



Memoria del LII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Mapeando proteínas estructurales en virus individuales mediante microscopía de molécula única

Mapping viral structural proteins with single molecule fluorescence microscopy

Vaca, Luis¹ ; Martínez-Flores, Daniel¹ ; Rodríguez-Hernández, Aaron Pavel¹ ; Sampieri, Alicia¹ ; Cruz-Reséndiz, Adolfo² ; Tobías-Juárez, Ileana¹ ; Contreras de la Torre, Karla Yarentzi¹ ; Terrazas-Douglas, Renata¹ ; Lara-Martínez, Reyna³ ; Jiménez-García, Luis F³ .

1. Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

✉ Correspondencia. Avenida Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México C.U., Coyoacán, CDMX, CP 04510. Tel: (+52)5556225654. lvaca@ifc.unam.mx

Editor responsable: Magdalena Vilchis Landeros
DOI: <https://doi.org/10.22201/fm.0188137xp.2025.49.06>

Recibido: 28 de enero de 2025
Revisado: 28 de abril de 2025
Aceptado: 30 de abril de 2025

Resumen

Los virus, debido a su tamaño nanoscópico, pueden parecer entidades simples; sin embargo, algunos virus son estructuralmente muy complejos. Observarlos mediante microscopía óptica ha sido un reto formidable debido a su tamaño, que es varias veces menor que la longitud de onda de la luz visible. Los avances recientes en microscopía de superresolución nos han permitido explorar en detalle los aspectos estructurales de cada virus. En este sentido, este trabajo presenta ejemplos de los avances más recientes de nuestro grupo de investigación en la identificación de gradientes de proteínas estructurales en virus individuales mediante microscopía de localización de moléculas individuales.

Palabras claves: Baculovirus, proteínas estructurales, microscopía de fluorescencia de molécula única.

Summary

Viruses, due to their nanoscopic size, might appear as simple entities; however, some viruses are structurally very complex. Observing viruses using light microscopy has been a formidable challenge due to their size, which is several times smaller than the wavelength of visible light. Recent advances in super-resolution microscopy allowed us to explore structural aspects of individual viruses in detail. In this regard, this work presents examples of the most recent advances achieved by our research group in identifying gradients of structural proteins in individual viruses using single-molecule microscopy.

Keywords: Baculovirus, structural viral proteins, single-molecule fluorescence microscopy.

Introducción

Los virus son sistemas biológicos de dimensiones nanométricas que desempeñan funciones críticas en los organismos vivos desde una perspectiva evolutiva, ecológica, biotecnológica y médica (1,2). Aunque su tamaño nanométrico puede sugerir una baja complejidad, la mayoría de los virus son estructural y funcionalmente muy sofisticados. Por esta razón, observarlos directamente para realizar estudios morfológicos detallados ha sido un desafío (3).

El primer virus descubierto fue el virus del mosaico del tabaco (TMV) en 1892, una nueva clase de agente infeccioso submicroscópico que dependía obligatoriamente de las células hospederas para replicarse (4). En 1935 y 1936 se publicaron las primeras micrografías de TMV (5,6), y en 1939 TMV se convirtió en el primer virus visualizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (7). La alta resolución ha convertido a la microscopía electrónica en el estándar de oro para visualizar y caracterizar estructuralmente virus, mientras que la microscopía óptica convencional sigue siendo una herramienta con resolución insuficiente para estos estudios nanométricos (8).

La microscopía óptica es una herramienta poderosa para observar sistemas biológicos en un entorno natural dinámico y permite estudiar células individuales y compartimentos celulares. Sin embargo, la luz tiene una limitación física, un límite de difracción que restringe la resolución, lo que hace que la microscopía óptica convencional sea insuficiente para observar virus individuales a escalas nanométricas (9). Este límite fundamental fue reconocido tempranamente por el físico alemán Ernst Karl Abbe en 1873 (10). Sin embargo, la microscopía de fluorescencia ha sido la semilla que ha impulsado nuevos desarrollos tecnológicos para observar virus a una escala que habría parecido inimaginable hace unos años, desempeñando un papel clave en la evolución de lo que hoy se conoce como microscopía de superresolución (SRM, Super Resolution Microscopy) (11).

La microscopía de fluorescencia consta de una serie de herramientas y técnicas que permiten la localización dinámica y específica de moléculas diana, utilizando indicadores fluorescentes, apoyados en un sistema óptico basado en lentes y espejos (12). La resolución lograda con técnicas convencionales de microscopía de fluorescencia permanece restringida por el límite de difracción de la luz, lo que permite una resolución lateral máxima en el rango de 250-300 nm (12). El desarrollo de la microscopía confocal introdujo la capacidad de obtener cortes ópticos de la muestra, mejorando la resolución axial a alrededor de 600 nm (13). Disponer de cortes ópticos permitió la

reconstrucción tridimensional de muestras y la medición de volúmenes (13). Sin embargo, la resolución obtenida con microscopía confocal fue insuficiente para observar en detalle virus individuales (14). El desarrollo de nuevos sistemas de iluminación, técnicas para capturar emisiones de fluorescencia y procesamiento avanzado de imágenes ha dado origen a una era completamente nueva en microscopía óptica, dando como resultado la SRM (12,15).

SRM ha abierto las puertas al mundo nanoscópico de los virus, permitiendo el estudio de su complejidad estructural mediante el etiquetado de proteínas y componentes estructurales específicos (16–20). Sin embargo, debido a que la SRM es de desarrollo reciente, existen muy pocos estudios donde se puede visualizar la distribución espacial de proteínas estructurales virales con alta definición.

Dentro de las diferentes técnicas de SRM existe una variante la cual consiste en inducir el parpadeo de fluoróforos con el fin de poder localizarlos de forma independiente. Esta metodología se conoce como microscopía de localización de molécula única (SMLM, Single Molecule Localization Microscopy).

En este trabajo presentamos nuestros avances más recientes en la caracterización de la distribución nanoscópica diferencial de componentes estructurales en baculovirus mediante microscopía de localización de molécula única (SMLM). Demostrando por primera vez que algunas proteínas estructurales se localizan en regiones específicas del virus, mientras que otras tienen una distribución más homogénea a lo largo del virus. Parte de estos resultados han sido publicados con anterioridad (21,22).

Los baculovirus son miembros de la familia Baculoviridae, virus de ADN que infectan selectivamente a diversos insectos, aunque su principal huésped son las larvas de lepidópteros (23). Los baculovirus suelen tener entre 30 y 60 nm de ancho y 230 a 385 nm de longitud, con un genoma formado por un ADN circular bicatenario (24).

Estos virus tienen dos formas de vida, una es el virión libre responsable de la infección de célula a célula y designado como virus en gemación (BV, Budded virus) y la otra forma generada en la última etapa de la infección es el virus ocluido. Los virus derivados de la oclusión (ODV, Occlusion-derived virus) están contenidos dentro de un cristal de proteína llamado poliedra, que se ensambla en el núcleo de las células infectadas (24). El ADN está contenido dentro de la cápside, pero sólo los BV obtienen una bicapa lipídica de las células de las que brotan, esta es la envoltura del virus (25) Mientras que ODV en el núcleo obtienen la membrana externa de la envoltura nuclear (26).

