



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
BIOMEDICINA**



**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL VIRUS
DE ZIKV QUE CONTENGA UN GEN REPORTERO FLUORESCENTE**

TESIS QUE PRESENTA:

LCAyS ALAN ARAUJO MIRELES

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
BÁSICAS**

CODIRECTORES DE TESIS:

DR. MAURICIO COMAS GARCÍA:

DRA. CLAUDIA CASTILLO MARTÍN DEL CAMPO

ASESORA INTERNA:

DRA. ADRIANA ELIZABETH MONSIVAIS URENDA

SAN LUIS POTOSÍ, SLP

JUNIO 2023



Créditos institucionales

El presente estudio se llevó a cabo en las secciones de biotecnología y genómica médica del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSAB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) bajo la dirección del Dr. Mauricio Comas García y de la Dra. Claudia Castillo Martín del Campo. Agradezco de igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 1048133 durante el periodo 2020 – 2022.

TESIS QUE PRESENTA:

LCaYS ALAN ARAUJO MIRELES

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
BÁSICAS**

CODIRECTORES DE TESIS:

Dr. Mauricio Comas García

Dra. Claudia Castillo Martín del Campo

ASESORA INTERNA:

Dra. Adriana Elizabeth Monsiváis Urenda

JURADO:

Presidenta de sinodales: Dra. Patricia Elizabeth Cossío Torres

Secretaria de sinodales: Dra. Adriana Elizabeth Monsiváis Urenda

Sinodal: Dra. Sofía Bernal Silva

Sinodal suplente: Dra. Esther Layseca Espinosa



Generación y caracterización de un clon infeccioso de virus de ZIKV que contiene un gen reportero fluorescente. Por Alan Araujo Mireles. Se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) .



Generación y caracterización de un clon infeccioso del virus de ZIKV que contenga un gen reportero fluorescente

A. Araujo-Mireles¹, C. Castillo Martín del Campo², A.E. Monsiváis-Urenda³, M. Comas-García^{4*},

1. Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
2. Laboratorio de células neurales troncales humanas. Centro de investigación en ambiente y salud. Coordinación para la innovación de la ciencia y tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
3. Laboratorio de inmunología, departamento de inmunología. Facultad de medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
4. Laboratorio de microscopía de alta resolución, Centro de investigación en ciencias de la salud y biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Agradecimientos:

A mis padres que me han apoyado incondicionalmente durante cada etapa de mi vida, que me han dado la oportunidad de formarme como un profesionalista y de permitirme realizar todo tipo de proyectos tanto académicos como personales. Todo lo bueno que hay en mi comenzó con ustedes.

A mis profesores, que con sus observaciones, comentarios y consejos que desde su experiencia en respectivas áreas de la ciencia, me han permitido crecer y tener mejores bases académicas para futuros proyectos.

Al grupo de trabajo de genómica médica y ensamblaje viral en especial a Mayra, Fernanda, María y Denisse que durante estos años me apoyaron durante la etapa experimental comenzando con mi capacitación en una nueva área de la ciencia y por hacer mucho más ameno el trabajo de investigación.

A mis mágicas amistades de la licenciatura, que a pesar de estar realizando proyectos de vida diferentes, tuve su apoyo y su preocupación. A mis amistades del posgrado Anahí, Marifer y Ruth por ser mi más grande apoyo durante este proyecto de investigación.

Finalmente a mi yo de la infancia, que tuvo el sueño de ser un científico cuando fuera grande, que ahora sabe que la ciencia es mucho más compleja de lo que esperaba pero que sigue teniendo la ambición de poder realizar nuevos proyectos, cosas que hagan un cambio significativo y que hagan sentir orgulloso a todas estas personas que he mencionado, que siempre me han apoyado y espero seguir teniéndolas cerca de mí.



GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON INFECCIOSO DEL VIRUS DE ZIKV QUE CONTENGA UN GEN REPORTERO FLUORESCENTE

1. Resumen

Introducción: El virus del Zika (ZIKV) es transmitida principalmente por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Actualmente se han reportado casos de fiebre por Zika en más de 80 países y aunque la mayoría de los casos de infección son asintomáticos, se ha asociado esta enfermedad con otros padecimientos tales como malformaciones congénitas en el Sistema Nervioso Central (p.ej. microcefalia), fiebre hemorrágica, y Síndrome de Guillain-Barré. Al ser parte de la familia *Flaviviridae*, presenta una alta similitud génica y estructural con los virus de dengue, de la fiebre amarilla y del oeste del Nilo. El genoma del ZIKV tiene un tamaño aproximado de 10.7 kb y se compone de una cadena simple de RNA de polaridad positiva [(+) ssRNA]. En el área de investigación biomédica, para determinar la carga viral se realizan ensayos de RT-qPCR, pero para determina la infectividad es necesario realizar ensayos de placa o inmunoquímica. Sin embargo, estas técnicas no son útiles cuando se quiere caracterizar la infección viral en cultivos celulares complejos donde hay varios linajes celulares, o cuando se quiere realizar cinéticas de infección sin tener que fijar las células. Es por ello, que en este proyecto desarrollaremos un clon infeccioso del ZIKV de la cepa asiática que exprese un gen reportero y que tenga la misma infectividad que el virus silvestre.

Metodología: Se modificó con un plásmido que contiene el genoma completo del ZIKV del linaje asiático realizando la inserción de la proteína verde fluorescente en una sección no estructural del genoma del ZIKV mediante una técnica de recombinación homóloga. Una vez realizada la clonación e inserción del gen reportero se determinó si dicha mutación alteró la infectividad del virus mutante con respecto al silvestre por medio de ensayos de placa y microscopía de fluorescencia.

Conclusión: La inserción de un gen reportero dentro de la sección no estructural del plásmido del virus de ZIKV inhibió la replicación viral; el gen reportero no se expresó y las células transfectadas con el clon no presentaron el efecto citopático clásico de la infección por ZIKV, así como tampoco resultó en muerte celular. Por lo tanto, se deberán evaluar nuevos sitios de inserción del gen fluorescente.

Palabras clave: Gen reportero, ZIKV, recombinación homóloga, transfección.



2. Introducción

La enfermedad emergente de la fiebre de Zika es causada por el virus del Zika (ZIKV), el cual se transmite principalmente a través de la picadura de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Didier Musso et. al., 2016) Sin embargo, se han reportado otras formas de transmisión de este virus como, transmisión vertical madre-feto, transfusión de sangre y sexualmente (Counotte et al., 2018). Esto ha llevado a instituciones de salud a emitir alertas y recomendaciones para prevenir un aumento de casos de infección por este virus (Brooks et al., 2016). De acuerdo con Organización Mundial de la Salud (OMS) y el centro para el control de enfermedades de los EE.UU. (CDC), se han reportado casos de la enfermedad del virus del Zika en 87 países de todo el mundo (OMS, 2017).

La infección por este virus se reportó por primera vez en el año de 1947 en Uganda, en el bosque de Zika, región que le dio nombre a este patógeno (Dick G, 1952). El siguiente brote agudo de infección por ZIKV ocurrió en 2007 en las Islas de Yap, Micronesia donde grupos de población manifestaron síntomas similares a la infección por Dengue hasta que pruebas de biología molecular detectaron la presencia del ZIKV en aproximadamente 185 personas (Duffy et al., 2009). Este virus tomó importancia durante los años de 2012 al 2014 a partir de brotes en regiones de Sudamérica y África, por lo cual la OMS declaró la enfermedad transmitida por el ZIKV como un serio problema de salud pública (Boeuf et al., 2016). Durante el brote en Latinoamérica, se estima que más de 1.5 millones de personas se infectaron por este virus (Pielnaa et al., 2020). Durante el 2016, se reportaron más de 1,200 casos en regiones de Europa lo cual elevó la preocupación por la adaptación del vector de este virus a nuevos ecosistemas (Imperato, 2016).

En México, la secretaría de salud a través de la dirección general de epidemiología ha reportado 13,000 casos confirmados autóctonos de enfermedad



por virus de Zika, además de 7,000 casos de infección por este virus en mujeres embarazadas durante el periodo 2015 a 2023. La distribución de los casos en nuestro país es muy amplia pues 29 de las 32 entidades han reportado casos de infección por virus de Zika siendo los estados con mayor número de casos: Veracruz, Yucatán, Nuevo León, Guerrero y Colima (Secretaría de Salud, 2022).

Al ser un problema de salud a nivel mundial, se han hecho recomendaciones para la prevención de la infección del ZIKV. Estas estrategias tienen como objetivo la protección contra la picadura del mosquito de forma que no pueda infectar a población humana. En estas metodologías se hace uso de herramientas como determinantes ecológicos y sociales en la salud para poder establecer programas continuos de vigilancia, prevención y monitoreo en áreas vulnerables o con alta prevalencia de casos de infección por ZIKV (Rees et al., 2018) (Maharajan et al., 2020). El cambio en la movilidad del vector del ZIKV se ha relacionado con los cambios de su nicho ecológico, adaptándose así a factores como temperatura, altitud, precipitación y más recientemente en sitios artificiales donde crear este reservorio de artrópodos que se mantienen cerca de poblaciones humanas, áreas en vías de desarrollo creando el escenario de riesgo para la infección por ZIKV debido a acumulación de residuos (Zhang et al., 2017). Dentro de los factores sociales que se han relacionado a brotes epidemiológicos de este virus se encuentran: niveles socioeconómicos bajos esto relacionado a la dificultad en el acceso a servicios básicos y de salud, ubicaciones residenciales cercanas a las zonas donde puede encontrarse el mosquito, condiciones de higiene que promueven la abundancia del vector así como la falta de medidas de salud y educación en materia de prevención (Rees et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, las recomendaciones y programas para la prevención de infección por ZIKV están enfocadas en la eliminación del reservorio natural o antropogénico del vector, la modificación de la ruta de exposición del mosquito y los programas de salud de monitoreo continuo en zonas de riesgo o con



antecedentes de infección. Sin embargo, es necesario además tener pruebas eficaces que puedan ayudar a la detección de casos de forma precisa. Una de las principales preocupaciones de la enfermedad causada por el virus del Zika se debe a su rápida y amplia dispersión, por ello se han desarrollado diversas pruebas para la detección de este virus, entre las que se encuentran: cadena en reacción de polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR), en tiempo real qRT-PCR y pruebas serológicas para la detección de anticuerpos por IgG e IgM (Singh et al., 2018). Sin embargo, cada herramienta de diagnóstico tiene sus ventajas y desventajas pues se ha observado como a mayor facilidad de técnica es menor su sensibilidad y especificidad. Y por otro lado, a mayor especificidad más costosa la técnica a realizar.

Los síntomas por la enfermedad del ZIKV son diversos, pero generalmente se observan: cuadros febriles, comezón, artralgia, y sensación de cansancio. Sin embargo, se ha estimado que hasta un 80% de los casos de infección pueden ser asintomáticos (Duffy et al., 2009). En Brasil se asoció por primera vez que la infección por ZIKV con otros padecimientos como: microcefalia, fiebre hemorrágica y Síndrome de Guillain-Barré (Boeuf et al., 2016).

El mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero por parte del virus del Zika aún no está completamente descrito, sin embargo, se sabe que involucra proteínas virales no estructurales, RNA no codificante y miRNAs para comprometer la respuesta antiviral y poder replicarse de manera exitosa (Estévez-Herrera et al., 2021). La respuesta antivírica consiste en una cascada de señalización donde intervienen citosinas que le permiten a las células del hospedero resistir a la infección por el virus además de reclutar células especializadas como NK para eliminar células infectadas y eliminar el reservorio viral.

La infección con este virus interrumpe el mecanismo para la producción de Interferón. Se ha observado que proteínas no estructurales como NS1 y NS4 tienen



afinidad por receptores tipo RIG previniendo la translocación de factores de transcripción (Riedl et al., 2019), de manera similar se ha analizado como NS2B/NS3 y NS5 bloquean la cascada de fosforilación de proteínas de las familias Tyk, Jak y STAT evitando la formación de interferón (Wu et al., 2017) (Lee et al., 2021).

La secuenciación de su genoma fue descrita por primera vez en 2006 durante los eventos de brotes agudos en el Pacífico Occidental (Kuno & Chang, 2007). Desde entonces su información ha estado disponible en bases de datos como GenBank y RCSB/PDB. Al ser parte de la familia *Flaviviridae*, comparte características de virus tales como el Dengue, virus de la fiebre amarilla o virus del oeste del Nilo. El genoma del virus del Zika tiene un tamaño aproximado de 10,700 nucleótidos y se compone de una cadena simple de RNA (ssRNA) que requiere de la maquinaria celular del hospedero para poder replicarse y generar nuevas partículas virales.

Como se observa en la figura 1, el genoma del ZIKV es un mRNA que traduce para un polipéptido en el que se encuentran 10 proteínas. Tres de ellas son de función estructural; la proteína C con función de empaquetamiento del RNA viral, prM/M involucrada en la interacción y fusión al interior de la célula del hospedero y la proteína E con función de generación de la partícula viral, interacción e ingreso del virión. Las siete restantes son no estructurales; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 con funciones que van desde la inhibición de la respuesta inmunitaria hasta funciones de replicación y ensamblaje del virión (Faria et al., 2016). Las funciones de estas proteínas se explican más detalladamente en la tabla 1.

El trabajo realizado por Sun y colaboradores (Sun et al., 2017) permitió conocer los sitios de reconocimiento para la proteasa viral y hospedero para los cortes de las diferentes proteínas que integran el genoma del ZIKV. Con esta información ahora es posible saber que secuencia de aminoácidos son reconocidos



para el corte por parte de la proteasa viral NS3 y permitir la liberación de las demás proteínas virales al interior de la célula infectada. En la tabla 2 se observan las secuencias reconocidas para la formación de dichas proteínas.

En el área de la investigación biomédica resulta de gran importancia conocer los mecanismos de señalización celular para desarrollar estrategias, terapias o fármacos que puedan hacer frente a enfermedades causadas por bacterias y virus. Sin embargo, muchas de estas metodologías pueden ser laboriosas. Como variante a estas metodologías se desarrollaron sistemas de genes reporteros insertados en los genomas de virus para evaluar en tiempo real los mecanismos de replicación e interacción virus-hospedero (Li et al., 2016).

Los genes reporteros poseen características fisicoquímicas que pueden ser cuantificadas haciéndolos marcadores sencillos una vez que son vinculados a una secuencia específica del genoma de los virus. Como ejemplos de estos marcadores tenemos: β -Galactosidasa que mediante hidrólisis forma nitrofenol, Luciferasa que por medio de oxidación forma Oxiluciferina y la más ampliamente utilizada: proteína verde fluorescente (GFP). Esta es un cromóforo natural que emite su capacidad bioluminiscente por tres aminoácidos en su secuencia (R. Green & Sambrook, 2012) (Ren et al., 2016). La utilidad de la GFP en biología molecular ha hecho que se realicen modificaciones a su estructura como, una mayor intensidad de fluorescencia e incluso emisión de un color diferente comparada con la proteína verde fluorescente sin modificar. Se han desarrollado variantes de GFP como la proteína súper plegada que conserva la intensidad de fluorescencia, presenta una mejor resistencia a la desnaturalización y cinética de plegado así como estabilidad al fusionarse con otras proteínas (Pédelacq et al., 2006).

Los sistemas de genes reporteros se han utilizado ampliamente desde Arenavirus (Fénéant et al., 2022), Rotavirus (Kanai et al., 2019) y más recientemente en el estudio de Coronavirus y Arbovirus (Pahmeier et al., 2021).



