

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencia de la Vida

Diseño de un gen recombinante de Influenza A para medir *in vitro* anticuerpos neutralizantes
contra el virus.

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

VIDA-330

Presentado por:

Melanie Aylin Cedeño Zambrano

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico en primer lugar a Dios, porque su voluntad siempre es buena.

A mis padres, Johanna y Miguel, porque sin su amor y sacrificio nada sería posible. A mis hermanas, Naomi y Demmy, por llenar de risas y esperanzas mi vida, por ser mi soporte y mi refugio.

A mi Papi Fausto y mi Mami Azu, por criarme y educarme, no solo como una nieta, sino como una hija. Papi Fausto, desde donde estés, espero que me veas y seas feliz conmigo.

A toda mi familia y todos quienes creen en mí.

Mel Cedeño Zambrano

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todos los que fueron y son parte equipo del Laboratorio para Investigaciones Biomédicas desde mis inicios en el 2021, por verme y ayudarme a crecer en este mundo de la ciencia. Gracias al PhD.

Washington Cárdenas (“El Doc.”) y a la MsC. Mariuxi Mirabá (“Maru”) por confiar en mí. A mis amigas de lab, Gaby T. y Emily S., por apoyarme y motivarme en los días complicados.

A todos los buenos profes que tuve en la U, por sus aprendizajes, apoyo y consejos.

Gracias a mis amigos de carrera, en especial a Marisa y Emilio por hacer que cada semestre se sienta sencillo. A Caleb y a mis mejores amigos, Christian y Gaby D., por siempre estar para mí, siempre a un mensaje o llamada.

Gracias a todos los amigos que hice en la U, de inicio a fin.

Declaración Expresa

Yo *Melanie Aylin Cedeño Zambrano* acuerdo y reconozco que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 04 de febrero del 2024.



Melanie Cedeño Zambrano

Evaluadores

Diego Gallardo Polit, M.Sc.

Profesor de Materia

Washington B. Cárdenas, PhD.

Tutor de proyecto

Resumen

El virus de la Influenza A, que infecta a gran cantidad de individuos incluyendo humanos y aves, se caracteriza por su gran variabilidad genética y su capacidad para constantemente evadir al sistema inmune. Brotes actuales de Influenza A del tipo H5N1 que afecta a aves implican un gran peligro para el creciente sector avícola del país, debido a su alta patogenicidad. Actualmente, se toman medidas de control y prevención basadas principalmente en la vacunación, por lo que es necesario una correcta evaluación de la eficacia de vacunas comerciales.

El presente proyecto, propone la implementación de un virus reportero con un gen recombinante fluorescente integrado a su genoma para conocer de la capacidad de neutralización que tienen los anticuerpos producidos por vacunación en una simulación celular en el laboratorio. Mediante el uso de técnicas moléculas y celulares se obtuvo el gen recombinante y se evaluó la expresión la cual emitió fluorescencia como se esperaba. Este resultado, ayudará en el obtención del virus reportero y posteriormente, en una evaluación real de las vacunas para implementar medidas adecuadas de control y prevención contra la Influenza A y todos su subtipos.

Palabras claves: Biología molecular, gen recombinante, eficacia de vacunación, *in vitro*, inmunización.

Abstract

The Influenza A virus, infecting many individuals, including humans and birds, is characterized by its significant genetic variability and its ability to constantly evade the immune system. Current outbreaks of Influenza A, such as the H5N1 subtype affecting birds, pose a substantial threat to the country's growing poultry sector due to its high pathogenicity. Presently, control and prevention measures primarily rely on vaccination, necessitating an accurate assessment of the effectiveness of commercial vaccines.

This project proposes the implementation of a reporter virus with a fluorescent recombinant gene integrated into its genome to understand the neutralization capacity of antibodies produced through vaccination in a laboratory-based cellular simulation. Through the use of molecular and cellular techniques, the recombinant gene was obtained, and its expression was evaluated, emitting fluorescence as expected. This result will aid in obtaining the reporter virus and subsequently in a real assessment of vaccines to implement appropriate control and prevention measures against Influenza A and all its subtypes.

Keywords: *Molecular biology, recombinant gene, vaccine efficacy, in vitro, immunization.*

Índice general

Evaluadores	5
Resumen	6
Abstract	7
Índice general	8
Abreviaturas	10
Simbología	11
Índice de figuras	12
1. CAPÍTULO 1	13w
1.1 Introducción.....	13
1.2 Descripción del problema.....	15
1.3 Justificación del problema	15
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general	16
1.4.2 Objetivos específicos	17
1.5 Marco teórico.....	17
1.5.1 Virus de Influenza A (IAV)	17
1.5.1.1 Virus de la influenza aviar y subtipos de alta patogenicidad	18
1.5.1.2 Estructura del virus de la Influenza.....	20
1.5.1.2.1 Proteínas No Estructurales (NS).....	21
1.5.1.2.2 Regiones no codificantes (NCR) y señales de empaquetamiento.....	23
1.5.2 Generalidades para la construcción del gen reportero en base a NS	23
1.5.3 Gen reportero fluorescente	24
1.5.4 Técnicas moleculares implementadas en la construcción del gen reportero	24
1.5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
1.5.4.2 Clonación molecular	25

1.5.4.3	Transfección celular.....	25
CAPÍTULO 2	26
2.	Metodología.....	27
2.1.1	<i>Construcción del gen reportero en base al gen NS</i>	27
2.1.1.1	Diseño in silico del gen.....	27
2.1.1.2	Amplificación de la secuencia sintetizada.....	29
2.1.1.3	Clonación del inserto de interés.....	29
2.1.1.4	Transfección y expresión de la proteína fluorescente.....	32
CAPÍTULO 3	34
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	35
3.1	Amplificación de la secuencia.....	35
3.2	Clonación de la secuencia.....	35
3.3	Transfección y evaluación de la expresión.....	36
CAPÍTULO 4	40
4.	CONCLUSIONES y recomendaciones.....	40
4.1	Conclusiones.....	40
4.2	Recomendaciones.....	41
Referencias	42

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
IAV	Virus de la Influenza A
HPAIV	High Pathogenic Aviar Influenza
LPAIV	Low Pathogenic Aviar Influenza
HA	Hemaglutinina
NA	Neurominidasa
PCR	Polymerase chain reaction
UV	Ultraviolet
NS	Nonstructural gene
PIB	Producto Interno Bruto
vRNP	Ribonucleoproteína viral
NCR	Non-coding región
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RNA	Ribonucleic acid

Simbología

pb	pares de bases
kb	kilobases
nt	nucleótidos

Índice de figuras

Figura 1.1 Estructura del virus de la Influenza (Breen et al., 2016). Elaborado en BioRender.com	18
Figura 1.2 Proteínas y genes del virus Influenza A (Chiem et al., 2022).....	21
Figura 1.3 Estructura del gen NS del virus de la Influenza A. (Breen et al., 2016). Elaborado en BioRender.com.....	22
Figura 2.1 Diagrama de metodología implementada en el proyecto. Elaborado en BioRender.com	27
Figura 2.2 Estructura de la construcción del gen reporte enviado a sintetizar.....	28
Figura 2.3 Diseño de primers y secuencia. Elaborado en Biorender	29
Figura 2.4 Plásmido abierto con enzimas de digestión. Elaborado en Biorender	30
Figura 2.5 Digestión y ligación de los fragmentos. Elaborado en Biorender	31
Figura 2.6 Transformación por choque térmico. Elaborado en Biorender.....	32
Figura 2.7 Transfección en células mamíferas. Elaborado en Biorender.....	33
Figura 3.1 Amplificación de la secuencia por PCR punto final.....	35
Figura 3.2 Comprobación por digestión del MiniPrep de las colonias transformadas.....	36
Figura 3.3 Plan de transfección	36
Figura 3.4 Resultado de la transfección con luz UV - 24 horas.....	37
Figura 3.5 Visualización a 40x con luz blanca+UV.....	39
Figura 3.6 Visualización a 40x luz UV	39

1. CAPÍTULO 1

1.1 Introducción

El sector avícola en Ecuador ha experimentado un notorio incremento del 27% en el número de aves criadas entre 2018 y 2019 (FAO, 2022), consolidándose como un componente significativo del Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario, representando el 16%, y

contribuyendo en un 2% al PIB total; además, genera 32,000 plazas de trabajo directas y 220,000 indirectas (Mero Chávez et al., 2022). A pesar de este crecimiento, la industria avícola se enfrenta a la amenaza de la influenza aviar, una enfermedad infecciosa que afecta primordialmente a las aves.

