

El SARS-CoV-2 se propaga a través de la transmisión de célula a célula

Cong Zeng, Eugene M. Oltz, Marcos E. Peeplesy, SeanP. J. Whelan, JuanP. Evans, Tiffany King, Yi-Min Zheng, Linda J. Saif, Shan-Lu Liu
[Ver todo autores y afiliaciones](#)

PNAS 4 de enero de 2022 119 (1) e2111400119; <https://doi.org/10.1073/pnas.2111400119>

1. Editado por Peter Palese, Microbiología, Escuela de Medicina Icahn en Mount Sinai, Nueva York, NY; recibido el 20 de junio de 2021; aceptado noviembre 29, 2021

- [Artículo](#)
- [Figuras & SI](#)
- [Información y métricas](#)
- [PDF](#)

Importancia

Actualmente se desconoce si el SARS-CoV-2 puede propagarse a través de los contactos célula-célula y, de ser así, los mecanismos e implicaciones subyacentes. En este trabajo, demostramos, mediante el uso de virus pseudotipados lentivirales, que la proteína espiga del SARS-CoV-2 media la transmisión viral de célula a célula, con una eficiencia superior a la del SARS-CoV. También encontramos que la fusión célula-célula contribuye a la transmisión de célula a célula, sin embargo, ACE2 no es absolutamente necesario. Si bien las variantes auténticas de preocupación (COV) B.1.1.7 (alfa) y B.1.351 (beta) difieren en la infectividad libre de células del tipo salvaje y entre sí, estos COV tienen una capacidad de transmisión de célula a célula similar y exhiben una sensibilidad diferencial a la neutralización por sueros de vacunas. Los resultados de nuestro estudio contribuirán a una mejor comprensión de la propagación y patogénesis del SARS-CoV-2.

Abstracto

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) es un coronavirus altamente transmisible responsable de la pandemia mundial de COVID-19. Aquí, proporcionamos evidencia de que el SARS-CoV-2 se propaga a través del contacto célula-célula en cultivos, mediado por la glicoproteína espiga. El pico del SARS-CoV-2 es más eficiente para facilitar la transmisión de célula a célula que el pico del SARS-CoV, que refleja, en parte, su actividad diferencial de fusión célula-célula. Curiosamente, el

tratamiento de células cocultivadas con inhibidores de la entrada endosomal perjudica la transmisión de célula a célula, implicando la fusión de la membrana endosomal como un mecanismo subyacente. En comparación con la infección libre de células, la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 es refractaria a la inhibición mediante anticuerpos neutralizantes o sueros convalecientes de pacientes con COVID-19. Si bien la enzima convertidora de angiotensina 2 mejora la transmisión de célula a célula, encontramos que no es absolutamente necesaria. En particular, a pesar de las diferencias en la infectividad libre de células, las variantes auténticas de preocupación (COV) B.1.1.7 (alfa) y B.1.351 (beta) tienen una capacidad de transmisión de célula a célula similar. Además, B.1.351 es más resistente a la neutralización por sueros vacunados en la infección libre de células, mientras que B.1.1.7 es más resistente a la inhibición por sueros vacunados en la transmisión de célula a célula. En general, nuestro estudio revela características críticas de la transmisión de célula a célula mediada por picos del SARS-CoV-2, con implicaciones importantes para una mejor comprensión de la propagación y patogénesis del SARS-CoV-2.

Variantes

- [preocupantes de](#)
 - [neutralización](#)
-

de la fusión célula

- [a célula de transmisión célula-célula del SARS-CoV-2](#)
-

- -
-

El SARS-CoV-2 es un nuevo beta-coronavirus que está estrechamente relacionado con otros dos coronavirus humanos altamente patógenos, el SARS-CoV y el MERS-CoV (1). Las proteínas espiga (S) del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV median la entrada en las células diana, y ambas utilizan la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor primario (2↓↓↓-6). La proteína espiga del SARS-CoV-2 también es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, desempeñando así un papel crítico en la inmunidad del huésped a la infección viral (7↓↓-10).

Al igual que el VIH y otras proteínas de fusión viral de clase I, el pico del SARS-CoV-2 se sintetiza como un precursor que posteriormente se escinde y se glicosila altamente;

estas propiedades son críticas para regular la activación de la fusión viral, la estructura de espiga nativa y la evasión de la inmunidad del huésped (11↓↓↓–15). Sin embargo, a diferencia del SARS-CoV, pero similar al MERS-CoV, la proteína espiga del SARS-CoV-2 es escindida por la furina en subunidades S1 y S2 durante el proceso de maduración en las células productoras (6, 16, 17). S1 es responsable de la unión al receptor ACE2, mientras que S2 media la fusión de la membrana viral (18, 19). El pico del SARS-CoV-2 también puede ser escindido por proteasas adicionales del huésped, incluida la serina proteasa 2 transmembrana (TMPRSS2) en la membrana plasmática y varias cathepsinas en el endosoma, que facilitan la fusión de la membrana viral y la entrada en las células huésped (20↓↓–22).

Los virus envueltos se propagan en células y tejidos cultivados a través de dos vías: por partículas libres de células y a través del contacto célula-célula (23↓↓–26). Este último modo de transmisión viral normalmente implica contactos célula-célula apretados, a veces formando sinapsis virológicas, donde la densidad de partículas virales locales aumenta (27), lo que resulta en una transferencia eficiente del virus a las células vecinas (24). Además, la transmisión de célula a célula tiene la capacidad de evadir la neutralización de anticuerpos, lo que representa la propagación eficiente del virus y la patogénesis, como se ha demostrado para el VIH y el virus de la hepatitis C (VHC) (28↓↓↓–32). Se han notificado niveles bajos de anticuerpos neutralizantes, así como una deficiencia en los IFN de tipo I, para el SARS-CoV-2 (18, 33↓↓↓–37) y pueden haber contribuido a la pandemia de COVID-19 y la progresión de la enfermedad (38↓↓↓ ↓↓–43).

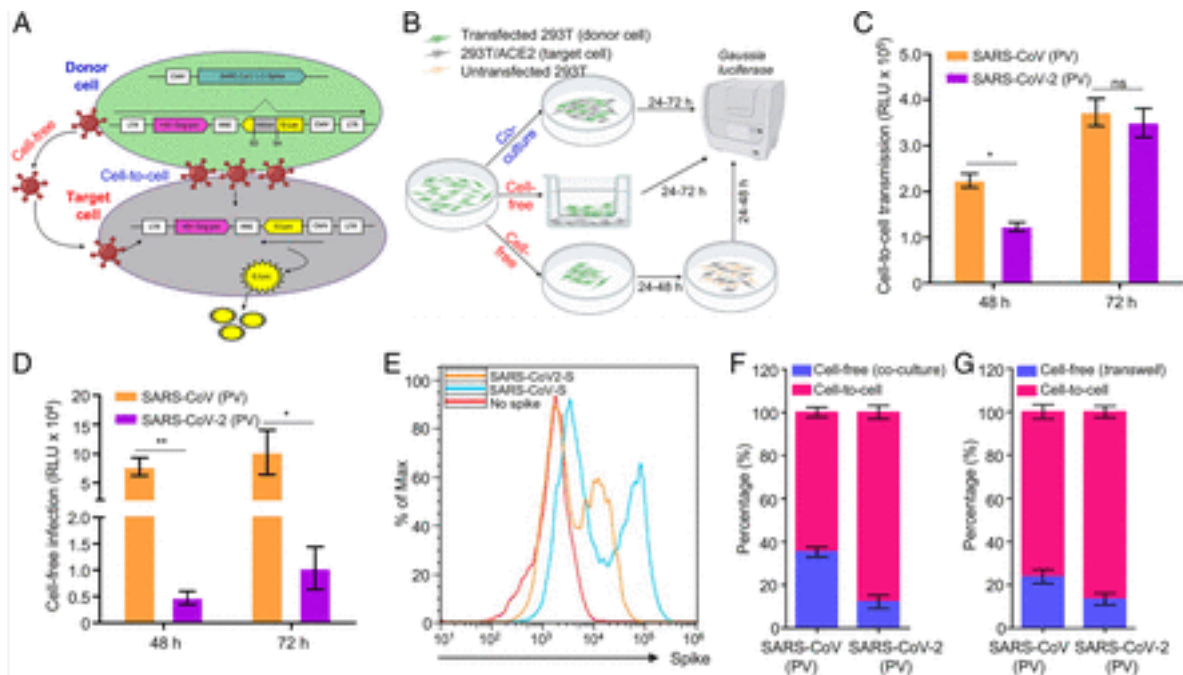
En este trabajo, evaluamos la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 en el contexto de la infección libre de células y en comparación con el SARS-CoV. Los resultados de este estudio in vitro revelan el papel hasta ahora no reconocido de la transmisión de célula a célula que potencialmente afecta la propagación del SARS-CoV-2, la patogénesis y el blindaje contra los anticuerpos in vivo.

Resultados

La proteína espiga del SARS-CoV-2 media eficientemente la transmisión de célula a célula de pseudotipos lentivirales.

El pico es la única proteína transmembrana viral que media directamente la entrada del SARS-CoV-2 en las células huésped. Evaluamos si la proteína espiga del SARS-CoV-2 es crítica para la propagación viral a través del contacto célula-célula. Para comparar la eficiencia de la infección de célula a célula frente a la infección libre de células mediada por las proteínas espiga del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV, aprovechamos un vector lentiviral VIH-1 intrón-Gaussia luciferasa (inGluc) que lleva el pico de interés. En este sistema, las células que producen los viriones lentivirales inGluc que llevan la proteína espiga no pueden expresar Gluc por sí mismas porque el intrón solo se elimina durante el empalme del genoma del virión transcrito del genoma integrado y no durante la producción de ARNm de Gluc. Sin embargo, cuando ese pseudotipo de lentivirus entra en una célula diana, ese genoma se transcribe inversamente y se integra en una nueva célula, y el promotor del citomegalovirus impulsa la transcripción de la transcripción de Gluc ahora sin intrón que conduce a la producción de proteínas gluc (44, 45). Medimos

la actividad de Gluc como una lectura para comparar las eficiencias de infección de células a célula y libre de células (Fig. 1 A y B y *Materiales y Métodos*). Debido a que la infección mediada por contacto celular comprende tanto la transmisión de célula a célula como la infección libre de células, calculamos la eficiencia de la transmisión de célula a célula restando la porción de infección libre de células realizada en paralelo (*Materiales y Métodos*).



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

• [Descargar powerpoint](#)

Figura 1.

La proteína espiga del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV media la transmisión de célula a célula de los pseudotipos lentivirales del VIH-1. (A y B) Representaciones esquemáticas de ensayos de infección de célula a célula y libres de células (ver detalles en *Materiales y Métodos*). Brevemente, los pseudotipos lentivirales basados en inGluc que llevan pico se produjeron en células 293T, que fueron cocultivadas con las células diana (293T/ACE2) para la transmisión de célula a célula; la actividad de Gluc de las células cocultivadas se midió a lo largo del tiempo (A). La infección libre de células se realizó mediante la recolección del virus del mismo número de células productoras, seguida de la infección de células diana 293T/ACE2 en presencia del mismo número de células 293T no transfectadas; alternatively, la infección libre de células se llevó a cabo en placas