Actualmente existe poca información de sistemas reporteros insertados en flavivirus. El primer modelo de sistema reportero en un flavivirus documentado fue en 2003, donde se desarrolló un clon infeccioso de virus de encefalitis japonés (JVE) a partir de la construcción y ligado de cDNA por medio de múltiples enzimas de restricción y la inserción de *luciferasa* y GFP en la porción terminal 3' de su plásmido (Yun et al., 2003). En el caso de ZIKV, la primera metodología reportada sobre un modelo de sistema reportero fue el elaborado por Gadea y colaboradores, donde sintetizaron por fragmentos el genoma del ZIKV de linaje africano insertando su gen reportero (GFP) además de un péptido de autoescisión 2A en la región de proteínas estructurales (C). Este DNA recombinante fue transfectado en células Vero por medio de electroporación y se comparó la eficiencia en la producción de partículas virales con la cepa del ZIKV Africano como control, observando una disminución significativa en su DNA recombinante (Gadea et al., 2016).

En otro trabajo, se insertó un gen de *Renilla Luciferasa* dentro de la secuencia que codifica para la proteína C. En esta metodología se construyó un plásmido del ZIKV a partir de la muestra de un paciente infantil logrando la inserción del reportero en la sección estructural. Primero se evaluó la infectividad y producción de partículas virales mediante RT-PCR y se observaron efectos citopáticos a los 6 y 7 días posteriores a la transfección en células Vero. Al corroborar la eficacia de su clon infeccioso se insertó el gen reportero de luciferina evaluando su actividad bioluminiscente la cual se encontró de manera estable. Por último se tomó este medio de cultivo que contenía partículas virales con el reportero para infectar nuevas células Vero y comparar contra el virus sin mutar, sin embargo, no se observaron unidades formadoras de placa pero sí se detectó la señal de *luciferasa* por medio de inmunotinción a los 6 días pos infección (Shan et al., 2016).

En el estudio realizado por Gao y colaboradores, se construyó un plásmido de ZIKV uniendo 2 fragmentos en el vector pBAC11. En esta construcción se insertó el gen EGFP unido al factor de auto proteólisis 2A dentro la secuencia que codifica



para la proteína no estructural NS1, observaron por microscopia de fluorescencia la presencia de su reportero a las 48 horas post infección en células Vero. Sin embargo, se encontró una diferencia notable en la producción de partículas virales comparadas con el virus sin mutar (Gao et al., 2020).

En el trabajo realizado por Mutso y colaboradores realizaron la construcción de su plásmido de ZIKV en un vector pCCI creando un gen fusión de varios reporteros unidos a la proteasa 2A dentro de la secuencia de la proteína estructural C. Se encontró una baja estabilidad del plásmido que contenía diversos reporteros debido a la mutación en la proteína estructural así como a la fusión de un gran número de genes reporteros (Mutso et al., 2017).



3. Metodología:

En la figura 2 se observa el mapa génico del plásmido ICD ZIKA Paraiba (Tsetsarkin et al., 2016). Este es un DNA circular de una longitud de 14,426 pb, contiene un sitio promotor de citomegalovirus, un gen que le confiere resistencia bacteriana a Ampicilina y diversos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Este DNA circular fue abierto por medio de una PCR inversa para la introducción del gen reportero entre las secciones que codifican para las proteínas no estructurales NS4A y 2K. Simultáneamente, por medio de PCR de punto final, nuestro gen reportero fue extendido con secuencias en sus extremos 5' y 3' que pertenecen a los sitios de reconocimiento de la proteasa viral para poder ser escindidos y liberar así al reportero. En la figura 2 se ilustra en secuencia como se trabajó con el plásmido hasta lograr la inserción del gen reportero.

El método de inserción del gen reportero (sfGFP) se realizó por medio de In-Fusion (Takara Bio™) una técnica libre de enzimas de restricción y ligasa para evitar la adición de nucleótidos que comprometan la infectividad del virus. La técnica de In Fusion permite la unión de fragmentos de DNA con extremos homólogos en 5' y 3' para que una enzima recombinasa pueda unir dichos fragmentos en un vector linearizado. Más adelante en la figura 3 se ilustra esta metodología y se detalla el protocolo a seguir. Primero se necesita que el fragmento (gen reportero extendido) y el vector (plásmido linearizado) tengan una homología de al menos 15 nucleótidos, esto es necesario para que puedan ser recombinados con el kit de In Fusion.



Primero se diseñaron los primers para generar la amplificación del gen reportero a introducir en el vector ICD ZIKV Paraiba, así como los primers necesarios para linearizar dicho vector por medio de una PCR inversa. Como se mencionó en un apartado anterior, se conocen los sitios de corte reconocidos por la proteasa viral NS3 (Sun et al., 2017). Gracias a estos datos se diseñaron los primers a partir de las porciones de reconocimiento en las proteínas no estructurales NS4A y 2K. Se eligieron estas proteínas para la inserción del gen reportero debido a que a nivel de genoma no comprometen por distancia el funcionamiento de la proteasa ni RNAsa viral. Como se mencionó anteriormente, los pocos trabajos reportados sobre la inserción de un gen reportero en un flavivirus hacen uso de las porciones que codifican para proteínas estructurales Pr, M y E.

Se ha observado que la modificación por la adición de nucleótidos ha disminuido la eficiencia de la infectividad y de producción de partículas virales. Por lo tanto en este trabajo elegimos como sitio de inserción las regiones que codifican para proteínas no estructurales NS4A y 2K para evitar en medida de lo posible no modificar la infectividad de nuestro virus. Para la generación de un nuevo plásmido recombinante que exprese la proteína verde fluorescente, se linearizó el vector ICD-ZIKV Paraiba el cual se desarrolló a partir de una paciente infectada con este virus de la cepa asiática.

Primeramente amplificamos del gen reportero que será insertado en el vector de ZIKV, para ello se utilizó un par de primers y DNA molde que amplifican para esta proteína verde fluorescente. En cada producto de PCR se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se observó por medio del sistema de documentación de geles Axygen™.

Se usaron los siguientes primers para la amplificación de GFP; FP-sfGFP: ATGAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTC y RP-sfGFP: TTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTGTAATCC



El protocolo para esta amplificación del gen reportero en un volumen de 20 μ l se muestra a continuación: agua libre de nucleasas (NFW): 10.4 μ l, buffer de polimerasa HF 5X: 4 μ l, dNTP's 10 mM: 0.4 μ l, Primer 1 (FP-sfGFP 10 μ M): 2.0 μ l, Primer 2 (RP-sfGFP 10 μ M): 2.0 μ l, DNA molde (sfGFP 10 ng/ μ l): 1.0 μ l y DNA polimerasa Hot Phusion II: 0.2 μ l El programa de temperaturas utilizadas para esta PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 98°C durante 3 minutos un único ciclo, desnaturalización a 98°C durante 15 segundos por 30 ciclos, alineamiento a 71°C durante 30 segundos por 30 ciclos, extensión de 72°C durante 15 segundos por 30 ciclos y extensión final de 72°C durante 7 minutos un ciclo.

Para linearizar el plásmido ICD ZIKV, se realizó una PCR inversa con el objetivo de abrir entre las secciones que codifican para las proteínas no estructurales NS4A Y 2K. Se diseñaron los siguientes primers para realizar esta PCR inversa; FP-ZIKV-Open: TCTCCCCAGGACAACCAAATGGCAATCATC y RP-ZIKV-Open: TCTTTGCTTTTCTGGCTCAGGTATGAGCAC.

El protocolo de esta PCR se realizó de la siguiente manera en reacción de 25 μ l. agua libre de nucleasas (NFW): 15.9 μ l, buffer de polimerasa 5X: 5 μ l, dNTP's 10 mM: 0.5 μ l, Primer 1 (FP-ZIKV-Open 10 μ M): 1.25 μ l, Primer 2 (RP-ZIKV-Open 10 μ M): 1.25 μ l, Primer 2 (RP-ZIKV-Open 10 μ M): 1.25 μ l, DNA molde (ICD-ZIKV Paraiba a 10 ng/ μ l): 1.0 μ l y DNA polimerasa Superfi: 0.1 μ l

El programa del termociclador se ajustó de la siguiente manera considerando la temperatura de alineamiento recomendada por Thermofisher Calculator para esta DNA polimerasa con los respectivos primers. La PCR se realizó en 28 ciclos, desnaturalización inicial de 98°C durante 2 minutos un ciclo, desnaturalización a 98°C durante 10 segundos por 28 ciclos, alineamiento a 71°C durante 10 segundos por 28 ciclos, extensión a 72°C durante 5 minutos por 28 ciclos y de extensión final a 72°C durante 10 minutos un ciclo. El tiempo de reacción fue de aproximadamente 3 horas y 40 minutos. Seguido se adicionó 0.5 μ l de la enzima de restricción Dpn1



para eliminar el DNA parental, el cual está metilado. Esta nueva reacción se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37°C.

Se diseñaron un par de primers a partir de mutaciones sinónimas para realizar la amplificación de la proteína verde fluorescente con los sitios de reconocimiento en los extremos 5' y 3' del reportero: FP-ZIKV-INS-1Z-V2: GATAATCAGATGGCTATTATTATTATGAAAGGAGAAGAAGACTTTTC y RP-ZIKV-INS-1Z-V2: TCAGGTTCTGGAATAAGTTTGTAGAGCTCATCCAT. El protocolo de amplificación para esta nueva primera mitad se muestra a continuación para un volumen de 20 µl. Agua libre de nucleasas (NFW): 10.4 µl, buffer de polimerasa HF 5X: 4.0 µl, dNTP's 10 mM: 0.4 µl, Primer 1 (FP-ZIKV-INS-1Z-V2) 10 µM: 2.0 µl, Primer 2 (RP-ZIKV-INS-1Z-V2) 10 µM: 2.0 µl, DNA molde (sf-GFP a 10 ng/µl): 1.0 µl y DNA polimerasa Hot Phusion II: 0.2 µl

El programa del termociclador se ajustó de la siguiente manera considerando la temperatura de alineamiento recomendada por Thermofisher Calculator para esta DNA polimerasa Hot Phusion II con los respectivos primers. La PCR se realizó en 30 ciclos. Desnaturalización inicial a 98°C durante 3 minutos un ciclo, desnaturalización a 98°C por 15 segundos 30 ciclos, alineamiento a 64°C durante 30 segundos 30 ciclos, extensión a 72°C por 15 segundos 30 ciclos y extensión final a 72°C durante 15 segundos un ciclo.

Después de cada PCR, se verificó que el producto tuviera el tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para esta parte, y como nuestro producto sería utilizado como molde para la segunda extensión, se utilizó el reactivo DNA Stain SYBR como agente intercalante reemplazando al bromuro de etidio. Se disolvieron 400 mg de agarosa en 40 ml de buffer TBE 1X, se cargó todo el volumen de la reacción más glicerol como buffer de carga. Se utilizó también un marcador o escalera de 1000 pares de bases para determinar el tamaño de nuestro



producto. Se corrió la electroforesis a 110 volts durante 45 minutos y se visualizó en foto documentador.

Se utilizó nuevamente el producto obtenido de la anterior PCR para la segunda amplificación de la proteína verde fluorescente con una alícuota a 10 ng/μl. Se diseñaron los siguientes primers; FP-ZIKV-INS-2Z-V2: CCTGAGCCAGAAAGCAAAGATCCCCGCAAGATAATCAGATGG y RP-ZIKV-INS-2Z-V2: CATTGGTTGTCCTGGGGCCTCTGTTTCTAGGTTCTGG. El protocolo de amplificación para esta nueva segunda mitad se muestra a continuación para un volumen de 20 μl. Agua libre de nucleasas (NFW): 9.35 μl, buffer de polimerasa HF 5X: 4.0 μl, dNTP's 10 mM: 0.4 μl, Primer 1 (FP-ZIKV-INS-2Z-V2) 10 μM: 2.0 μl, Primer 2 (RP-ZIKV-INS-2Z-V2) 10 μM: 2.0 μl, DNA molde (ZIKV-INS-1Z-V2) a 10 ng/μl: 1.25 μl, DMSO (4% de reacción total): 0.8 μl y DNA polimerasa Hot Phusion II: 0.2 μl.

El programa de termociclador utilizado para esta PCR se muestra a continuación tomando en consideración la temperatura de alineamiento recomendada por Thermofisher Calculator: una desnaturalización inicial a 98°C durante 3 minutos un ciclo, desnaturalización a 98°C durante 15 segundos por 30 ciclos, extensión a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos un ciclo.

Una vez verificado el tamaño del producto, se realizó la limpieza del DNA mediante el protocolo de purificación de producto de PCR a partir de electroforesis. Para ello se utilizó la metodología del kit Wizard de Promega, este consistió en remover los residuos de dNTP's, primers y buffer mediante lavado con solución de etanol. Al finalizar la limpieza el DNA se cuantificó mediante nanodrop y se almacenó a -20°C.

Para realizar el proceso de clonación donde no se cuenta con un producto purificado por medio de algún buffer de lavado con etanol, se recomienda el uso de



la solución Enhancer que mejora el funcionamiento de la enzima recombinasa HD Premix Infusion cuando el fragmento y vector son de tamaños muy diferentes. Este tratamiento consistió en el siguiente protocolo: se añadieron 2 μl de la solución de enhancer a 5 μl del producto de PCR sin purificar (INS2Z-V2). Esta reacción se dejó en incubación a 37°C durante 15 minutos y posteriormente a 80°C durante 15 minutos. Al término de la incubación el producto se almacenó a -20°C hasta que se realizó la clonación.

Como se mencionó anteriormente, realizamos la unión del vector linearizado (ZIKV-Open) y del fragmento (ZIKV-INS2Z-V2) para la generación del nuevo plásmido recombinante. Este experimento se realizó mediante el kit y protocolo de In-Fusion con los siguientes reactivos para una reacción de 10 μl . Se añadió Agua libre de nucleasas (NFW): 4.64 μl , Vector linearizado (ZIKV-Open): 1.36 μl , Fragmento (ZIKV-INS-2): 2.0 μl y enzima recombinasa Premix HD In Fusion; 2.0 μl . El programa de incubación para la clonación de acuerdo al protocolo del kit fue de: 15 minutos a 37°C seguido de 15 minutos a 50°C.

Una vez terminada la incubación se colocó la reacción en hielo y se preparó la transformación en células competentes proporcionadas por el mismo kit comercial (Células Stellar competentes).



Se añadieron 3 μ l de la reacción In Fusion a un vial con 50 μ l de células stellar competentes previamente descongeladas en hielo, posteriormente se dejaron reposar en hielo durante 30 minutos. Realizamos un choque térmico poniendo las bacterias en un termoblock a 42°C durante 45 segundos y después se añadieron 500 μ l de medio SOC a las bacterias, estas se dejaron en termo agitación durante una hora, 180 rpm a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 1000g's durante 5 minutos el vial con bacterias para obtener el pellet. Decantamos 400 μ l de sobrenadante y se resuspendió el pellet con los 100 μ l restantes. Se sembraron los 100 μ l de bacterias en una placa de Agar con ampicilina y se dejó en incubación durante 16 horas a 37°C. Se observó el crecimiento de colonias en la placa y se seleccionaron 8 colonias iniciales para verificar que contenían el gen de interés. Para ello se picaron y se pusieron a crecer en 10 ml de medio Luria Bertani (LB) adicionando 10 μ l de Ampicilina, se dejaron en termo agitación durante 16 horas.

El proceso de obtención de plásmido se basa en la lisis de las bacterias, la obtención del DNA plasmídico, su precipitación y lavado mediante etanol. Se utilizó el kit Wizard SV miniprep de Promega®. El protocolo de extracción de DNA se explica a detalle a continuación.