La influenza aviar se subdivide en variantes de baja y alta patogenicidad, siendo las variantes de alta patogenicidad, como los subtipos H5 y H7 del tipo A, particularmente peligrosas. Estas cepas presentan la capacidad de inducir enfermedades graves con tasas de mortalidad que alcanzan el 100% en diversas especies avícolas. Aunque la mayoría de los virus de la influenza aviar no son zoonóticos, algunas cepas altamente patógenas exhiben la capacidad de afectar a los seres humanos, representando así una amenaza significativa para la salud pública (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

Es relevante destacar que el virus de la influenza, incluido el de alta patogenicidad, tiene la capacidad de recombinarse, lo que significa que puede intercambiar material genético con otros virus de influenza en ciertas circunstancias. Este fenómeno aumenta la posibilidad de generar nuevas variantes del virus, lo que puede complicar los esfuerzos de control y prevención.

En el contexto de la influenza aviar, es importante recordar el brote de H1N1 en 2009, que fue una variante de influenza A de origen porcino que afectó a nivel mundial. Este evento resalta la capacidad de los virus de influenza para atravesar barreras de especies y generar cepas que pueden infectar tanto a animales como a humanos, subrayando la importancia de mantener una vigilancia constante y estrategias de prevención efectivas. Desde el 2022, en Ecuador ya se han registrado casos de influenza aviar H5N1, tanto en aves silvestres como en aves de corral, según informes de diversos medios de comunicación nacional (Revista AviNews, 2023).

En respuesta a esta amenaza, el gobierno ecuatoriano ha implementado estrategias de prevención y control, destacando la vacunación como una medida central. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (2023), la vacunación en aves contra la cepa H5N1 se presenta como una

herramienta efectiva que, complementada con medidas de bioseguridad, ha logrado reducir la tasa de mortalidad del 80% al 40%. Desde marzo de 2023, Ecuador ha iniciado un programa de vacunación masiva de aves de corral, administrando 4 millones de dosis, y para mayo del mismo año, más de 6,3 millones de individuos habían sido inmunizados, preservando así la salud avícola.

En base a esto, es importante evaluar la eficacia de las vacunas aplicadas para proteger a los individuos contra el virus (H5N1) utilizando herramientas que permitan la evaluación real de la producción de anticuerpos neutralizantes.

1.2 Descripción del problema

La influenza aviar, representa una amenaza significativa para la industria avícola y la fauna silvestre, así como una posible afección a la salud pública. La variabilidad genética y antigénica de este virus le permite cambiar constantemente para poder evadir las respuesta del sistema inmune, y se requiere una constante adaptación de las estrategias de vacunación y control. La evaluación de la efectividad de las vacunas se basa mayormente en pruebas serológicas que miden de los niveles de anticuerpos neutralizantes generados. Sin embargo, estos presentan limitaciones en la precisión y sensibilidad ya que no presentan una evaluación real de la inmunización, lo que puede resultar en estrategias subóptimas de prevención y control de la influenza aviar.

1.3 Justificación del problema

La industria avícola emerge como un actor fundamental en la economía a nivel global, y posee un papel importante en la provisión de productos avícolas y la generación de empleo. Sin embargo, la presencia de brotes de influenza aviar puede tener impactos devastadores en la producción y la economía de este sector. La eficacia de las medidas de control y prevención, como la vacunación, es esencial para mantener la salud y la sostenibilidad de esta industria.

Resolver esta problemática se debe a la importancia de la industria avícola en la seguridad alimentaria global y la salud pública. La producción avícola es una fuente de alimento importante a nivel mundial, por lo que, cualquier amenaza a la salud de las poblaciones de aves tendría implicaciones directas en la disponibilidad y accesibilidad de productos avícolas para consumidores de todo el mundo. A su vez, la influenza aviar representa una seria amenaza tanto para la salud de las aves como para la salud pública. Brotes de influenza aviar pueden aumentar las probabilidades de la transmisión del virus a humanos, lo que puede resultar en brotes de gripe pandémica con graves consecuencias para la salud humana.

El diseño de un gen recombinante para la medición de anticuerpos neutralizantes contra la Influenza A proporciona una herramienta más real, precisa y confiable para la evaluación de la respuesta inmunológica inducida por vacunación, y con esto, se mejora sustancialmente la efectividad de las estrategias de vacunación y control. Esto, a su vez, no solo protegería a las poblaciones avícolas, sino que también garantizaría la disponibilidad de productos avícolas seguros y de alta calidad para consumidores a nivel global, teniendo también un impacto en la economía y salud pública.

Por lo mencionado anteriormente, este proyecto se alinea con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS): Hambre Cero – ODS 2, Salud y Bienestar – ODS 3 e, Industria, Innovación e Infraestructura – ODS 9.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar un gen reportero recombinante de Influenza A utilizando técnicas de ingeniería genética para la evaluación de los niveles de anticuerpos inducidos por vacunación.

1.4.2 *Objetivos específicos*

- Construir un gen recombinante reportero mediante la combinación de un segmento viral específico de Influenza A y un gen de proteína fluorescente.
- Evaluar la expresión del gen reportero mediante la emisión de fluorescencia luego de la transfección celular como método de validación de la actividad viral in vitro.

1.5 **Marco teórico**

1.5.1 *Virus de Influenza A (IAV)*

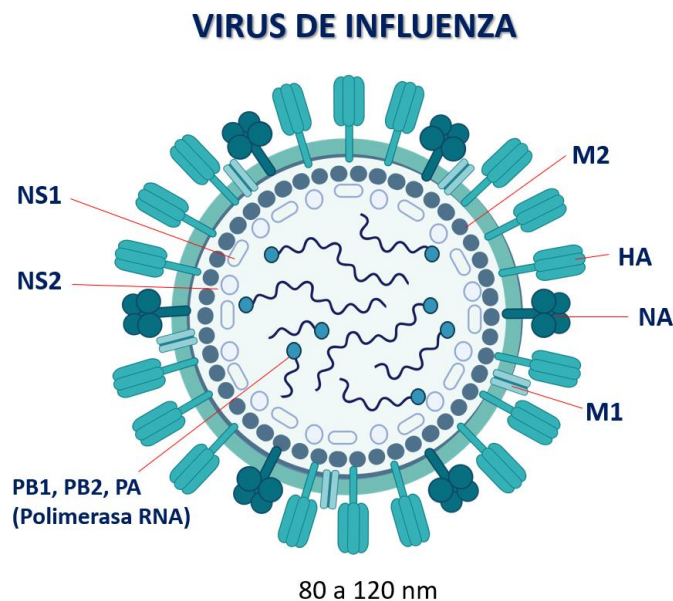
El virus de la influenza perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, es causante de afecciones respiratorias en gran proporción a nivel global en distintos seres vivos. Actualmente, se tienen cuatro tipos de IAV: A, B, C y D. Las cepas de los virus A y B se relacionan con epidemias estacionales en seres humanos (temporada de influenza). Además, se conoce que sólo influenza A es causante de pandemias. La infección por influenza tipo C no causa epidemias en humanos, hasta donde se ha reportado, y sus síntomas son leves. Por otra parte, influenza D afectan mayormente a ganados, y no se sabe con certeza si puede infectar a seres humanos. (Centers for Disease Control and Prevention, 2023a)

La principal fuente de IAV se encuentra en aves acuáticas silvestres, en especial de los órdenes *Anseriformes* (patos) y *Charadriiformes* (Aves playeras y gaviotas), sin embargo, diversos estudios han encontrado varios subtipos en otros vertebrados con gran divergencia genética e indican que pudo haberse dado una coevolución entre el virus de influenza y sus huéspedes durante la evolución de los vertebrados. (Wille & Holmes, 2020)

El virus de IAV se clasifica en subtipos en base a las 2 proteínas que se encuentran en su superficie: hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (Figura 1.1). Se conocen 18 subtipos de hemaglutinina y 11 subtipos de neuraminidasa distintas (de H1 a H18 y de N1 a N11). A pesar de

que más de 130 combinaciones de subtipos de influenza A han sido identificadas en la naturaleza, mayormente aves silvestres, es posible que existan más variantes de influenza A debido a la facilidad de "recombinación" génica. Este es un mecanismo por el que el virus de influenza puede cambiar segmentos de su genoma con otro virus de influenza. Esto se produce cuando dos cepas virales de la influenza infectan simultáneamente a un mismo huésped, permitiendo un intercambio de material genético entre ellas. (Centers for Disease Control and Prevention, 2023a)

Figura 1.1 Estructura del virus de la Influenza (Breen et al., 2016). Elaborado en BioRender.com



1.5.1.1 Virus de la influenza aviar y subtipos de alta patogenicidad. La influenza aviar es la enfermedad que causa el virus de la influenza en aves. Se encuentra de forma natural en aves silvestres acuáticas, pero puede llegar a contagiar a aves de corral y otros animales. Las aves enfermas pueden contagiar a otras aves por medio de secreciones, heces y saliva.