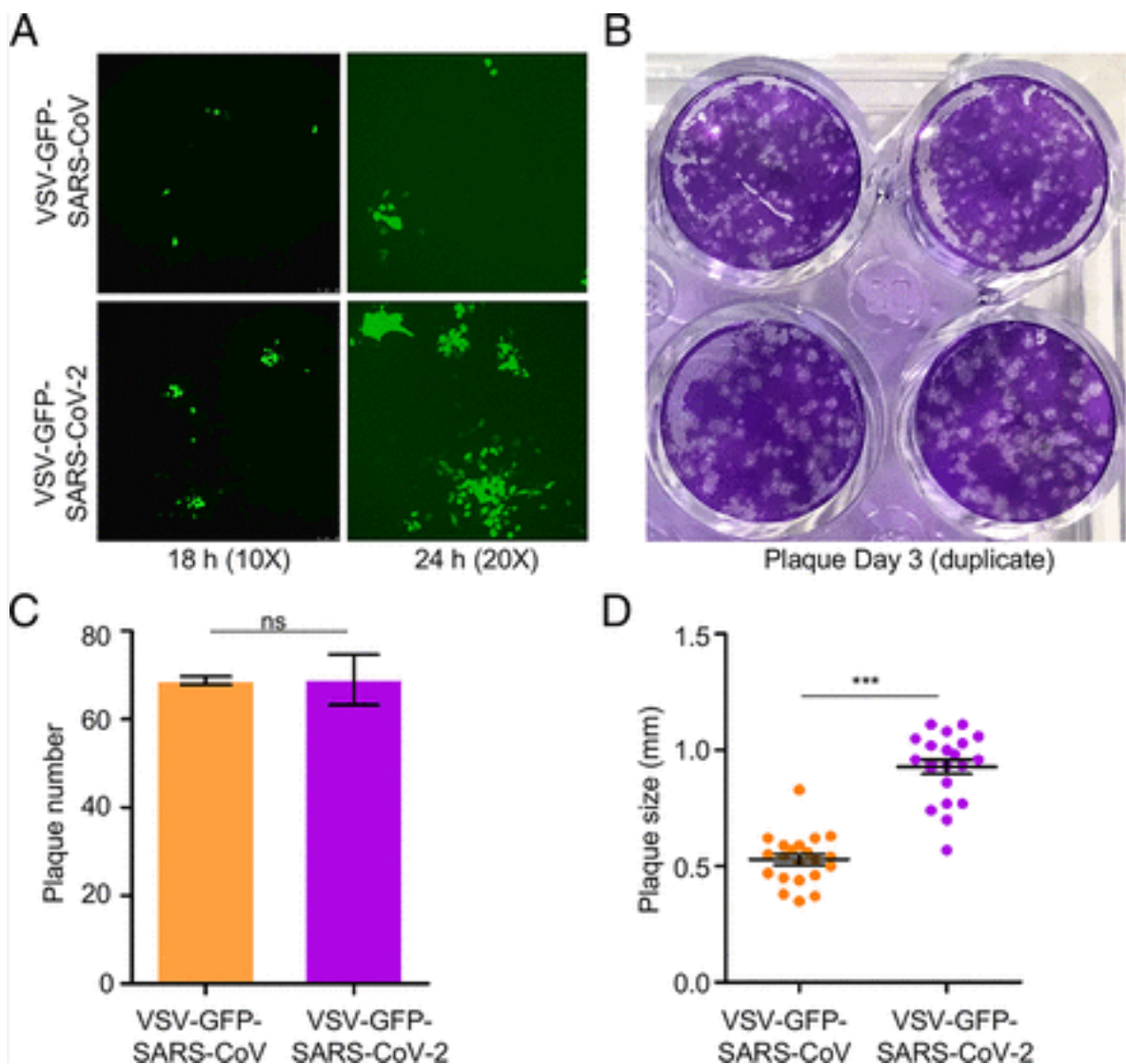
de Transwell, a partir de las cuales se midió la actividad de Gluc (B). (C) Comparación de la transmisión de célula a célula mediada por el pico del SARS-CoV-2 o del SARS-CoV. Los resultados mostrados fueron de seis experimentos independientes, con infección libre de células medida a las 48 y 72 h después del cocultivo; se excluyó la porción de infección libre de células ($n = 6$). (D) Comparación de la infección libre de células mediada por el pico de SARS-CoV-2 o SARS-CoV. Los resultados fueron de seis experimentos independientes ($n = 6$). (E) El nivel de expresión de proteínas espiga en la membrana plasmática de las células donantes se midió mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal T62, que detecta tanto el SARS-CoV-2 como el SARS-CoV. (F y G) Las proporciones calculadas entre la infección de célula a célula y la infección libre de células mediada por el pico de SARS-CoV-2 o SARS-CoV-2. Los resultados del cocultivo celular se muestran en F y de las placas de Transwell que se muestran en G ($n = \sim 3$ a 6). PV, virus pseudotipado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. ns, no significativo.

A pesar de un nivel 2 veces menor de transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 en comparación con el SARS-CoV después de 48 h de cocultivación de células productoras de pseudotipos lentivirales portadoras de espigas y células 293T que expresan de manera estable ace2 humana (293T/ACE2), observamos niveles similares de transmisión de célula a célula entre sars-CoV-2 y SARS-CoV en 72 h, lo que indica una propagación más eficiente del SARS-CoV-2 (Fig. 1C). Por el contrario, la tasa de infección libre de células por SARS-CoV fue mucho mayor que la del SARS-CoV-2, es decir, ~ 10 veces, medida a las 48 y 72 h después de la infección (Fig. 1D). El análisis citométrico de flujo de células productoras virales utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce el S1 de los picos de SARS-CoV-2 y SARS-CoV mostró que la señal de fluorescencia del pico de SARS-CoV fue mayor que la del SARS-CoV-2 (Fig. 1E), de acuerdo con nuestro informe anterior (46). Al promediar los resultados de seis experimentos independientes, estimamos que la transmisión de célula a célula contribuyó al $>90\%$ de la propagación total del SARS-CoV-2 en el sistema de cocultivación, en comparación con $\sim 60\%$ para el SARS-CoV realizado en entornos experimentales idénticos (Fig. 1F). También se realizaron experimentos paralelos mediante el uso de un sistema Transwell, que mostró $\sim 90\%$ de infección de célula a célula frente a $\sim 10\%$ de infección libre de células para el SARS-CoV-2 en comparación con $\sim 77\%$ de célula a célula frente a $\sim 23\%$ libre de células para el SARS-CoV (Fig. 1G). En conjunto, estos resultados revelaron que la proteína espiga del SARS-CoV-2 media la transmisión de célula a célula de los pseudotipos lentivirales de manera más eficiente que la proteína espiga del SARS-CoV. Sin embargo, el pico de SARS-CoV es más capaz de mediar la infección libre de células en comparación con el SARS-CoV-2 en el sistema de pseudotipado lentiviral.

El virus de la estomatitis vesicular recombinante (rVSV) que expresa el pico de SARS-CoV-2 se propaga más rápido que el pico de SARS-CoV que contiene rVSV.

A continuación, comparamos la infección de propagación del rVSV competente para la replicación que expresa el pico de SARS-CoV-2 o SARS-CoV. Este sistema se ha utilizado previamente para estudiar la transmisión de célula a célula del Ebolavirus (EBOV) mediada por la glicoproteína (GP) (30). Las células vero se inocularon con una multiplicidad relativamente baja de infección (MOI) (0,01) de rVSV expresando GFP y

brote de SARS-CoV-2 en lugar de la proteína VSV G (rVSV-GFP-SARS-CoV-2) o el pico de SARS-CoV (rVSV-GFP-SARS-CoV) (47). Las células se superpusieron con metilcelulosa al 1% para bloquear la difusión viral, y el número y el tamaño de las placas GFP positivas se tiñeron y determinaron mediante microscopía de fluorescencia. A pesar de un número similar de placas GFP positivas entre el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV, que confirmaron inoculaciones equivalentes, los tamaños de las placas del SARS-CoV-2 fueron notablemente mayores, según lo inspeccionado a las 18 y 24 h después de la infección(Fig. 2 A y B). Los análisis cuantitativos de los datos a las 72 h mostraron que el tamaño de las placas de SARS-CoV-2 (diámetro $0,93 \pm 0,03$ mm) era aproximadamente dos veces mayor que el del SARS-CoV (diámetro $0,53 \pm 0,02$ mm), mientras que los números de placa entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV eran comparables(Fig. 2 C y D).



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

- [Descargar powerpoint](#)

Figura 2.

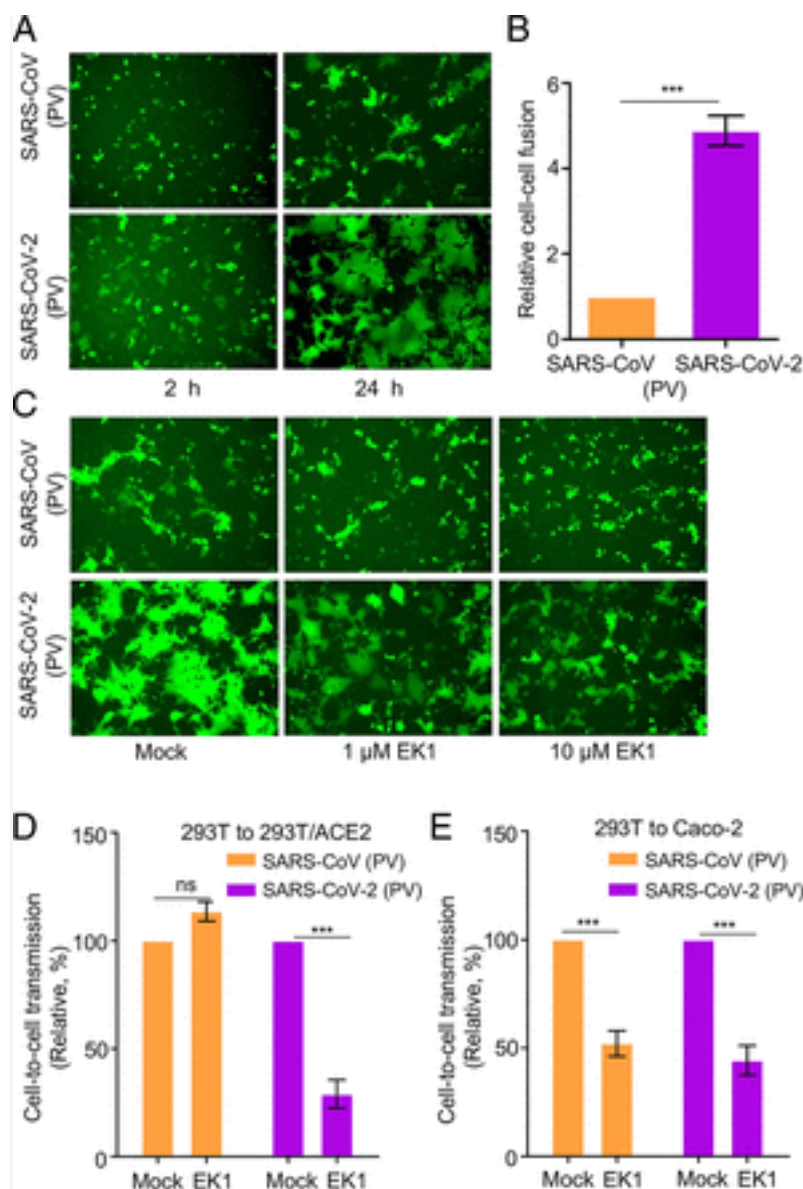
El rVSV que expresa el pico del SARS-CoV-2 se propaga más rápido que el pico del SARS-CoV que lleva el rVSV. Las células Vero-E6 fueron infectadas con rVSV-GFP-SARS-CoV-2 o SARS-CoV (MOI = 0,01); 1 h después de la infección, las células se lavaron con PBS y se cultivaron en presencia de metilcelulosa al 1%. Las fotos fueron tomadas a las 18 h y 24 h (A). Después de 72 h de infección, las células se fijaron con 3,7% de paraformaldehído (PFA) y se tiñeron con cristal violeta (B). El número y el tamaño de las placas se trazan en C y D, respectivamente. $P < 0,001$. ns, no significativo.

A continuación, intentamos visualizar la transmisión de célula a célula de rVSV-GFP-SARS-CoV-2 mediante la transferencia de colorantes fluorescentes por imágenes en células cocultivadas, ya sea en presencia de metilcelulosa o anticuerpo monoclonal 2B04 contra el pico de SARS-CoV-2. En este experimento, las células Vero del donante se infectaron con rVSV-GFP-SARS-CoV-2 en diferentes MOI y posteriormente se cocultivaron con células Vero objetivo que expresan de manera estable mTomato (Vero-mTomato-Red). Se detectó una transmisión eficiente mediante microscopía de fluorescencia, así como por citometría de flujo a las 6 h, con un 23,9% de poblaciones celulares doblemente positivas (Apéndice SI, Fig. S1 A y B). El tratamiento de células cocultivadas con metilcelulosa, que se ha encontrado que previene la infección libre de células al reducir drásticamente la difusión de viriones entre las células (24), o 2B04 que inhibe potentemente la infección libre de células (46), redujo la transmisión de célula a célula a 12,7% y 5,38%, respectivamente. Combinando los resultados de múltiples experimentos independientes, estimamos que ~50% de la infección total provino de la transmisión de célula a célula, que todavía estaba parcialmente bloqueada por 2B04 (Apéndice SI, Fig. S1C). Experimentos similares realizados en paralelo para rVSV-GFP-SARS-CoV mostraron una inhibición más fuerte por metilcelulosa (~65%), lo que sugiere una infección libre de células más eficiente de rVSV-GFP-SARS-CoV en comparación con la del SARS-CoV-2. Es importante destacar que 2B04 no tuvo ningún efecto sobre la infección de célula a célula o libre de células de rVSV-GFP-SARS-CoV como se esperaría ya que 2B04 no reacciona de forma cruzada con el SARS-CoV (Apéndice SI, Fig. S1 D–F) (46, 48). En conjunto, estos resultados demostraron que, al igual que los pseudotipos lentivirales, la proteína espiga del SARS-CoV-2 media de manera más eficiente la transmisión de célula a célula de rVSV-GFP que el SARS-CoV.

La mayor actividad de fusión célula-célula del pico de SARS-CoV-2 contribuye a la transmisión eficiente de célula a célula del virus pseudotipado.

