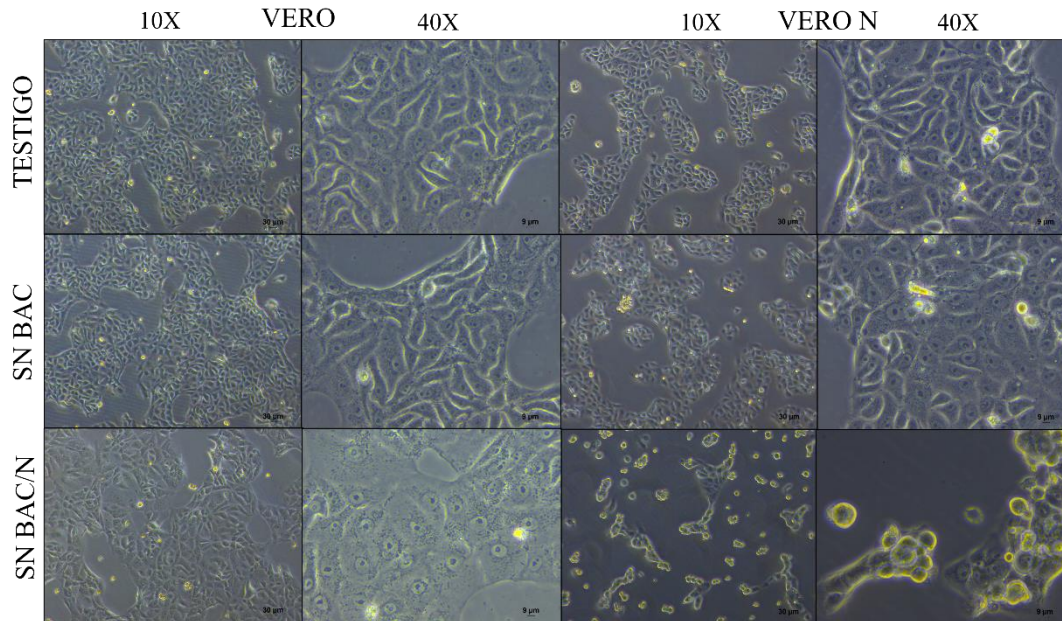


Figura 14. CPE en células VERO medido por sobrenadante de células transfectadas. Se muestran imágenes de contraste de fases a 10 y 40 X de células VERO E6 y VERO N que fueron expuestas a sobrenadantes de células que no expresan la Nucleocápside transfectadas con el vector (SN BAC) y células N transfectadas con el vector(SN BAC/N); además de células testigo. Se observa una abundante disminución de la densidad celular con un marcado CPE en las células VERO-N expuestas a SN BAC.

La misma metodología se siguió con las células HEK-N. Tras 48 horas post-infección se logró observar en las células expuestas a SN BAC/N una disminución de la densidad celular, además del CPE marcado ya anteriormente descrito. Estos cambios morfológicos no se encontraban presentes en las células HEK-293T expuestas al mismo sobrenadante (**Figura 15**). Sin embargo, en el grupo testigo y control SN BAC logramos observar una considerable cantidad de células flotantes y de células de morfología anormal en la línea HEK-N comparada con su línea materna HEK-293T. Debido a estas características morfológicas

anormales se decidió continuar los siguientes experimentos con las líneas VERO E6 y VERO N.

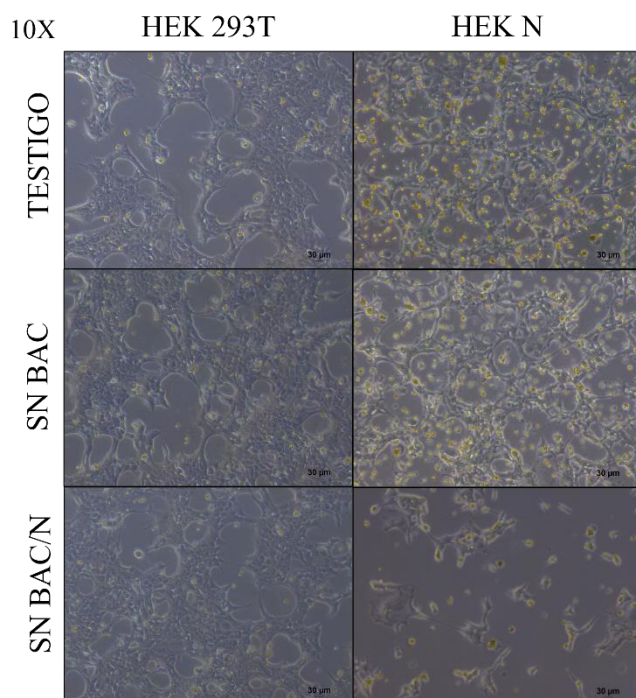


Figura 15. Efecto citopático en HEK medido por sobrenadante de células transfectadas. Se muestran imágenes de contraste de fases a 10 X de células HEK 293T Y HEK-N que fueron expuestas a sobrenadantes de células que no expresan la Nucleocápside transfectadas con el vector (SN BAC) y células N transfectadas con el vector(SN BAC/N); además de células testigo. Se observa una abundante disminución en la densidad celular además un marcado efecto citopático en las células HEK-N expuestas a SN BAC/N

LAS PARTÍCULAS INFECTIVAS GENERADAS POR UN SISTEMA DE TRANS-COMPLEMENTACIÓN SIGUEN GENERANDO EFECTO CITOPÁTICO (CPE) POR LO MENOS DURANTE SEIS PASAJES.