El virus de influenza se puede clasificar en dos subtipos:

- Influenza Aviar A de baja patogenicidad (LPAI): No provoca síntomas graves.

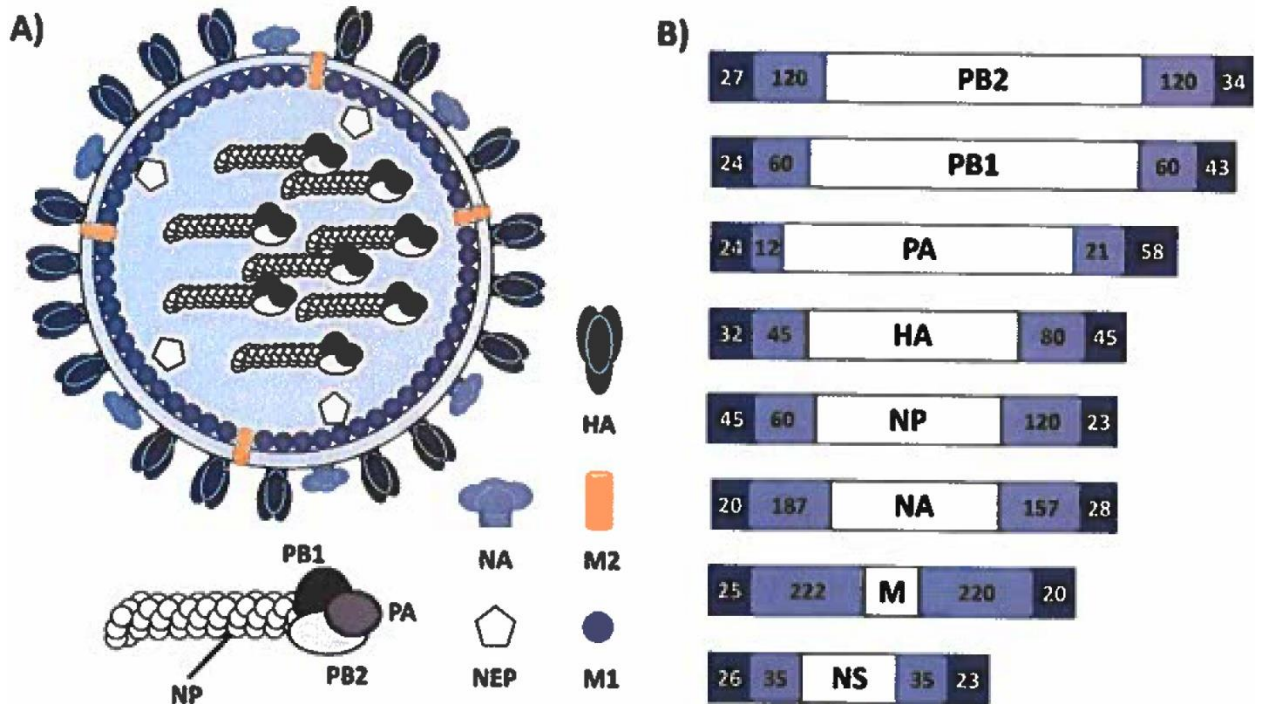
- Influenza Aviar A de alta patogenicidad (HPAI): Provocan síntomas graves con alta tasa de mortalidad en aves infectadas entre el 90% y 100%, usualmente en 48 horas, causando daño a varios órganos internos. Sólo algunas cepas de A(H5) y A(H7) pertenecen a este subtipo.

Ambos subtipos logran propagarse rápidamente mediante las aves de granjas. Estos brotes en aves domésticas son de interés dado que: los LPAI del tipo H5 y H7 pueden volverse HPAI causando gran mortalidad e impacto económico en el sector avícola, así como la posible propagación a humanos (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). De los pocos casos de contagio a humanos, estos se han debido por contacto con aves infectadas. Actualmente, el virus AH5N1 no es capaz de unirse con facilidad a los receptores de las vías respiratorias humanas. Las cepas de mayor interés son las HPAI H5N1 del clado 2.3.4.4b (Centers for Disease Control and Prevention, 2023b).

1.5.1.2 Estructura del virus de la Influenza. El genoma del virus de la influenza es de ARN lineal segmentado monocatenario de sentido negativo. Posee 8 segmentos y 10 ORFs que codifican proteínas estructurales y no estructurales (Figura 1.1) (Talledo & Zumaeta, 2009). En la parte externa se encuentran dos proteínas cruciales en la infección, entrada y liberación del virus en las células infectadas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Asimismo, se encuentra la proteína M2 (matriz 2) del canal iónico, mientras que la proteína de la matriz 1 (M1) está presente bajo la membrana viral (ver Figura 1a). Dentro del virión también se tiene la proteína de exportación nuclear (NEP), encargada de exportar los complejos de ribonucleoproteína viral (vRNP) del núcleo hacia el citoplasma de las células hospederas en las fases finales del ciclo vital del virus.

Internamente, se encuentran los ocho segmentos de ARN (v) viral: PA, NP, PB1, PB2, HA, NA, NS y M, los cuales están envueltos por la nucleoproteína viral (NP). Cada región codificante de ARN_v está rodeada de regiones no codificantes (NCR) y señales de empaquetamiento tanto en extremos 5' como 3', que son esenciales en replicación y transcripción del genoma viral. Los 8 segmentos se asocian a un complejo de ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp), compuestos por las subunidades PB1, PB2 y PA, junto con el vRNA y las NP virales, conformando los complejos de nucleoproteína viral (vRNP), que se encargan de replicar y transcribir el genoma. (Chiem et al., 2022)

Figura 1.2 Proteínas y genes del virus Influenza A (Chiem et al., 2022).

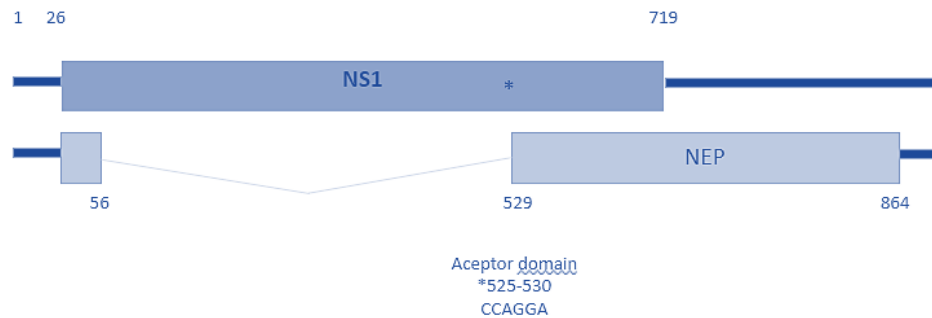


1.5.1.2.1 Proteínas No Estructurales (NS). El gen NS (segmento 8) es el más pequeño, con un longitud de 890 nt. incluyendo su parte codificante y no codificante. Codifica dos proteínas, NS1 (27-719 nt.) y NS2/NEP (26-56; 529-864), las cuales son expresadas mediante la transcripción de ARNm sin empalme y empalmado, respectivamente. (Zhang et al., 2023).