A continuación, exploramos si la fusión célula-célula por el pico de SARS-CoV-2 juega un papel en la transmisión de célula a célula. Con este fin, cotransfectamos células 293T con plásmidos que expresan el vector lentiviral inGluc, el pico SARS-CoV-2 o SARS-CoV y GFP. Las células productoras transfectadas fueron cocultivadas con células objetivo 293T/ACE2; la formación de sincitios y la transmisión de célula a célula se midieron a lo largo del tiempo. Después de ~2 h de cocultivación, observamos sincitios pequeños

pero aparentes para SARS-CoV-2, pero sin formación de sincitios para SARS-CoV(Fig. 3A). A las 24 h siguientes a la coculturización, se observó más formación de sincitia, con tamaños más grandes, en células que expresaban un pico de SARS-CoV-2, mientras que se observaron menos y más pequeñas sincitias para el SARS-CoV(Fig. 3A). La diferencia entre el SARS-CoV-2 y la fusión célula-célula inducida por picos del SARS-CoV se evaluó aún más mediante un ensayo de fusión más cuantitativo, basado en Tet-off, que mostró una actividad de fusión aproximadamente cinco veces mayor del SARS-CoV-2 en comparación con la del SARS-CoV(Fig. 3B).



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

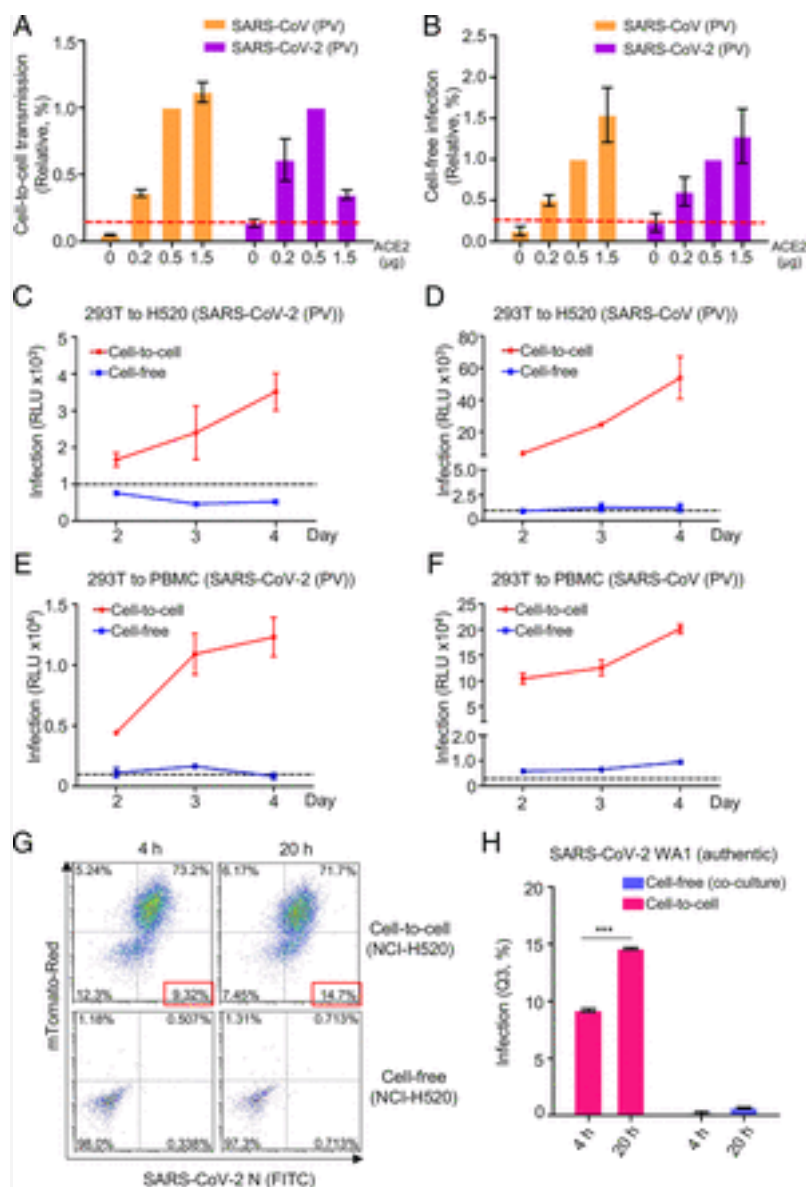
Figura 3.

La fusión célula-célula mediada por el sars-CoV y el pico del SARS-CoV-2 contribuye a la transmisión de célula a célula. (A) Formación de Syncytia mediada por el pico de SARS-CoV-2 o SARS-CoV. Las células donantes de 293T fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican el sars-CoV-2 o el pico del SARS-CoV, el vector lentiviral NL4-3 inGluc y la eGFP. Después de 24 h después de la transfección, las células donantes se cocultivaron con células objetivo 293T / ACE2 en una proporción de 1: 1, con fusión monitoreada a lo largo del tiempo y fotos tomadas después de 2 h y 24 h, respectivamente. (B) Cuantificación de la fusión célula-célula. Las células 293T fueron transfectadas con plásmidos que codifican tet-off o SARS-CoV o SARS-CoV-2 pico y cocultivadas con células objetivo 293FT-mCAT-Gluc, que fueron transfectadas con un plásmido que expresa ACE2; La actividad glucética se midió a partir del sobrenadante de células cocultivadas a las 24 h y 48 h, respectivamente. La fusión relativa se trazó estableciendo la actividad de fusión del SARS-CoV como 1.0. (C–E) El inhibidor defusión EK1 inhibe la fusión célula-célula del pico del SARS-CoV-2, de acuerdo con su efecto sobre la transmisión de célula a célula. Efecto de EK1 sobre la formación de sincitios inducida por el pico de SARS-CoV-2 (C); las fotos fueron tomadas a las 24 h. Efectos de EK1 sobre la infección por SARS-CoV-2 o SARS-CoV de 293T a 293T/ACE2 (D) o de 293T a Caco-2 (E). Las células donantes transfectadas de 293T se cocultivaron con células 293T/ACE2 o Caco-2 en presencia o ausencia de 10 μ M EK1, y la actividad de Gluc se midió a las 24 a 72 h después del cocultivo. Los resultados de tres a seis experimentos independientes se promediaron y trazaron como valores relativos estableciendo el control simulado como 100% ($n = \sim 3$ a 6). PV, virus pseudotipado. $P < 0,001$. ns, no significativo.

A continuación, tratamos células cocultivadas con un inhibidor del péptido de fusión pan-coronavirus EK1 que se ha demostrado que inhibe la fusión de SARS-CoV-2, SARS-CoV y otros CoV relacionados (49, 50), y simultáneamente medimos su efecto sobre la fusión célula-célula y la transmisión de célula a célula. La formación de sincitia del SARS-CoV-2 fue fuertemente inhibida por EK1 (Fig. 3C), de acuerdo con su efecto sobre la transmisión de célula a célula (Fig. 3D). Inesperadamente, aunque EK1 inhibió la capacidad del pico de SARS-CoV para inducir sincitia pequeña, no encontramos una inhibición obvia de EK1 en la transmisión de célula a célula mediada por picos de SARS-CoV (Fig. 3 C y D). Para investigar si estos resultados dependían del tipo celular, realizamos experimentos similares utilizando Caco-2 epitelial del intestino humano como células diana y encontramos que EK1 de hecho inhibió la transmisión de célula a célula tanto del SARS-CoV-2 como del SARS-CoV (Fig. 3E). En general, estos resultados apoyan el concepto de que la actividad de fusión célula-célula del pico de SARS-CoV-2 y SARS-CoV contribuye a la transmisión de célula a célula, de una manera dependiente del tipo de célula, y que la formación extensa de sincitia podría conducir a la muerte celular y, por lo tanto, disminuir la eficiencia de transmisión en la etapa tardía de los procesos.

ACE2 mejora pero no es necesario para la transmisión de célula a célula.

ACE2 es el receptor primario tanto del SARS-CoV-2 como del SARS-CoV, mediando la entrada viral en las células huésped. A continuación, evaluamos el papel de ACE2 en la transmisión de célula a célula en comparación con la infección libre de células. Observamos un aumento de la infección de célula a célula y libre de células cuando se transfectó más plásmido que codifica ACE2 en las células 293T objetivo, como era de esperar(**Fig. 4 A y B**). Curiosamente, con una dosis relativamente baja de ACE2 (es decir, 0,2 μ g), el SARS-CoV-2 alcanzó ~70% de su transmisión máxima de célula a célula (a 0,5 μ g de ACE2). Por el contrario, el SARS-CoV mostró ~30% de transmisión máxima de célula a célula a 1,5 μ g ace2(**Fig. 4 A y B**). En particular, cuando la dosis más alta de ACE2 (1,5 μ g) se transfectó en las células diana, observamos consistentemente una disminución de la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 en comparación con una tendencia en continuo aumento para el SARS-CoV(**Fig. 4 A y B**). Este patrón de transmisión de célula a célula fue diferente del de la infección libre de células, donde tanto el SARS-CoV-2 como el SARS-CoV exhibieron un aumento, con cinética similar, de una manera estrictamente dependiente de la dosis de ACE2(**Fig. 4 A y B**). Se confirmó la expresión de ACE2 en células diana mediante citometría de flujo y Western blotting (*Apéndice SI, Fig. S2 A y B*). Consistente con el aumento de la expresión de ACE2 en las células diana, observamos un aumento en el tamaño de la formación de sincitios para el SARS-CoV-2, pero la fusión célula-célula por el SARS-CoV no fue evidente(*Apéndice SI, Fig. S2C*). La formación de sincitia gigante a 1,5 μ g de ACE2 resultó en la muerte celular, lo que podría haber contribuido a la disminución de la transmisión de célula a célula para el SARS-CoV-2(*Apéndice SI, Fig. S2C*). En general, estos resultados indican que ACE2 mejora la transmisión de célula a célula tanto del SARS-CoV-2 como del SARS-CoV en el sistema de pseudotipado lentiviral, sin embargo, el primero requiere menos ACE2 para que ocurra el proceso.



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

• [Descargar powerpoint](#)

Figura 4.

ACE2 mejora la transmisión de célula a célula, pero no es absolutamente necesario. (A y B) La infección de célula a célula y libre de células se realizó como se describe para [las Figs. 1 y 3](#), excepto que las células diana fueron transfectadas 293T con diferentes cantidades de un plásmido que codifica ACE2. Las tasas relativas de transmisión de célula a célula e infección libre de células se calcularon estableciendo los valores de 0,5

μg de ACE2 a 1,0 (A y B, $n = 3$). (C–F) Los experimentos se llevaron a cabo como se describe para las [Figs. 1 y 3](#), excepto que las células diana eran H520 y PBMC humanos ($n = 3$ para cada uno). (G) Los glóbulos Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato (Rojo) se infectaron con MOI = 0,01 de SARS-CoV-2 WT auténtico (USA-WA1/2020) durante 18 h, seguido de la cocultiva de las células NCI-H520 del donante durante otras 4 h o 20 h. Las células se fijaron y teñieron con una proteína anti-SARS-CoV-2 N para el análisis citométrico de flujo. El mismo número de células NCI-H520 se infectaron con el WT SARS-CoV-2 extraído de las células Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato del donante infectado por SARS-CoV-2 durante 4 h o 20 h para la infección libre de células y analizado por citometría de flujo. (H) Se trazaron los resultados de los análisis del cuadrante Q3. $P < 0,001$. PV, virus pseudotipado.