El baculovirus *Autographa californica* múltiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) ha sido el baculovirus más estudiado, frecuentemente utilizado en la producción de proteínas recombinantes con interés médico y biotecnológico (27,28). Inicialmente, se creía que las cápsides de BV y ODV contenían la misma composición proteica (29). Sin embargo, los análisis proteómicos de las proteínas presentes en las nucleocápsides y las envolturas aisladas del baculovirus han demostrado lo contrario (30). Actualmente sabemos que los baculovirus gemados y ocluidos comparten algunas proteínas estructurales, pero otras son específicas del fenotipo viral.

Los baculovirus representan un modelo excelente para estudiar la localización de proteínas en viriones individuales. La forma de varilla de cada BV facilita la exploración de la distribución de proteínas utilizando SRM. El hecho de que los baculovirus contengan proteínas localizadas diferencialmente en la envoltura y la cápside, como GP64 y VP39, estimula el estudio de la distribución precisa de estas y otras proteínas estructurales (31–33). Otra ventaja de utilizar baculovirus como modelo para estudiar la distribución diferencial de proteínas en viriones individuales utilizando SRM, es la facilidad de manipulación mediante tecnologías de ADN recombinante (34). Lo anterior permite producir proteínas de fusión de proteínas fluorescentes con proteínas estructurales virales para poder visualizarlas fácilmente mediante técnicas de fluorescencia. El presente trabajo describe por primera vez la distribución espacial diferencial de varias proteínas estructurales de baculovirus, en virus individuales, mediante el uso de técnicas de fluorescencia, ADN recombinante y mapeo de moléculas individuales por microscopía de super resolución.

Materiales y Métodos

1. Construcción de baculovirus recombinantes y cultivo celular.

Los genes que codifican las proteínas E25 (GeneID: 1403927) y P24 (GeneID: 1403962) de AcMNPV se clonaron en el vector de transferencia pFastBac™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) bajo el control del promotor de poliedrina (pPH) y en marco de lectura con la variante monomérica del gen de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) (Takara Bio USA, San José, CA). La clonación se realizó utilizando enzimas de restricción y se confirmó mediante secuenciación.

El plásmido de transferencia pFastBac™ que contiene las construcciones se usó para realizar la transposición en células DH10Bac™ E. coli, que contienen el báculo y el plásmido auxiliar, como

parte del sistema Bac-to-Bac® (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 ATCC®, EE. UU. n.º de cat. CRL-1711, RRID: CVCL_0549) fueron transfectadas con el báculo para la generación de baculovirus recombinantes utilizando el agente transfectante Flyfectin según las especificaciones del fabricante (OZ Biosciences, San Diego, CA, EE.UU. n.º de catálogo FF50500).

El sobrenadante de las células transfectadas se recogió como el virus P1 inicial, y las células Sf9 en fase de crecimiento logarítmico (2×10^6 células/ml) se infectaron con el pasaje viral P1 y se incubaron a 27 °C con agitación constante. Después de 72 horas de infección, se recogió el sobrenadante como pasaje viral P2. El proceso se repitió hasta llegar al paso P3, con el que se realizó una expresión a gran escala para recuperar el virus del sobrenadante.

Las células Sf9 se mantuvieron en medio Grace (Thermo Fisher, EE. UU., n.º de cat. 11300-027) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado al 10% (Biowest, Francia, n.º de cat. S1650-500), lactoalbúmina (Sigma - Aldrich, EE. UU., cat. no. 292805), antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher, EE. UU., n.º de cat. 15240-062) y ácido plurónico F-68 al 0,1 % (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de cat. P1300) a 27 °C con agitación.

2. Purificación de baculovirus

Se produjeron baculovirus recombinantes utilizando células de insecto Sf9. La incubación se llevó a cabo a 27 °C con agitación de 100 rpm hasta alcanzar un volumen de 50 ml a una densidad de 2×10^6 células/ml. Posteriormente, cada matraz se infectó con baculovirus recombinantes BacE25-EGFP o BacP24-EGFP, así como BacWT. Cinco días después de la infección, las células se precipitaron por centrifugación a 2435 xg por 10 minutos a 4°C, utilizando un rotor SLA-1500. El sobrenadante se recuperó y se ultracentrifugó a 103.864 x g en un rotor SW-28 durante 1,5 horas a 4 °C para concentrar los BV. El pellet conteniendo los BV se resuspendió en 2 ml de PBS estéril y se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron los baculovirus resuspendidos, se cargaron en un gradiente discontinuo de sacarosa del 50% y del 10% y se purificaron por ultracentrifugación a 103.864 x g en un rotor SW-28 durante 1,5 horas a 4°C; Se aislaron BV de la interfaz de gradiente. Para eliminar el exceso de sacarosa, los virus se centrifugaron nuevamente bajo los mismos parámetros en PBS estéril. Se descartó el sobrenadante y el pellet se mantuvo en PBS durante la noche a 4 °C. Finalmente, los baculovirus brotados se resuspendieron, se recuperaron y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

3. TEM-ImmunoGold

Para microscopía TEM inmunoGold, se incubaron BacWT, BacP24-EGFP y BacE25-EGFP con anticuerpo anti-GP64 (1:10) o anti-EGFP (1:10, Takara, JP, n.º de catálogo 632592) durante la noche a 4 °C, posteriormente se montaron en rejillas de oro recubiertas con Formvar y se inmunomarcaron con anticuerpo secundario conjugado con nanopartículas de oro (1:10, 15 nm en diámetro, Aurion, NL cat. no. AU25816) durante toda la noche. Las rejillas se lavaron y posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos y luego con citrato de plomo al 0,4% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron con agua destilada y se secaron al aire antes de su visualización en un TEM JEM-1010 (JEOL, Peabody, MA, EE. UU.), funcionando a 80 kV. La adquisición de imágenes se realizó utilizando el software Gatan Microscopy Suite (V. 2.32.888.0).

4. Producción de anticuerpos anti-P24

La proteína P24-His(6x) recombinante se expresó y purificó a partir de *E. coli* BL21(DE3). P24-His (6x) se purificó mediante cromatografía de afinidad y se dializó frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS). La pureza e identidad de la proteína se confirmaron mediante SDS-PAGE.

Se inmunizaron ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad con la proteína P24-His (6x) purificada en una mezcla 1:1 con hidróxido de aluminio. Cada ratón recibió una inyección intramuscular (100 µl) con una concentración de 15 µg de proteína por ratón. Los ratones fueron inmunizados dos veces: la primera al día 0 y la segunda aplicación dos semanas después. Se recogió suero obtenido mediante punción submandibular de ratones inmunizados antes de la inmunización (control inicial) y a intervalos de 14 días.

La producción de anticuerpos específicos contra la proteína P24 se evaluó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos (Corning, EE. UU., n.º de catálogo 3590) con P24 (5 µg/ml en PBS) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con leche en PBS-T (PBS con Tween-20 al 0,05%) durante 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron con PBS-T y se añadió suero de ratón (1:100). Los anticuerpos específicos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (1:5000) y revelado con la solución de sustrato TMB. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0.16 M y la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de microplacas multiskan FC 3.1 (Thermo Fisher, EU).