Tanto NS1 como NS2 comparten el mismo codón de inicio, y, por lo tanto, el mismo marco de lectura; pero a diferencia de NS1 que se traduce de corrido, el gen NS del virus de la Influenza ha usado la estrategia de “Alternative Splicing” para la codificación de NS2. El empalme alternativo es un proceso mediante el cual se pueden obtener diversas isoformas de ARNm y proteínas a partir de un transcrito primario de ARN mensajero (ARNm) o pre-ARNm. Estas isoformas suelen tener funciones diferentes. (Dwivedi et al., 2023) El sitio de empalme está compuesto por un “Donor domain” y un “Acceptor

domain” que van a permitir que se dé el salto y la unión de las secuencias. El aceptor domain se encuentra en la secuencia NS 525-CCAG↓GA-530. (Basler et al., 2001)

Figura 1.3 Estructura del gen NS del virus de la Influenza A. (Breen et al., 2016). Elaborado en BioRender.com



La proteína NS1 tiene una expresión temprana y posee varias funciones como la capacidad para antagonizar la respuesta inmune del hospedador: contrarrestar la producción de interferón (IFN) tipo I y la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs), así también, la regulación de la exportación al núcleo, del empalme y de traducir el ARNm viral y celular del huésped (Nogales, Aydillo, et al., 2019; Zhang et al., 2023). La proteína NS1 está estructurada por tres dominios los cuales incluyen: el dominio desordenado C-terminal, el dominio de unión al ARN, también conocido como RBD, y el dominio efector (ED), que le permiten interactuar con varios factores de la célula (Marc, 2014). Por otra parte, NS2 se expresa tarde y su porcentaje de ARNm es entre 10-15 % del de NS1. Esta proteína interviene en la exportación de vRNP al núcleo, por lo que se la conoce como proteína de exportación nuclear (NEP). Así también, NS2 actúa en los procesos de replicación y de transcripción del ARN del virus mediante cambios estequiométricos al igual que NS1. (Zhang et al., 2023)

1.5.1.2.2 Regiones no codificantes (NCR) y señales de empaquetamiento. Para el gen NS, la señal de empaquetamiento comprende desde el nucleótido 16-26 en la parte del NCR 3' y del 27 al 56 en la parte codificante (Fujii et al, 2005). Además, se ha comprobado que las posiciones 27-35 son de gran importancia y que la sustitución de nucleótidos en estos nucleótidos reduce sustancialmente las eficiencias de incorporación de ARNv. (Fujii et al, 2009). Existen dominios específicos que ayudan a la correcta ejecución de las funciones que poseen las proteínas codificadas por NS. Según una traducción teórica de una secuencia de 1918 realizada por Basler C. et al, en el 2001, predice que el dominio de unión al ARN (residuos 19–38), el dominio efector (residuos 134–161) y las señales de localización nuclear (residuos 34–38 y 216–221) coinciden con el consenso secuencias de proteínas NS1 de influenza A (del alelo A).

1.5.2 Generalidades para la construcción del gen reportero en base a NS

Para la construcción de un gen reportero se suele usar el gen NS por su alto número de copias en células infectadas y su corta longitud de nucleótidos. Además, se deben tener ciertas consideraciones como:

- Virus de influenza presenta limitación intrínseca de incorporar genes extraños.
- IAV presenta segmentos de corta longitud (~0,9–2,4 kb) por lo que no acepta insertos de gran tamaño.
- Añadir un gen reportero en cualquiera de los extremos del gen, logra interrumpir las señales de empaquetamiento del ARN viral necesarias para que el virión se ensamble eficientemente.
- Es necesario hacer una evaluación de la estabilidad del gen reportero añadido. Se sabe que ciertos IAV han perdido el gen reportero con facilidad durante la replicación. Aún no se conoce la causa con certeza de esta inestabilidad, pero se cree que pueda deberse al tamaño o naturaleza de la secuencia insertada. (Breen et al., 2016)

1.5.3 Gen reportero fluorescente

La integración estable de genes exógenos en el virus de la influenza A (IAV), con la capacidad intrínseca de llevar a cabo replicación y expresión informativa, facilita un seguimiento preciso de la infección viral tanto in vitro como in vivo. Este enfoque permite realizar lecturas cuantitativas robustas que resultan aplicables en ensayos de alto rendimiento (HTS) y en la evaluación de la infección viral en cultivos celulares y modelos animales. (Breen et al., 2016)

Las proteínas de fluorescencia son usadas como reportero a causa de su estabilidad y sensibilidad. Estas proteínas son inicialmente estimuladas mediante la absorción de energía, la misma que luego es emitida como luz, pero de longitud de onda distinta, mientras que las moléculas transitan en un estado energético más reducido. Son utilizadas principalmente para ensayos de localización celular in vitro, así como ex vivo. (Chiem et al., 2019)

1.5.4 Técnicas moleculares implementadas en la construcción del gen reportero

1.5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR constituye una técnica de alta sensibilidad que posibilita obtener millones de copias de segmentos específicos de ADN deseados, con lo que facilita la detección e identificación de secuencias genéticas tanto cualitativa como cuantitativamente dependiendo del tipo de PCR a realizar. (Garibyan & Avashia, 2013)

1.5.4.2 Clonación molecular. La clonación de genes o molecular constituye una serie de metodologías empleadas para la inserción de ADN recombinante en un vector, que actúa como portador del fragmento insertado en la célula huésped. El inserto de ADN, se puede extraer de una especie procariota, eucariota o viral. Luego de esto, tanto el vector como el fragmento o inserto son cortados usando enzimas de restricción y posteriormente purificados. Las partes purificadas se ensamblan mediante “ligación”, donde la enzima catalizadora es la ligasa. Este producto de ligación se inserta en bacterias ultra competentes, a través del método de “transformación” para poder tener varias copias del plásmido. (JoVE Science Education Database, 2023)

1.5.4.3 Transfección celular. La transfección es un procedimiento por el que se introducen ácidos nucleicos exógenos en una célula eucariota con el propósito de cambiar su composición genética. La transfección se clasifica en dos categorías: estable y transitoria. La transfección transitoria prescinde de la necesidad de integrar el inserto, que es ingresado mediante un vector, en el genoma de la célula transfectada.

En consecuencia, el transgénico se expresa de forma eventual y desaparece conforme se dé la replicación celular, por lo que se utiliza en estudios de corto plazo. Los plásmidos, al tener un adecuado promotor eucariótico, facilitan la expresión del transgénico exógeno. Uno de los métodos para favorecer la transferencia de plásmidos implica el uso de lípidos, mejorando la interacción del vector y la membrana de la célula, que facilita el ingreso del complejo en las células (Chong et al., 2021).

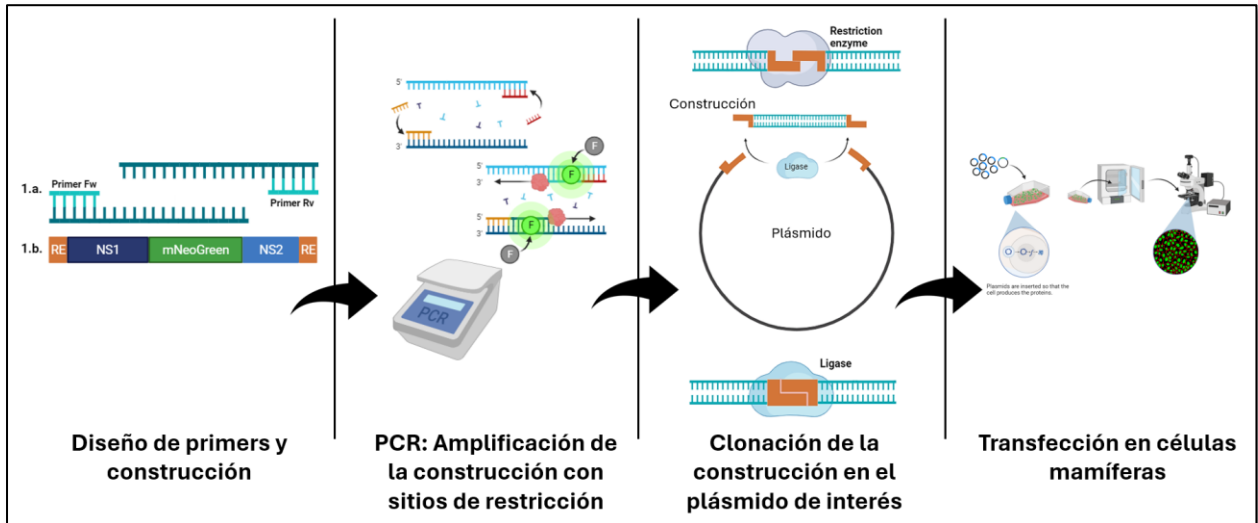
CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA.