Para demostrar la efectividad del sistema de trans-complementación a través del tiempo y de la partícula infectiva para seguir infectando y replicándose, se utilizaron los sobrenadantes obtenidos de las transfecciones del vector SARS-CoV-2- Δ N-Nluc, denominados P0, para infectar líneas VERO E6 y VERO-N. Los sobrenadantes obtenidos de una primera ronda de infección fueron denominados P1 y se siguieron utilizando en infecciones consecuentes hasta P6, donde se analizaron las células hasta obtener un CPE evidente.

Desde el pasaje 1 (P1) se logró observar la aparición de CPE en células VERO-N expuestas a sobrenadante proveniente de la transfección con el vector en una célula estable a la expresión de la proteína N, efecto no posible de observar en la línea VERO E6 expuesta al mismo sobrenadante (**Figura 16**). Esto nos indicó que la partícula infectiva presente en el sobrenadante BAC/N (SN BAC/N) solo podía replicarse y causar CPE en células VERO-N. El mismo CPE fue observable hasta el pasaje 6 (P6) del sobrenadante SN BAC/N en las células VERO-N, mientras que no hubo ningún cambio asociado en la línea VERO E6. Lo que nos sugiere que la partícula infectiva generada tiene la capacidad de propagarse solamente en línea estables a la proteína de la Nucleocápside.

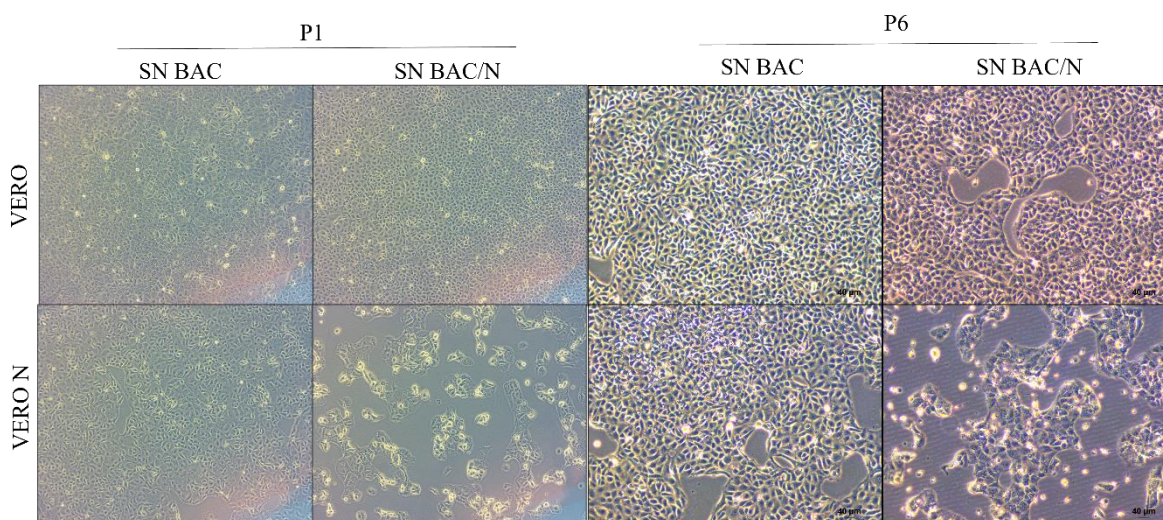


Figura 16. Efecto citopático a través del tiempo en células VERO-N expuestas a sobrenadante SN BAC/N. Se muestran imágenes de contraste de fases a 10X de células VERO E6 y VERO N que fueron expuestas a sobrenadantes SN BAC y SN BAC/N de P1 y P6 durante 72 horas. Es notable la capacidad de generar CPE de la partícula infecciosa en células VERO-N desde el pasaje 1 hasta el pasaje 6.

LA INFECCIÓN CON SOBRENADANTE NO PUEDE SER DETECTADA POR MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCENCIA

Como método directo para detectar la generación de partículas de SARS-CoV-2 por medio de un sistema de trans-complementación dependiente de la proteína N, se decidió utilizar el reportero quimioluminescente de la Nanoluciferasa, presente en el vector de clonación SARS-CoV-2- Δ N-NLuc. Para esto, se utilizaron las líneas VERO E6 y VERO-N las cuales fueron expuestas a sobrenadantes provenientes de transfecciones con el vector de clonación en células N (SN BAC/N) o células no N (SN BAC), durante 48 horas hasta observar efecto citopático. Las células fueron lisadas y sus sobrenadantes proteicos fueron mezclados con su sustrato para su posterior lectura por medio de luminometría.