Las bacterias se dejaron en incubación en 10 ml de medio LB durante 12 horas, posteriormente obtuvimos la biomasa de las bacterias por centrifugación (8,300 rpm durante 5 minutos) decantamos el sobrenadante y se añade la solución de resuspensión, se mezcla bien para re suspender el pellet con ayuda de vortex y seguido se añade el buffer de lisis celular para comenzar con la ruptura de los organelos de las bacterias para permitir la liberación de los ácidos nucleicos. Se añade la proteasa alcalina para la desnaturalización y precipitación de proteínas en un tiempo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Seguido se detiene la acción del buffer de lisis con ayuda de un buffer de neutralización. Posteriormente con ayuda de mini columnas ensambladas sobre tubos de colecta se comienza a



precipitar el DNA por medio de centrifugación a 14,000 rpm con ayuda de la solución de lavado con etanol.

El DNA es insoluble en etanol por lo que precipita. Por último se deja secar el remanente de solución de lavado y se resuspende el DNA en 100 μ l de agua libre de nucleasas. Finalmente se mide la concentración de DNA obtenido por medio de nanodrop tomando en cuenta las absorbancias de pureza en el espectro de 260/280 y 260/230 nm.

Se realizó una PCR con 10 colonias crecidas en la placa de ampicilina en busca del DNA recombinante, para ello se picaron la mitad de estas colonias y se buscó amplificar con ayuda de primers específicos adyacentes al sitio de inserción del gen reportero productos con tamaño esperado de 1200 pb aproximadamente. Los primers utilizados para este experimento fueron los siguientes; FP-ZIKA-2: CGGAGACCCTAGAGACCATTAT y RP-ZIKA-5: CCTCCTCTCTCCTTCCCATTA. El protocolo utilizado para la PCR de colonia en reacciones de 10 μ l cada una, se muestra a continuación: buffer de enzima polimerasa Dream Taq: 1.0 μ l, dNTP's 10 mM: 0.2 μ l, FP-ZIKA-2 10 μ M: 0.5 μ l, RP-ZIKA-5 10 μ M: 0.5 μ l, agua libre de nucleasas: 7.75 μ l, colonia de interés picada desde la placa y Enzima polimerasa Dream Taq: 0.1 μ l.

El programa de termociclador es el siguiente: desnaturalización a 98°C durante 3 minutos un ciclo, desnaturalización a 98°C por 15 segundos 30 ciclos, alineamiento a 72°C durante 30 segundos por 30 ciclos, extensión a 72°C durante 30 segundos 30 ciclos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los DNA's recombinantes positivos a la PCR de colonia fueron enviados a secuenciación al laboratorio nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental (LANBAMA) perteneciente al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) para verificar la inserción del gen de interés. Las muestras se llevaron refrigeradas en un volumen de 20 μ l a una concentración de 50 ng/ μ l de



acuerdo a los requerimientos de dicho laboratorio. Se usó como referencia el mismo par de primers utilizados en la PCR de colonia a una concentración de 1 μ M.

De igual manera, se corroboró por medio de digestión con la enzima de restricción BamHI (New England Biolabs®) que el DNA positivo a la PCR de colonia y a la secuenciación para verificar el tamaño de los fragmentos por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se usó como referencia el DNA molde de ICD-ZIKV para comparar los tamaños de las bandas. El protocolo para esta digestión fue el siguiente de acuerdo a la ficha técnica de la enzima de restricción: 1 μ g de DNA (ICD ZIKV y ZIKV GFP), buffer de enzima NEB CutSmart: 2.0 μ l, enzima de restricción BamHI: 0.2 μ l y agua libre de nucleasas (aforar hasta 20 μ l). La reacción se dejó en incubación a 37°C durante 2 horas. Posteriormente fueron cargados en un gel de agarosa al 1% y corridos a 110 volts durante 40 minutos.

Las células HEK293T fueron incubadas a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium SIGMA-ALDRICH®) suplementadas con suero fetal bovino al 10%. Para los experimentos, las células fueron levantadas con Tripsina 1x, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, decantado el sobrenadante y re suspendido el pellet en DMEM al 10% SFB.

Finalmente, con una dilución 1:5 (80 μ L de azul de tripano y 20 μ L de células) se realizó el conteo con ayuda de una cámara de Neubauer. Para los ensayos de transfección por medio de Lipofectamina, se sembraron 200,000 células HEK293 por pozo en una placa de 6 pocillos y se cambió y recuperó el medio a las 24, 48 y 72 horas. Durante cada cambio de medio se analizó por microscopio la fluorescencia de las células y los sobrenadantes fueron almacenados a -80°C. Para la transfección, se utilizó 1 μ g de DNA tanto en ICD ZIKV como de ZIKV GFP. Se usó el reactivo Lipofectamine™ 3000 de Invitrogen™ (Número de catálogo: L3000001) y se siguió el protocolo de transfección utilizando los siguientes



volúmenes para formar el complejo lípido-DNA. Se añadió Opti-MEM: 250 μ l, 1 μ g de DNA (ZIKV GFP), Lipofectamine 3000: 3.75 μ l y P3000: 2 μ l.



4. Resultados

En las figuras 4 a 6 se observan los resultados de las PCR utilizadas para la amplificación y extensión del gen reportero, mientras que en las figuras 7 y 8 se observa la linearización del vector ICD ZIKV y posterior inserción del gen reportero. Por medio del software LaserGene Molecular Biology, con la extensión de SeqBuilder Pro se visualizó el producto con el tamaño esperado *In Silico* para comparar con el producto obtenido una vez realizada la PCR. En la figura 9 se observa la digestión por medio de la enzima de restricción BamHI que reconoce los sitios G^AGATCC, observamos que se generan 2 bandas de diferente tamaño y utilizamos el plásmido no linearizado de ICD ZIKV para comparar el tamaño de bandas respecto al DNA recombinante de ZIKV GFP y en las figuras 10 y 11 se comprueba la inserción del gen reportero mediante digestión con la enzima BamHI y por medio de secuenciación Sanger.

En las figuras 12 y 13 se observan las células HEK293T transfectadas con el virus recombinante que contiene el reportero GFP y su control de virus sin mutar. Se observó y cambió medio de cultivo cada 24 horas sin embargo solo se muestran imágenes a las 48 y 72 horas posteriores a la transfección. Después de las 72 horas se alcanzó la confluencia y las células comenzaron a perder su adherencia. Esta línea celular es ampliamente utilizada en áreas de biotecnología, cultivo celular y toxicología por su mantenimiento y manejo sencillo. Presentan una morfología aplanada y crecen en adhesión a la superficie de la placa en una mono capa, al alcanzar un punto alto de población celular comienzan a perder esta característica y a formar pequeños agregados o islas de células antes de comenzar a morir.



5. Discusión

En el presente trabajo realizamos la inserción de un gen reportero en secciones no estructurales de un plásmido del virus del Zika mediante una técnica de recombinación homóloga usando parte de las secuencias pertenecientes a las proteínas que flanquean a nuestro reportero para ser reconocidas por la proteasa viral.

El primer reto en este trabajo fue lograr la unión del fragmento y vector linearizado para la creación de ZIKV-GFP, debido a las similitudes en los extremos 5' y 3' de la proteína verde fluorescente extendida con el plásmido linearizado y como se menciona en los puntos 4.6 y 4.7 de la sección metodología, diseñamos un par de primers a partir de mutaciones sinónimas en los codones que codifican para los mismos aminoácidos de los sitios de reconocimiento para las proteínas no estructurales 2K y NS4A en los extremos 5' y 3' respectivamente, de esta manera la enzima recombinasa no cometía errores en la unión entre vector y fragmento. La dificultad para unir vector y fragmento se debía al uso de dobles sitios de reconocimiento que flanquean nuestro gen reportero. Es posible que al únicamente usar un solo sitio de reconocimiento en 5' y 3' del gen reportero sea posible una clonación más sencilla. Como se observa en la figura 11, pudimos comprobar la inserción del reportero al comparar la secuencia de aproximadamente 800 nucleótidos con numerosos trabajos reportados en la base de datos del Instituto de salud de los Estados Unidos donde utilizan el gen de GFP, la poca diferencia de similitud que obtuvimos (< 9%) se debe a la extensión que realizamos adicionando secuencias del ZIKV.

Sin embargo nuestro gen recombinante no expresó de manera eficaz la fluorescencia al ser transfectado en células HEK293 durante un periodo de 72 horas. Como se observa en las figuras 12 y 13, al infectar con ZIKV-GFP no hubo un decremento en la población por muerte celular como se esperaba tanto en el



grupo control como con nuestro gen recombinante. Se observó un ligero cambio en la morfología de las células entre las 48 y 72 horas posteriores a la transfección tanto con el virus control (ICD ZIKV) como con ZIKV-GFP.

La poca fluorescencia captada corresponde a las 72 horas posteriores a la transfección, lo cual denota el ingreso del virus y su posterior traducción, replicación y liberación del reportero como se observa en la figura 13. Al momento se observa una ligera disminución de la población celular lo cual puede deberse tanto a la infectividad del virus como al alto porcentaje de confluencia y posterior pérdida de capacidad de adhesión de las células. Un trabajo de transfección con ambos linajes del ZIKV demostró que la morfología de las células HEK 293 mantenían su morfología hasta 3 días posteriores a la transfección y comenzaban a perder adherencia una semana posterior a la transfección con notable efecto citopático y degeneración celular aproximadamente 10 días pos infección (Liu et al., 2019).

Como se mencionó al inicio de este trabajo, existen pocos trabajos documentados sobre la inserción de un gen reportero en un plásmido del ZIKV. La primera metodología descrita y a partir de la cual se derivaron estrategias similares fue propuesta por (Gadea et al., 2016) en donde a partir de la construcción de su plásmido insertaron un gen fusión (GFP + 2^a) en la porción estructural. Al realizar la infección con su virus recombinante en células VERO se observó un pico máximo de producción de partículas virales a las 48 horas pos infección y una expresión máxima de fluorescencia a las 36 horas pos infección.

En el trabajo publicado por (Shan et al., 2016) sintetizaron su propio plásmido de ZIKV de linaje asiático a partir de una muestra clínica de un paciente infantil. Se comprobó su infectividad en células VERO y posteriormente se añadió un gen reportero (Luciferasa) dentro de la región que codifica para la cápside viral. Se observó la actividad del reportero hasta el día 6 pos infección mediante inmunotinción.



En otro estudio, usando la metodología de Gadea y colaboradores se insertó de igual manera un gen reportero (eGFP) dentro de la porción estructural de un plásmido del ZIKV y se infectaron células VERO para evaluar la infectividad de este virus recombinante. Si bien se observó una señal de fluorescencia hasta más de 72 horas pos infección, este virus resultó con una baja capacidad de infección comparada con su control wildtype. De igual manera no se observaron cambios morfológicos en su cultivo celular (Gao et al., 2020).

En el trabajo realizado por (Mutso et al., 2017) construyeron su plásmido de virus del Zika insertando un gen reportero distinto para comparar la actividad bioluminiscente (Nanolucif, GFP y mCherry) . La inserción se llevó a cabo dentro de la región codificante para la cápside viral y posteriormente se infectaron células VERO, observándose un decremento inmediato de la actividad del reportero y poca formación de unidades formadoras de colonia. No se observaron cambios morfológicos en las células VERO.



6.- Conclusiones

En el presente trabajo realizamos la inserción de un gen reportero dentro de la sección no estructural de un plásmido del ZIKV mediante una técnica de recombinación homóloga usando regiones de reconocimiento propias de la proteasa con el fin de evitar la adición de secuencias externas que comprometieran la capacidad infecciosa del virus. La principal dificultad para lograr la inserción de nuestro gen reportero al vector de ICD ZIKV se debió a que las regiones que flanqueaban a nuestro reportero tenían la misma secuencia en 5' y 3', por lo cual para lograr una clonación exitosa, tuvimos que rediseñar la metodología de extensión de sfGFP mediante mutaciones sinónimas que codificaban para los mismos aminoácidos que sirven para el reconocimiento de la proteasa viral y permitir la escisión del gen reportero.

Por características mismas del plásmido de ZIKV fue difícil obtener el DNA plasmídico recombinante suficiente con el cual infectar las células HEK, por lo que elevar la concentración de DNA para la tranfección no fue posible, además de que un mayor volumen de DNA podría comprometer la formación del complejo lipídico, sin embargo como recomendaciones señalamos que trabajar con concentraciones de 2.5 a 5 µg de DNA y analizar durante más de 72 horas la presencia de fluorescencia podría dar resultados positivos en la señal del reportero. De igual manera podríamos observar un decremento en la población celular como se planteaba inicialmente y como se ha reportado previamente en la literatura.

Como perspectivas, en este trabajo logramos la inserción un gen reportero mediante el uso de secuencias propias del vector viral sin la adición de proteínas exógenas ni enzimas de restricción. Sin embargo, el sitio de inserción posiblemente no fue el adecuado debido a que no se observó una infectividad y muerte celular como era de esperarse, es probable también que la inserción del reportero haya dañado la habilidad del virus para replicarse. Nuestra hipótesis se basaba en que el



sitio entre NS4A y 2K era idóneo para la inserción del gen reportero debido a que no comprometía la función de proteasa viral así como la formación del virión. Sin embargo, como se ha reportado en la literatura, estas proteínas no estructurales están involucradas en la replicación viral y respuesta inmune del hospedero, por lo cual es posible que a pesar de ser secuencias mismas del virus haya un decremento en la señalización celular. Una de las sugerencias con base a los trabajos reportados sería probar la inserción de la proteína verde fluorescente en una nueva región como el caso de secciones estructurales. Tal y como reportaron los respectivos autores, la capacidad de infección disminuyó respecto a su control sin embargo, la señal de su reportero fue detectable dentro de las 36 y 72 horas, por lo que al usar la metodología de recombinación homóloga, no se comprometería la formación del virión y sin hacer uso de secuencias externas como el caso del factor de auto proteólisis 2A es posible que la infectividad del virus recombinante sea más parecida a su control sin mutar.

La enfermedad por virus del Zika ha retomado gran importancia debido a la adaptación del vector a nuevos ambientes urbanos y otros factores abióticos tales como temperatura, precipitación y altitud. Además de observarse como puede ser transmitido ahora vía sexualmente, esto significa que ahora no solo poblaciones humanas alrededor del hábitat natural del mosquito son susceptibles a la infección y de mayor importancia, la capacidad que tiene este virus de pasar barrera placentaria y hematoencefálica para generar patologías a nivel de sistema nervioso. Es por ello que se necesita seguir con el estudio de este virus en todos sus aspectos, desde la adaptación del vector, hasta su señalización celular que involucra los efectos nocivos en salud.