2.1 Etapas del proyecto

Se siguieron los protocolos estandarizados por el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas para los distintos métodos y procesos a implementar.

Figura 2.1 Diagrama de metodología implementada en el proyecto. Elaborado en BioRender.com



2.1.1 Construcción del gen reportero en base al gen NS.

2.1.1.1 Diseño in silico del gen. Para la secuencia del gen NS se tomó como referencia el segmento 8 de la cepa A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1) y se colocó como reportero la secuencia del gen mNeoGreen, el cual codifica una proteína fluorescente. Se realizó una revisión bibliográfica para agregar mutaciones y añadir secuencias para poder tener una buena expresión de las proteínas. La construcción se basó principalmente en la publicación de Nogales, Ávila-Pérez, et al., del 2019. En los extremos, se colocaron los NCR del gen NS, el NCR 3' upstream de la secuencia y el NCR 5' downstream, ya que los genes de Influenza están en sentido negativo.

Se colocaron 2 linkers a los extremos del gen mNeoGreen para fusionar la proteína: un linker de GSGG y otro de GSG, entre mNeoGreen con NS1 y con NS2

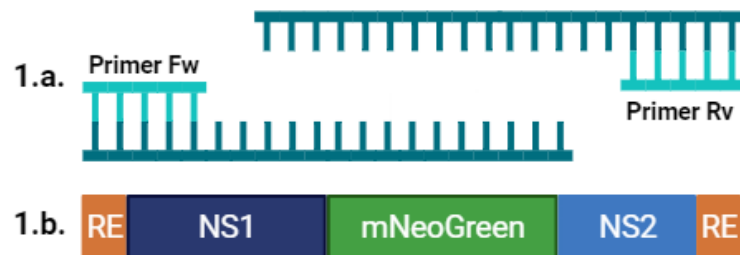
respectivamente. A su vez, se añadió un sitio de escisión proteolítica 2A “upstream” del gen NS2, que ayudará a la escisión de las proteínas (Liu et al., 2017). Además, dentro del gen NS1, se encuentra el Dominio Aceptor del alternative Splicing, NS 525-CCAG↓GA-530 (Basler et al., 2001), en el cual se agregaron mutaciones silenciosas para apagar la señal de splicing, cambiando a CCCG↓GG. Todo el diseño se realizó en el Software Geneious. Luego de esto, la secuencia final fue enviada a sintetizar. La construcción se ilustra en la Figura 2.2.

Figura 2.2 Estructura de la construcción del gen reporte enviado a sintetizar.



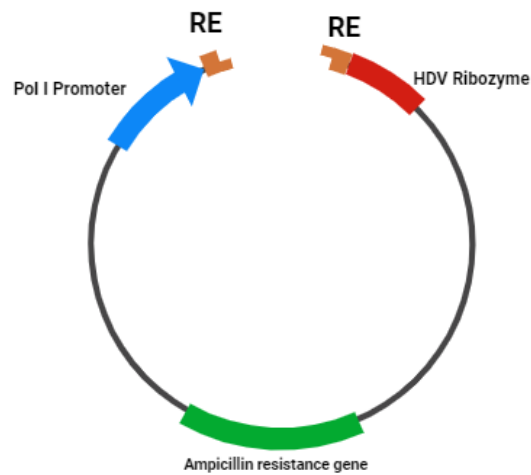
2.1.1.2 Amplificación de la secuencia sintetizada. Primers específicos fueron diseñados para amplificar la secuencia sintetizada añadiendo sitios de restricción en los extremos para luego poder ingresarla en el vector seleccionado usando enzimas de restricción y ligación. Mediante PCR, se amplificó la secuencia usando los primers diseñados (Figura 2.1). Las reacciones se revelaron por electroforesis en gel al 1% de agarosa y el fragmento de interés en el tamaño adecuado fue cortado y purificado usando el kit de Extracción de Gel E.Z.N.A. de Omega Bio-Tek, Inc.

Figura 2.3 Diseño de primers y secuencia. Elaborado en Biorender



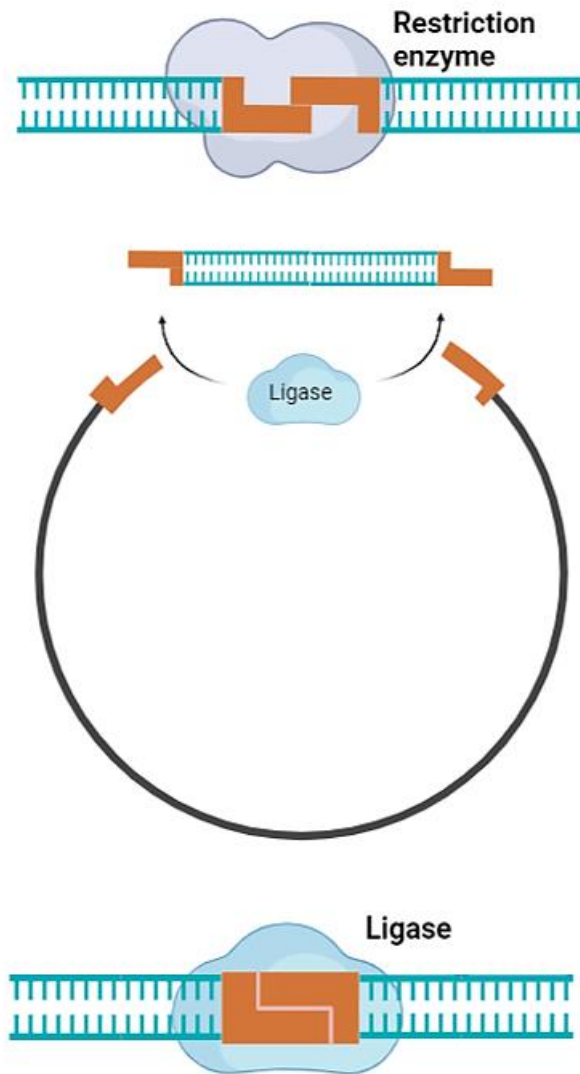
2.1.1.3 Clonación del inserto de interés. Para esta parte, se seleccionó el plásmido pPol I, que posee la capacidad de expresar proteínas en células de mamíferos de forma eficiente. Este plásmido posee un promotor de ARN Polimerasa I, el cual ha sido usado para expresar exitosamente ARN en sentido negativo, “upstream” de donde se colocará el inserto, y “downstream”, una ribozima de HDV para que se produzca un secuencia terminal 3’ nativa (Vial et al., 2021). También posee un gen de resistencia a la ampicilina para el crecimiento bacteriano, y un sitio de clonación