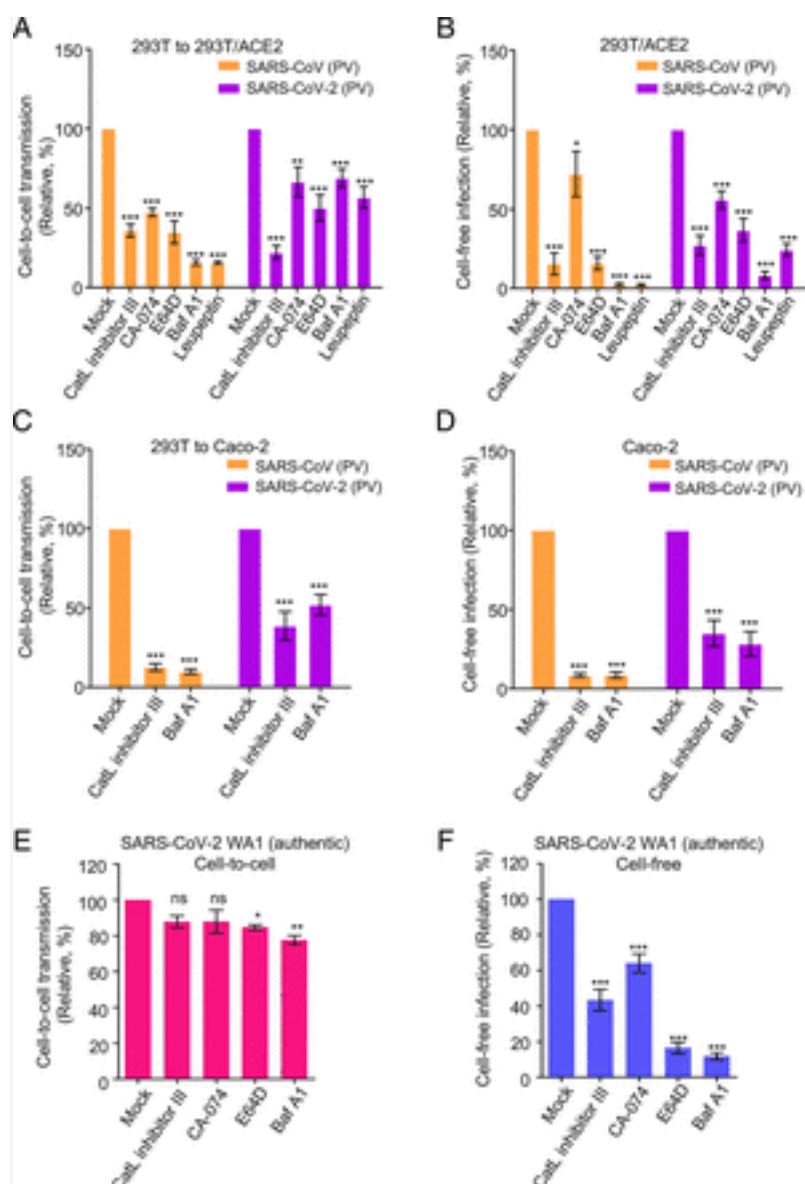
Además, exploramos si la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 puede ocurrir en ausencia de expresión de ACE2 en las células diana. Primero utilizamos NCI-H520, una línea celular epitelial pulmonar humana que expresa un nivel extremadamente bajo de ACE2 ([Apéndice SI, Fig. S2D](#)). La transmisión de célula a célula se detectó en el día 2, que continuó aumentando hasta el día 4. Por el contrario, no se detectó infección libre de células en las células NCI-H520 durante todo el período 3-d ([Fig. 4C](#)). También se observó transmisión de célula a célula para el SARS-CoV en células H520, a un nivel más alto que el del SARS-CoV-2; pero de nuevo, al igual que el SARS-CoV-2, la infección no/baja libre de células fue detectable ([Fig. 4D](#)). A continuación, probamos células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), que no expresan ACE2 ([Apéndice SI, Fig. S2D](#)), y observó una aparente transmisión de célula a célula tanto para el SARS-CoV como para el SARS-CoV-2, sin embargo, no se detectó una infección libre de células baja, siendo esta última consistente con los resultados publicados recientemente ([51](#)) ([Fig. 4 E y F](#)). Como control, realizamos transmisión de célula a célula e infección libre de células en Calu-3, una línea celular epitelial pulmonar humana que expresa un mayor nivel de ACE2 ([Apéndice SI, Fig. S2D](#)). Se observó un rápido aumento en la transmisión de célula a célula para el SARS-CoV-2 desde el día 2 hasta el día 4, a pesar de un nivel general de infección por sars-CoV que fue más alto que el observado para el SARS-CoV-2 ([Apéndice SI, Fig. S2 E y F](#)). Juntos, estos resultados demostraron que la transmisión de célula a célula de pseudotipos lentivirales portadores de SARS-CoV-2 o sars-CoV puede ocurrir en ausencia de ACE2.

A continuación, examinamos la infección de célula a célula de células H520 con bajo ACE2 utilizando SARS-CoV-2 auténtico en condiciones de nivel de bioseguridad 3 (BSL3). Infectamos células Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato con SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020), que sirvieron como células donantes, y las cocultivamos con células diana H520 durante diferentes períodos de tiempo. La eficiencia de la infección de célula a célula se determinó mediante la detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en células H520 mediante citometría de flujo. Paralelamente, también se analizó la infección libre de células H520. A las 4 y 20 h siguientes a la cocultivación, observamos que entre el 9,32 y el 14,7% de las células H520 resultaron positivas para la proteína N del SARS-CoV-2, mientras que menos del 1% de las células H520 fueron positivas en la infección libre de

células(**Fig. 4 G y H** y Apéndice *SI, Fig. S2G*). Estos resultados indicaron que el auténtico SARS-CoV-2 puede infectar células H520 expresando un nivel muy bajo de ACE2.

La transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 implica la entrada endosomal.

El SARS-CoV-2 utiliza diferentes vías de entrada, ya sea en la membrana plasmática y/o en el compartimento endosomal (**20, 52**–**56**). Si bien nuestros resultados indicaron que la entrada a través de la membrana plasmática es importante para la transmisión de célula a célula, investigamos si la fusión en el compartimento endosomal también puede estar involucrada. Aplicamos en paralelo un panel de inhibidores endosomales a los ensayos de infección de célula a célula y libre de células. Encontramos que el inhibidor de la cathepsina L III, el inhibidor de la cathepsina B CA-074, E-64d (inhibidor general de la cathepsina), BafA1 (inhibidor de la bomba ATPasa) y la leupeptina (inhibidor general de la proteasa), todos inhibieron significativamente la transmisión de célula a célula(**Fig. 5A**). Curiosamente, el efecto de estos fármacos sobre el SARS-CoV-2 fue generalmente menos potente en comparación con el SARS-CoV, con la excepción del inhibidor de la cathepsina L III(**Fig. 5A**). Además, estos fármacos generalmente mostraron un efecto más fuerte sobre la infección libre de células, de nuevo especialmente para el SARS-CoV(**Fig. 5B**). Cabe destacar que CA-074 tuvo efectos modestos en ambos virus(**Fig. 5B**), lo que fue consistente con la noción de que la cathepsina B no juega un papel significativo en la escisión de la proteína espiga del SARS-CoV y el SARS-CoV-2, que se requiere para la fusión (**57, 58**). También aplicamos estos inhibidores a los ensayos de fusión célula-célula, pero no encontramos ningún efecto sobre el SARS-CoV-2 o el SARS-CoV, como era de esperar(*Apéndice SI, Fig. S3*). Para evaluar los posibles efectos dependientes del tipo celular, realizamos experimentos con células diana de Caco-2 y encontramos que el inhibidor de la cathepsina L III y BafA1 inhibieron de manera robusta la transmisión de célula a célula y la infección libre de células de ambos virus, en particular el SARS-CoV(**Fig. 5 C y D**). En general, estos resultados apoyan la idea de que la entrada endosomal está involucrada en la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 y, en mayor medida, del SARS-CoV de los pseudotipos lentivirales.



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

• [Descargar powerpoint](#)

Figura 5.

La vía de entrada endosomal está involucrada en la transmisión de célula a célula. Efecto de los inhibidores de la entrada endosomal sobre la infección de célula a célula y libre de células por SARS-CoV-2 y SARS-CoV. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en [la Fig. 1 C y D](#), excepto que los inhibidores indicados estuvieron presentes durante el período de infección. Las concentraciones de inhibidores utilizados fueron las

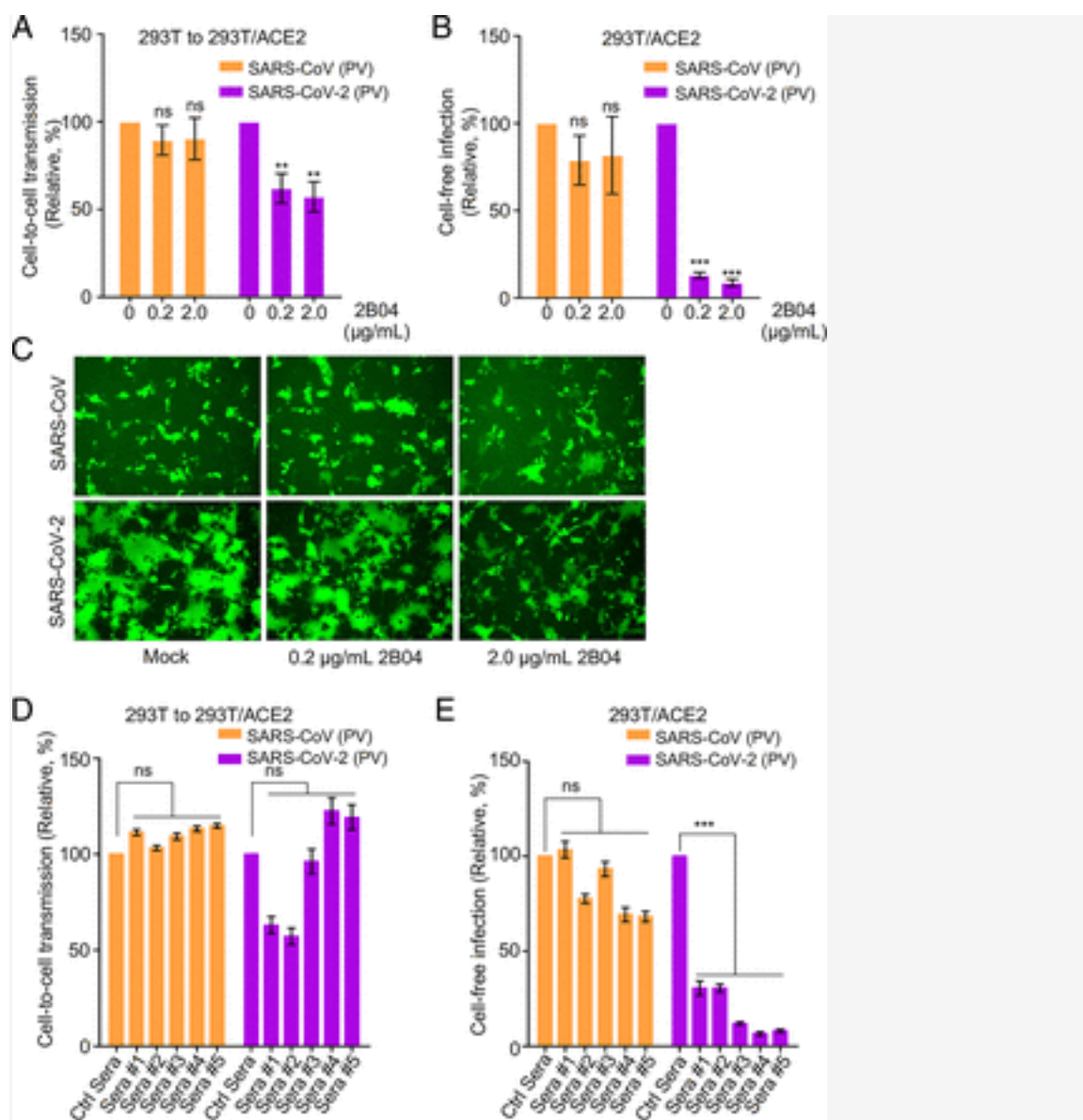
siguientes: 1 μ M o 5 μ M Cat L inhibidor III, 1 μ M o 5 μ M CA-074, 10 μ M o 30 μ M E-64D, 25 nM o 50 nM BafA1, y 20 μ M o 50 μ M leupeptina. (A y B) Efecto en células 293T. (C y D) Efecto en células Caco-2. En todos los experimentos, la actividad de Gluc se midió a las 48 y 72 h después de la infección, y las tasas de infección relativa se trazaron estableciendo los valores de infección simulada sin medicamentos en 100. Los resultados fueron de aproximadamente cuatro a seis experimentos independientes. (E y F) Efecto de los tratamientos con inhibidores sobre la infección célula a célula y libre de células del auténtico SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020). Tenga en cuenta que las células Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato (roja) sirvieron como células donantes, y las células Vero-ACE2-TMPRSS2 sirvieron como células diana ($n = 3$). PV, virus pseudotipado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. ns, no significativo.

Además, probamos los efectos de estos inhibidores utilizando sars-CoV-2 auténtico. Infectamos los glóbulos Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato (Rojo) con SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020), que posteriormente fueron cocultivados con células diana Vero-ACE2-TMPRSS2 o Calu-3 en presencia de estos inhibidores durante 4 h. Se utilizó el análisis citométrico de flujo para detectar células infectadas por el virus con un anticuerpo anti-N del SARS-CoV-2. De manera similar a los resultados de los pseudotipos lentivirales, se observaron efectos mucho más débiles para estos inhibidores sobre la propagación de célula a célula en comparación con la infección libre de células (Fig. 5 E y F y APÉNDICE SI, Fig. S4). En conjunto, estos resultados sugirieron que la vía de entrada endosomal está involucrada en la transmisión de célula a célula del auténtico SARS-CoV-2, pero parece desempeñar un papel menos dominante en comparación con la infección libre de células.

La transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 es refractaria al anticuerpo neutralizante y al plasma convaleciente.