A pesar del marcado CPE observado tras las 48 horas post-infección, no se detectaron en las unidades relativas de luminiscencia entre los cuatro grupos analizados (**Figura 17**), esto comparado con un control de técnica consistente en la transfección de células VERO E6 con un plásmido que portaba la secuencia codificante de la Nanoluciferasa. Estas unidades de luminiscencia fueron analizadas en el rango de tiempo de una hora, mas no se observaron cambios en el patrón.

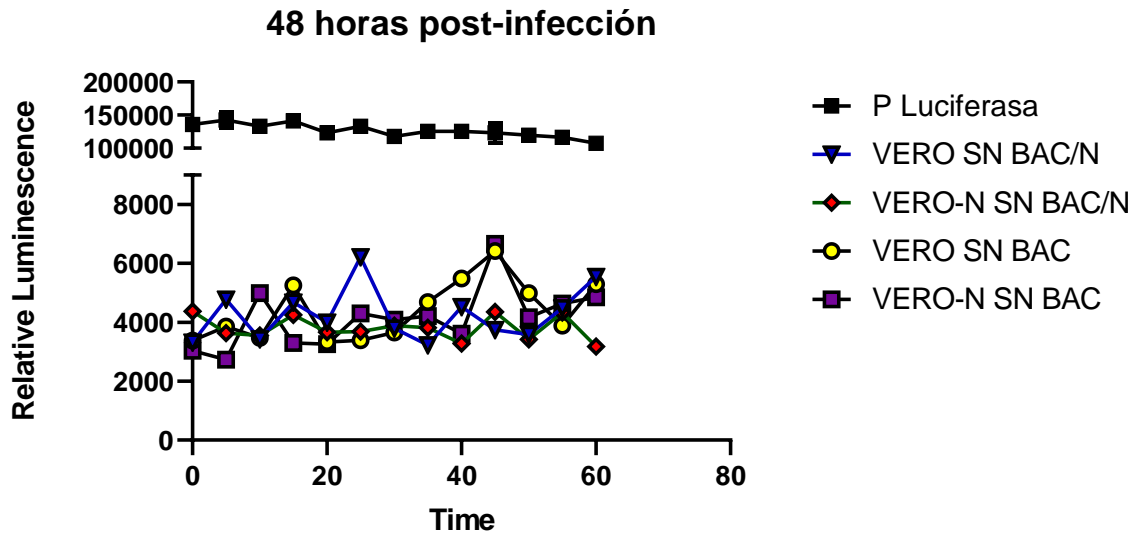


Figura 17 Medición del reportero quimioluminescente en células infectadas con sobrenadante. Se obtuvo los datos de las unidades relativas de luminiscencia en un rango de tiempo de una hora y se compararon con un control de expresión del mismo reportero (P. Luciferasa). No se observaron diferencias entre las células expuestas a los sobrenadantes infecciosos (SN BAC/N) comparadas con sus controles de infección (SN BAC).

LOS SOBRENADANTES INFECTIVOS PROVOCAN ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN CÉLULAS ESTABLES A LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCAPSIDE.

Para confirmar el CPE inducido por sobrenadante observado por medio de la microscopía de contraste de fases, se analizaron las células VERO E6 y VERO-N expuestas a sobrenadantes infecciosos (SN BAC/N) y sobrenadante control (SN BAC) para posteriormente ser cosechadas y procesadas por la técnica convencional de microscopía electrónica para la obtención de cortes semifinos y su tinción con azul de toluidina.

Una vez obtenidas las preparaciones, se observaron las células y se tomaron los siguientes criterios a analizar: células que presentaran características normales en su forma, relación núcleo: citoplasma, patrón de cromatina, presencia o ausencia de vesículas, y la presencia o

ausencia de inclusiones citoplasmáticas visibles. Así mismo se utilizó como control de referencia de CPE inducido por infección viral a una muestra de células HEK-293T infectadas con adenovirus, esto para contar con un control positivo a los cambios morfológicos de CPE tras infección por virus.

No se observaron diferencias apreciables en las células VERO E6 expuestas a sobrenadantes infecciones (SN BAC/N) comparado con la misma línea celular expuesta a sobrenadante control (SN BAC) (**Figura 18**); ambas mantuvieron su forma poligonal, no mostraron alteraciones en la relación núcleo:citoplasma y presentaron un patrón de cromatina similar. Así mismo tampoco se observó diferencia en el número y tamaño de las vesículas presentes por célula.