7. Bibliografía

Boeuf, P., Drummer, H. E., Richards, J. S., Scoullar, M. J. L., & Beeson, J. G. (2016). The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Medicine*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0660-0>

Brooks, J. T., Friedman, A., Kachur, R. E., LaFlam, M., Peters, P. J., & Jamieson, D. J. (2016). Update: Interim guidance for prevention of sexual transmission of Zika virus - United States, July 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(29), 745–747. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6529e2>

Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., Broutet, N. J. N., & Low, N. (2018). Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Medicine*, *15*(7), e1002611. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002611>

Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)

Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>

Estévez-Herrera, J., Pérez-Yanes, S., Cabrera-Rodríguez, R., Márquez-Arce, D., Trujillo-González, R., Machado, J.-D., Madrid, R., & Valenzuela-Fernández, A. (2021). Zika virus pathogenesis: A battle for immune evasion. *Vaccines*, *9*(3), 294. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030294>

Faria, N. R., Azevedo, R. do S. da S., Kraemer, M. U. G., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., Thézé, J., Bonsall, M. B., Bowden, T. A., Rissanen, I., Rocco, I. M., Nogueira, J. S., Maeda, A. Y., Vasami, F. G. da S., Macedo, F. L. de L., Suzuki, A., Rodrigues, S. G., Cruz, A. C. R., Nunes, B. T., ... Vasconcelos, P. F. C. (2016). Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6283), 345–349. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>

Fénéant, L., Leske, A., Günther, K., & Groseth, A. (2022). Generation of reporter-expressing new world arenaviruses: A systematic comparison. *Viruses*, *14*(7), 1563. <https://doi.org/10.3390/v14071563>

Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., Mavingui, P., & Desprès, P. (2016). A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology*, *497*, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015>



- Gao, J., Shi, L., Chen, J., Lu, W., Cai, J., Zhao, W., & Zhang, B. (2020). Construction of a full-length infectious clone of Zika virus stably expressing EGFP marker in a eukaryotic expression system. En *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-20982/v1>
- Imperato, P. J. (2016). The convergence of a virus, mosquitoes, and human travel in globalizing the Zika epidemic. *Journal of Community Health, 41*(3), 674–679. <https://doi.org/10.1007/s10900-016-0177-7>
- Kanai, Y., Kawagishi, T., Nouda, R., Onishi, M., Pannacha, P., Nurdin, J. A., Nomura, K., Matsuura, Y., & Kobayashi, T. (2019). Development of stable Rotavirus reporter expression systems. *Journal of Virology, 93*(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.01774-18>
- Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology, 152*(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Lee, L. J., Komarasamy, T. V., Adnan, N. A. A., James, W., & Rmt Balasubramaniam, V. (2021). Hide and seek: The interplay between Zika virus and the host immune response. *Frontiers in Immunology, 12*, 750365. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750365>
- Li, Y., Li, L.-F., Yu, S., Wang, X., Zhang, L., Yu, J., Xie, L., Li, W., Ali, R., & Qiu, H.-J. (2016). Applications of replicating-competent reporter-expressing viruses in diagnostic and molecular virology. *Viruses, 8*(5), 127. <https://doi.org/10.3390/v8050127>
- Liu, H., Liao, H.-M., Li, B., Tsai, S., Hung, G.-C., & Lo, S.-C. (2019). Comparative genomics, infectivity and cytopathogenicity of American isolates of Zika virus that developed persistent infections in human embryonic kidney (HEK293) cells. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(12), 3035. <https://doi.org/10.3390/ijms20123035>
- Maharajan, M. K., Rajiah, K., Belotindos, J.-A. S., & Basa, M. S. (2020). Social determinants predicting the knowledge, attitudes, and practices of women toward Zika virus infection. *Frontiers in Public Health, 8*, 170. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00170>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical Microbiology Reviews, 29*(3), 487–524. <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-15>
- Mutso, M., Saul, S., Rausalu, K., Susova, O., Žusinaite, E., Mahalingam, S., & Merits, A. (2017). Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *The Journal of General Virology, 98*(11), 2712–2724. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000938>
- OMS, organizacion mundial de la salud. (2017). *Informe sobre la situación VIRUS DE ZIKA MICROCEFALIA SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ.* 1–5. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254747/zikasitrep10Mar17-spa.pdf;jsessionid=474F9D0C5DF22FF540C090A47D867D64?sequence=1>



- Pahmeier, F., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Prasad, V., Pape, C., Laketa, V., Ruggieri, A., Bartenschlager, R., & Cortese, M. (2021). A versatile reporter system to monitor virus-infected cells and its application to dengue virus and SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, *95*(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01715-20>
- Pédélecq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, *24*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, *543*, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Rees, E. E., Petukhova, T., Mascarenhas, M., Pelcat, Y., & Ogden, N. H. (2018). Environmental and social determinants of population vulnerability to Zika virus emergence at the local scale. *Parasites & Vectors*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2867-8>
- Ren, L., Peng, Z., Chen, X., & Ouyang, H. (2016). Live cell reporter systems for positive-sense single strand RNA viruses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *178*(8), 1567–1585. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1968-5>
- Riedl, W., Acharya, D., Lee, J.-H., Liu, G., Serman, T., Chiang, C., Chan, Y. K., Diamond, M. S., & Gack, M. U. (2019). Zika virus NS3 mimics a cellular 14-3-3-binding motif to antagonize RIG-I and MDA5-mediated innate immunity. *Cell Host & Microbe*, *26*(4), 493-503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.012>
- Shan, C., Xie, X., Muruato, A. E., Rossi, S. L., Roundy, C. M., Azar, S. R., Yang, Y., Tesh, R. B., Bourne, N., Barrett, A. D., Vasilakis, N., Weaver, S. C., & Shi, P.-Y. (2016). An infectious cDNA clone of Zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host & Microbe*, *19*(6), 891–900. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.004>
- Singh, R. K., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Iqbal, H. M. N., Malik, Y. S., & Bueno-Marí, R. (2017). Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of Zika virus: An update. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2677. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02677>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl_10), S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Sun, G., Larsen, C. N., Baumgarth, N., Klem, E. B., & Scheuermann, R. H. (2017). Comprehensive annotation of mature peptides and genotypes for Zika virus. *PloS One*, *12*(1), e0170462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170462>
- Tsetsarkin, K. A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S. S., Laassri, M., Chumakov, K., & Pletnev, A. G. (2016). A full-length infectious cDNA clone of Zika virus from the 2015 epidemic in Brazil as a genetic platform for studies of virus-host interactions and vaccine development. *MBio*, *7*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-16>



Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., & Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery*, 3(1), 17006. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6>

Yun, S.-I., Kim, S.-Y., Rice, C. M., & Lee, Y.-M. (2003). Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *Journal of Virology*, 77(11), 6450–6465. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.11.6450-6465.2003>

Zhang, Q., Sun, K., Chinazzi, M., Pastore y Piontti, A., Dean, N. E., Rojas, D. P., Merler, S., Mistry, D., Poletti, P., Rossi, L., Bray, M., Halloran, M. E., Longini, I. M., Jr, & Vespignani, A. (2017). Spread of Zika virus in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), E4334–E4343. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620161114>

8. Figuras

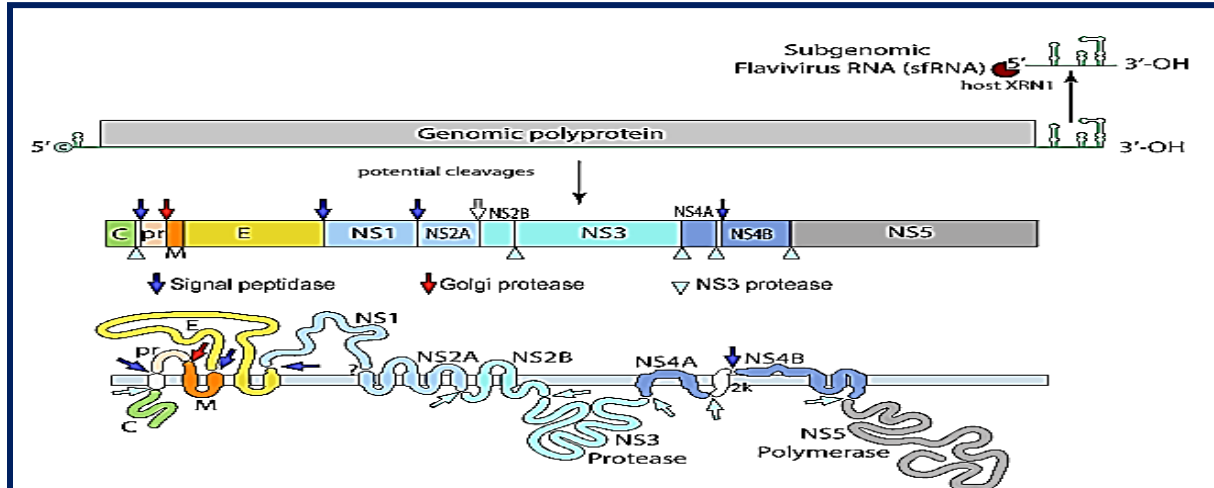


Figura 1: Representación de las distintas proteínas que codifica el genoma de 10.7 kbp del virus del Zika. El RNA viral codifica para un polipéptido que a su vez se traduce en 3 proteínas estructurales que intervienen en la formación de la partícula viral y 7 no estructurales con funciones diversas, desde el empaquetamiento del genoma, replicación e interacción con el hospedero. Imagen obtenida del repositorio en línea ExpASY. https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species.

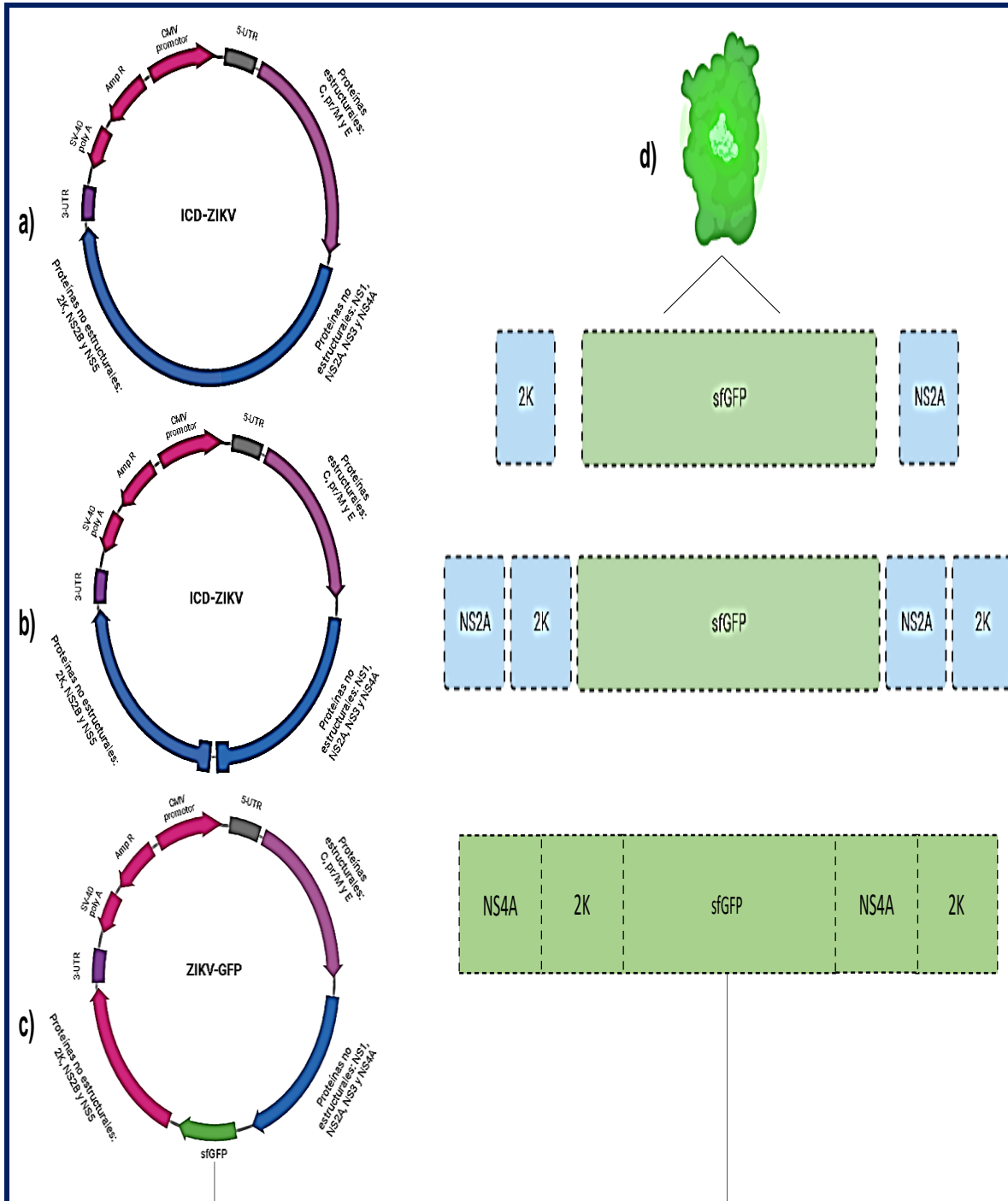


Figura 2 Modificaciones del plásmido ICD ZKV: a) plásmido original de ZIKV de linaje asiático, b) plásmido de ICD ZIKV linealizado mediante PCR inversa en sección de proteínas no estructurales, c) inserción de la proteína verde fluorescente extendida con sitios de reconocimiento de ZIKV en sus porciones 5' y 3' d) proceso de extensión de la proteína verde fluorescente agregando sitios de reconocimiento de la proteasa viral en sus extremos 5' y 3' posteriormente insertada en el plásmido linealizado.

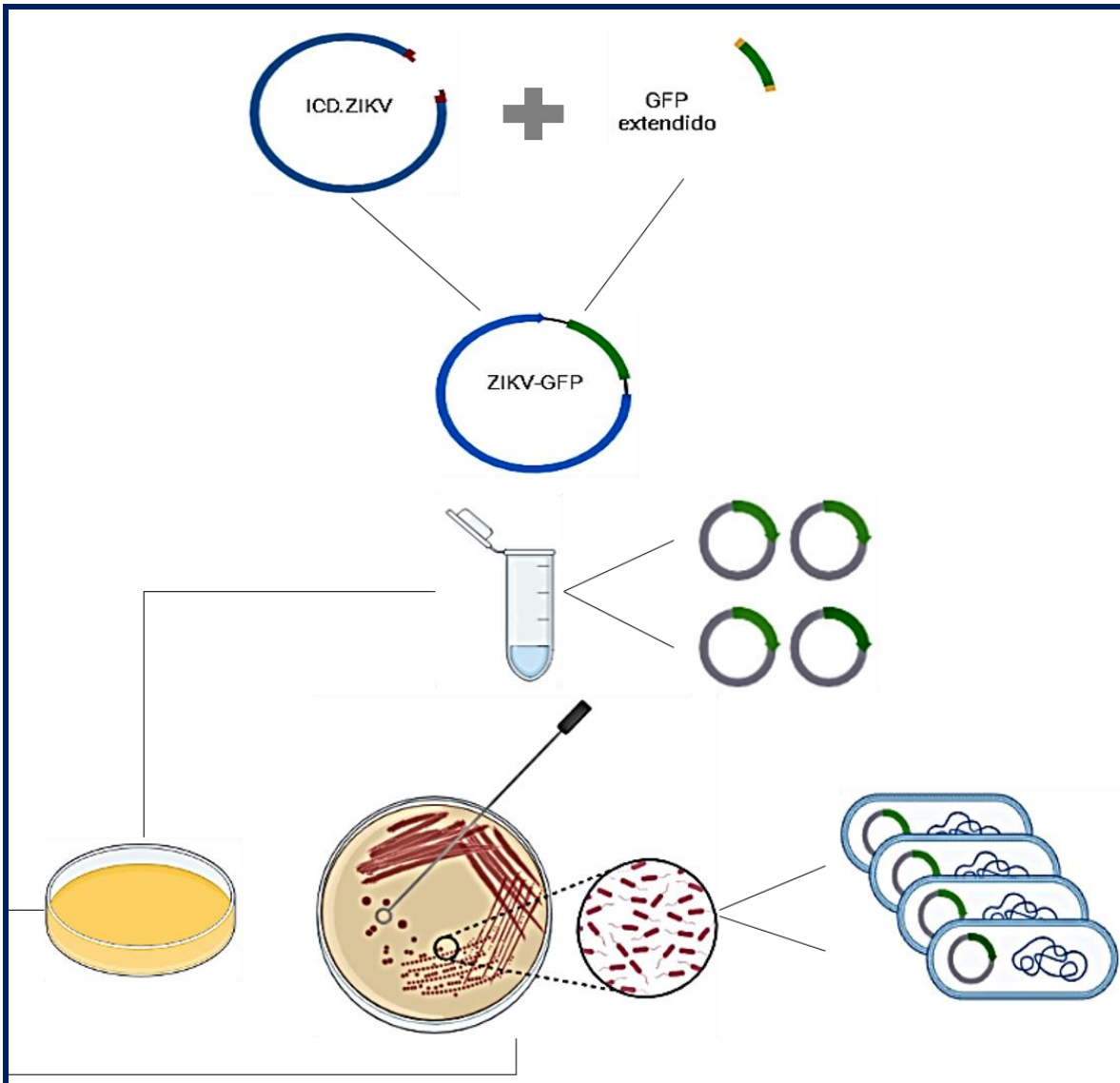


Figura 3: Diagrama de metodología In Fusion para la unión del vector linearizado y fragmento por medio de una enzima recombinasa. Una vez obtenido el nuevo plásmido recombinante se transforma en células competentes (E. Coli) para la producción de más DNA plasmídico. Las bacterias son sembradas en agar con ampicilina, de manera que solo las que crezcan han asimilado el DNA recombinante debido a la porción que le confiere resistencia a este antibiótico.