Figura 2.4 Plásmido abierto con enzimas de digestión. Elaborado en Biorender



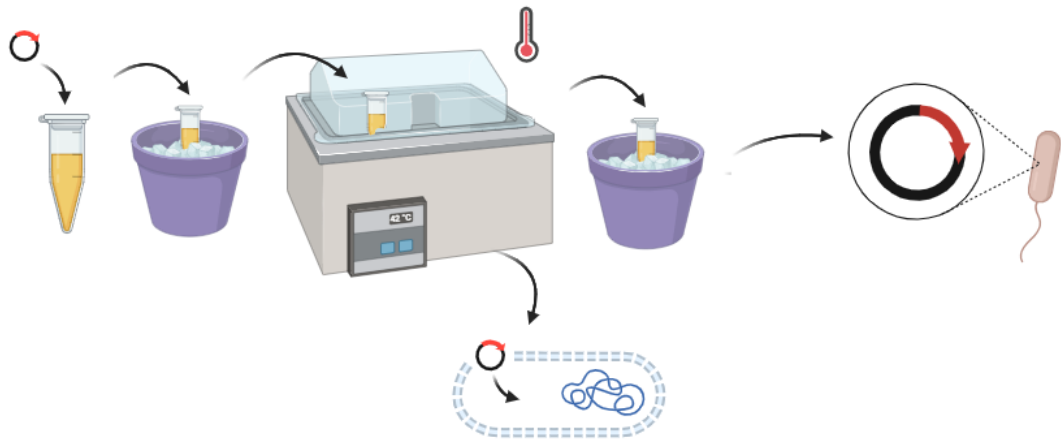
Se cortó tanto la secuencia amplificada como el vector seleccionado con enzimas de restricción. Estas reacciones se revelaron por electroforesis en gel al 1% de agarosa, los fragmentos en el tamaño esperado se cortaron, y, posterior a esto, se purificaron ambos fragmentos con el kit de Extracción de Gel E.Z.N.A. de Omega BioTek, Inc. Los extremos del vector se desfosforalizaron usando la enzima Fosfatasa Alcalina Intestinal Bovina (CIAP) de ThermoFisher Scientific, que luego se purificó nuevamente por gel con el Kit de Extracción de Gel. Posteriormente, usando la enzima ligasa de ADN T4 de ThermoFisher Scientific, se ligó el vector seleccionado con la secuencia de interés.

Figura 2.5 Digestión y ligación de los fragmentos. Elaborado en Biorender



El producto de ligación fue insertado en bacterias ultra competentes DH5 α mediante transfección por choque térmico. Se verificó por Colony PCR que las bacterias hayan ingresado el plásmido. Luego, se sembró en medio de cultivo líquido durante la noche las colonias que dieron positivas, y se extrajo el plásmido usando el kit para MiniPrep E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I. Para la comprobación y verificación, se realizó PCR usando los primers específicos diseñados para el inserto.

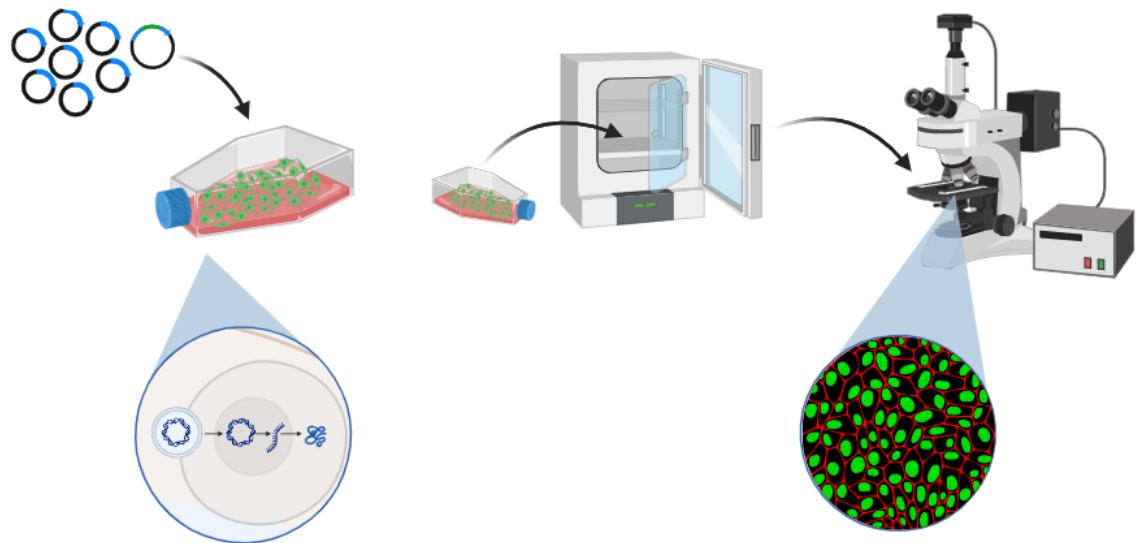
Figura 2.6 Transformación por choque térmico. Elaborado en Biorender



2.1.1.4 Transfección y expresión de la proteína fluorescente. Para poder verificar que el gen reportero diseñado pueda expresar las proteínas adecuadamente, se realizó transfección del plásmido con el gen diseñado Reportero NS_mNeoGreen, junto con otros 4 plásmidos del Minigenoma del virus de Influenza A (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)), genes: PA, NP, PB1, PB2

Se implementó la metodología de transfección por lipofectamina de ThermoFisher Scientific en células de mamíferos HEK 293-T con protocolo de Laboratorio para Investigaciones Biomédicas-ESPOL, las cuales crecieron en medio de cultivo formulado con: DMEM Gibco de ThermoFisher Scientific y Suero Fetal Bovino (FBS) al 10%. Las células se dejaron incubar a 37°C. A las 24 horas se realiza un cambio de medio a las células ya que la lipofectamina puede llegar a presentar toxicidad. Se observaron las células a las 24 y 48 horas en el microscopio de fluorescencia usando luz blanca y luz UV.

Figura 2.7 Transfección en células mamíferas. Elaborado en Biorender.



Plasmids are inserted so that the cell produces the proteins.

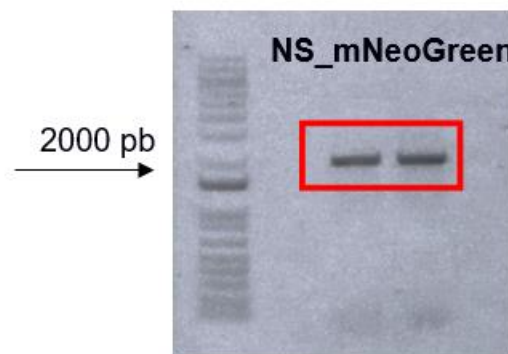
CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Amplificación de la secuencia

Se amplificó la construcción sintetizada usando los primers específicos que añadieron sitios de restricción para poder colocar en el plásmido de expresión. En la figura 3.1 se visualiza la amplificación de la banda en el tamaño esperado, aproximadamente 2300 pb.

Figura 3.1 Amplificación de la secuencia por PCR punto final.



3.2 Clonación de la secuencia

La secuencia amplificada en la PCR se purificó, se digirió con enzimas de restricción y se ligó en el plásmido seleccionado (pPol I). Luego de esto, se transformó, se escogieron 3 colonias y se sembraron en medio SOB. Se extrajo el plásmido por medio de MiniPrep y se comprobó por digestión que se tuviera el plásmido con el inserto. Se esperaban 3 bandas de tamaños: 651pb, 1480 pb, 2662pb. (Figura 3.2). Las colonias 1 y 3 contenían el inserto correctamente.

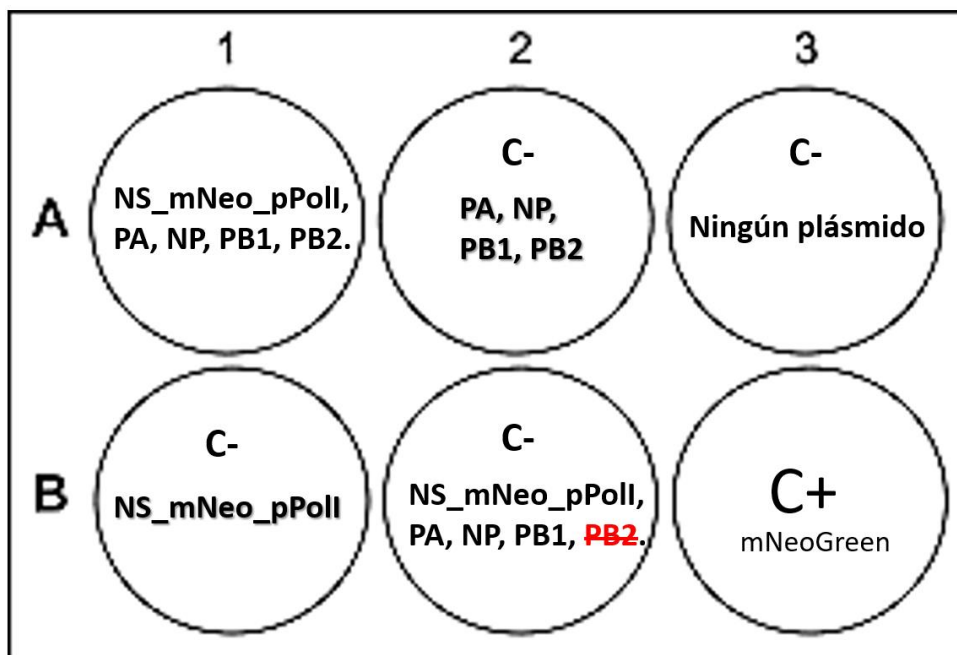
Figura 3.2 Comprobación por digestión del MiniPrep de las colonias transformadas.