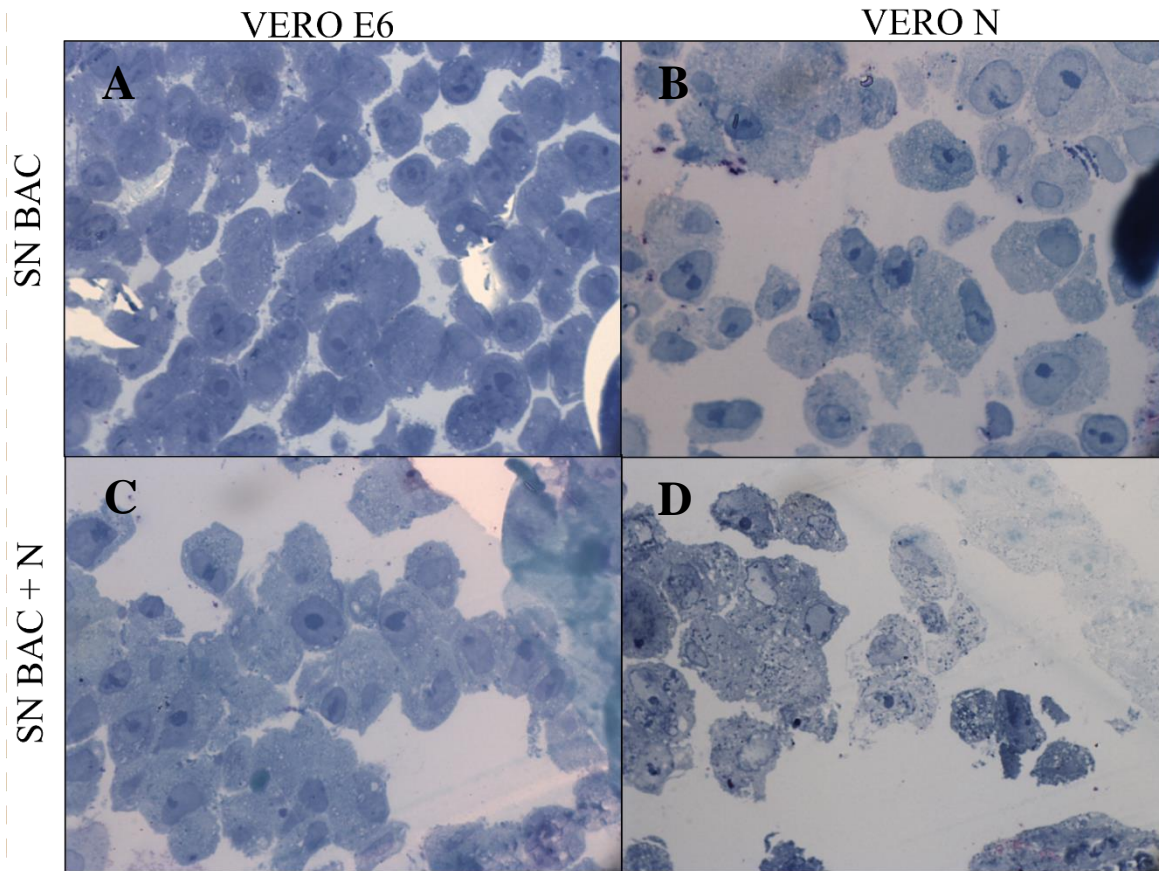


Figura 18. Efecto citopático inducido por el sobrenadante BAC/N en células estables.. No se observaron diferencias entre las células expuestas a los sobrenadantes infecciosos (SN BAC/N) comparadas con sus controles de infección (SN BAC).

No se observaron diferencias en las características ya mencionadas previamente al analizar las muestras obtenidas de células VERO-N expuestas a sobrenadante control (SN BAC), mostrando apariencia similar a su línea materna VERO E6. Sin embargo, al analizar la línea VERO- N expuesta a sobrenadante infeccioso (SN BAC/N) se identificaron alteraciones en la forma de las células, mostrando un patrón irregular, además de un cambio en el patrón de la cromatina presentándose esta en una forma relajada. La característica más evidente fue la presencia de abundantes y grandes vesículas en la mayoría de las células observadas por campo, característica también observada en nuestro control de referencia. Se realizó una

cuantificación del número de células vesiculadas por campo en los cuatro grupos de interés (**Figura 19**), encontrando que las células VERO-N infectadas con SN BAC/N presentaban hasta un 70% de células vesiculadas por campo, mientras que los otros grupos mostraban patrones similares entre ellos, indicando la presencia de un factor infeccioso en el SN BAC/N que causaba cambios citopáticos en las células que expresan la nucleoproteína de SARS-CoV-2.