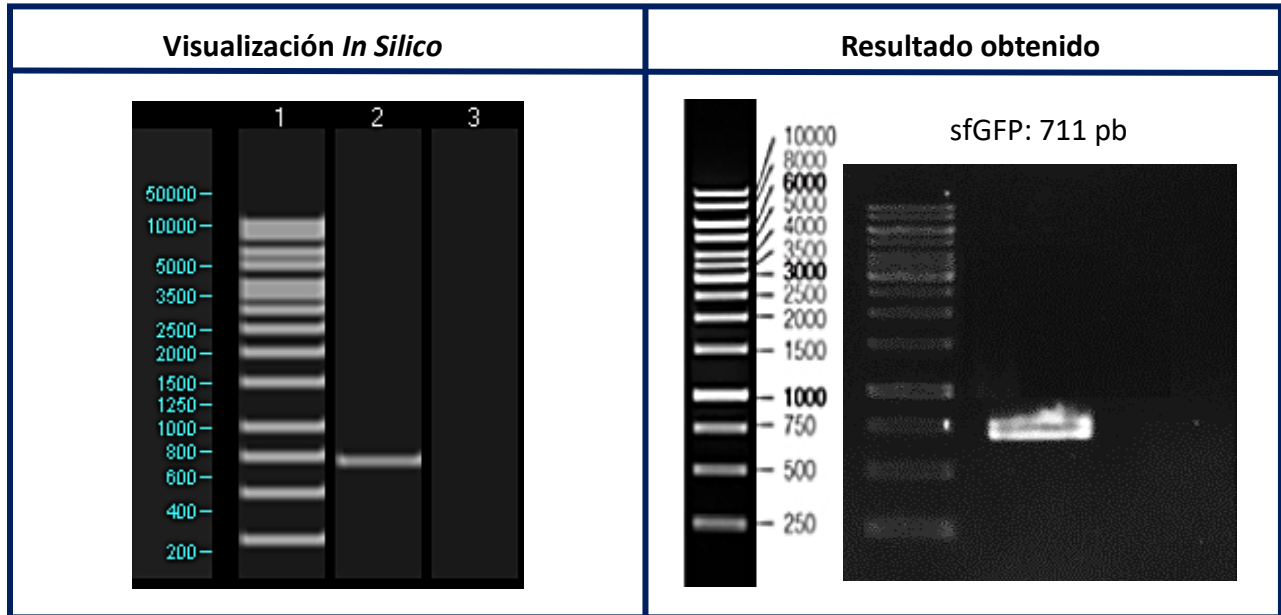


Figura 4. Resultado de la amplificación de la proteína verde fluorescente (sfGFP) que fue utilizada como molde para la posterior extensión con porciones de secuencias no estructurales en los extremos 5' y 3'.

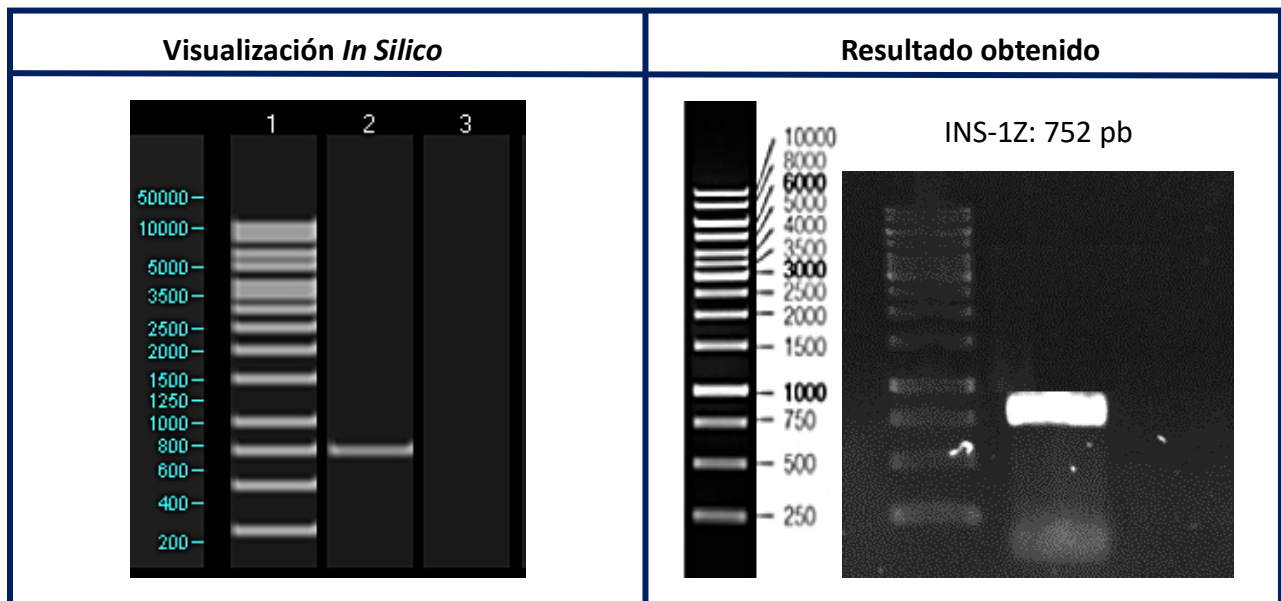


Figura 5. Resultado de la primera extensión de la proteína verde fluorescente (sfGFP) con los sitios de reconocimiento de proteínas no estructurales en extremos 5' y 3' utilizando como molde el producto de PCR anterior.

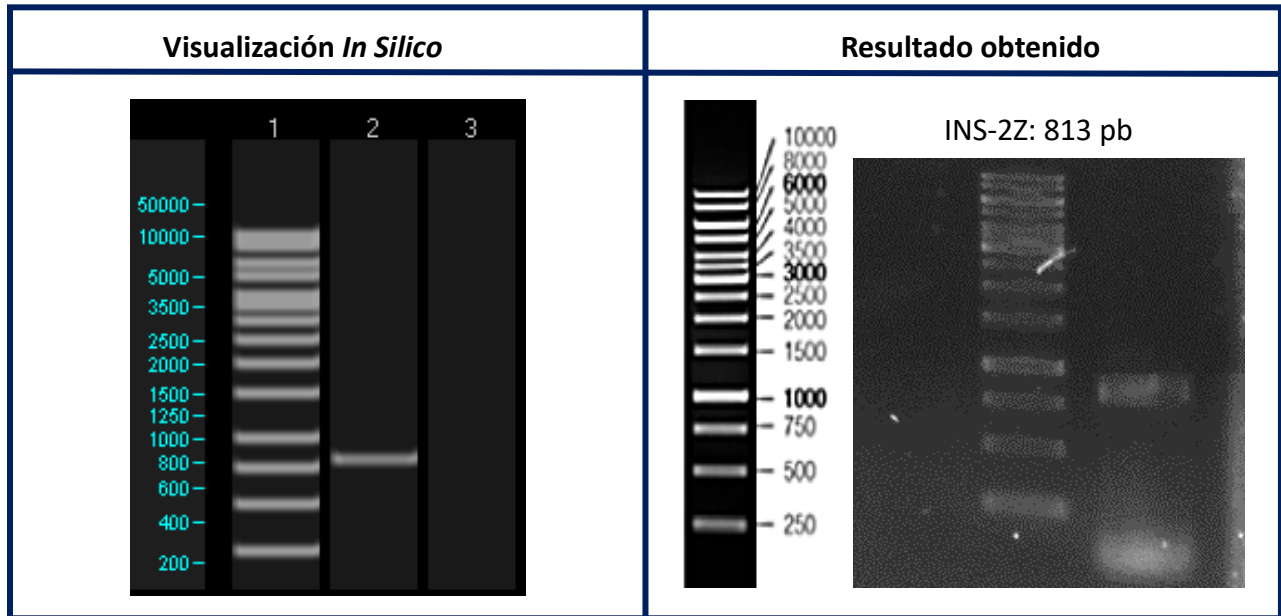


Figura 6. Resultado de la segunda extensión de la proteína verde fluorescente (sfGFP) con los sitios de reconocimiento de proteínas no estructurales en extremos 5' y 3' utilizando como molde el DNA extendido producto de la PCR anterior.

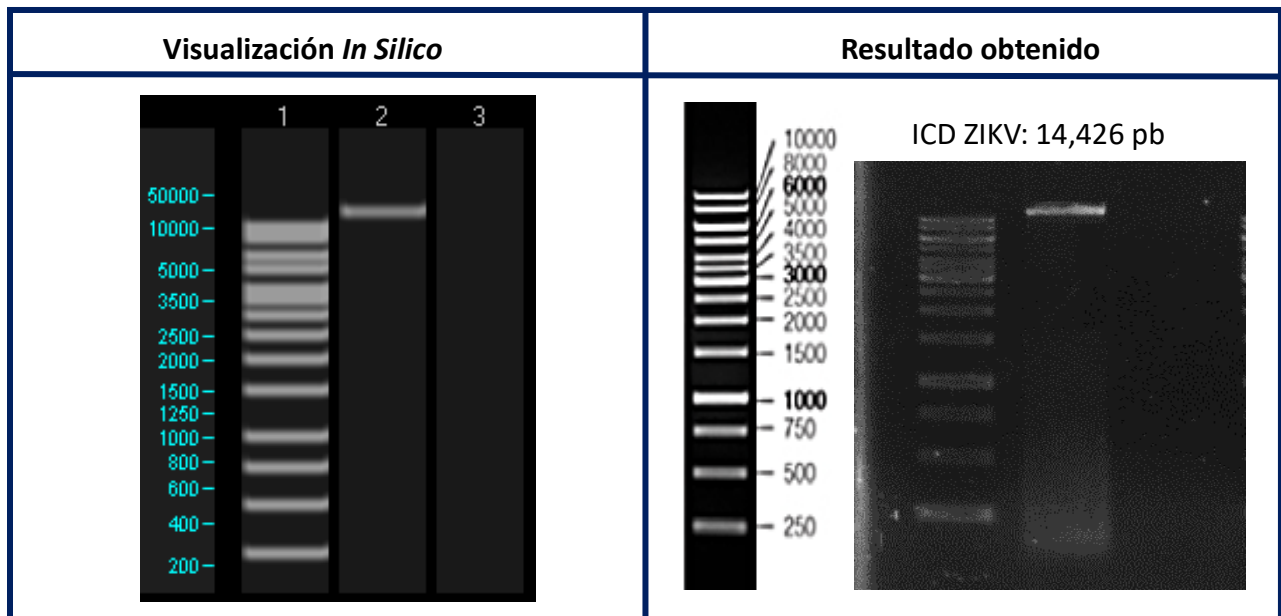


Figura 7. Resultado de la linearización del plásmido ICD ZIKV que fue utilizado como vector para la inserción del gen reportero.

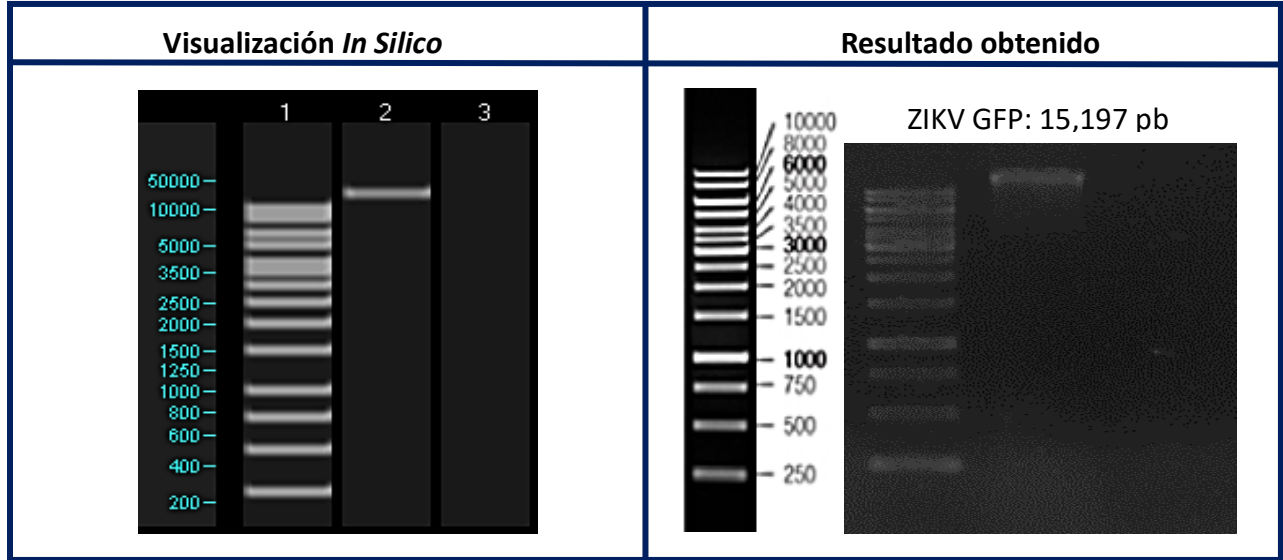


Figura 8. Resultado de clonación al unir el vector linealizado de ICD ZIKV más la amplificación del gen reportero (sfGFP) por medio de la metodología In Fusion