Una característica importante de la transmisión de célula a célula del virus es la evasión de la inmunidad del huésped, particularmente la respuesta neutralizante mediada por anticuerpos. Por lo tanto, examinamos la sensibilidad de la transmisión de célula a célula mediada por picos de SARS-CoV-2 a la neutralización por un anticuerpo monoclonal contra el dominio de unión al receptor de la espiga, 2B04 (48), así como el plasma convaleciente derivado de pacientes con COVID-19 (46, 59). Mientras que 2B04 inhibió efectivamente la infección libre de células de SARS-CoV-2 en células 293T/ACE2 en más del 90%, su efecto sobre la transmisión de célula a célula entre 293T y 293T/ACE2 fue ~50% (Fig. 6 A y B). Como era de esperar, 2B04 no tuvo ningún efecto sobre el SARS-CoV, independientemente de la transmisión de célula a célula o la infección libre de células (Fig. 6 A y B). También realizamos la fusión célula-célula en presencia de diferentes concentraciones de 2B04, y encontramos que la actividad de fusión del pico de SARS-CoV-2 se inhibió de manera dependiente de la dosis (Fig. 6C). Luego analizamos cinco muestras de suero de pacientes con COVID-19 y observamos que, aunque inhibieron potently la infección libre de células del SARS-CoV-2 ($P < 0,001$), mostraron un efecto variable pero no significativo sobre la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2; el efecto de estos sueros sobre la infección por SARS-CoV, ya sea de célula a célula o libre de células, fue mínimo o modesto (Fig. 6 D y E). En conjunto, estos

resultados indican que la transmisión de célula a célula del virus lentiviral pseudotipado por SARS-CoV-2 es en su mayoría refractaria a la neutralización mediante la neutralización de anticuerpos contra el pico en relación con la infección libre de células.



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

• [Descargar powerpoint](#)

Figura 6.

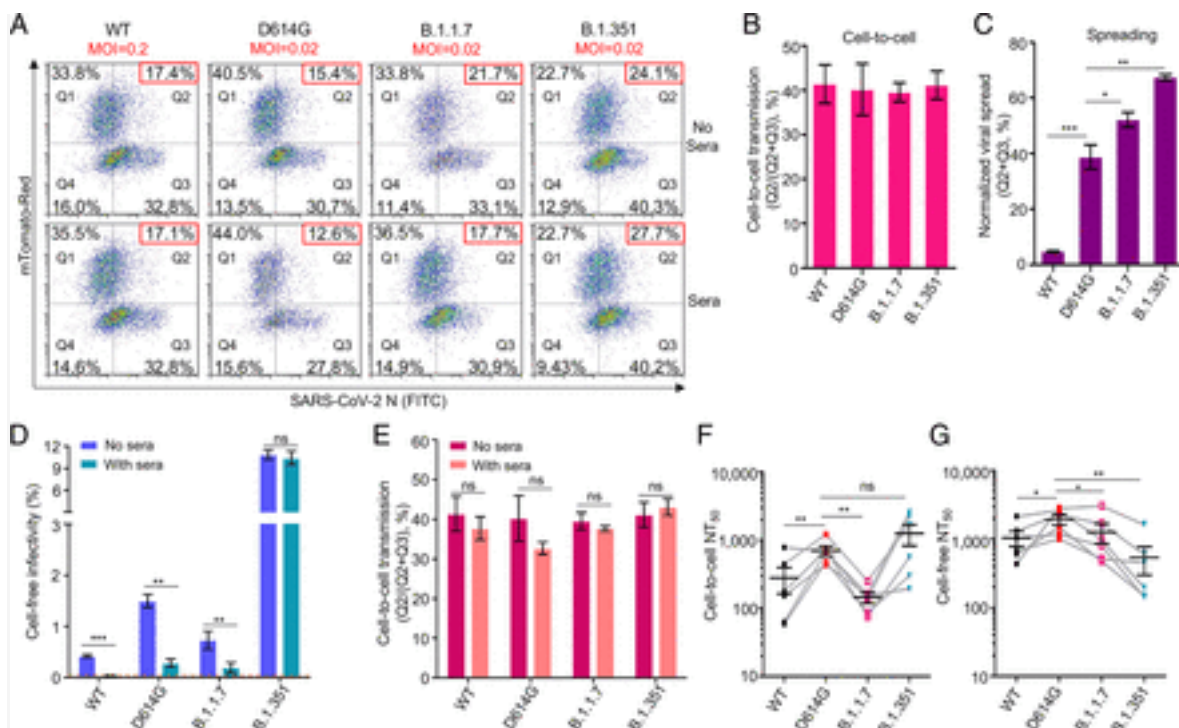
La transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 es refractaria a la inhibición mediante la neutralización de anticuerpos y plasma convaleciente de COVID-19. (A–C) Efectos del anticuerpo monoclonal 2B04 del SARS-CoV-2 en la transmisión de célula a célula, la infección libre de células y la fusión célula-célula mediada por el pico del SARS-CoV-2 o el SARS-CoV-2. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en la [Fig. 1 C y D](#), excepto que se incluyeron 0,2 µg/mL o 2 µg/mL 2B04 durante el período de infección. Las infecciones relativas se trazaron estableciendo los valores de infección simulada sin 2B04 a 100% para análisis estadísticos (A y B). Las fotos de la formación de sincitia se tomaron a las 18 h después de la cocultura y se presentaron (C). (D y E) Efecto de los sueros de COVID-19 en la infección de célula a célula y libre de células del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV. Los experimentos se realizaron como se describió anteriormente, excepto que se incluyeron cinco sueros diluidos de COVID-19 durante el período de infección. El efecto sobre la infección de célula a célula (D) y libre de células (E) del SARS-CoV o del SARS-CoV-2 se resumió y trazó estableciendo los valores de control simulado de la infección en 100% ($n = \sim 3$ a 4). PV, virus pseudotipado. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. ns, no significativo.

Transmisión de célula a célula de auténticas variantes preocupantes del SARS-CoV-2 y su sensibilidad a los sueros vacunados contra la COVID-19.

Se ha informado que la mutación D614G en el pico del SARS-CoV-2, así como las variantes emergentes de preocupación (COV) que contienen D614G y otras mutaciones clave del pico, mejoran la infectividad viral, la transmisibilidad y la resistencia a las vacunas COVID-19 ([60](#)–[65](#)). Como tal, examinamos la capacidad de transmisión de célula a célula del auténtico tipo salvaje (WT) del SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020), la variante D614G (B.1.5) y dos COV B.1.1.7 (501Y. V1) y B.1.351 (sudáfrica, 501Y. V2), en presencia o ausencia de sueros agrupados de vacunas de ARNm (tres de Moderna y tres de Pfizer). Las células Vero-ACE2 del donante se infectaron por primera vez con WT SARS-CoV-2 (MOI = 0.2), D614G (MOI = 0.02), B.1.1.7 (MOI = 0.02) y B.1.351 (MOI = 0.02), respectivamente. Tenga en cuenta que se utilizó un MOI 10 veces más alto para WT con el fin de lograr tasas comparables de infección en células donantes entre WT y COV, dado que se sabe que las variantes que contienen D614G aumentan significativamente la infectividad viral ([60](#), [66](#)). Aproximadamente 20 h después de la infección, se extrajo el medio de cultivo de las células donantes, cuyo volumen total se utilizó para infectar los glóbulos Vero-mTomato-Red objetivo durante 6 h para determinar la infectividad viral. Paralelamente, las células Vero-ACE2 del donante infectado fueron digeridas y cocultivadas con el mismo número de vero-tomato-glóbulos rojos que se utilizó en el ensayo de infectividad libre de células, también durante 6 h, como medida de la transmisión de célula a célula. Para determinar la sensibilidad de la transmisión de célula a célula frente a la infección libre de células a la neutralización por sueros vacunales, agrupamos las muestras de suero de 6 vacunas de ARNm, es decir, tres de Moderna y tres de Pfizer, y las agregamos al medio cultivado. La eficiencia de la transmisión de célula a célula y la infectividad libre de células se determinó midiendo el porcentaje de glóbulos vero-mtomato-rojos positivos para la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2 mediante citometría de flujo. Teniendo en cuenta el impacto potencial de las células donantes infectadas en la transmisión de célula a célula,

normalizamos la tasa de transmisión de célula a célula con la tasa total de propagación del virus tanto en los glóbulos vero-mTomato-rojos positivos para SARS-CoV-2 como en las células Vero-ACE2 durante todo el período de infección, es decir, desde la infección inicial de las células donantes hasta el final del cocultivo (~26 h).

Los resultados citométricos de flujo representativos y los análisis resumidos se presentan en **la Fig. 7** y el **Apéndice SI, Fig. S5**. Curiosamente, incluso con un MOI 10 veces mayor utilizado para la infección por WT de células Vero-ACE2 del donante en relación con otras variantes, observamos tasas comparables de transmisión de célula a célula entre WT, D614G, B.1.1.7 y B.1.351 (**Fig. 7 A**, **Apéndice superior y B** y **SI, Fig. S5 A y B**). Nótese que la tasa relativa de transmisión de célula a célula mostrada en **la Fig. 7B** se obtuvo dividiendo el porcentaje de vero-mTomato-rojos positivos para SARS-CoV-2 (Q2 en la **Fig. 7 A**, **Superior**) por el porcentaje de células totales positivas para SARS-CoV-2 (Q2 más Q3 en la **Fig. 7 A**, **Superior**). Observamos que la tasa de infección por propagación de B.1.351 en vero-ACE2 y vero-mTomato-red (Q2 más Q3 en **la Fig. 7 A**, **Superior**) fue la más alta, seguida de B.1.1.7 > D614G > WT (**Fig. 7C**). Consistente con la replicación más eficiente de B.1.351 en células Vero-ACE2 donantes durante todo el período de infección de 26 h (Q3 en **la Fig. 7 A**, **Superior**), encontramos una infectividad libre de células significativamente mayor para B.1.351 producida durante la infección inicial de 20 h en relación con WT, D614G y B.1.1.7 (**Fig. 7D**, véase "sin sueros"). En general, estos resultados revelaron una replicación fuertemente mejorada de B.1.351 en relación con B.1.1.7, D614G y WT, pero una eficiencia comparable de transmisión de célula a célula entre WT, D614G y COV.



• [Descargar figura](#)

• [Abrir en una pestaña nueva](#)

• [Descargar powerpoint](#)

Figura 7.

Transmisión de célula a célula de coV del SARS-CoV-2 y sensibilidad a la neutralización por sueros vacunados. (A–E) La capacidad de transmisión de célula a célula del auténtico SARS-CoV-2 WT, D614G, B.1.1.7 y B.1.351 en presencia o ausencia de sueros vacunados. Las células Vero-ACE2 del donante se infectaron con WT SARS-CoV-2 (MOI = 0,2), D614G (MOI = 0,02), B.1.1.7 (MOI = 0,02) y B.1,351 (MOI = 0,02) durante 20 h, seguido de la cocultación con células Vero-mTomato (rojas) diana en presencia o ausencia de sueros vacunados de ARNm agrupados (tres de Moderna y tres de Pfizer) durante 6 h. Las células se fijaron y teñieron con la proteína anti-SARS-CoV-2 N y se analizaron mediante citometría de flujo. Los análisis citométricos de flujo representativos de las células infectadas se muestran en A, con el objetivo recién infectado Vero-mTomato (Red) cells (Q2) como indicativo de transmisión de célula a célula. La eficiencia relativa de transmisión de célula a célula se calculó dividiendo la tasa de células positivas de Vero-mTomato-Red (Q2) por la tasa de donantes infectados totales y células diana (Q2 + Q3) (B, $n = 3$). La diseminación viral total normalizada por MOI tanto en células donantes como diana (Q2+Q3) se muestra en C ($n = 3$). El sobrenadante de la infección inicial de 20-h de las células donantes se utilizó para infectar a los glóbulos vero-mTomato-rojos objetivo durante 6 h como la medición de la infectividad viral libre de células, ya sea en presencia o ausencia de los sueros vacunados agrupados, y las células infectadas se analizaron por citometría de flujo (D) ($n = 3$). Los sueros vacunados agrupados también se agregaron a los cocultivos Vero-ACE2 y Vero-mTomato-Red como se describe en A para determinar su efecto sobre la transmisión de célula a célula (E). (F y G) Los valores calculados de NT_{50} de sueros de vacuna contra la transmisión de célula a célula y la infección libre de células de pseudotipos lentivirales que llevan un pico individual de COV. Los procedimientos experimentales fueron los mismos descritos en la [Fig. 6 D y E](#), excepto que todas las comparaciones se realizaron en relación con la variante D614G ($n = 6$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. ns, no significativo.