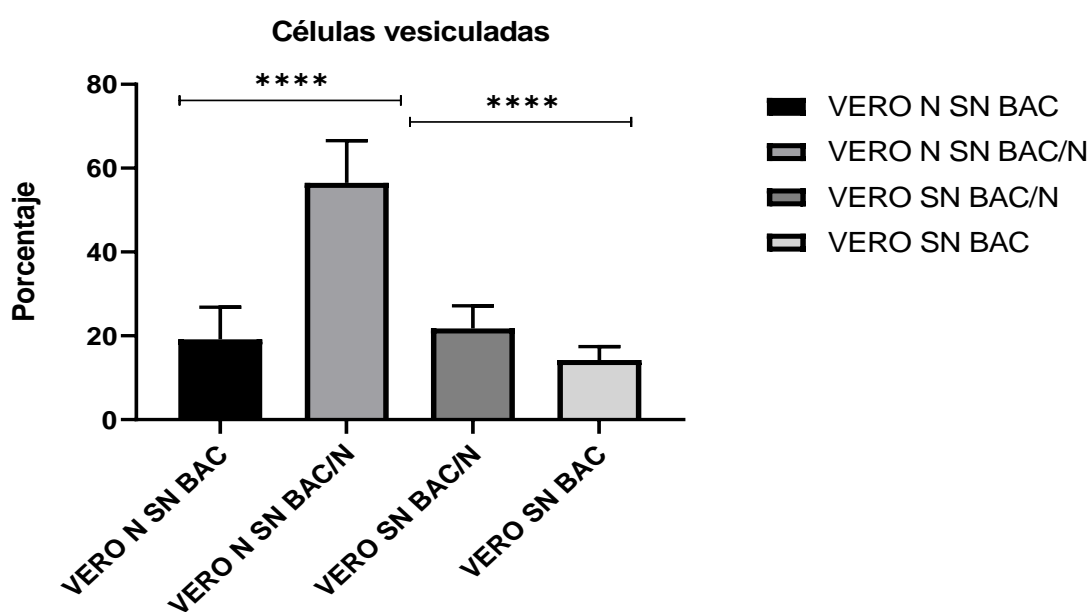


Figura 19. Porcentaje de células vesiculadas tras exposición a los sobrenadantes. Se cuantificó la presencia y el número de vesículas por célula en los diferentes tratamientos. Se denota al alto porcentaje de células vesiculadas VERO-N tras ser expuestas al sobrenadante infeccioso SN BAC/N; efecto no replicado en las otras líneas celulares.

DISCUSIÓN

El estudio de SARS-CoV-2 se vio limitado al inicio de la pandemia debido a su alta capacidad infecciosa, la ausencia de vacunas adecuadas y los pocos laboratorios de bioseguridad nivel 3 existentes en los distintos países. La mayoría de las investigaciones de este virus fueron llevadas a cabo en un principio utilizando como estrategia de virus vectores que expresaban proteínas específicas de SARS-CoV-2 lo que limitó el conocimiento completo del ciclo viral, de las interacciones de las otras proteínas con los organismos y del rendimiento global de los antivirales en un ciclo completo ((62).

Los sistemas de trans-complementación se han utilizado desde hace años para el estudio seguro de virus altamente patógenos (63) tales como virus pertenecientes a las familias de los *flavivirus* (64) y *paramixovirus* (65), permitiendo realizar ensayos de ciclo viral y desarrollo de fármacos en laboratorios de bioseguridad de nivel 2. De igual manera se han desarrollado sistemas de trans-complementación para virus la familia *Coronaviridae*, tales como SARS-CoV (66) y MERS-CoV (67), por lo que en este trabajo se decidió realizar uno para SARS-CoV-2.

A la fecha de la publicación de este trabajo se han publicado dos sistemas de trans-complementación de SARS-CoV-2, utilizando las proteínas E (68) y N (69) respectivamente, para generar virus replicativos deficientes; esto haciendo uso de producto de ligación de ADNc que contenía la secuencia completa del virus junto a la delección de la proteína ya mencionada, que posteriormente fue transcrito *in vitro* y electroporado en células complementarias en *trans* a la proteína deletada. Ambos trabajos demostraron la capacidad de producir virus replicativos deficientes de SARS-CoV-2 por medio de la delección de gen E y N utilizando su complementación en *trans*.

En este trabajo decidimos utilizar un vector de clonación del tipo plasmídico que contuviera la secuencia completa de SARS-CoV-2 junto a la delección completa del gen N (SARS-CoV-2-ΔN), esto debido a la facilidad de manejo y amplificación de un producto plásmido a comparación de un producto de RNA, además de una reducción en el costo entre ambos métodos, lo que permitirá la replicación del modelo en la mayoría de los laboratorios del país (70).