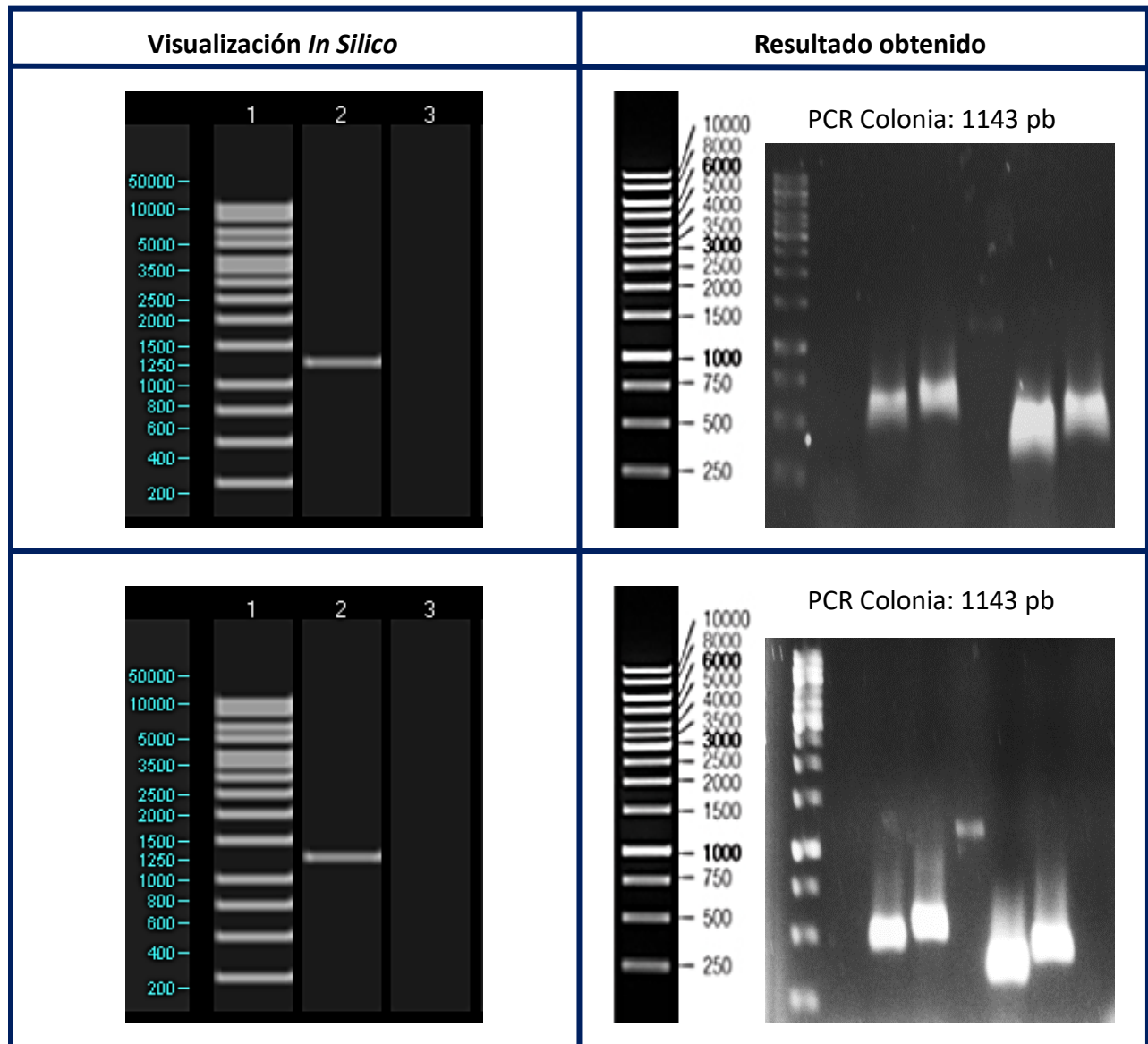


Figura 9. Visualización de colonias que contienen el gen reportero por medio de PCR de colonia. Se observaron dos colonias que amplificaron para el tamaño esperado de aprox 1200 pb.

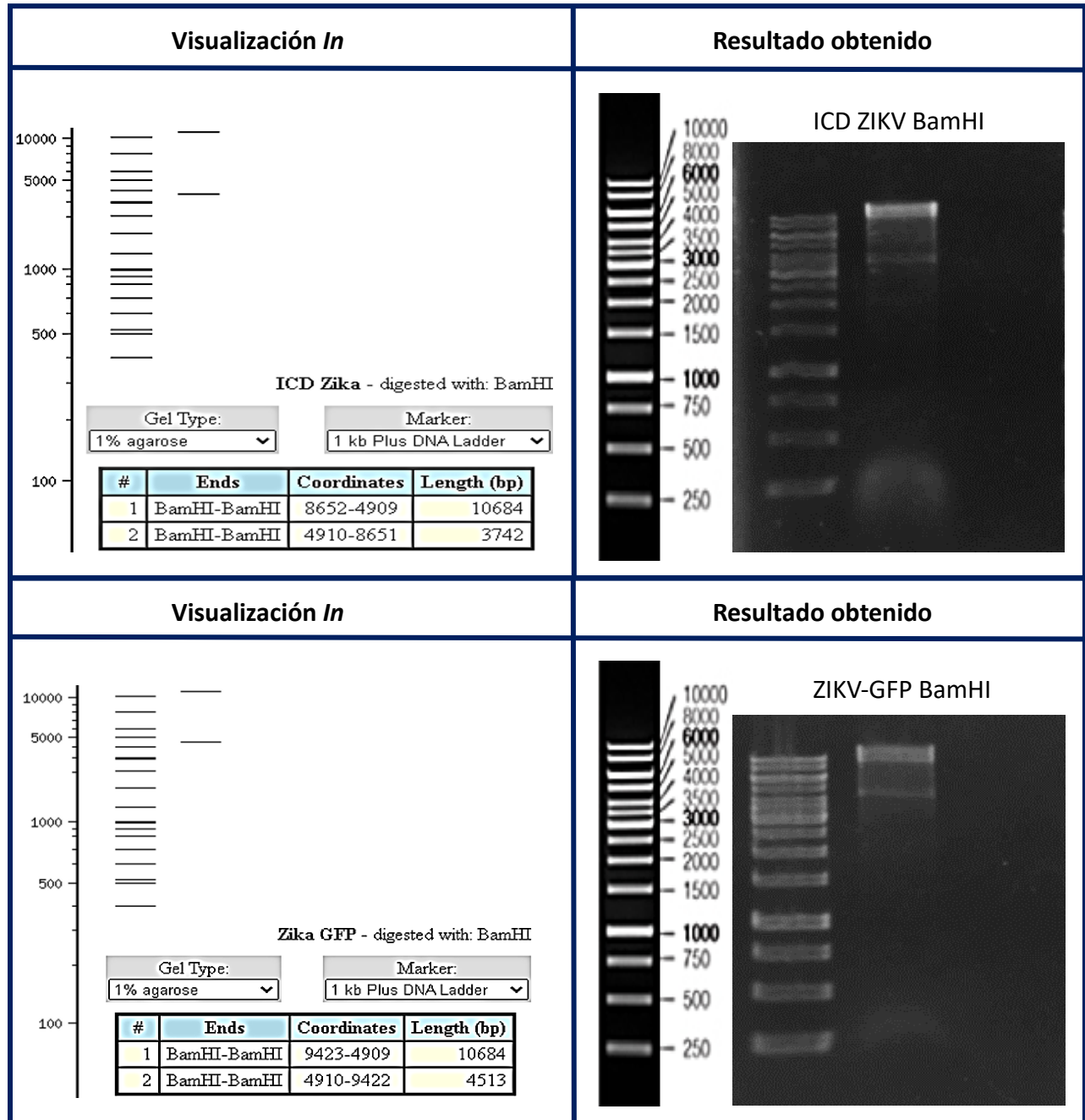


Figura 10. Visualización de la digestión por medio de la enzima de restricción BamHI. Se analizó el plasmido no linearizado de ICD ZIKV para comparar el tamaño de las 2 bandas generadas. La digestión In Silico se realizó por medio del software NEBcutter v2.0.



Figura 11 a) Electroferograma obtenido por medio de secuenciación Sanger del laboratorio nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental (IPICYT), b) análisis de la secuencia fasta por medio de la herramienta Blast, c) comparación de la secuencia de GFP con la base de datos del instituto de salud de los Estados Unidos

Transfección de ZIKV GFP 1 μ g DNA

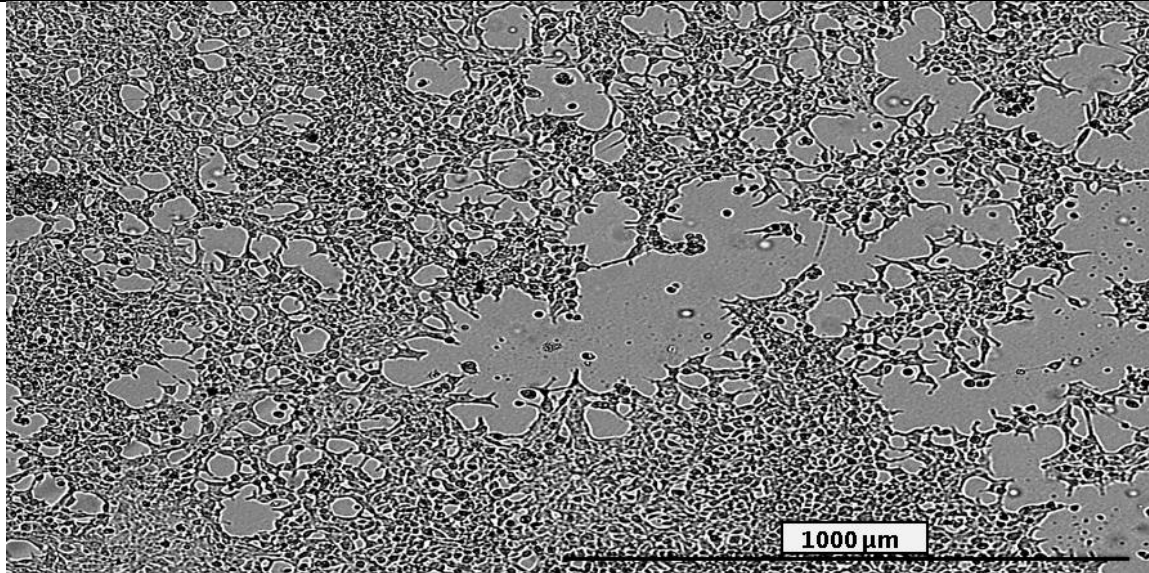


Imagen en aumento 4X a las 48 Horas posterior a la transfección

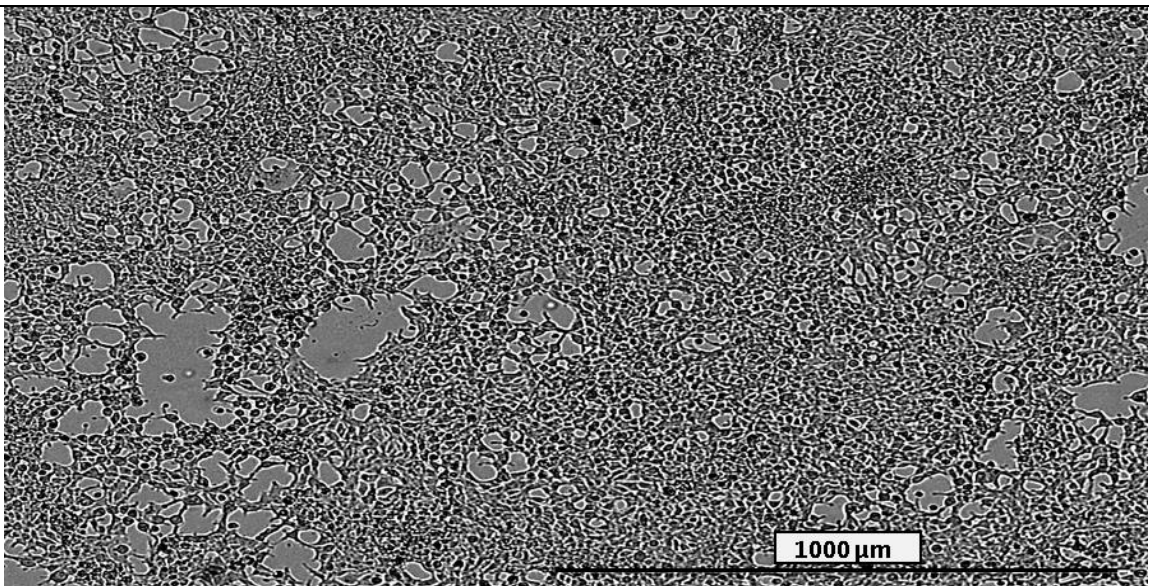


Imagen en aumento 4X a las 72 horas posterior a la transfección

Figura 12. Visualización de las células HEK293T entre las 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el virus recombinante que contiene el gen reportero, observándose una gran proliferación celular.

Transfección de ICD ZIKV 1 μ g DNA

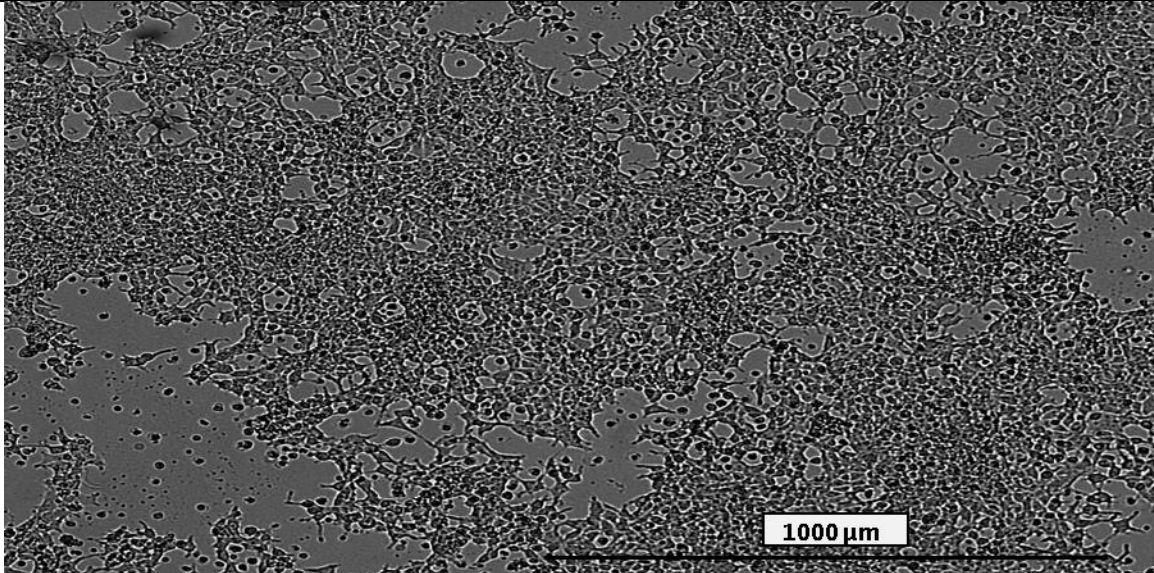


Imagen en aumento 4X a las 48 Horas posterior a la transfección

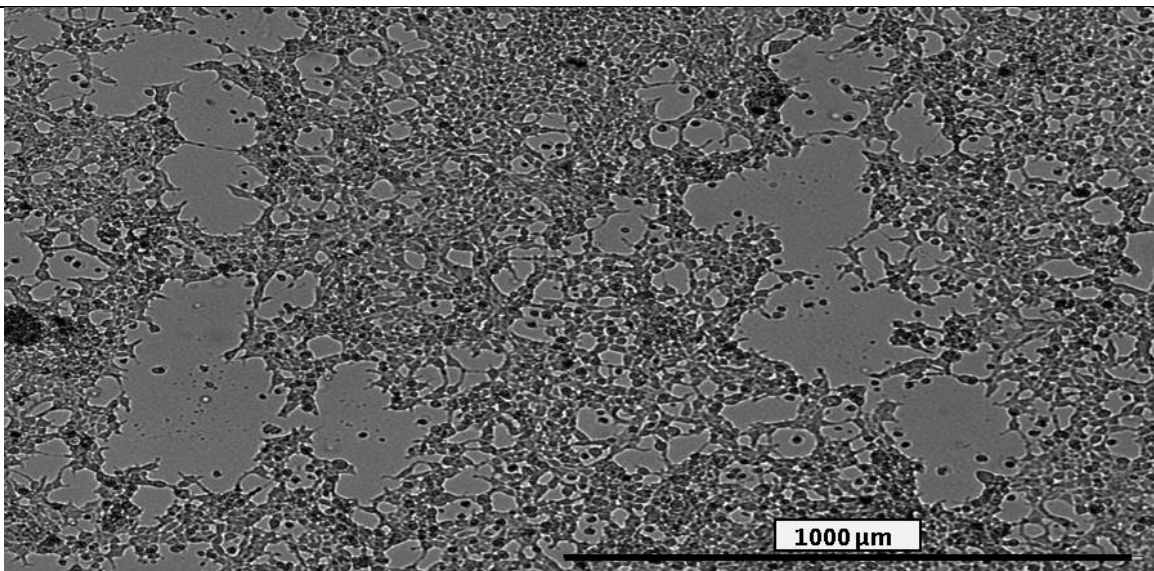
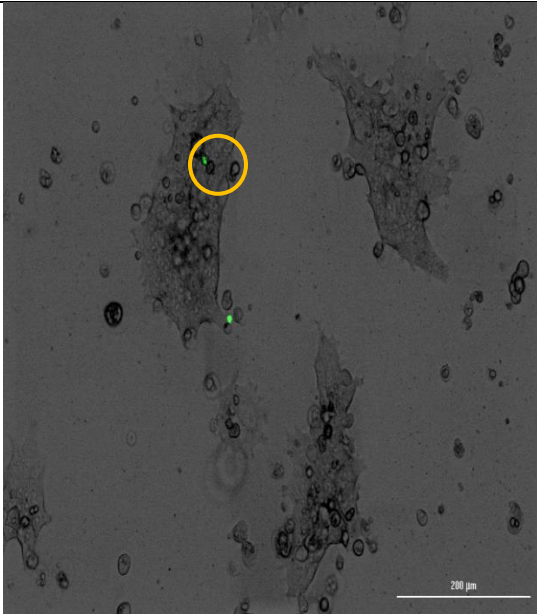