También evaluamos la sensibilidad de la transmisión de célula a célula y la infección libre de células a la neutralización por parte de los sueros vacunados de Moderna y Pfizer. Con una dosis relativamente baja de sueros agrupados, observamos que la transmisión de célula a célula de WT, D614G, B.1.1.7 y B.1.351 fue prácticamente resistente a los anticuerpos neutralizantes inducidos por estas vacunas de ARNm para todos los virus, mientras que la infección libre de células de WT, D614G y B.1.1.7 fue fuertemente inhibida, siendo B.1.351 resistente ([Fig. 7 A, Lower and D y E y SI Appendix, Fig. S5 C y D](#)). Mediante el uso de virus pseudotipados por VIH-inGluc con muestras de suero diluidas en serie de las vacunas de Moderna y Pfizer, pudimos obtener y comparar los valores de

título neutralizante del_{50%} (NT 50) de cada virus en latransmisión de célula a célula frente a la infección libre de células. Encontramos que, en general, los sueros vacunales de ARNm neutralizaron la transmisión de célula a célula ~3 veces menos eficientemente que la infección libre de células, con la notable excepción de B.1.351, que mostró grados similares de inhibición para las infecciones de célula a célula y libres de células(Fig. 7 F y G). Curiosamente, encontramos que la transmisión de célula a célula de B.1.1.7 fue más resistente a la neutralización por sueros vacunados, con ~NT 50 4,9 veces más bajo que D614G ($P < 0,01$) y ~8,7 veces menor que B.1,351 ($P < 0,05$) (Fig. 7 F y G). Por el contrario, la infección libre de células de B.1.351 fue más resistente a la neutralización que D614G y B.1.1.7, con 3.6 veces($P < 0.01$) y ~2.4 veces ($P < 0.01$) NT 50 inferior,respectivamente(Fig. 7 F y G),lo que fue consistente con estudios recientes (67, 68). En conjunto, estos resultados confirmaron que la transmisión de célula a célula de los COV del SARS-CoV-2 auténticos y pseudotipados es más refractaria a la inhibición mediante la neutralización de anticuerpos inducidos por las vacunas de ARNm en comparación con la infección libre de células y, lo que es más importante, mostró que la transmisión de célula a célula de B.1.1.7 y la infección libre de células de B.1.351 son más resistentes a la neutralización de anticuerpos. La sensibilidad diferencial de B.1.1.7 y B.1.351 a la neutralización por sueros vacunados en la transmisión de célula a célula frente a la infección libre de células probablemente tenga implicaciones importantes para comprender la propagación de estas variantes y su patogénesis en los pacientes (ver *Discusión*).

Discusión

La evidencia acumulada indica que los virus, incluidos el VIH altamente patógeno, el VHC y el EBOV, etc., pueden propagarse eficientemente a través de la transmisión de célula a célula (23, 29–31, 69–71). Es importante destacar que la transmisión de célula a célula es más eficiente que la infección libre de células (31), y se han demostrado roles para este modo de transmisión in vivo para el VIH y otros virus(29, 31, 45, 70). En particular, se sabe que muchos virus de plantas utilizan la transmisión de célula a célula para propagarse desde las células epidérmicas y moverse secuencialmente hacia el mesófilo, la vaina del haz y el parénquima del floema y las células acompañantes (72, 73). Para los coronavirus, actualmente se sabe muy poco sobre su modo de propagación entre las células o su eficiencia en comparación con la infección libre de células. Esta pregunta es crítica, dada la robusta replicación del SARS-CoV-2 en el pulmón humano y otros tejidos, así como la rápida propagación del SARS-CoV-2, incluyendo algunas variantes de preocupación, en la población humana, lo que lleva a la pandemia mundial (38, 67, 68, 74, 75). En este trabajo, abordamos esta cuestión utilizando pseudotipos lentivirales, rVSV competentes para la replicación que expresan el pico de SARS-CoV-2 o SARS-CoV, así como auténtico SARS-CoV-2. Descubrimos que el pico de SARS-CoV-2 es más eficiente en la mediación de la transmisión de célula a célula que el pico de SARS-CoV, sin embargo, el pico de SARS-CoV es más capaz de mediar la infección libre de células. Hasta donde sabemos, esta es una comparación directa de la transmisión de célula a célula frente a la infección libre de células entre el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV en células cultivadas, y los resultados proporcionan información importante sobre dos modos distintos de infección y los factores huésped-viral que regulan estos procesos.

Proporcionamos evidencia de que la eficiencia de infección de célula a célula relativamente robusta del SARS-CoV-2 está en parte relacionada con la mayor capacidad de fusión célula-célula de su proteína espiga en comparación con la del SARS-CoV (Fig. 3). Otra evidencia que apoya el papel de la fusión célula-célula en la transmisión del SARS-CoV-2 provino de la aplicación de un inhibidor de la fusión de membrana EK1, que atenuó significativamente la transmisión de célula a célula. De hecho, la fusión célula-célula ha sido reconocida como un mecanismo importante de infección de célula a célula para una serie de virus envueltos, incluidos los herpesvirus, paramixovirus y retrovirus (23). Sin embargo, debe enfatizarse que la fusión extensa célula-célula por el pico de SARS-CoV-2 puede conducir a la formación de sincitia gigante y la muerte celular, lo que a su vez reduce la transmisión de célula a célula. Si bien pudimos confirmar la infección de célula a célula del SARS-CoV-2 utilizando la cepa WA-1 auténtica, la formación de sincitia no fue evidente en la mayoría de los casos, excepto cuando las células Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato y Vero-ACE2-TMPRSS2 se utilizaron como células donantes y diana, respectivamente, debido a las expresiones de alto nivel de ACE2 y TMPRSS2. Sin embargo, la sincitia per se no tendrá en cuenta la transferencia de la proteína N del SARS-CoV-2 de las células donantes a las células diana, ya que las células fueron completamente digeridas por tripsina y las células fusionadas deberían haberse excluido sobre la base del análisis de una sola célula utilizando el área de dispersión directa (FSC-A) / ancho de dispersión hacia adelante (FSC-W). En este sentido, vale la pena señalar que la infección auténtica por SARS-CoV-2 puede inducir sincitia gigante en células H1299-ACE2 epiteliales pulmonares humanas (76), aunque el tamaño de la sincitia inducida por SARS-CoV-2 puede ser dependiente del tipo celular (77). En general, un control fino de la fusión célula-célula inducida por picos es importante para la transmisión eficiente de célula a célula y, por lo tanto, la propagación de la infección por SARS-CoV-2.

Otro hallazgo interesante en este trabajo es que aunque ACE2 mejora la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV, no es absolutamente necesario. Esta observación está respaldada además por los datos de las células H520 y los PBMC humanos, que expresan un nivel mínimo de ACE2 si lo hay, pero exhibieron una transmisión obvia de célula a célula del virus pseudotipado lentiviral (Fig. 4). Además, obtuvimos resultados similares mediante el uso de SARS-CoV-2 auténtico en células H520 donde se observó una transmisión clara de célula a célula (Fig. 4). En todos los casos, no se detectó infección libre de células del SARS-CoV-2 en células H520 y PBMC, lo que respalda aún más estas conclusiones. El mecanismo molecular subyacente a la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2, incluidas las posibles funciones de los cofactores celulares y las sinapsis virológicas, se investigará en estudios futuros.

Un resultado sorprendente que surgió de nuestros estudios fue que, a pesar del papel crítico del contacto célula-célula y la fusión mediada por la membrana plasmática, las vías de entrada endosomales también estaban involucradas en la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV (Fig. 5). Esto se evidencia por el efecto inhibitorio de los medicamentos que se dirigen específicamente a la vía de entrada endosomal de estos virus, incluido el inhibidor de CatL III, que bloquea la escisión de la glicoproteína viral, así como BafA1, que neutraliza el pH endosomal. Estos resultados en conjunto recuerdan a estudios previos de VIH y EBOV, donde la endocitosis y / o la escisión de la

proteasa procesada son necesarias para la transmisión de célula a célula de estos virus envueltos (26, 30, 71, 78, 79). Curiosamente, encontramos que estos inhibidores parecen ser menos potentes para disminuir la transmisión de célula a célula en comparación con la infección libre de células, incluso para el AUTÉNTICO SARS-CoV-2 (Fig. 5 y Apéndice SI, Fig. S4), y además, sus efectos sobre el SARS-CoV-2 son más débiles que sus efectos sobre el SARS-CoV. También notamos que la infección libre de células del SARS-CoV-2 en células Vero-ACE2-TMPRSS2 todavía era sensible al tratamiento con inhibidores endosomales, similar a un informe reciente (80); razonamos que esto podría estar asociado con los niveles de expresión de TMPRSS2 en la membrana plasmática de las células diana utilizadas para la infección, así como con las existencias virales que contienen mutantes defectuosos con furina generados a partir de células Vero. Estas observaciones sugieren colectivamente un papel menos dominante para la vía de entrada endosomal en la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2. Las imágenes microscópicas en vivo de alta resolución serían útiles para diseccionar el papel exacto de las vías de entrada endosómicas frente a las de la membrana plasmática en la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2.

En este trabajo, también probamos el efecto del remdesivir (RDV), un medicamento aprobado por la FDA, en la infección de célula a célula del SARS-CoV-2. Anteriormente, se ha demostrado que el RDV inhibe eficientemente la replicación del SARS-CoV-2 en Vero (concentración inhibitoria medio máxima [IC₅₀] = 11,41 μM) y células Calu-3 (IC₅₀ = 1,1 μM) (81). Curiosamente, encontramos solo un efecto modesto del RDV en la propagación de célula a célula del auténtico SARS-CoV-2, es decir, ~50% de inhibición de Vero-ACE2-TMPRSS2 a células Calu-3, incluso a una concentración de 100 μM (Apéndice SI, Fig. S4 D y E). Estos resultados pueden no ser tan sorprendentes, dado el tiempo de cocultivación relativamente más corto, así como el hecho de que RDV actúa para bloquear solo la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) del virus recién transmitido en las células diana, en lugar del virus existente que se transfirió de donante a células diana. Por lo tanto, el efecto limitado del RDV para la propagación de célula a célula del SARS-CoV-2 apoya la afirmación de que el SARS-CoV-2 auténtico se propaga de manera eficiente a través del contacto célula-célula.

La transmisión de célula a célula se considera un medio eficaz por el cual los virus evaden la inmunidad del huésped, especialmente las respuestas mediadas por anticuerpos. Comparamos la sensibilidad de la transmisión de célula a célula frente a la infección libre de células del SARS-CoV-2 con los tratamientos mediante la neutralización de anticuerpos monoclonales y el plasma convaleciente de COVID-19, ambos aprobados por la FDA para uso de emergencia. Encontramos que mientras que la infección libre de células del SARS-CoV-2 fue casi completamente bloqueada por estos tratamientos, la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 fue, en gran medida, refractaria (Figs. 6 y 7). Aunque no es estadísticamente significativo, algunos de los sueros de COVID-19 (dos de cada cinco) incluso mejoraron la transmisión de célula a célula del SARS-CoV-2 (Fig. 6D), aunque los mecanismos subyacentes actualmente no se conocen. Curiosamente, a pesar de los aumentos significativos en la infectividad libre de células, la variante de Sudáfrica B.1.351, la variante del Reino Unido B.1.1.7, así como la variante D614G, exhibieron eficiencias similares de transmisión de célula a célula en comparación con el WT (Fig. 7). Además, aunque B.1.351 es más resistente a los sueros vacunados en la

infección libre de células, de acuerdo con algunos informes recientes (67, 68), B.1.1.7 parece más resistente a los sueros vacunados para la ruta de transmisión de célula a célula (Fig. 7). Esto puede explicar por qué B.1.1.7 tiene una mayor duración de la infección aguda que otras variantes (82). El mecanismo subyacente a estas observaciones no está claro actualmente, pero puede tener implicaciones para comprender la rápida propagación de los COV en la población humana, así como su mayor patogénesis. La ruta libre de células está directamente relacionada con la capacidad de los virus para infectar las células diana y provocar la propagación entre los seres humanos a través del contacto de persona a persona. Por el contrario, la transmisión de célula a célula tiene un papel dominante en la patogénesis viral y la progresión de la enfermedad (24). Por lo tanto, nuestros resultados sobre la resistencia de B.1.1.7 y B.1.351 a la inhibición mediada por sueros de los vacunados de la transmisión de célula a célula y la infección libre de células pueden proporcionar fundamentos moleculares y virológicos para la replicación viral prolongada y la rápida propagación de estas dos variantes en la población mundial (67, 68, 83, 84).

Materiales y métodos

El cultivo celular, el virus, los constructos, los anticuerpos y los reactivos, la fusión célula-célula, el ensayo de placa, la citometría de flujo, el Western blotting, el ensayo de neutralización y el análisis estadístico se describen en [el Apéndice del SI, Materiales y Métodos del SI](#).

Transmisión de célula a célula.

En el sistema vectorial lentiviral, la expresión del gen reportero anti-sentido Gluc es interrumpida por un intrón orientado en la dirección sensorial del genoma del VIH-1, de modo que la producción de Gluc solo ocurrirá en células diana infectadas y no en células productoras de virus (46). Al coculpir el productor del virus y las células diana, la transmisión de célula a célula se determinó midiendo la actividad de Gluc de los medios cocultivados entre las células donantes (como 293T) que producen pseudotipos lentivirales y células diana (como 293T / ACE2). Específicamente, 293 célulasT fueron sembradas en placas de 6 pocillos y transfectadas con 1.4 µg NL4.3-inGluc y 0.7 µg de plásmidos que codifican sars-CoV o sars-CoV-2 pico. Al día siguiente, las células donantes transfectadas de 293T se digirieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se lavaron a fondo con PBS para eliminar el EDTA, seguido de cocultivación con células diana (293T / ACE2, Caco-2, Calu-3, NCI-H520 o PBMC) en una proporción de 1: 1 en placas de 24 pocillos durante ~24 a 72 h. Se agregaron inhibidores o sueros según fuera necesario. Los sobrenadantes fueron recolectados y medidos para la actividad de Gluc.