Así mismo, se decidió el uso de las células VERO-E6 como línea complementaria en *trans*, debido a que se encuentran fielmente caracterizadas (71), son de fácil manejo y son un excelente modelo de propagación viral debido a que no expresan genes de la familia de los interferones, lo que permite una rápida replicación y propagación de los virus(72). Estas células también demostraron ser un excelente modelo de expresión de la proteína de la Nucleocápside de SARS-CoV-2, esto al expresarla manera constante a través del tiempo y al no mostrar alguna alteración en la tasa de crecimiento o en su manejo, a comparación de la línea HEK-293T también utilizada en este trabajo. Así mismo corroboramos su alta susceptibilidad a la infección por SARS-CoV-2 ya reportada en la literatura, esto debido a que observamos el rápido y marcado efecto citopático a las 48 horas post infección, lo que corrobora su uso eficiente para el estudio de este virus (73,74)

Una de las principales complicaciones en el estudio de virus de genomas de gran tamaño como SARS-CoV-2 es el método transporte a utilizar para poder expresar todos los productos del virus, siendo esta una de las razones por las que se ha preferido utilizar la electroporación como método de transfección, por su mayor tasa de eficiencia (75). En este estudio utilizamos un vector de clonación tipo BAC el cual fue ingresado a las células por medio de transfección química y, que tras 72 horas post-transfección, mostró la capacidad de generar efecto

citopático en células complementarias que expresaban la proteína de la Nucleocápside; tiempos y efectos similares a los ya reportados en la literatura utilizando otros tipos de vectores para la expresión de SARS-CoV-2, lo que nos sugirió la correcta expresión del vector(76,77).

Así mismo logramos generar una probable partícula infecciosa que causaba cpe en células que expresan la proteína N de SARS-CoV-2, mas no en líneas que no trans-complementaban esta proteína como el tipo VERO E6. Mismo efecto que logramos observar a través del tiempo tras la propagación de esta partícula infecciosa en células VERO-N hasta un pasaje 6, similar a lo reportado por Ju y colaboradores (69).

Sin embargo, con una dificultad que nos encontramos durante uno estudio fue la detección de la proteína reportera NanoLuciferasa que fue incorporada al BAC en sustitución de la proteína N, misma que nos permitiría detectar de forma indirecta la capacidad infecciosa de la partícula generada por nuestro sistema de trans-complementación. Empero, no fuimos capaces de detectarla a las 48 horas post-infección, a pesar de que a esos tiempos ya se mostraba un CPE marcado en las células expuestas a SN BAC/N. Otros estudios ya han utilizado la molécula de NanoLuciferasa como reportero de infección por SARS-CoV-2, sin embargo, a diferencia con este trabajo, este reportero se ha colocado en regiones de proteínas accesorias, por lo que su funcionalidad, su expresión y su capacidad de sufrir mutaciones deletorias puede variar dependiente de su localización. Así mismo consideramos como posible evento deletéreo a la expresión del reportero, la citopatogenicidad bajo la que se encuentran las células infectadas por SN BAC/N, mismo que puede estar causando la degradación enzimática de la NanoLuciferasa durante el proceso de muerte celular.

CONCLUSIONES

Se generó una línea estable VERO E6 que expresa la Nucleoproteína de SARS-CoV-2.

La trans-complementación del vector SARS-CoV-2- Δ N con células VERO que expresan la proteína N, genera un agente infeccioso capaz de inducir efecto citopático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–3.
2. Lauxmann MA, Santucci NE, Autrán-Gómez AM. The SARS-CoV-2 coronavirus and the COVID-19 outbreak. *International Braz J Urol*. 2020;46(Suppl 1):6–18.
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*.
4. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. 2020;395(10223):507–13.
5. Al-Qahtani AA. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Emergence, history, basic and clinical aspects. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(10):2531–8.
6. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. 2020;(January).
7. Suárez V, Suarez Quezada M, Oros Ruiz S, Ronquillo De Jesús E. Epidemiology of COVID-19 in Mexico: from the 27th of February to the 30th of April 2020. *Revista Clinica Espanola*. 2020 Nov 1;220(8):463–71.
8. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian Journal of Pathology*. 2020;42(1):3–11.
9. Haque SKM, Ashwaq O, Sarief A, Azad John Mohamed AK. A comprehensive review about SARS-CoV-2. *Future Virology*. 2020;15(9):625–48.
10. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10(November):1–17.
11. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. Vol. 10, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an Jiaotong University; 2020. p. 102–8.
12. Maier HJ, Bickerton E, Britton P. Coronaviruses: Methods and protocols. *Coronaviruses: Methods and Protocols*. 2015;1282(1):1–282.
13. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*. 2014;6(8):2991–3018.
14. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. 2020;(January).