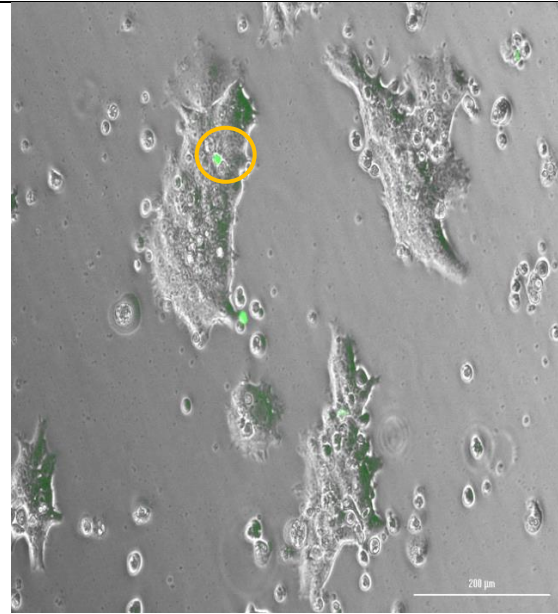
Imagen en aumento 4X a las 72 horas posterior a la transfección

Figura 13. Visualización de las células HEK293T entre las 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el virus control de Zika sin mutar, observándose una disminución de la población celular.

Transfección de ZIKV GFP 1 μ g DNA a las 72 horas



Visualización extrapolando campo claro y campo para GFP. Imagen en aumento 10X.



Visualización en campo claro. Imagen en aumento 10X.

Figura 14. Visualización del gen reportero GFP dentro de células HEK293T a las 72 horas posteriores a la transfección con el virus recombinante.



9. Tablas

| Proteína no estructural | Función descrita |
|-------------------------|---|
| NS1 | Involucrada en el ensamblaje y replicación viral. Interviene en la inhibición de la respuesta inmune del hospedero al bloquear la activación de interferón. |
| NS2A | Involucrada en el ensamblaje y replicación viral. |
| NS2B | Función de cofactor de la proteasa viral. |
| NS3 | Tiene 2 funciones enzimáticas: RNA helicasa y proteasa viral, junto a NS2B lleva a cabo los cortes del polipéptido recién traducido. |
| NS4A | Regula la actividad helicasa de NS3. Bloquea el receptor MDA5 inhibiendo la respuesta de Interferón Tipo 1 del hospedero. |
| Péptido 2K | Funciona como señal para la actividad inhibitoria de interferón para NS4B. |
| NS4B | Induce la formación de vesículas formadas a partir de retículo endoplásmico. Inhibe la formación de Interferón beta. |
| NS5 | RNA polimerasa RNA dependiente. |

Tabla 1. Descripción de las funciones que tienen cada una de las proteínas no estructurales del ZIKV. Principalmente involucradas en la replicación viral y la inhibición de la respuesta inmune antivírica del hospedero mediada vía Interferón por medio del bloqueo en la cascada de señalización de cinasas. Estas proteínas regulan la actividad de mismas proteínas no estructurales como el caso de NS2B, 2K y NS4A (Sirohi & Kuhn, 2017).



| Sitios de corte de ZIKV | Secuencia de reconocimiento de aminoácidos | Posición |
|-------------------------|--|-----------|
| C/Ci | INARK <u>ERKRR</u> GADTSIGIIG | 104-105 |
| Ci/pr | IGLLL <u>TTAMA</u> AEITRRGSAY | 122-123 |
| pr/M | KKGEA <u>RRSR</u> AVTLPSHSTR | 215-216 |
| M/E | MILLI <u>APAYS</u> IRCIGVSNRD | 290-291 |
| E/NS1 | MIFLST <u>TAVSA</u> DVGCSVDFSK | 790-791 |
| NS1/NS2a | SNLVR <u>SMVTA</u> GSTDHMDHFS | 1142-1143 |
| NS2a/NS2b | LLLL <u>TRSGKR</u> SWPPSEVLTA | 1368-1369 |
| NS2b/NS3 | FAAGA*WYVYV <u>KTGKR</u> SGALWDVPAP | 1498-1499 |
| NS3/NS4a | SFKEF <u>AAGKR</u> GAALGVMEAL | 2115-2116 |
| NS4a/2k | VLIPE <u>PEKQR</u> SPQDNQMAII | 2242-2243 |
| 2k/NS4b | AVGLL <u>GLITA</u> NELGWLERTK | 2265-2266 |
| NS4b/NS5 | TRNAG <u>LVKRR</u> GGGTGETLGE | 2516-2517 |

Tabla 2. Secuencias de reconocimiento de aminoácidos por parte de la proteasa viral NS3. En negrita y subrayado se remarca la sección que es reconocida por parte de la proteasa para realizar el corte entre estas regiones y generar 2 proteínas separadas y con funciones específicas. Esta tabla se realizó a partir del trabajo publicado por (Sun et al., 2017).

Diapositivas

Generación y caracterización de un clon infeccioso del virus de Zika que contenga un gen reportero fluorescente

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas

Seminario de defensa de tesis de maestría
Para obtener el grado de maestría en ciencias biomédicas básicas
Presente: LCyS. Alan Araujo Mireles

Co-Director de tesis: Dr. Mauricio Comas García
Co-directora de tesis: Dra. Claudia Castillo Martín del Campo
Asesora: Dra. Adriana Elizabeth Monsiváis Urenda

ANTECEDENTES

- > 80% asintomáticos
- Manifestaciones clínicas: cuadros febriles, cefalea, sensación de cansancio y dolor articular
- Microcefalia
- Fiebre hemorrágica
- Síndrome de Guillain-Barré

Infección por picadura de mosquito

- Células susceptibles a infección: epiteliales, células dendríticas en el sitio de la picadura
- Entrada del virus a células del hospedero vía endocitosis mediada por clatrina
- Fusión de proteína E con la célula permissiva
- Proteínas estructurales se unen a RE y comienza la replicación viral

Isard et al., 2016

ENFERMEDADES ASOCIADAS

Infeción

Apoptosis

Autoinmunidad

Activación respuesta inmune

Referencia: Kise L, Giburd E, Shovman, 2019; Lee J, et al, 2021; Homan et al, 2022

EPIDEMIOLOGÍA

Mapa elaborado a partir de los datos epidemiológicos actualizados de la OMS 2022. Realizado en MapChart.net

EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

Mapa elaborado a partir de los datos reportados por la dirección general de epidemiología y de la comisión estatal de protección contra riesgos sanitarios. Secretaría de Salud 2022. Realizado en MapChart.net

- Nuevo León: > 980 casos, > 670 casos mujeres
- Yucatán: > 1025 casos, > 900 casos mujeres
- Veracruz: > 2116 casos, > 998 casos mujeres
- Chiapas: > 300 casos, > 260 casos mujeres
- Quintana Roo: > 988 casos, > 482 casos mujeres

ESTRATEGIAS DE VIGILANCIA Y PREVENCIÓN

- Jornadas de saneamiento
- Operación sanitaria: Fumigación para el control de vectores
- Capacitaciones, mantenimiento y limpieza de áreas
- JURISDICCIONES SANITARIAS
- Programas de monitoreo y saneamiento

Acciones y programas de la dirección general de epidemiología y de la comisión estatal de protección contra riesgos sanitarios. Secretaría de Salud 2022.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL ZIKV

Traducción del RNA viral

10.8 kBP

5' ORF 3'-OH

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| C | pr | M | E | NS1 | NS2A | NS2B | NS3 | NS4A | 2K | NS4B | NS5 |
| Transmembrana de ERG | Transmembrana viral | Mitocondrio y citosol | Transmembrana viral | Modificación de proteínas | Transmembrana viral | Citocinas | Proteasa viral | Regulador de actividad viral | Substrato de respuesta inmune | Promotor de replicación de ER | RNA polimerasa viral dependiente |

Sun et al., 2017
Scriba & Talar, 2017

SEÑALIZACIÓN CELULAR

Activación de la respuesta inmune

Inhibición de la respuesta inmune

Wu, Y., et al 2017 & Lee LJ, et al 2021

GENES REPORTEROS

GFP (Green Fluorescent Protein)

Reacción de oxidación: D-Luciferina es oxidada a Oxiluciferina, este producto es capaz de emitir luz y ser así cuantificado.

Green MR, Sambrook J, 2016

ANTECEDENTES DE INSERCIÓN

Construcción de JEV cDNA

Amplificación

Ligación

Tian et al., 2009

ANTECEDENTES DE INSERCIÓN

ZIKV línea africana

Proceso de elaboración del plásmido

Sitios con homología posteriormente ligados

Inserción de GFP en proteína C unido a factor de proteasa 2A

Caldas et al., 2016

ANTECEDENTES DE INSERCIÓN

Referencia GenBank Zika de línea africana

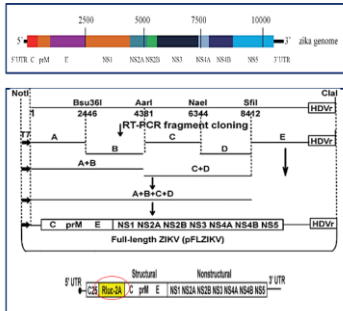
Construcción mediante restricción/ligación

Inserción de eGFP dentro de NS1 unido a factor 2A

Cao et al., 2020



ANTECEDENTES DE INSERCIÓN



Referencia GenBank Zika de linaje asiático

Construcción mediante restricción/ligación

Inserción de Luciferasa+factor 2° en proteína C

Zhan et al., 2016



14



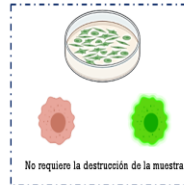
JUSTIFICACIÓN



Método cuantitativo y cualitativo para la detección del virus en células infectadas



Permite la visualización, análisis en tiempo real del ciclo infeccioso



No requiere la destrucción de la muestra

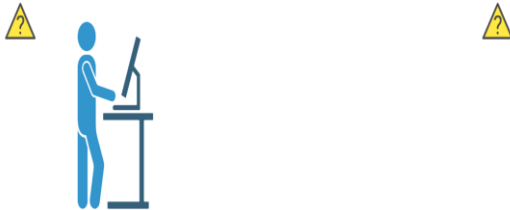


15



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede un virus mutado del Zika que expresa un gen reportero tener la misma infectividad que el virus silvestre?



16



OBJETIVOS

General

Insertar un gen reportero fluorescente (sfGFP) en el genoma del virus del Zika sin alterar la secuencia de las proteínas virales

Específicos

Modificar el genoma del Zika para la inserción de un gen reportero

Comparar la infectividad del clon infeccioso que contenga el sfGFP con respecto al virus silvestre

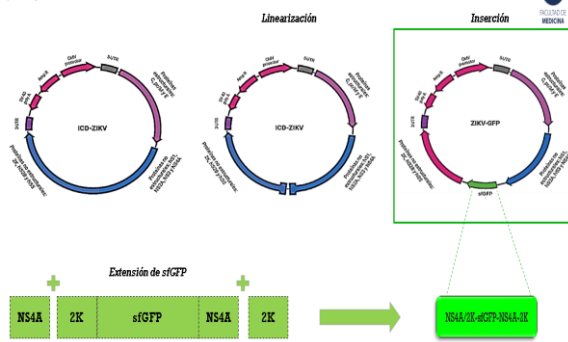
Comparar la eficiencia de producción de partículas virales del clon infeccioso con respecto al virus silvestre



17



MARCO METODOLÓGICO



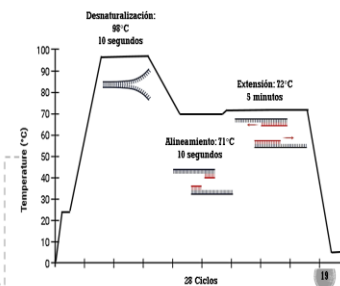
18



APERTURA DEL PLÁSMIDO



| Reactivo | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| NFWH ₂ O | 18.9 µl |
| 5x Buffer SuperFi | 5.0 µl |
| 10 mM dNTP's | 0.5 µl |
| 10 uM FP- Zikv-Open | 1.25 µl |
| 10 uM RP- Zikv-Open | 1.25 µl |
| 10 ng/ul DNA molde (ICD-ZIKV) | 1.0 µl |
| SuperFi DNA polimerasa | 0.1 µl |



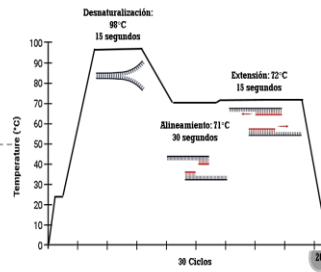
19



AMPLIFICACIÓN DE GFP



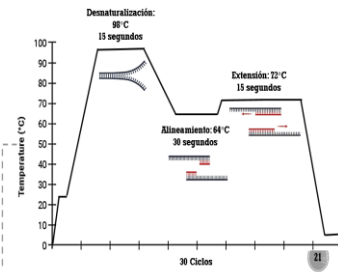
| Reactivo | Volumen |
|---------------------------|---------|
| NFWH ₂ O | 10.4 µl |
| 5x Buffer Phusion HF | 4.0 µl |
| 10 mM dNTP's | 0.4 µl |
| 10 uM FP- sGFP | 2.0 µl |
| 10 uM RP- sGFP | 2.0 µl |
| 10 ng/ul DNA molde (sGFP) | 1.0 µl |
| DNA pol II | 0.2 µl |