Para examinar la propagación de célula a célula del AUTÉNTICO SARS-CoV-2 WT y COV, infectamos las células Vero-ACE2 del donante con un MOI de 0,2 (WT) o 0,02 (COV) durante 20 h y las cocultivamos con el mismo número de vero-mTomato-glóbulos rojos durante 6 h adicionales, en presencia o ausencia de sueros vacunados. Para los otros fines, las células Vero-ACE2-TMPRSS2-mTomato sirvieron como células donantes, que fueron infectadas con WT SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020, MOI = 0.01) durante 18 h, seguidas de ser cocultivadas con células Vero-ACE2-TMPRSS2, NCI-H520 o Calu-3 en

condiciones específicas (ver leyendas). Las células se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 1 h, seguido de un lavado tres veces con PBS antes de sacarlo del laboratorio BSL3. Las células fijas se incubaron con nucleocápside anti-SARS-CoV-2 y anti-FITC de ratón, y se sometieron a análisis de citometría de flujo.

Infección libre de células.

La infección libre de células se realizó junto con la transmisión de célula a célula en este trabajo. Brevemente, un número igual de células de donantes transfectadas se sembraron en nuevas placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante el mismo período de tiempo que en la transmisión de célula a célula (normalmente de 48 a 72 h). Los volúmenes totales de sobrenadantes se recolectaron y utilizaron para infectar células diana, que se sembraron con la presencia de la misma cantidad de células 293T no transfectadas; esto garantizaría que el número total de células y la densidad utilizada para los ensayos de infección de célula a célula y sin célula fueran comparables. Para el ajuste de Transwell, las células donantes transfectadas se sembraron en el inserto, mientras que las células objetivo, que nuevamente se mezclaron con la misma cantidad de células 293T no transfectadas, estaban en la parte inferior; esto evitaría el contacto entre el donante y las células diana, sin embargo, el virus puede propagarse a través del filtro. Los sobrenadantes se recolectaron en los mismos puntos de tiempo que la transmisión de célula a célula y se midieron para la actividad de Gluc.

Disponibilidad de datos

Todos los datos del estudio se han depositado en el sitio web SeroNet del Instituto Nacional del Cáncer(<https://www.immport.org/shared/study/SDY1890>). Los datos se pondrán en marcha en enero de 2022 y estarán disponibles bajo petición hasta entonces.

Reconocimientos

Agradecemos a Gerard Lozanski, Richard Gumina, Eric Freed, David Derse, Marc Johnson, Fang Li y Ali Ellebedy por el suministro de muestras de sueros, plásmidos y células. También agradecemos al Programa de Reactivos contra el SIDA de los NIH y a BEI Resources por suministrar reactivos importantes que hicieron posible este trabajo. Este trabajo fue apoyado por un fondo proporcionado por un donante privado anónimo a la Universidad Estatal de Ohio y por NIH Grant U54CA260582; soporte adicional de la S.-L.L. El laboratorio incluye las subvenciones de los NIH R01 AI112381 y R01 AI150473. M.E.P. y T.K. fueron apoyados por NIH Grant U19AI131386-04S1 y por el Nationwide Children's Hospital COVID-19 Seed Fund. L.J.S. fue parcialmente apoyado por el Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano Grant R01 HD095881. El contenido es responsabilidad exclusiva de los autores y no representa necesariamente los puntos de vista oficiales de los NIH.

Notas

- ↩️ A quién puede dirigirse la correspondencia. Correo electrónico: liu.6244@osu.edu.

- Aceptado el 29 de noviembre de 2021.

- Contribuciones del autor: C.Z. y S.-L.L. investigación diseñada; C.Z., T.K. y M.E.P. realizaron investigaciones; E.M.O. y S.P.J.W. aportaron nuevos reactivos/herramientas analíticas; C.Z., Y.-M.Z., L.J.S., M.E.P. y S.-L.L. datos analizados; y C.Z., J.P.E. y S.-L.L. escribió el periódico.
 - Los autores declaran no tener ningún interés en contra.
 - Este artículo es una presentación directa de PNAS.
-
- Este artículo contiene información de apoyo en línea en <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2111400119/-/DCSupplemental>.
 - Copyright © 2021 el(los) Autor(es). Publicado por PNAS.

Este artículo de acceso abierto se distribuye bajo [Creative Commons Attribution License 4.0 \(CC BY\)](#).

Referencias

1. ↩️

1. J. F. Chan et al.

, Caracterización genómica del nuevo coronavirus patógeno humano de 2019 aislado de un paciente con neumonía atípica después de visitar Wuhan. Emerger. Los microbios infectan. **9**,221–236 (2020).

[Google Académico](#)

2. ↩️

1. F. Li

, Estructura, función y evolución de las proteínas espiga del coronavirus. Annu. Reverendo Virol. **3**,237–261 (2016).

[Becario PubMedGoogle](#)

3. ↩️

1. Y. Huang,
2. C. Yang,
3. X. F. Xu,
4. W. Xu,
5. S. W. Liu

, Propiedades estructurales y funcionales de la proteína espiga del SARS-CoV-2: Desarrollo potencial de fármacos antivirales para COVID-19. Acta Pharmacol. Med. **41**,1141–1149 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

4. [↵](#)

1. J. Lan et al.

, Estructura del dominio de unión al receptor de espigas del SARS-CoV-2 unido al receptor ACE2. Naturaleza **581**,215–220 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

5. [↵](#)

1. P. Zhou et al.

, Un brote de neumonía asociado a un nuevo coronavirus de probable origen murciélago. Naturaleza **579**,270–273 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

6. [↵](#)

1. A.C. Walls et al.

, Estructura, función y antigenicidad de la glicoproteína espiga del SARS-CoV-2. Celda **181**,281–292.e6 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

7. [↵](#)

1. A. Baum et al.

, El cóctel de anticuerpos contra la proteína espiga del SARS-CoV-2 previene el escape mutacional rápido observado con anticuerpos individuales. Ciencia **369**,1014–1018 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

8. [↵](#)

1. T. F. Rogers et al.

, Aislamiento de anticuerpos neutralizantes potentes contra el SARS-CoV-2 y protección contra enfermedades en un modelo animal pequeño. Ciencia **369**,956–963 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

9. [↵](#)

1. C. O. Barnes et al.

, las estructuras de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 informan las estrategias terapéuticas. *Naturaleza* **588**,682–687 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

10. ↵

1. S. J. Zost et al.

, Anticuerpos humanos potentemente neutralizantes y protectores contra el SARS-CoV-2. *Naturaleza* **584**,443–449 (2020).

[Google Académico](#)

11. ↵

1. Z. Sun et al.

, El análisis de espectrometría de masas de la nueva proteína espiga HCoV-19 del coronavirus emergente y ace2 humano revela glicanos camuflados y modificaciones post-traduccionales únicas. *Ingeniería* **7**,1441–1451 (2021).

[Google Académico](#)

12. ↵

1. Y. Watanabe et al.

, Vulnerabilidades en los escudos de glicanos de coronavirus a pesar de la extensa glicosilación. *NAT. Comunidad.* **11**, 2688 (2020).

[Becario CrossRefGoogle](#)

13. ↵

1. G.B. Stewart-Jones et al.

, Las estructuras triméricas de VIH-1-env definen escudos de glicanos de los clados A, B y G. *Celda* **165**,813–826 (2016).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

14. ↵

1. L. Duan et al.

, La biosíntesis, estructura, función y antigenicidad de la glicoproteína de espiga del SARS-CoV-2: Implicaciones para el diseño de inmunógenos de vacuna basados en espigas. *Frente. Immunol.* **11**, 576622 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

15. ↵

1. J.M. Blanco,
2. S. E. Delos,
3. M. Brecher,
4. K. Schornberg

, Estructuras y mecanismos de las proteínas de fusión de la membrana viral: Múltiples variaciones sobre un tema común. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **43**,189–219 (2008).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

16. ↵

1. B. Coutard et al.

, La glicoproteína espiga del nuevo coronavirus 2019-nCoV contiene un sitio de escisión similar a la furina ausente en el CoV del mismo clado. Antiviral Res. **176**, 104742 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

17. ↵

1. H. Chu et al.

, Determinantes del huésped y virales para la infección eficiente por SARS-CoV-2 del pulmón humano. NAT. Comunidad. **12**,134 (2021).

[Becario CrossRefGoogle](#)

18. ↵

1. J. Shang et al.

, Mecanismos de entrada celular del SARS-CoV-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **117**, 11727–11734 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

19. ↵

1. P. Wang et al.

, Base estructural y funcional de la entrada del SARS-CoV-2 mediante el uso de ACE2 humano. Celda **181**,894–904.e9 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

20. ↵

1. M. Hoffmann et al.

, la entrada de células del SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de la proteasa clínicamente probado. Celda **181**,271–280.e8 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

21. ↵

1. G. N. Brooke,
2. F. Prischi

, Modelización estructural y funcional de la entrada del SARS-CoV-2 en modelos animales. Sci. Rep. **10**,15917 (2020).

[Google Académico](#)

22. ↵

1. S. Lukassen et al.

, los receptores del SARS-CoV-2 ACE2 y TMPRSS2 se expresan principalmente en células secretoras transitorias bronquiales. EMBO J. **39**, e105114 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

23. ↵

1. P. Sattentau

, Evitar el vacío: Propagación de virus humanos de célula a célula. NAT. Rev. Microbiol. **6**,815–826 (2008).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

24. ↵

1. W. Mothes,
2. N.M. Sherer,
3. J. Jin,
4. P. Zhong

, Transmisión de virus de célula a célula. J. Virol. **84**,8360–8368 (2010).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

25. ↵

1. K.M. Derecho,
2. N. Satija,
3. A.M. Esposito,
4. B. K. Chen

, Propagación de célula a célula del VIH y patogénesis viral. **95**,43–85 (2016).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

26. ↵

1. B.M. Dale et al.

, La transferencia de célula a célula del VIH-1 a través de sinapsis virológicas conduce a la maduración endosomal del virión que activa la fusión de la membrana viral. Cell Host Microbe **10**, 551–562 (2011).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

27. ↵

1. P. Zhong,

2. L.M. Agosto,
3. J.B. Munro,
4. W. Mothes

, Transmisión de virus de célula a célula. Curr. Opin. Virol. **3**,44–50 (2013).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

28. ↵

1. C. L. Brimacombe et al.

, Neutralización de la transmisión de célula a célula del virus de la hepatitis C resistente a los anticuerpos. J. Virol. **85**,596–605 (2011).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

29. ↵

1. B.M. Dale,
2. R. A. Álvarez,
3. B. K. Chen

, Mecanismos de propagación mejorada del VIH a través de sinapsis virológicas de células T. Immunol. **251**,113–124 (2013).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

30. ↵

1. C. Miao,
2. M. Li,
3. Y.M. Zheng,
4. F. S. Cohen,
5. S. L. Liu

, El contacto célula-célula promueve la infección mediada por el virus del Ébola gp. Virología **488**,202–215 (2016).

[Google Académico](#)

31. ↵

1. P. Zhong et al.

, La transmisión de célula a célula puede superar las barreras celulares de múltiples donantes y diana impuestas al VIH libre de células. PLoS One **8**, e53138 (2013).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

32. ↵

1. H. Li,
2. C. Zony,
3. P. Chen,
4. B. K. Chen

, Potencia reducida y neutralización incompleta de anticuerpos ampliamente neutralizantes contra la transmisión de célula a célula del VIH-1 con envs fundadores transmitidos. J. Virol. **91**, e02425-16 (2017).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

33. ↵

1. M. Jeyanathan et al.

, Consideraciones inmunológicas para las estrategias de vacunación contra la COVID-19. NAT. Rev. Immunol. **20**,615–632 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

34. ↵

1. F. Zhou et al.

, Curso clínico y factores de riesgo para la mortalidad de pacientes adultos hospitalizados con COVID-19 en Wuhan, China: un estudio de cohorte retrospectivo. Lancet **395**,1054–1062(2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

35. ↵

1. D. Acharya,
2. G. Liu,
3. M. U. Gack

, Desregulación de las respuestas de interferón tipo I en COVID-19. NAT. Rev. Immunol. **20**,397–398 (2020).

[Google Académico](#)

36. ↵

1. P. Zhang et al.

, Médicos de COVID-STORM; Médicos COVID; Imagine COVID Group; Grupo francés de estudio de cohorte COVID; Cohorte CoV-Contacto; Biobanco UMC Covid-19 de Ámsterdam; Esfuerzo Genético Humano COVID; NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, Errores congénitos de inmunidad IFN tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. Ciencia **370**, eabd4570 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

37. ↵

1. S. A. Lowery,
2. A. Sariol,
3. S. Perlman

, Respuestas innatas e inflamatorias al SARS-CoV-2: Implicaciones para la COVID-19. Cell Host Microbe **29**, 1052–1062 (2021).