15. Chen CY, Chang C ke, Chang YW, Sue SC, Bai HI, Riang L, et al. Structure of the SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein RNA-binding Dimerization Domain Suggests a Mechanism for Helical Packaging of Viral RNA. *Journal of Molecular Biology*. 2007;368(4):1075–86.
16. Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, et al. Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*. 2004;43(20):6059–63.
17. Mu J, Xu J, Zhang L, Shu T, Wu D, Huang M, et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Science China Life Sciences*. 2020;63(9):1–4.
18. Li J yan, Liao C heng, Wang Q, Tan Y jun, Luo R, Qiu Y, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. 2020;(January).
19. Mu J, Fang Y, Yang Q, Shu T, Wang A, Huang M, et al. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2. *Cell Discovery*. 2020;6(1):10–3.
20. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;(December).
21. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(3):155–70.
22. Trougakos IP, Stamatelopoulos K, Terpos E, Tsitsilonis OE, Aivalioti E, Paraskevis D, et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of Biomedical Science*. 2021;28(1):1–18.
23. Iwen PC, Stiles KL, Pentella MA. Safety Considerations in the Laboratory Testing of Specimens Suspected or Known to Contain the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *American Journal of Clinical Pathology*. 2020;153(5):567–70.
24. Aufer ALMK, Heis TOT, Au KAAL, Ray JOLG. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent. 2020;(January).
25. Souza TML, Morel CM. The COVID-19 pandemics and the relevance of biosafety facilities for metagenomics surveillance, structured disease prevention and control. 2020;(January).
26. Res M, Ruts C, Hospital CR, Sciences M, Committee IE, Crh-smims S. Biorisk assessment for infrastructure & biosafety requirements for the laboratories providing coronavirus SARS-CoV-2/(COVID-19) diagnosis. 2018;(May):517–20.
27. Xiong HL, Wu YT, Cao JL, Yang R, Ma J, Qiao XY, et al. Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressed BHK21 cells. *bioRxiv*. 2020;9.

28. Zettl F, Meister TL, Vollmer T, Fischer B, Steinmann J, Krawczyk A, et al. Rapid quantification of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies using propagation-defective vesicular stomatitis virus pseudotypes. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):1–13.
29. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging Microbes and Infections*. 2020;9(1):680–6.
30. Xie X, Muruato A, Lokugamage KG, Narayanan K, Zhang X, Zou J, et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*. 2020;27(5):841-848.e3.
31. Zhang N, Li C, Jiang S, Du L. Recent advances in the development of virus-like particle-based flavivirus vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):1–20.
32. van Kuppeveld FJM, van den Hurk PJJ, Schrama IWJ, Galama JMD, Melchers WJG. Trans-complementation of a genetic defect in the coxsackie B3 virus 2B protein. *Journal of General Virology*. 2002;83(2):341–50.
33. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*. 2013;53(1):92–107.
34. Wataru Akahata, Zhi-yong Yang, Hanne Andersen, Siyang Sun, Heather A. Holdaway, Wing-Pui Kong, Mark G. Lewis, Stephen Higgs, Michael G. Rossmann SR and GJN, Akahata W, Yang ZY, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, et al. A VLP vaccine for epidemic Chikungunya virus protects non- human primates against infection. *Nat Med*. 2010;16(3):334–8.
35. Mohr CA, Arapovic J, Mühlbach H, Panzer M, Weyn A, Dölken L, et al. A Spread-Deficient Cytomegalovirus for Assessment of First-Target Cells in Vaccination. *Journal of Virology*. 2010;84(15):7730–42.
36. Jorba N, Coloma R, Ortín J. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathogens*. 2009;5(5).
37. Neuman BW, Adair BD, Yeager M, Buchmeier MJ. Purification and electron cryomicroscopy of coronavirus particles. *Methods in Molecular Biology*. 2008;454:129–36.
38. Gray D. Overview of Protein Expression by Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science*. 1997;10(1):1–18.
39. Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Recombinant Gene Expression*. 2004;4(4):15–51.
40. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(8):3173–8.
41. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2004;22(11):1393–8.
42. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malones RW, et al. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*. 2000;29(2):314–31.

43. Plasmids 101: What is a plasmid? [Internet]. [cited 2021 Apr 7]. Available from: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-what-is-a-plasmid>
44. Kroll J, Klintner S, Schneider C, Voß I, Steinbüchel A. Plasmid addiction systems: Perspectives and applications in biotechnology. *Microbial Biotechnology*. 2010;3(6):634–57.
45. Lidonnici MR, Paleari Y, Tiboni F, Mandelli G, Rossi C, Vezzoli M, et al. Multiple Integrated Non-clinical Studies Predict the Safety of Lentivirus-Mediated Gene Therapy for β -Thalassemia. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. 2018;11(December):9–28.
46. Roesler J, Brenner S, Bukovsky AA, Whiting-Theobald N, Dull T, Kelly M, et al. Third-generation, self-inactivating gp91phox lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4381–90.
47. Almazán F, Sola I, Zu S, Marquez-jurado S, Morales L, Becares M, et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
48. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(18):8794–7.
49. Shizuya H, Kouros-Mehr H. MINIREVIEW SERIES FOR THE 50TH VOLUME The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med*. 2001;50(1):26–30.
50. Almazán F, Dediego ML, Galán C, Escors D, Lvarez EA', Ortego J, et al. Construction of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infectious cDNA Clone and a Replicon To Study Coronavirus RNA Synthesis. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2006;80(21):10900–6.
51. Yount B, Curtis KM, Baric RS. Strategy for Systematic Assembly of Large RNA and DNA Genomes: Transmissible Gastroenteritis Virus Model. Vol. 74, *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2000.
52. Scobey T, Yount BL, Sims AC, Donaldson EF, Agnihothram SS, Menachery VD, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 1;110(40):16157–62.
53. Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, Rockx B, Sims AC, Sheahan T, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. 2008.
54. Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, Karikó K. In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides. *Methods in Molecular Biology*. 2013;969:29–42.
55. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines-a new era in vaccinology. Vol. 17, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2018. p. 261–79.