5. Etiquetado y montaje de virus

La envoltura viral se marcó con fluorescencia utilizando la sonda de etiquetado de membrana CellBrite™ Steady 650 (Biotium, EE. UU., n.º cat. n.º 30108-T) durante el proceso de purificación. Las partículas virales purificadas se resuspendieron en una solución de etiquetado que contenía CellBrite™ según las instrucciones del fabricante. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave para asegurar la incorporación uniforme de la sonda en la envoltura viral. Después del etiquetado, el exceso de tinte se eliminó realizando una serie de pasos de purificación, incluida la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, para obtener las partículas virales marcadas. La integridad de la envoltura viral se evaluó mediante TEM.

Se sometieron partículas de baculovirus recombinantes que expresaban GP64 y P24/P24-EGFP a marcaje por inmunofluorescencia para visualizar la distribución de estas proteínas. Las partículas virales se montaron en cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina (0,01%) y las muestras se bloquearon con BSA al 3% en PBS para evitar la unión no específica.

Los anticuerpos primarios específicos de GP64 (anti-GP64, 1:100) y P24 (anti-P24, 1:100) se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (CF568, 1:100, Biotium, EE. UU., n.º cat. n.º 20100) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de lavados adicionales para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios, las partículas virales marcadas se montaron en portaobjetos y se analizaron mediante SMLM.

Para obtener imágenes SMLM, se preparó un tampón de parpadeo que contenía MEA (2-mercaptoetilamina) 100 mM (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de catálogo 30070-50G), glucosa al 8,9% (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de catálogo G5767-500G), 0.56 mg/ml de glucosa oxidasa (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de cat. #G2133-250KU) y 170 µg/ml de catalasa (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de catálogo #C40-100MG). La muestra se montó con el tampón parpadeante entre el portaobjetos y el cubreobjetos que contenía la muestra y se selló con esmalte de uñas para evitar la oxidación durante la adquisición.

6. Imágenes SMLM

Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio ONI Nanoimager invertido (Oxford Nanoimaging Ltd., Oxford, Reino Unido) equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 100x, NA

1.4. El sistema está equipado con la cámara ORCA-Flash 4.0 (V3 C133440-20CU) con un tamaño de píxel de 6,5 x 6,5 μm^2 . Los fluoróforos se excitaron utilizando láseres con longitudes de onda de 405 nm, 473 nm, 561 nm y 640 nm. Los cuatro láseres tienen una potencia de 1 W medida en la fuente. Se utilizó el láser de 405 nm para promover el parpadeo inicial del fluoróforo en todas las adquisiciones. Se empleó iluminación de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) para capturar la fluorescencia de las partículas virales más cercanas al cubreobjetos. El microscopio ONI Nanoimager proporciona un límite de resolución de 20 nm según el fabricante (Oxford Nanoimaging Ltd., Oxford, Reino Unido). Realizamos un análisis de decorrelación de imágenes sin parámetros que proporcionó un límite de resolución de 6,6 nm en nuestras condiciones experimentales (35).

La corrección de la aberración cromática se realizó utilizando microesferas TetraSpeck™ de 100 nm (Thermo Fisher Scientific, EE. UU., n.º de catálogo T7279) y se habilitó el sistema de control de temperatura para minimizar la deriva durante la adquisición.

Se adquirieron series de imágenes para cada campo de visión con un tiempo de exposición de 30 ms por cuadro para un total de 10.000 cuadros por canal. La localización precisa de cada fluoróforo se identificó en tiempo real durante la adquisición de imágenes utilizando el software ONI, NimOS (ONI v.1.19.5.20230223170946-e050349, Oxford Nanoimaging Ltd., Oxford, Reino Unido). Las imágenes adquiridas se exportaron individualmente por canal con un tamaño de píxel de 0,5 nm en un formato TIFF compatible y se importaron al software ImageJ (FIJI) (v. 1.54f, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) para su posterior análisis.

7. Análisis de distribución de fluorescencia

Las imágenes de SMLM, luego de ser exportadas e importadas a ImageJ, se analizaron utilizando la herramienta de selección rectangular en la región de interés (ROI) de la imagen, donde previamente las partículas virales habían sido alineadas horizontalmente con el software ImageJ.

Con la región de interés (ROI) seleccionada, utilizamos la función "Perfil de trazado" de Fiji para calcular la intensidad promedio de píxeles a lo largo del eje X para cada ROI. Este proceso se repitió para el segundo fluoróforo, asegurando que las condiciones de adquisición y procesamiento fueran equivalentes para ambas muestras. Se dibujaron rectángulos idénticos para garantizar que se midieran las mismas áreas en las imágenes correspondientes a ambos fluoróforos. Dadas las diferencias de longitud entre los baculovirus, los datos se normalizaron como

porcentaje de longitud y las intensidades de fluorescencia se ajustaron y presentaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (AU).

8. Conteo de moléculas

Para el análisis del número de moléculas mostradas de E25-GFP y P24-GFP en baculovirus individuales, se desarrolló un script en R Studio. Los datos sin procesar se extrajeron de las imágenes de cada adquisición de SMLM obtenidas con el software NimOS (Oxford Nanoimaging Ltd., Oxford, Reino Unido). Los datos sin procesar contenían coordenadas (localización de píxeles X, Y) para cada partícula y cada canal de fluorescencia. El script de R lee los millones de puntos de datos de cada imagen SMLM, filtra los datos por canal y coordenadas X, Y, y realiza el análisis de virus individuales, descartando moléculas con las mismas coordenadas para eliminar partículas duplicadas en el conteo. El procedimiento se realizó para 15-25 baculovirus individuales para BacE25-EGFP, BacP24-EGFP y BacWT.

9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre los recuentos moleculares de GP64-WT, E25-EGFP y P24-EGFP se analizaron mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) para comparar la media de cada grupo y determinar si hubo diferencias significativas. Se realizó una prueba de Tukey post-hoc para comparaciones múltiples. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Para evaluar si había una diferencia significativa entre las medias del recuento molecular de P24 y P24-EGFP, se empleó la prueba t de Student. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue inferior a 0,0001 ($p < 0,0001$).

Resultados

1. La proteína de la envoltura GP64 está polarizada hacia un extremo del baculovirus.

Un estudio estructural en baculovirus utilizando TEM en combinación con marcaje de anticuerpos y partículas de oro (InmunoGold), describió hace años que la proteína estructural GP64 se encontraba localizada hacia un extremo del virus (33,36). GP64 es una proteína esencial para la infección por este virus, ya que permite el anclaje a las células y facilita la salida del endosoma, una vez que el baculovirus ha ingresado a la célula hospedera de insecto (36).

Con el fin de determinar si los baculovirus recombinantes producidos por nosotros mantienen la polarización de la proteína GP64, realizamos experimentos de TEM-immunoGold utilizando un anticuerpo específico contra GP64 y un anticuerpo

secundario acoplado a nanopartículas de oro. El primer paso fue producir los baculovirus recombinantes, para este proyecto generamos 3 diferentes virus: un baculovirus silvestre (BacWT), un baculovirus que contiene el gen que codifica para la proteína de la envoltura E25 fusionado a la proteína

fluorescente verde (EGFP) (BacE25-EGFP) y un baculovirus recombinante que contiene el gen que codifica para la proteína de la nucleocápside P24 fusionado a EGFP (BacP24-EGFP). Estas construcciones se detallan en la figura 1A.