3.3 Transfección y evaluación de la expresión.

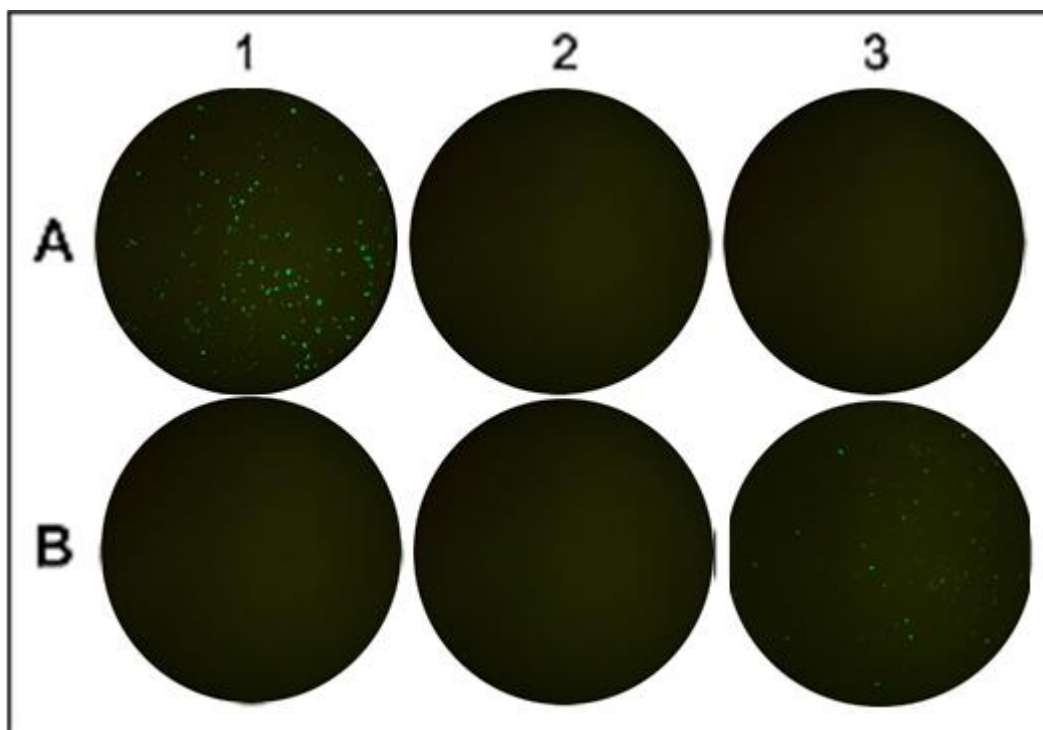
El plásmido purificado fue transfectado en células HEK 293T junto con 4 plásmidos de pDz que contiene los genes PA, NP, PB1, PB2 del Minigenoma de Influenza A. Además, se agregó 1 control positivo de transfección (C+) y 4 controles negativos, como se muestra en el plan de transfección (Figura 3.3). Las células transfectadas de incubaron por 24 horas a 37°C.

Figura 3.3 Plan de transfección




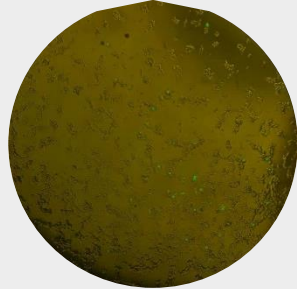
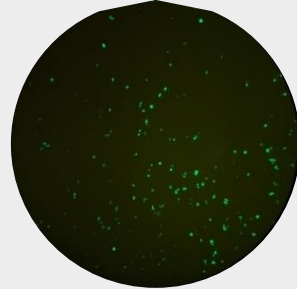
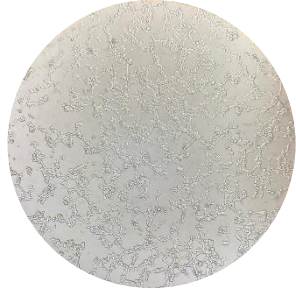
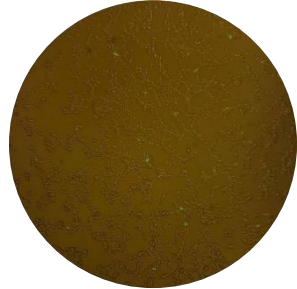
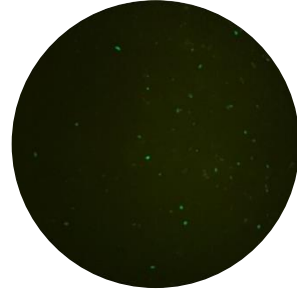

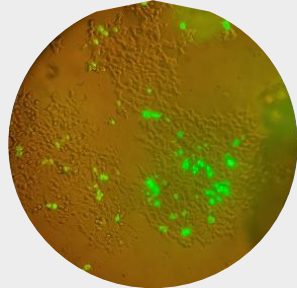
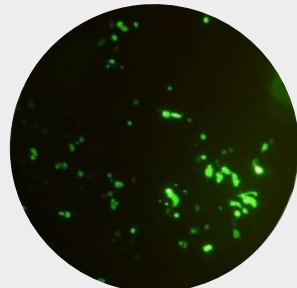

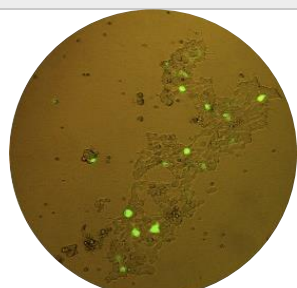
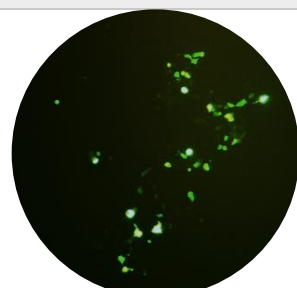
Las células se observaron en el microscopio de fluorescencia a luz blanca y luz UV. El pocillo de interés 1A que contiene el plásmido con el gen reportero NS_mNeoGreen y el minigenoma expresó fluorescencia correctamente al ser expuesto a luz UV. El pocillo 3B que contenía el control de transfección también presentó fluorescencia. Por otro lado, los 4 controles negativos no presentaron fluorescencia cuando se colocaron en luz UV. (Figura 3.4). La expresión de fluorescencia solo en el pocillo 1A y la ausencia de esta en los pocillo 1B y 2B evidencia que la expresión del gen reportero, insertado en sentido invertido en el plásmido pPol I, está condicionado por todo el complejo RNP que conforma el minigenoma. Esto simula lo que debería ocurrir cuando se integre al genoma completo al formar el virus.

Figura 3.4 Resultado de la transfección con luz UV - 24 horas



En la tabla 1, se presentan las imágenes en luz blanca, luz blanca+UV y luz UV tanto del pocillo con el gen reportero NS_mNeoGreen con el minigenoma como del C+, a las 24 y 48 horas luego de la transfección. Como era de esperarse, a las 48 horas se evidenció mayor intensidad de fluorescencia.

Tabla 3.1. Células expuestas a luz blanca, luz blanca+UV y luz UV. Visualización a 10x.