PRIMERA EXTENSIÓN DE GFP



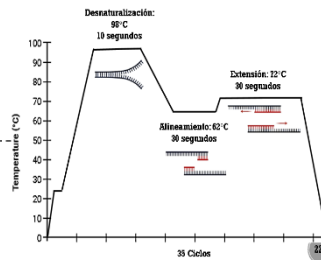
| Reactivo | Volumen |
|---------------------------|---------|
| NFWH ₂ O | 10.4 µl |
| 5x Buffer Phusion GC | 4.0 µl |
| 10 mM dNTP's | 0.4 µl |
| 10 uM FP- ZIKV-INS-1Z-V2 | 2.0 µl |
| 10 uM RP- ZIKV-INS-1Z-V2 | 2.0 µl |
| 10 ng/ul DNA molde (sGFP) | 1.0 µl |
| DNA pol II | 0.2 µl |



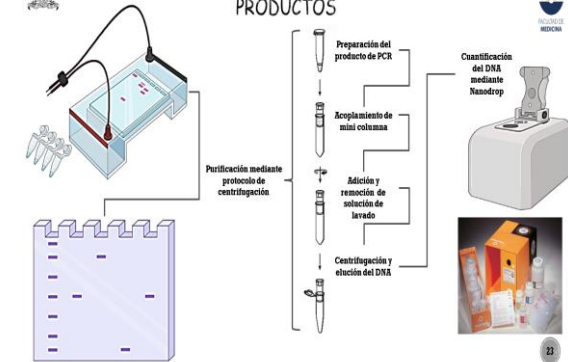
SEGUNDA EXTENSIÓN DE GFP



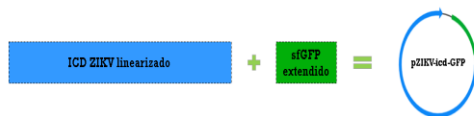
| Reactivo | Volumen |
|---------------------------------|---------|
| NFWH ₂ O | 9.35 µl |
| 5x Buffer Phusion HF | 4.0 µl |
| 10 mM dNTP's | 0.4 µl |
| 10 uM FP- ZIKV-INS-2Z-V2 | 2.0 µl |
| 10 uM RP- ZIKV-INS-2Z-V2 | 2.0 µl |
| 10 ng/ul DNA molde (ZIKV-INS-1) | 1.25 µl |
| DMSO (4% RXN) | 0.8 µl |
| DNA pol II | 0.2 µl |



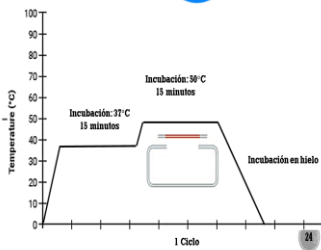
COMPROBACIÓN Y PURIFICACIÓN PRODUCTOS



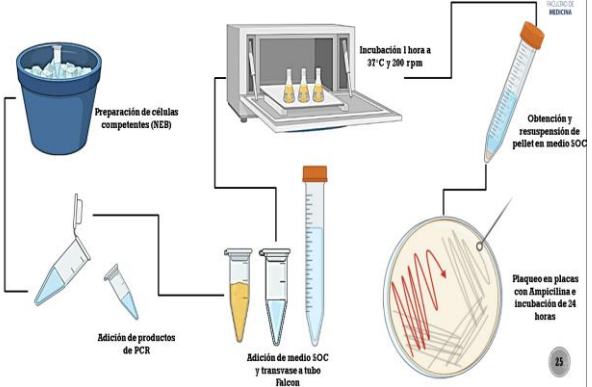
CLONACIÓN POR IN FUSION



| Reactivo | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| Agua libre de nucleasas (NFW) | 4.64 µl |
| Vector linearizado | 1.36 µl |
| Fragmento | 2.0 µl |
| Solución Enhancer | 2.0 µl |
| Enzima recombinasa Premix HD | 2.0 µl |



TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS COMPETENTES



OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MINIPREPS)

Crecimiento de colonias con el plásmido generado

Picado de colonias para su incubación

Lisis celular, lavado y precipitación del DNA plasmídico

COMPROBACIÓN DNA PLASMÍDICO

Selección de colonias

Amplificación del repertorio

Visualización del producto

PCR DE COLONIA

Amplificación del repertorio con porciones de las proteínas adyacentes NS4A y NS4B

| Reactivo | Volumen |
|----------------------------|---------|
| NFWH ₂ O | 7.75 µl |
| Dream Taq DNA buffer | 1.0 µl |
| 10 mM dNTP's | 0.2 µl |
| 10 nM FP- ZIKV-NS-22-V2 | 0.5 µl |
| 10 nM RP- ZIKV-NS-22-V2 | 0.5 µl |
| DNA molde (colonia picada) | --- |
| Dream Taq DNA pol | 0.1 µl |

Denaturalización: 95°C 15 segundos

Extensión: 72°C 30 segundos

Alisamiento: 72°C 30 segundos

30 Ciclos

DIGESTIÓN CON ENZIMA BAMHI

| Reactivo | Volumen |
|-----------------------------|----------------|
| NFWH ₂ O | Aforar a 20 µl |
| Buffer NEB CutSmart | 1.0 µl |
| DNA molde (1 µg) | --- |
| Enzima de restricción BamHI | 0.2 µl |

Reconocimiento del sitio de corte

Escisión

Corte

Incubación: 37°C 2 horas

SECUENCIACIÓN SANGER

Selección de productos

Análisis por LAMBDA del IPCTT

Limpieza y dilución de productos

TRANSFECCIÓN

Células HEK-293T mantenidas en DMEM con 5% de CO₂ a 37°C

Tripsina IX, centrifugación a 1800 RPM - 5 minutos

Conteo y siembra de 300,000 células por pozo

Transfección mediada por lipofectamina

| Condiciones | 1 | 2 | 3 |
|-------------|---------------|---------------------|---------------------|
| A | Grupo control | ICD-ZIKV 0.8 µg DNA | ICD-ZIKV 1.0 µg DNA |
| B | Grupo control | ZIKV-GFP 0.8 µg DNA | ZIKV-GFP 1.0 µg DNA |

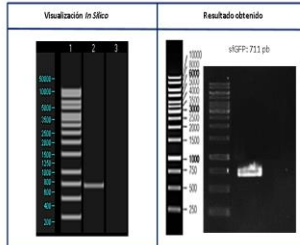


Resultados

Biología molecular y cultivo celular



AMPLIFICACIÓN DE GFP



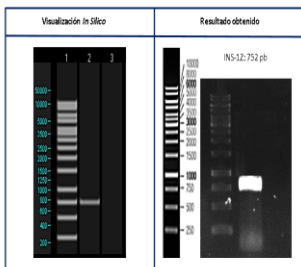
Resultado de la amplificación de la proteína verde fluorescente (sGFP) que fue utilizada como molde para la posterior extensión con porciones de secuencias no estructurales en los extremos 5 y 3.



33



PRIMERA EXTENSIÓN DE GFP



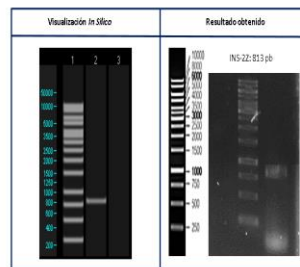
Resultado de la primera extensión de sGFP con los sitios de reconocimiento de proteínas no estructurales en extremos 5 y 3 utilizando como molde el producto de PCR anterior a 10 ng/µl



34



SEGUNDA EXTENSIÓN DE GFP



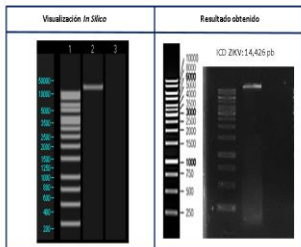
Segunda extensión de la proteína verde fluorescente (sGFP) con los sitios de reconocimiento de proteínas no estructurales en extremos 5 y 3 utilizando como molde la primera extensión de sGFP



35



LINEARIZACIÓN DE ICD ZIKV



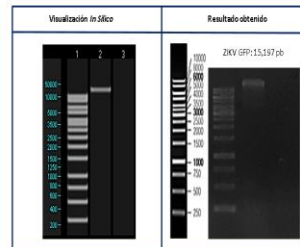
Resultado de la linealización del plásmido ICD ZIKV que fue utilizado como vector para la inserción del gen reportero.



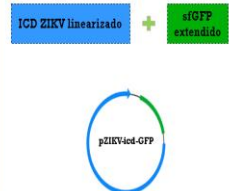
38



CLONACIÓN DE INFUSION



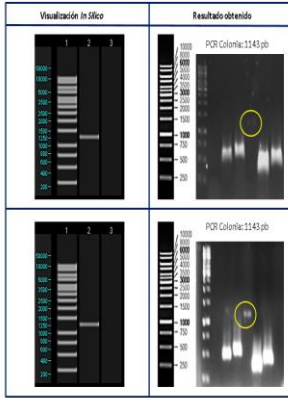
Resultado de clonación al usar el vector linealizado de ICD ZIKV más la amplificación del gen reportero (sGFP) por medio de la metodología In Fusión



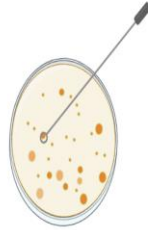
37



COMPROBACIÓN DE PRODUCTO MEDIANTE PCR DE COLONIA



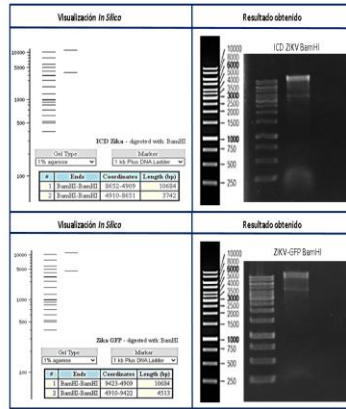
Visualización de colonias positivas a sGFP por medio de PCR de colonia. Se observaron dos colonias que amplificaron para el tamaño esperado de aprox 1100 pb.



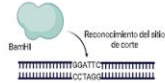
38



COMPROBACIÓN DE PRODUCTO MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN



Visualización de la digestión por medio de BamHI. Se analizó el plásmido no linealizado de ICD ZIKV y ZIKV GFP. La digestión in Sílico se realizó por medio del software NEBuilder v2.8.



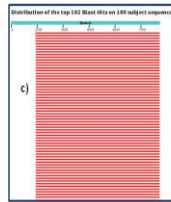
38



COMPROBACIÓN DE PRODUCTO MEDIANTE SECUENCIACIÓN SANGER



Electroferograma obtenido



c)

Comparación de nuestra secuencia con la base de datos

40



TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK 293T

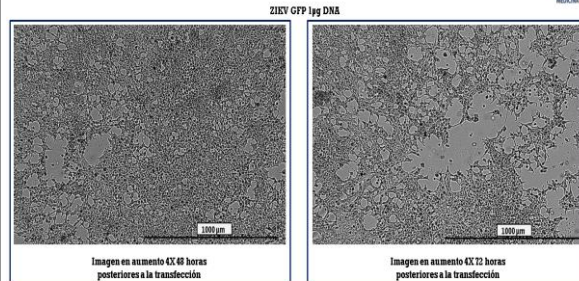


Imagen en aumento 4X 48 horas posteriores a la transfección

Imagen en aumento 4X 72 horas posteriores a la transfección

41



TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK 293T

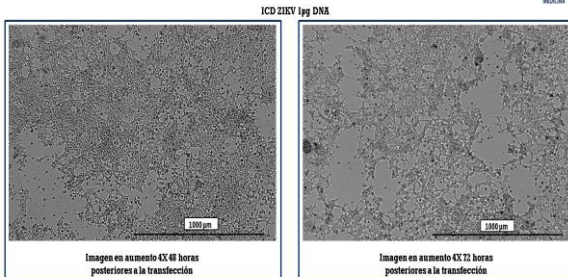


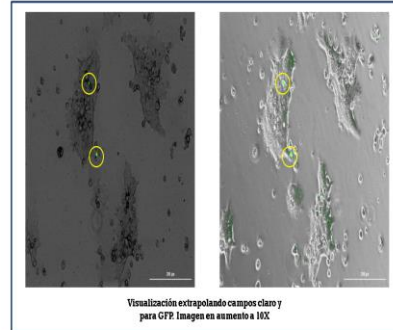
Imagen en aumento 4X 48 horas posteriores a la transfección

Imagen en aumento 4X 72 horas posteriores a la transfección

42



TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK 293T



Visualización extrapolando campos claro y para GFP. Imagen en aumento a 10X

43



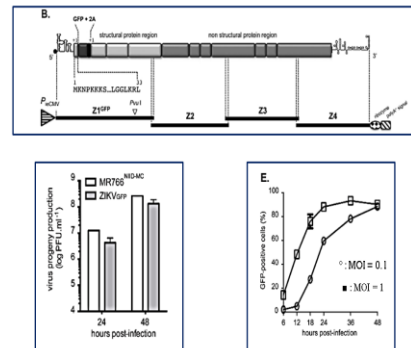
DISCUSIÓN



41



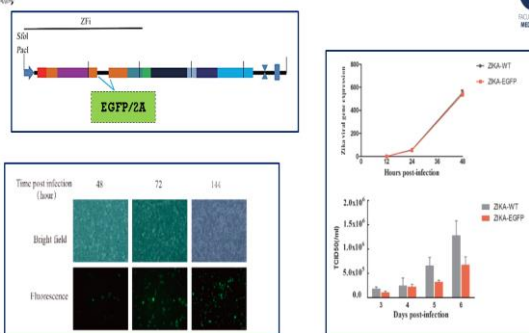
DISCUSIÓN



42



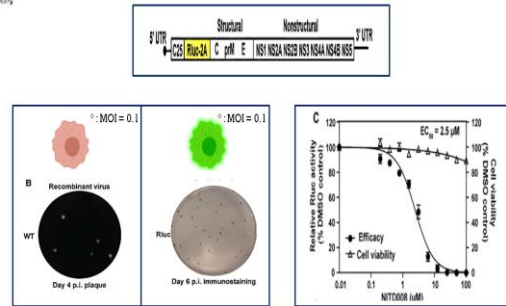
DISCUSIÓN



43



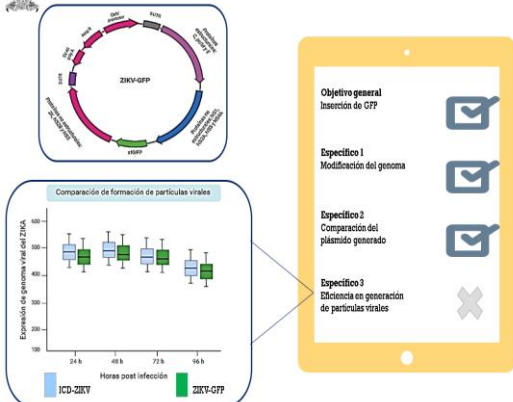
DISCUSIÓN



44



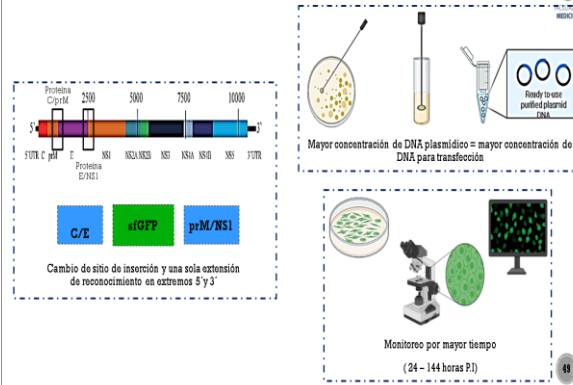
CONCLUSIONES



45



CONCLUSIONES



46