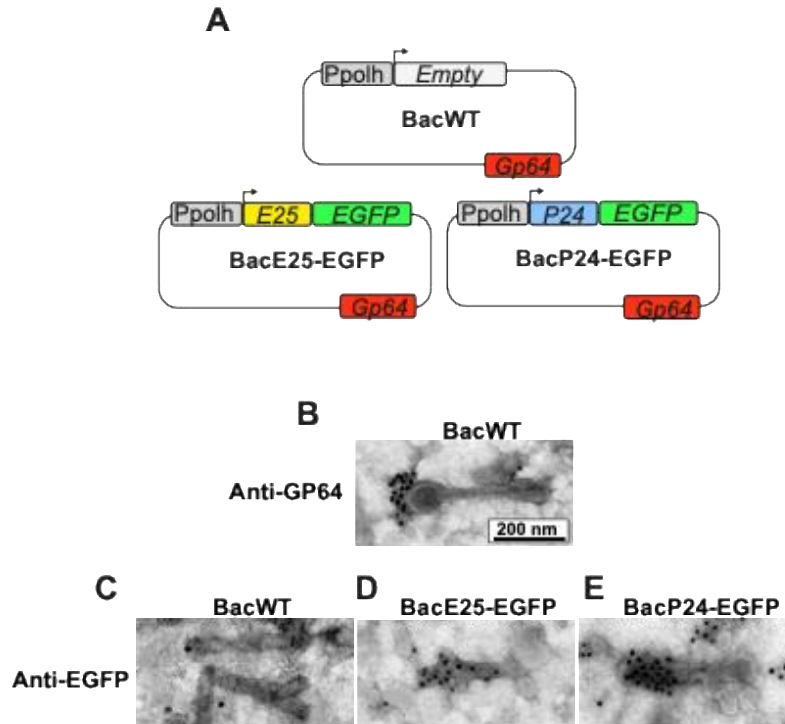


Figura 1. Generación de baculovirus recombinantes para estudios de molécula única. A, diagrama mostrando las construcciones utilizadas para generar baculovirus recombinantes silvestre (BacWT), baculovirus recombinante expresando la proteína de fusión E25-EGFP (BacE25-EGFP) y baculovirus recombinante expresando la proteína de fusión P24-EGFP (BacP24-EGFP). Imágenes representativas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) combinada con inmunoGold de BacWT marcando la proteína de la envoltura GP64 (B), la proteína verde fluorescente (EGFP) en el baculovirus silvestre como control negativo de marcaje (C) y la proteína de fusión E25-EGFP del baculovirus recombinante BacE25-EGFP (D) y la proteína P24-EGFP del baculovirus recombinante BacP24-EGFP (E). Figura modificada de (22).

Posteriormente se amplificaron los baculovirus y se purificaron (materiales y métodos) para realizar posteriormente el marcaje necesario para los estudios de TEM-immunoGold. La figura 1B muestra una micrografía representativa de un baculovirus individual, mostrando el marcaje por nanopartículas de oro de la proteína GP64. Como se observa en la figura, GP64 se ubica polarizada a un extremo del virus (Fig. 1B). Posteriormente realizamos el marcaje con un anticuerpo específico contra la proteína EGFP. Como se observa en el baculovirus control, no se ve marcaje específico, como era de esperarse ya que el baculovirus BacWT no lleva el gen que codifica para EGFP (Fig. 1C). En contraste, el marcaje anti-EGFP se observa claramente en el baculovirus BacE25-EGFP (Fig. 1D) y BacP24-EGFP (Fig. 1E). Interesantemente, el marcaje de E25-EGFP se observa a todo lo largo del baculovirus, mientras que el marcaje de P24-EGFP pareciera localizarse

también hacia un extremo del baculovirus recombinante. Esto se explorará más adelante utilizando la microscopía de molécula única.

2. La proteína de la envoltura E25 se distribuye de forma homogénea en la envoltura de baculovirus mientras que la proteína P24 esta polarizada a un extremo del virus.

Debido a que la técnica de TEM-immunoGold permite solo el marcaje de unas cuantas nanopartículas de oro y esto no permite una evaluación adecuada de la polaridad de proteínas, decidimos implementar una técnica de microscopía de fluorescencia de molécula única (SMLM), aprovechando que nuestros baculovirus recombinantes llevan genes que codifican para proteínas de fusión para E25 y P24 con la proteína fluorescente EGFP (Fig. 1A).

El principio básico de la microscopía de fluorescencia de molécula única (SMLM) consiste en excitar al fluoróforo de interés manteniéndolo en un ambiente reductor (el cual se consiste en el uso de soluciones que previenen la oxidación del fluoróforo) con el fin de que el fluoróforo pueda ciclar entre un estado apagado y uno encendido, lo cual genera que cada fluoróforo parpadee de forma intermitente (Fig. 2A). Debido a que los fluoróforos parpadean de forma aleatoria (estocástica) la probabilidad de que dos fluoróforos contiguos parpadeen de forma sincrónica

es bajísima, lo cual permite eliminar la luz proveniente de fluoróforos vecinos, obteniéndose la luz de un solo fluoróforo en esa región espacial (Fig. 2B). Si se adquieren miles de imágenes por segundo es factible reconstruir empalmando todas las miles de imágenes y así obtener (molécula por molécula) la localización espacial de todos los fluoróforos individuales de la muestra (Fig. 2C). De esta forma reconstruimos, una a una, todas las proteínas estructurales de un virus individual con una resolución nanométrica.

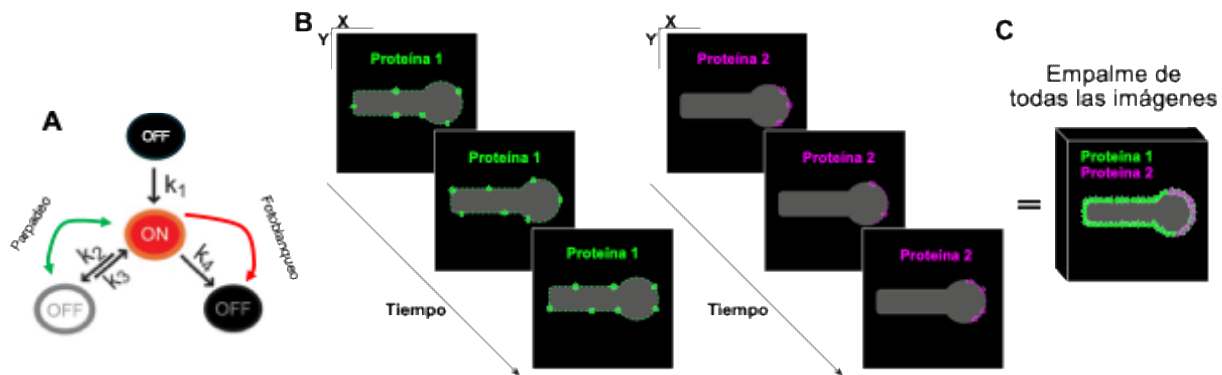


Figura 2. Principios del funcionamiento de la microscopía de localización de molécula única (SMLM). A, esquema mostrando los estados de un fluoróforo. Se observa el estado apagado (arriba marcado como OFF fondo negro). Posteriormente a la excitación con luz el fluoróforo cambia al estado de emisión de fluorescencia (ON en fondo rojo). De aquí puede seguir dos caminos, cuando existe un ambiente reductor el fluoróforo se mueve a un estado de apagado (OFF con fondo gris) y cambia rápidamente entre estos dos estados generando un parpadeo (nótese como este estado es reversible con constantes k_2 y k_3). En el segundo camino, cuando existe un ambiente oxidante, el fluoróforo se fotoblanquea (OFF en fondo negro con letra gris) y no vuelve a emitir luz nunca más. Este estado con constante k_4 es irreversible. En este último estado el fluoróforo queda destruido e imposibilitado para generar un nuevo ciclo de fluorescencia