56. Cristina Ballesteros-Briones M, Silva-Pilipich N, Herrador-Cañete G, Vanrell L, Smerdou C. A new generation of vaccines based on alphavirus self-amplifying RNA.
57. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. Vol. 773, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 91–103.
58. Holmen SL, Vanbrocklin MW, Eversole RR, Stapleton SR, Ginsberg LC. EFFICIENT LIPID-MEDIATED TRANSFECTION OF DNA INTO PRIMARY RAT HEPATOCYTES. Vol. 30, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1995.
59. Washbourne P, McAllister AK. Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology*. 2002;12(5):566–73.
60. Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(5):733–53.
61. Inoue T, Krumlauf R. An Impulse to the brain—using in vivo electroporation. *Nature Neuroscience*. 2001;4(11s):1156–8.
62. Lobanova I. Chapter 2 - History of SARS-CoV-2. Qureshi AI, Saeed O, Syed U, editors. *Coronavirus Disease* [Internet]. 2022 [cited 2022 May 23];13–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128244098000072>
63. Latham JR, Wilson AK. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Molecular Plant Pathology* [Internet]. 2008 Jan [cited 2022 May 23];9(1):85. Available from: [/pmc/articles/PMC6640258/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16640258/)
64. Vlaicu O, Selescu T, Pastrama F, Munteanu C, Riva L, Dubuisson J, et al. Novel replicons and trans-encapsidation systems for Hepatitis C Virus proteins live imaging and virus-host interaction proteomics. *J Virol Methods* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 May 23];246:42–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438609/>
65. Grantham ML, McCown MF, Pekosz A. The Influenza A Virus M2 Protein trans-Complementation System Offers a Set of Tools for the Undergraduate Virology Laboratory. *J Microbiol Biol Educ* [Internet]. 2019 Jan [cited 2022 May 23];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31160927/>
66. Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. Identification of the Mechanisms Causing Reversion to Virulence in an Attenuated SARS-CoV for the Design of a Genetically Stable Vaccine. *PLoS Pathog* [Internet]. 2015 [cited 2022 May 23];11(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26513244/>
67. Gutiérrez-Álvarez J, Honrubia JM, Sanz-Bravo A, González-Miranda E, Fernández-Delgado R, Rejas MT, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccine based on a propagation-defective RNA replicon elicited sterilizing immunity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021 Oct 26 [cited 2022 May 23];118(43). Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.2111075118>

68. Zhang X, Liu Y, Liu J, Bailey AL, Plante KS, Plante JA, et al. A trans -complementation system for SARS-CoV-2. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Jan 19 [cited 2022 May 23]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33501436/>
69. Ju X, Zhu Y, Wang Y, Li J, Zhang J, Gong M, et al. A novel cell culture system modeling the SARS-CoV-2 life cycle. *PLoS Pathog* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 May 23];17(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33711082/>
70. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczyk A, et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021 Jul 20;9:634.
71. Sun D, Shi H, Guo D, Chen J, Shi D, Zhu Q, et al. Analysis of protein expression changes of the Vero E6 cells infected with classic PEDV strain CV777 by using quantitative proteomic technique. *Journal of Virological Methods*. 2015 Jun 15;218:27–39.
72. Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, et al. Whole-Genome Sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and Comparative Analysis of Four Vero Cell Sublines. *Frontiers in Genetics*. 2022 Mar 22;13:276.
73. Terkis S, Pavel I, Yetiskin H, Aydin G, Holyavkinid C, Uygut A, et al. Isolation and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Turkey. 2020 [cited 2022 May 23]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238614>
74. Barreto-Vieira DF, da Silva MAN, de Almeida ALT, Rasinhas A da C, Monteiro ME, Miranda MD, et al. SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an In Vitro System. *Viruses* 2022, Vol 14, Page 201 [Internet]. 2022 Jan 20 [cited 2022 May 23];14(2):201. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/201/htm>
75. Zhang H, Fischer DK, Shuda M, Moore PS, Gao SJ, Ambrose Z, et al. Construction and characterization of two SARS-CoV-2 minigenome replicon systems. *J Med Virol* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2022 May 23];94(6):2438–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35137972/>
76. Jin YY, Lin H, Cao L, Wu WC, Ji Y, Du L, et al. A Convenient and Biosafe Replicon with Accessory Genes of SARS-CoV-2 and Its Potential Application in Antiviral Drug Discovery. *Virol Sin* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 May 23];36(5):913–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33999369/>
77. elade JM, eraldine Piorkowski G, Touret F, Fouri T, elim Driouich JS, Cochin M, et al. A simple reverse genetics method to generate recombinant coronaviruses. *EMBO Rep* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2022 May 23];23(5):e53820. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.15252/embr.202153820>