[Google Académico](#)

38. ↵

1. H. Chu et al.

, Comparativos de replicación y perfiles de activación inmune del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV en pulmones humanos: Un estudio ex vivo con implicaciones para la patogénesis de covid-19. Clin. Infecta. Dis. **71**,1400–1409 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

39. ↵

1. K. P. Y. Hui et al.

, Tropismo, competencia de replicación y respuestas inmunes innatas del coronavirus SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio humano y la conjuntiva: un análisis en cultivos ex-vivo e in vitro. Lancet Respir. Med. **8**,687–695 (2020).

[Google Académico](#)

40. ↵

1. D. Yang et al.

, El interferón atenuado y la respuesta proinflamatoria en células dendríticas humanas infectadas por SARS-CoV-2 se asocian con antagonismo viral de fosforilación stat1. J. Infectar. Dis. **222**,734–745 (2020).

[Google Académico](#)

41. ↵

1. S. Dispinseri et al.

, Neutralizar las respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 en COVID-19 sintomáticos es persistente y crítico para la supervivencia. NAT. Comunidad. **12**, 2670 (2021).

[Becario CrossRefGoogle](#)

42. ↵

1. A. Parque,
2. A. Iwasaki

, Interferones tipo I y tipo III : inducción, señalización, evasión y aplicación para combatir el COVID-19. Cell Host Microbe **27**, 870–878 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

43. ↵

1. T. Carvalho,
2. F. Krammer,
3. A. Iwasaki

, Los primeros 12 meses de COVID-19: Una línea de tiempo de conocimientos inmunológicos. NAT. Rev. Immunol. **21**,245–256 (2021).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

44. ↵

1. D. Mazurov,
2. A. Ilinskaya,
3. G. Heidecker,
4. P. Lloyd,
5. D. Derse

, Comparación cuantitativa de la infección de célula a célula por HTLV-1 y VIH-1 con nuevos vectores dependientes de la replicación. PLoS Pathog. **6**, e1000788 (2010).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

45. ↵

1. L.M. Agosto,
2. P. Zhong,
3. J. Munro,
4. W. Mothes

, Las terapias antirretrovirales altamente activas son efectivas contra la transmisión de célula a célula del VIH-1. PLoS Pathog. **10**, e1003982 (2014).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

46. ↵

1. C. Zeng et al.

, Anticuerpos neutralizantes contra el aumento del SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19, trabajadores de la salud y donantes de plasma convalecientes. JCI Insight **5**, e143213 (2020).

[Google Académico](#)

47. ↵

1. J.B. Case y otros.

, Anticuerpo neutralizante e inhibición soluble de ace2 de un VSV-SARS-CoV-2 competente para la replicación y un aislado clínico de SARS-CoV-2. Cell Host Microbe **28**, 475–485.e5 (2020).

[Google Académico](#)

48. ↵

1. W.B. Alsoussi et al.

, Un anticuerpo potentemente neutralizante protege a los ratones contra la infección por SARS-CoV-2. J. Immunol. **205**,915–922 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

49. ↵

1. S. Xia et al.

, Mecanismo de fusión de 2019-nCoV e inhibidores de fusión dirigidos al dominio HR1 en la proteína espiga. Celda. Mol. Immunol. **17**,765–767 (2020).

[Google Académico](#)

50. ↵

1. S. Xia et al.

, Un inhibidor de la fusión pan-coronavirus dirigido al dominio HR1 del pico de coronavirus humano. Sci. Adv. **5**, eaav4580 (2019).

[Texto completo GRATISGoogle Scholar](#)

51. ↵

1. A. Banerjee et al.

, Cinética de aislamiento, secuencia, infectividad y replicación del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2. Emerger. Infecta. Dis. **26**,2054–2063 (2020).

[Google Académico](#)

52. ↵

1. N. Murgolo et al.

, tropismo, entrada, replicación y propagación del SARS-CoV-2: Consideraciones para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. PLoS Pathog. **17**, e1009225(2021).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

53. ↵

1. D. Wrapp et al.

, Estructura crio-EM del pico 2019-nCoV en la conformación de prefusión. Ciencia **367**,1260–1263 (2020).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

54. ↵

1. P. V'Kovski,
2. A. Kratzel,
3. S. Steiner,
4. H. Stalder,
5. V. Thiel

, Biología y replicación del coronavirus: implicaciones para el SARS-CoV-2. NAT. Rev. Microbiol. **19**,155–170 (2021).

[Becario PubMedGoogle](#)

55. [↵](#)

1. A. G. Harrison,
2. T. Lin,
3. P. Wang

, Mecanismos de transmisión y patogénesis del SARS-CoV-2. *Tendencias Immunol.* **41**,1100–1115 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

56. [↵](#)

1. M. L. Yeung et al.

, Entrada celular soluble mediada por ACE2 del SARS-CoV-2 a través de la interacción con proteínas relacionadas con el sistema renina-angiotensina. *Celda* **184**,2212–2228.e12 (2021).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

57. [↵](#)

1. X. Ou et al.

, Caracterización de la glicoproteína espiga del SARS-CoV-2 en la entrada del virus y su reactividad cruzada inmune con el SARS-CoV. *NAT. Comunidad.* **11**,1620 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

58. [↵](#)

1. G.M. Nitulescu et al.

, Análisis exhaustivo de medicamentos para tratar la infección por SARS-CoV-2: Información mecanicista sobre las terapias actuales contra la COVID-19 (Revisión). *Int. J. Mol. Med.* **46**,467–488 (2020).

[Becario PubMedGoogle](#)

59. [↵](#)

1. J. D. Roback,
2. J. Guarner

, Plasma convaleciente para tratar el COVID-19: posibilidades y desafíos. *JAMA* **323**,1561–1562 (2020).

[Google Académico](#)

60. [↵](#)

1. J. A. Plante et al.

, La mutación Spike D614G altera la condición física del SARS-CoV-2. *Naturaleza* **592**,116–121 (2021).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

61. ↵

1. X. Xie et al.

, Neutralización de la delección del pico 69/70 del SARS-CoV-2, variantes E484K y N501Y por sueros provocados por la vacuna BNT162b2. *NAT. Med.* **27**,620–621 (2021).

[Becario PubMedGoogle](#)

62. ↵

1. B. Zhou et al.

, el cambio D614G del pico del SARS-CoV-2 mejora la replicación y la transmisión. *Naturaleza* **592**,122–127 (2021).

[Google Académico](#)

63. ↵

1. J. Y. Noh,
2. H. W. Jeong,
3. E.C. Shin

, mutaciones, vacunas e inmunidad del SARS-CoV-2: implicación de variantes preocupantes. *Transducto de señal. Blanco. Ther.* **6**,203 (2021).

[Google Académico](#)

64. ↵

1. A. Khan et al.

, La mayor infectividad de las nuevas variantes del SARS-CoV-2 se asocia con los mutantes K417N/T, E484K y N501Y: una visión a partir de datos estructurales. *J. Celda. Fisiol.* **236**, 7045–7057 (2021).

[Google Académico](#)

65. ↵

1. A. Wu et al.

, Un año de evolución del SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **29**, 503–507 (2021).

[Google Académico](#)

66. ↵

1. L. Zhang et al.

, la mutación de la proteína espiga D614G del SARS-CoV-2 aumenta la densidad del pico del virión y la infectividad. NAT. Comunidad. **11**, 6013 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

67. ↵

1. P. Wang et al.

, Resistencia a los anticuerpos de las variantes del SARS-CoV-2 B.1.351 y B.1.1.7. Naturaleza **593**,130–135 (2021).

[Google Académico](#)

68. ↵

1. D. Planas et al.

, Sensibilidad de las variantes infecciosas del SARS-CoV-2 B.1.1.7 y B.1.351 a anticuerpos neutralizantes. NAT. Med. **27**,917–924 (2021).

[Google Académico](#)

69. ↵

1. N. Cifuentes-Muñoz,
2. R. E. Holandés,
3. R. Cattaneo

, Transmisión directa de célula a célula de virus respiratorios: Los carriles rápidos. PLoS Pathog. **14**, e1007015 (2018).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

70. ↵

1. F. Xiao et al.

, transmisión de células celulares del virus de la hepatitis C y resistencia a los agentes antivirales de acción directa. PLoS Pathog. **10**, e1004128 (2014).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

71. ↵

1. L. Wang et al.

, Visualización de sinapsis virológicas de células T del VIH y compartimentos que contienen virus mediante microscopía electrónica y de luz correlativa tridimensional. J. Virol. **91**, e01605-16 (2017).

[Resumen/Texto Completo GRATISGoogle Scholar](#)

72. ↵

1. J.C. Carrington,
2. K. D. Kasschau,
3. S. K. Mahajan,

4. M.C. Schaad

, Transporte de célula a célula y a larga distancia de virus en plantas. *Célula vegetal* **8**,1669-1681 (1996).

[Texto completo GRATISGoogle Scholar](#)

73. ↵

1. C. Hipper,
2. V. Brault,
3. V. Ziegler-Graff,
4. F. Reverso

, Factores virales y celulares implicados en el transporte de floemas de virus vegetales. *Frente. Planta Sci.* **4**,154 (2013).

[Becario PubMedGoogle](#)

74. ↵

1. R. P. Walensky,
2. H. T. Walke,
3. A. S. Fauci

, variantes preocupantes del SARS-CoV-2 en los Estados Unidos: desafíos y oportunidades. *JAMA* **325**, 1037–1038 (2021).

[Becario PubMedGoogle](#)

75. ↵

1. N. D. Grubaugh,
2. E.B. Hodcroft,
3. J. R. Fauver,
4. A. L. Phelan,
5. M. Cevik

, Acciones de salud pública para controlar las nuevas variantes del SARS-CoV-2. *Celda* **184**,1127–1132 (2021).

[Google Académico](#)

76. ↵

1. L. Jackson et al.

, la propagación de célula a célula del SARS-CoV-2 ocurre rápidamente y es insensible a la neutralización de anticuerpos. *bioRxiv* [Preimpresión] (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446516> (consultado el 15 de diciembre de 2021).

[Google Académico](#)

77. ↵

1. J. Buchrieser et al.

, formación de Syncytia por células infectadas por SARS-CoV-2. EMBO J. **39**, e106267 (2020).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

78. ↵

1. R.M. Markosyan et al.

, Inducción de la fusión célula-célula por la glicoproteína del virus del Ébola: El pH bajo no es un desencadenante. PLoS Pathog. **12**, e1005373 (2016).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

79. ↵

1. B. K. Titanji,
2. M. Aasa-Chapman,
3. D. Pillay,
4. C. Jolly

, Los inhibidores de la proteasa bloquean eficazmente la propagación del VIH-1 de célula a célula entre las células T. Retrovirología **10**,161 (2013).

[Becario CrossRefPubMedGoogle](#)

80. ↵

1. A. J.B. Kreutzberger et al.

, Bloqueo sinérgico de la infección por SARS-CoV-2 mediante la inhibición farmacológica combinada de los factores de entrada del huésped PIKfyve quinasa y proteasa TMPRSS2. J. Virol. **95**, e0097521 (2021).

[Google Académico](#)

81. ↵

1. M. Ko,
2. S. Jeon,
3. W. S. Ryu,
4. S. Kim

, Análisis comparativo de la eficacia antiviral de los medicamentos aprobados por la FDA contra el SARS-CoV-2 en células pulmonares humanas. J. Med. Virol. **93**,1403–1408(2021).

[Google Académico](#)

82. ↵

1. S.M. Kissler et al.

, Las trayectorias virales densamente muestreadas sugieren una mayor duración de la infección aguda con la variante B.1.1.7 en relación con la no B.1.1.7 SARS-CoV-2. medRxiv [Preimpresión]

(2021). <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.21251535> (consultado el 15 de diciembre de 2021).

[Google Académico](#)

83. ↵

1. T. Alpert et al.

, Primeras introducciones y transmisión de la variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 en los Estados Unidos. Celda **184**,2595–2604.e13 (2021).

[Google Académico](#)

84. ↵

1. T. Funk et al.

, Características de las variantes preocupantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7, B.1.351 o P.1: Datos de siete países de la UE/EEE, semanas 38/2020 a 10/2021. Vigilancia del euro. **26**, **33890566** (2021).

[Google Académico](#)

Recomendamos

1. Compromiso del pico del SARS-CoV-2 de ACE2 primes S2' escindir el sitio e iniciación de la fusión
[Shi Yu et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2022](#)
2. Activación de la proteína espiga del coronavirus del SARS a través de la escisión proteolítica secuencial en dos sitios distintos
[Sandrine Belouzard et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009](#)
3. Las nanopartículas señuelo protegen contra covid-19 al adsorbente simultáneamente virus y citoquinas inflamatorias
[Lang Rao et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2020](#)
4. La modulación de la enzima convertidora de TNF- α por la proteína espiga del SARS-CoV y ACE2 induce la producción de TNF- α y facilita la entrada viral
[Shiori Haga et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008](#)
5. Una vacuna dirigida a MHC de clase II provoca inmunidad contra el SARS-CoV-2 y sus variantes
[Novalia Pishesha et al., Proc Natl Acad Sci](#)