La figura 3 muestra imágenes típicas de baculovirus individuales donde se marcó a la proteína GP64 con un anticuerpo fluorescente para poder visualizarla en combinación con la fluorescencia de las proteínas E25-EGFP y P24-EGFP. En la figura 3A se muestra el marcaje de cientos de moléculas individuales de GP64 (cada punto es una molécula individual), las cuales se localizan polarizadas hacia un extremo del baculovirus, tal y como se reportó en trabajos anteriores al nuestro y como habíamos observado con la técnica de TEM-immunoGold (Fig. 1B). Para poder visualizar al baculovirus completo utilizamos una sonda fluorescente que marca la

envoltura viral (envelope, mostrado en magenta). La distribución de la proteína E25-GFP se observa más homogénea a lo largo de la envoltura viral (Fig. 3B). Interesantemente, la distribución de la proteína P24-EGFP se observa localizada hacia un extremo del baculovirus, de forma muy parecida a la distribución de la proteína GP64 (Fig. 3C). El análisis de la distribución espacial de la intensidad de fluorescencia a lo largo de los baculovirus muestra de forma más evidente la distribución polarizada de P24 y GP64 (Fig. 3D).

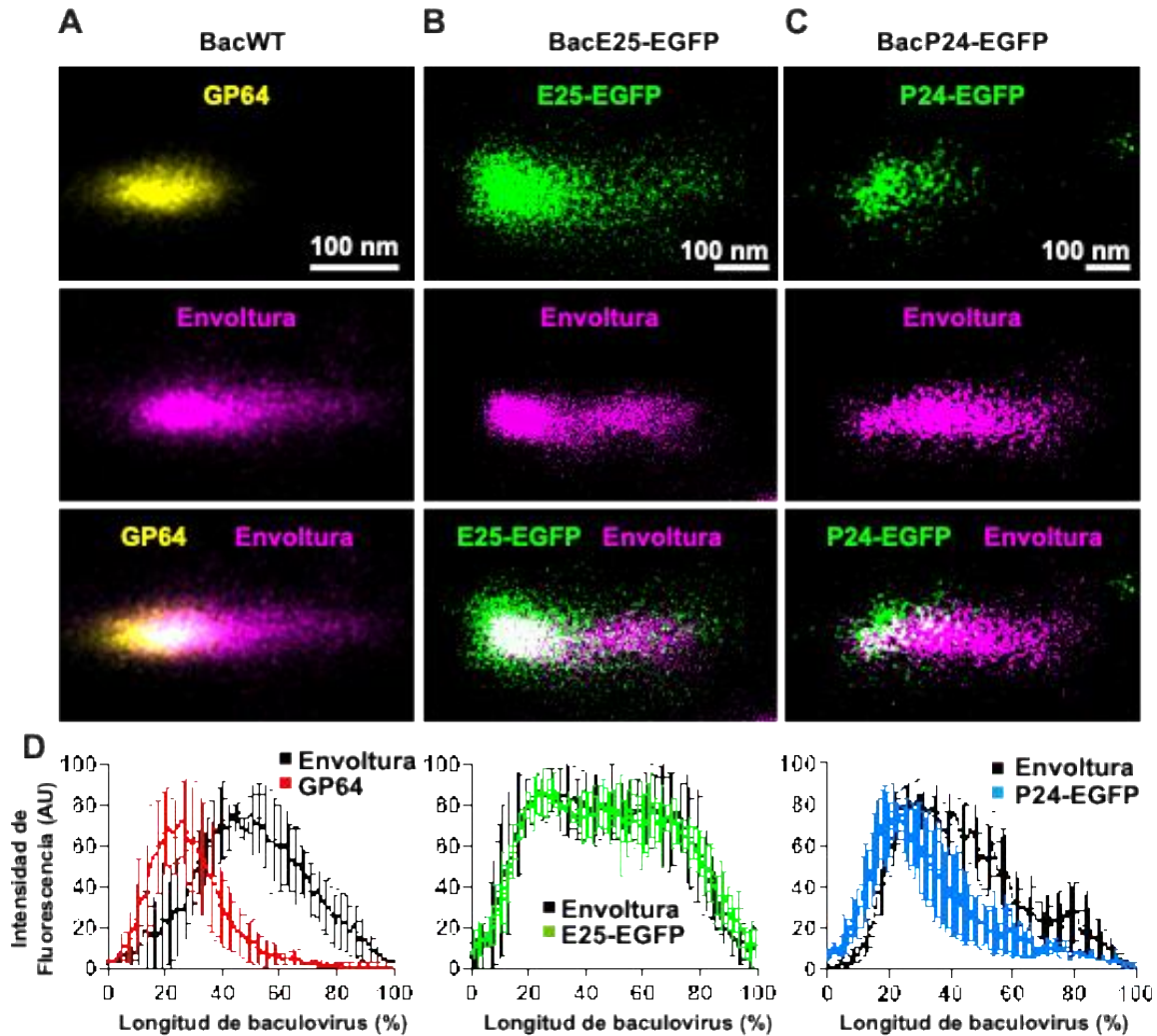


Figura 3. Estudios de microscopía de molécula única con los baculovirus recombinantes. Fluorescencia de molécula única con baculovirus silvestre (A, BacWT), baculovirus recombinante (B, BacE25-EGFP) y baculovirus recombinante (C, BacP24-EGFP). Cada punto de fluorescencia corresponde a una molécula individual de las proteínas de fusión o de GP64 endógena (marcada con un anticuerpo anti-GP64 comercial acoplado a un fluoróforo). D, análisis de la distribución de fluorescencia en el espacio para decenas de baculovirus individuales como los mostrados en las imágenes superiores. La intensidad de fluorescencia se midió a lo largo del baculovirus (izquierda a derecha). Los datos muestran la media y desviación estándar de al menos 25 baculovirus individuales. Nótese como la proteína endógena GP64 se concentra en un polo del baculovirus (a la izquierda), mientras que la proteína de la envoltura E25 muestra una distribución indistinguible de la obtenida con un marcador de envoltura viral (mostrado en magenta en las imágenes superiores). La proteína de la nucleocápside P24 también muestra una distribución discreta polarizada hacia la misma ubicación de la proteína GP64. Figura modificada de (22).

3. La proteína de la nucleocápside P24 se encuentra polarizada hacia el mismo extremo del baculovirus donde se encuentra GP64.