		Luz Blanca	Luz Blanca + UV	Luz UV
24 HORAS	NS_mNeoGreen y Minigenoma			
	C+			
48 HORAS	NS_mNeoGreen y Minigenoma			
	C+			

Así también, se visualizaron las células del pocillo 1A, con un aumento de 40x, para evaluar la localización de la expresión. Como se observa en las figuras # y #, la expresión de luminiscencia se da a nivel citoplasmático.

Figura 3.5 Visualización a 40x con luz blanca+UV: Se observan 2 células con fluorescencia, una de ellas en proceso de mitosis (célula superior).

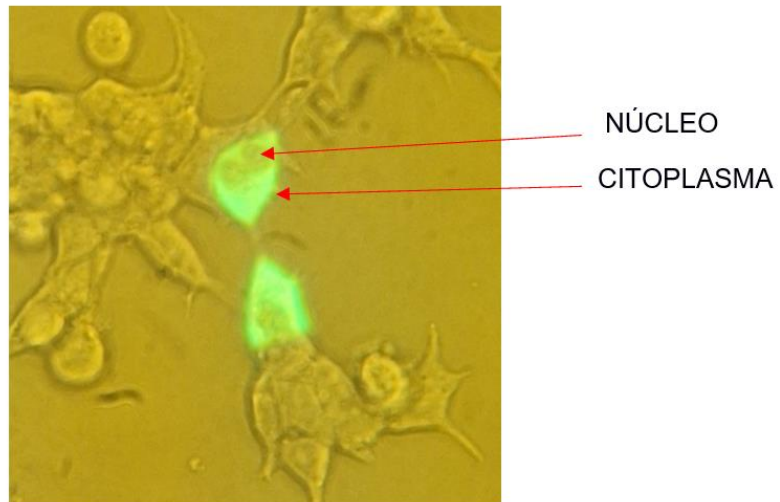
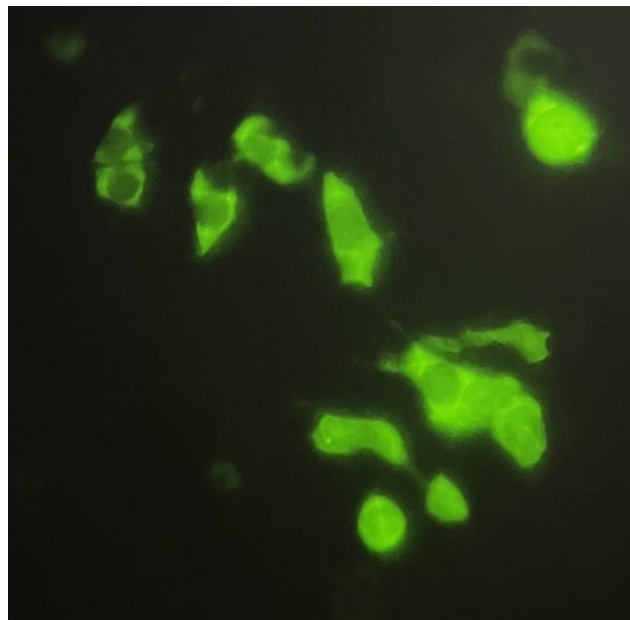


Figura 3.6 Visualización a 40x luz UV



CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

En base a los resultados que se obtuvieron y su correspondiente análisis, se concluye:

- La construcción del gen reportero fluorescente se obtuvo exitosamente. Se comprobó mediante técnicas de biología molecular en el laboratorio.
- Se observó fluorescencia en el pocillo esperado que contenía el gen reportero NS_mNeoGreen y el minigenoma de Influenza A. Esto indica una correcta expresión de las proteínas debido a un diseño adecuado de la construcción. Además, la ausencia de fluorescencia en los controles negativos descarta la presencia de contaminación e indica dependencia del complejo RNP para la expresión del gen.
- Con esto, se puede avanzar a la siguiente etapa que es el rescate del virus con el gen reportero integrado para poder realizar las pruebas celulares y comprobar la eficacia de la vacunación.
- La integración de un gen reportero de fluorescencia permite la evaluación cualitativa y cuantitativa del virus al ser usado en técnicas de laboratorio.
- La implementación de métodos celulares usando un virus reportero para la evaluación de la eficacia de las vacunas comerciales permitirá tener una visión más real de la actividad de los anticuerpos para neutralizar al virus. Esto debido a que simulará lo que pasa dentro de un individuo al momento de ser infectado y se tendrán las estructuras virales de la forma natural en la que suelen estar.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda tener ciertas consideraciones en la transfección como: no exponer las células HEK 293T más de 10 segundos a la tripsina, homogenizar bien las células con el medio y los plásmidos en cada pocillo.
- Evitar grandes variaciones de temperaturas al tratar la células. La incubadora está a 37 °C por lo que la temperatura del área donde esté el microscopio no debe estar tan fría para no afectar a las células.

- No exponer a las células por periodos muy prolongados a la luz UV, sobre todo si se desea continuar con la observación por varios días.

Referencias

Basler, C. F., Reid, A. H., Dybing, J. K., Janczewski, T. A., Fanning, T. G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M. L., Swayne, D. E., García-Sastre, A., Palese, P., & Taubenberger, J. K. (2001). Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS

- genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2746–2751.
<https://doi.org/10.1073/pnas.031575198>
- Breen, M., Nogales, A., Baker, S., & Martínez-Sobrido, L. (2016). Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*, 8(7), 179.
<https://doi.org/10.3390/v8070179>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023a, March 30). *Types of Influenza Viruses*. Understanding Influenza Viruses. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023b, October 5). *Avian Flu*. Technical Report: Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses.
- Centers for Disease Control and Prevention, N. C. for I. and R. D. (2022, June 14). *Avian Flu*. Avian Influenza in Birds. <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/avian-in-birds.htm>
- Chiem, K., Nogales, A., & Martinez-Sobrido, L. (2022). *Generation, Characterization, and Applications of Influenza A Reporter Viruses* (pp. 249–268). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2453-1_19
- Chiem, K., Rangel-Moreno, J., Nogales, A., & Martinez-Sobrido, L. (2019). A Luciferase-fluorescent Reporter Influenza Virus for Live Imaging and Quantification of Viral Infection. *Journal of Visualized Experiments*, 150. <https://doi.org/10.3791/59890>
- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*, 9, e11165. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>
- Dwivedi, S. L., Quiroz, L. F., Reddy, A. S. N., Spillane, C., & Ortiz, R. (2023). Alternative Splicing Variation: Accessing and Exploiting in Crop Improvement Programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15205.
<https://doi.org/10.3390/ijms242015205>
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

- JoVE Science Education Database, C. M. (2023). *Métodos Básicos en Biología Celular y Molecular*. Clonación Molecular.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Ruth Vaseghi, H., Qian, L., & Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific Reports*, 7(1), 2193. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>
- Marc, D. (2014). Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *Journal of General Virology*, 95(12), 2594–2611. <https://doi.org/10.1099/vir.0.069542-0>
- Nogales, A., Ávila-Pérez, G., Rangel-Moreno, J., Chiem, K., DeDiego, M. L., & Martínez-Sobrido, L. (2019). A Novel Fluorescent and Bioluminescent Bireporter Influenza A Virus To Evaluate Viral Infections. *Journal of Virology*, 93(10). <https://doi.org/10.1128/JVI.00032-19>
- Nogales, A., Aydillo, T., Ávila-Pérez, G., Escalera, A., Chiem, K., Cadagan, R., DeDiego, M. L., Li, F., García-Sastre, A., & Martínez-Sobrido, L. (2019). Functional Characterization and Direct Comparison of Influenza A, B, C, and D NS1 Proteins in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02862>
- Vial, T., Oade, M. S., Russell, C. A., Eggink, D., & Te Velhuis, A. J. W. (n.d.). A SARS-CoV-2 mini-genome assay based on negative-sense RNA to study replication inhibitors and emerging mutations. <https://doi.org/10.1101/2021.06.28.450211>
- Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). The Ecology and Evolution of Influenza Viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(7), a038489. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489>

Zhang, L., Wang, Y., Shao, Y., Guo, J., Gao, G. F., & Deng, T. (2023). Fine Regulation of Influenza Virus RNA Transcription and Replication by Stoichiometric Changes in Viral NS1 and NS2 Proteins. *Journal of Virology*, 97(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.00337-23>