Con el fin de estudiar de manera más detallada las distribuciones de E25-EGFP y P24-EGFP en relación con GP64, realizamos marcajes dobles en baculovirus individuales y procedimos a contar el número de proteínas en cada baculovirus individual (Fig. 4). La

figura 4A muestra la distribución polarizada de GP64 (rojo) y la de E25-EGFP (verde) en el mismo baculovirus individual. El análisis de la distribución de intensidad de fluorescencia respecto a la distancia muestra claramente que la proteína GP64 se localiza hacia un extremo del baculovirus, como habíamos mostrado con anterioridad (Fig. 4B)

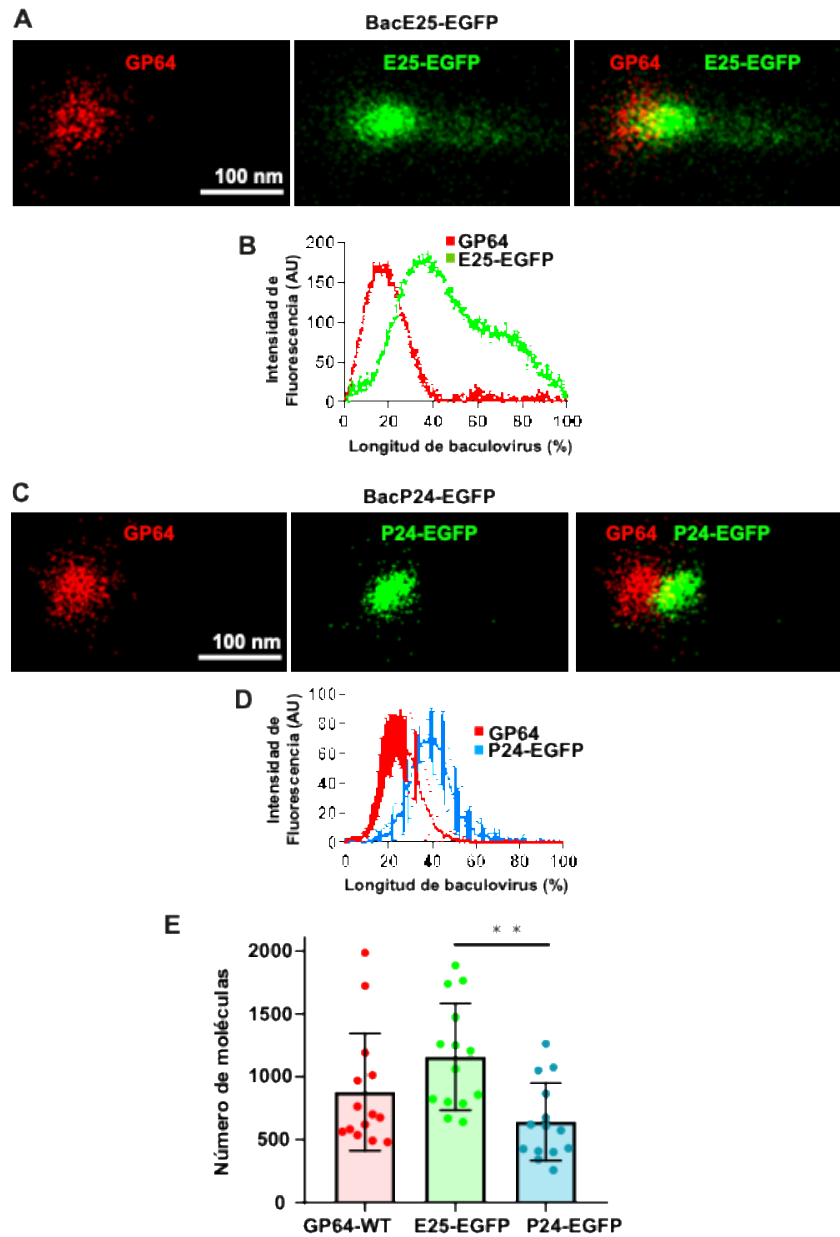


Figura 4. Conteo de moléculas individuales de las proteínas de la envoltura E25 y de la nucleocápside P24. A, ejemplos representativos de baculovirus individuales donde se marcó a la proteína GP64 con un anticuerpo comercial en el baculovirus recombinante BacE25-EGFP. B, análisis de la distribución espacial de la intensidad de fluorescencia de la proteína de fusión E25-EGFP y la proteína endógena GP64. C, imágenes representativas de un baculovirus recombinante BacP24-EGFP expresando la proteína de fusión P24-EGFP. D, análisis de la distribución espacial de la intensidad de fluorescencia de la proteína de fusión P24-EGFP y la proteína endógena GP64. E, conteo de moléculas individuales de GP64 en el baculovirus silvestre BacWT, E25-EGFP del baculovirus recombinante BacE25-EGFP y P24 del baculovirus recombinante BacP24-EGFP. Los datos muestran la media y desviación estándar de al menos 15 baculovirus individuales. El asterisco doble marca la diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre E25-EGFP y P24-EGFP. El número de moléculas contado fue: 878 ± 466 para GP64, 1158 ± 424 para E25-EGFP y 642 ± 308 para P24-EGFP, media y desviación estándar respectivamente. Figura modificada de (22).

Posteriormente estudiamos la localización de P24-EGFP con respecto a GP64 (Fig. 4C). Ambas proteínas se encuentran localizadas hacia un extremo del baculovirus, donde P24-EGFP se ubica justo al

lado de GP64 (Fig. 4C). La distribución de la fluorescencia en el espacio hace más evidente la localización de ambas proteínas adyacentes una a la otra (Fig. 4D). Además, tomamos ventaja de la

microscopía de molécula única que permite identificar y contar moléculas individuales de la proteína de interés, para cuantificar el número de moléculas presente en promedio en los baculovirus individuales. Tal y como se muestra en la figura 4E, la cantidad de moléculas individuales de GP64 fue similar a la de E25-EGFP, y la cantidad de moléculas individuales de P24-EGFP fue un poco menor a las otras dos proteínas.

4. Modelo de la distribución diferencial de proteínas estructurales en baculovirus individuales.

La figura 5A muestra un diagrama representando la distribución diferencial de algunas proteínas estructurales de baculovirus. Como se puede apreciar, las proteínas GP64 y P24 se localizan en un extremo

del virus, mientras que la proteína E25 tiene una distribución más homogénea a lo largo del baculovirus. La localización espacial de GP64 hacia un extremo del virus tiene vital relevancia para la infección viral, dado que esta proteína es la encargada de permitir el ingreso del virus a la célula huésped. Lo anterior sugeriría que el baculovirus entra a la célula huésped orientado a lo largo del virus (Fig. 5B) ya que GP64 se une al receptor de la célula huésped para iniciar el proceso de ingreso del virus (el proceso de infección). Es muy poco probable que el baculovirus entre de lado u orientado hacia el extremo opuesto al que concentra a GP64 (Fig. 5C), ya que en ese extremo no hay proteína GP64 para unirse al receptor celular.

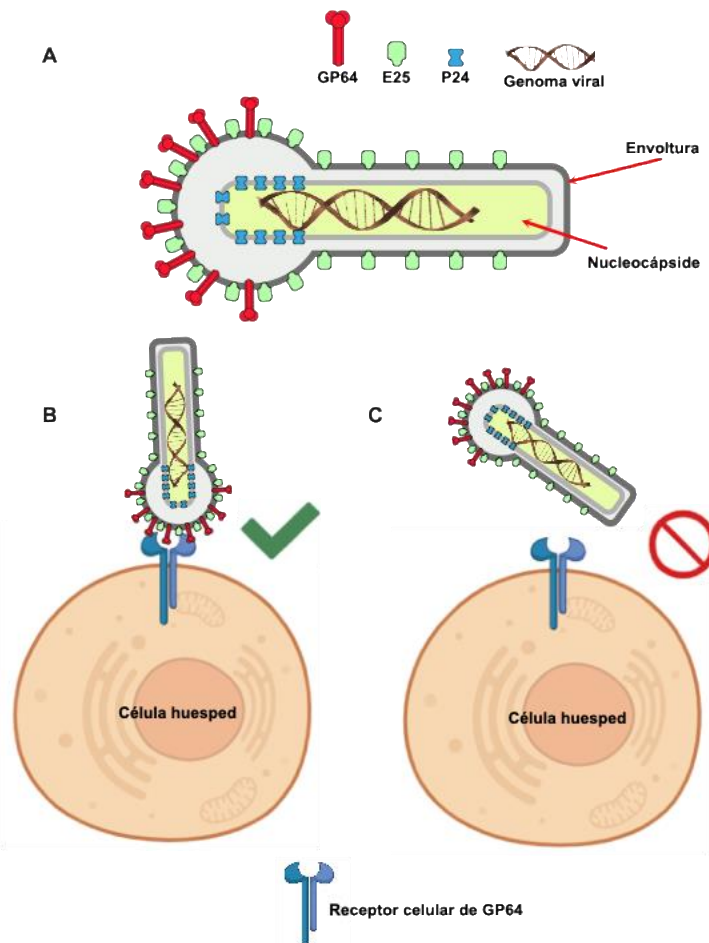


Figura 5. Modelo representativo de la distribución diferencial de proteínas estructurales en baculovirus. A, El esquema muestra la localización diferencial de 3 proteínas estructurales en el baculovirus mostrando la envoltura viral y la nucleocápside (donde se localiza el genoma viral) como referencia. Nótese que la proteína GP64 y P24 se encuentran cercanas y ubicados en un polo del virus, mientras que la proteína E25 decora la envoltura viral. B, esquema representado la posible orientación que toma el baculovirus para ingresar a la célula huésped. C, la orientación incorrecta del baculovirus con respecto a la célula y a la posición de GP64 no permitiría el ingreso del virus a la célula huésped. La proteína GP64 debe estar dirigida hacia la superficie celular para facilitar la interacción con el receptor del virus presente en la célula huésped y la proteína GP64.

Discusión y conclusiones

La técnica de microscopía de fluorescencia de molécula única (SMLM), no solo permite conocer la distribución espacial de proteínas virales estructurales en virus individuales, sino que además permite conocer con certeza el número de moléculas desplegadas en la superficie del virus. Lo anterior es relevante cuando se utilizan virus para desplegar antígenos de interés con fines biomédicos, como en la creación de vacunas. Esto permitiría conocer con precisión el número de antígenos administrado a pacientes al ser vacunados. En las vacunas actuales disponibles comercialmente este dato es imposible de determinar. Esto permitiría dosificar no solamente en nanogramos de proteína, sino el número de moléculas del antígeno administrado en una vacunación.

El trabajo presentado aquí es una prueba de concepto de que es factible conocer la distribución espacial de proteínas estructurales en virus con muy alta resolución. En la actualidad solo existen unos cuantos trabajos donde se explora el uso de SMLM en virus individuales. Creemos que esta metodología puede ofrecer una gran cantidad de información estructural y ayudar en el entendimiento de la morfogénesis viral.

Los avances futuros en microscopía de super resolución permitirán, eventualmente, alcanzar resoluciones similares a la proporcionada por la microscopía electrónica, con la ventaja de que en la microscopía de luz no es necesario fijar o manipular los virus como en microscopía electrónica. Lo anterior permitiría avanzar más rápidamente en la caracterización morfológica a nivel molecular de virus de interés.

Finalmente, sería importante determinar si la distribución espacial diferencial de algunas proteínas virales estructurales tiene algún papel funcional, por

ejemplo, en el caso de P24. Sabemos que GP64 es la proteína esencial para permitir el ingreso del baculovirus a la célula de insecto. Si se elimina esta proteína los baculovirus no son infectivos. Tiene sentido que dicha proteína se ubique en un extremo del baculovirus. Estos virus tienen forma de bastón (de ahí su nombre de báculo, bastón en latín). La forma más energéticamente viable de introducir un bastón a una célula es orientada hacia uno de sus polos, ya que, en orientación lateral el baculovirus presenta una mayor superficie y energéticamente es más difícil atravesar la membrana plasmática en esta orientación (Fig. 5A-C). Por ello tiene sentido que GP64 se localice únicamente en un extremo del bastón, lo cual facilitaría la interacción entre GP64 y el receptor del baculovirus presente en la membrana de la célula huésped (Fig. 5B). Sin embargo, la razón por la cual P24 se encuentra también orientada hacia el mismo polo que GP64 permanece desconocida. Lo anterior se debe principalmente a que no sabemos cuál es la función de P24, lo único que sabemos es que esta proteína se encuentra adosada a la nucleocápside viral. Experimentos futuros que actualmente hemos iniciado en nuestro grupo permitirán relacionar la función de esta proteína estructural con su localización polarizada.

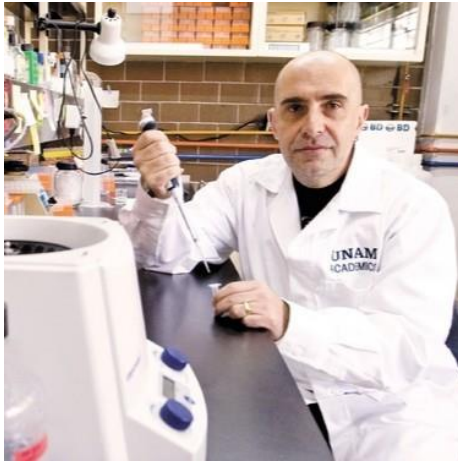
Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por un donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, AV200320). Luis Vaca, Daniel Martínez-Flores, Aaron Pavel Rodríguez-Hernández e Ileana Tobías-Juárez recibieron apoyo del Conahcyt mediante las becas 815023, 1190360 y 812 631.

Referencias

- López-García P, Moreira D. Viruses in Biology. *Evo Edu Outreach* 2012;5:389–98. <https://doi.org/10.1007/s12052-012-0441-y>.
- Michán C, Michán-Doña A. Viruses: Friends or foes. *Microbial Biotechnology*. 2022;15:88–90. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13948>.
- Robb NC. Virus morphology: Insights from super-resolution fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2022;1868:166347. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166347>.
- Lecoq H. Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898? *C R Acad Sci III* 2001;324:929–33. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(01\)01368-3](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(01)01368-3).
- Stanley WM. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. *Science* 1935;81:644–5. <https://doi.org/10.1126/science.81.2113.644>.
- Wyckoff RWG, Corey RB. The Ultracentrifugal Crystallization of Tobacco Mosaic Virus Protein. *Science, New Series* 1936;84:513.
- Kausche GA, Pfankuch E, Ruska H. Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften* 1939;27:292–9. <https://doi.org/10.1007/BF01493353>.
- Schmolze DB, Standley C, Fogarty KE, Fischer AH. Advances in Microscopy Techniques. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011;135:255–63. <https://doi.org/10.5858/135.2.255>.
- The Diffraction Barrier in Optical Microscopy. Nikon's MicroscopyU n.d. <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy> (accessed September 3, 2024).
- Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f mikrosk Anatomie* 1873;9:413–68. <https://doi.org/10.1007/BF02956173>.
- Valli J, Garcia-Burgos A, Rooney LM, Vale De Melo E, Oliveira B, Duncan RR, Rickman C. Seeing beyond the limit: A guide to choosing the right super-resolution microscopy technique. *Journal of Biological Chemistry* 2021;297:100791. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100791>.

12. Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O, et al. Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol* 2019;21:72–84. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8>.
13. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *CP Cytometry* 2020;92:e68. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>.
14. Witte R, Andriasyan V, Georgi F, Yakimovich A, Greber UF. Concepts in Light Microscopy of Viruses. *Viruses* 2018;10:202. <https://doi.org/10.3390/v10040202>.
15. Jacquemet G, Carisey AF, Hamidi H, Henriques R, Leterrier C. The cell biologist's guide to super-resolution microscopy. *Journal of Cell Science* 2020;133:jcs.240713. <https://doi.org/10.1242/jcs.240713>.
16. Gray RDM, Beerli C, Pereira PM, Scherer KM, Samolej J, Bleck CKE, et al. VirusMapper: open-source nanoscale mapping of viral architecture through super-resolution microscopy. *Sci Rep* 2016;6:29132. <https://doi.org/10.1038/srep29132>.
17. Beilstein F, Cohen GH, Eisenberg RJ, Nicolas V, Esclatine A, Padeloup D. Dynamic organization of Herpesvirus glycoproteins on the viral envelope revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Pathog* 2019;15:e1008209. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008209>.
18. Laine RF, Goodfellow G, Young LJ, Travers J, Carroll D, Dibben O, et al. Structured illumination microscopy combined with machine learning enables the high throughput analysis and classification of virus structure. *eLife* 2018;7:e40183. <https://doi.org/10.7554/eLife.40183>.
19. Buttler CA, Pezeshkian N, Fernandez MV, Aaron J, Norman S, Freed EO, et al. Single molecule fate of HIV-1 envelope reveals late-stage viral lattice incorporation. *Nat Commun* 2018;9:1861. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04220-w>.
20. McMahon A, Andrews R, Groves D, Ghani SV, Cordes T, Kapanidis AN, et al. High-throughput super-resolution analysis of influenza virus pleomorphism reveals insights into viral spatial organization. *PLoS Pathog* 2023;19:e1011484. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011484>.
21. Olaya-Bravo K, Martínez-Flores D, Rodríguez-Hernández AP, Tobías-Juárez I, Castro-Rodríguez JA, Sampieri A, et al. Resolving viral structural complexity by super-resolution microscopy. *Arch Virol* 2024;170:5. <https://doi.org/10.1007/s00705-024-06192-3>.
22. Martínez-Flores D, Rodríguez-Hernández AP, Sampieri A, Cruz-Reséndiz A, Tobías-Juárez I, Lara-Martínez R, et al. Resolving the differential distribution of structural proteins in baculovirus using single-molecule localization microscopy. *Journal of General Virology* 2024;105:002054. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.002054>.
23. Thiem SM, Cheng X-W. Baculovirus host-range. *Virol Sin* 2009;24:436–57. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3058-8>.
24. Rohrmann GF. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. *Baculovirus Molecular Biology* [Internet]. 4th edition, National Center for Biotechnology Information (US); 2019.
25. Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* 1990;35:127–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001015>.
26. Vialard JE, Arif BM, Richardson CD. Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses. *Baculovirus Expression Protocols*, vol. 39, New Jersey: Humana Press; 1995, p. 1–24. <https://doi.org/10.1385/0-89603-272-8:1>.
27. Cox MMJ. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 2012;30:1759–66. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>.
28. Pidre ML, Arriás PN, Amorós Morales LC, Romanowski V. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses* 2022;15:80. <https://doi.org/10.3390/v15010080>.
29. Clem RJ, Passarelli AL. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *PLOS Pathogens* 2013;9:e1003729. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003729>.
30. Blissard GW, Theilmann DA. Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. *Annu Rev Virol* 2018;5:113–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>.
31. Jia X, Gao Y, Huang Y, Sun L, Li S, Li H, et al. Architecture of the baculovirus nucleocapsid revealed by cryo-EM. *Nat Commun* 2023;14:7481. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43284-1>.
32. Wang Q, Bosch B-J, Vlák JM, Van Oers MM, Rottier PJ, Van Lent JWM. Budded baculovirus particle structure revisited. *Journal of Invertebrate Pathology* 2016;134:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.001>.
33. Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 1996;70:4607–16. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.7.4607-4616.1996>.
34. Chambers AC, Aksular M, Graves LP, Irons SL, Possee RD, King LA. Overview of the Baculovirus Expression System. *CP Protein Science* 2018;91. <https://doi.org/10.1002/cpps.47>.
35. Descloux A, Grubmayer KS, Radenovic A. Parameter-free image resolution estimation based on decorrelation analysis. *Nat Methods* 2019;16:918–24. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0515-7>.
36. Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 1992;66:6829–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.11.6829-6835.1992>.



DR. LUIS VACA
ORCID: 0000-0003-2266-4847

El Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez nació en Guadalajara, Jalisco en el año de 1960. En el año de 1985 se graduó de Médico Cirujano, por la Universidad Autónoma Metropolitana. En el año de 1985 obtiene el título de Maestría en Investigación Biomédica Básica, por la Universidad Nacional Autónoma de México, y en 1995 el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas por la misma Institución, graduándose con honores en ambos casos. En 1997 recibe la medalla Gabino Barreda a la mejor tesis doctoral de su generación. En el año de 1989 es contratado como joven investigador (Assistant profesor) por el Colegio de Medicina de Baylor, en Houston Texas, donde permanecería hasta el año 1995, cuando ingresa como investigador titular al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El Dr. Vaca ha sido acreedor a más de treinta premios nacionales e internacionales, entre los que destacan

haber sido investigador Alexander von Humboldt en el año de 1999, el premio Miguel Alemán Valdés en Investigación en Salud 2001, el premio Silanes al mejor artículo de investigación básica en 2004, el premio al mejor desarrollo tecnológico de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARMA) 2010, 2016, 2017, 2021 y el premio Roche Dr. Jorge Rosenkranz 2016 y el Premio Estímulos a Investigaciones Médicas “Miguel Alemán Valdes” 2017. Los proyectos de investigación del Dr. Vaca han sido apoyados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos, la Fundación Americana de Fibrosis Quística, la Asociación Americana del Corazón y la Fundación Nacional de Ciencia de Estados Unidos (National Science Foundation).

El Dr. Vaca ha graduado a más de 40 alumnos de posgrado y más de 20 de licenciatura. Varios de sus ex alumnos de Doctorado ahora son investigadores independientes en México y el extranjero, en las universidades de Washington en Seattle, Universidad de Ohio, la Universidad Erasmus en Rotterdam Holanda, el Cinvestav, la UNAM y el INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica), La Universidad Autónoma de Querétaro, entre otras.

Ha publicado más de 100 artículos en revistas de arbitraje internacional y varios capítulos en libros. Sus trabajos han recibido más de 5000 citas a la fecha.

El Dr. Vaca tiene 5 patentes internacionales y 3 nacionales, ha sido asesor científico para las compañías Noran Instruments, Olympus Imaging, Silicon Graphics, Sigma-Aldrich y TIRF Technologies. De esta última compañía además forma parte de la junta directiva. El Dr. Vaca es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 3 e Investigador Titular C del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.