



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización de anticuerpos monoclonales específicos para la
proteína NEP del virus influenza A**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
DIANA CLAUDIA HERNÁNDEZ DE JESÚS**

**DIRECTOR:
DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2021

Cuernavaca, Morelos a 26 de marzo de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **HERNÁNDEZ DE JESÚS DIANA CLAUDIA**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA LA PROTEÍNA NEP DEL VIRUS INFLUENZA A.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: BIOL. PATRICIA ESCOBAR CASTAÑEDA

SECRETARIO: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

VOCAL: DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

SUPLENTE: M. EN C. PEDRO ROMERO GUIDO

SUPLENTE: DRA. DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2021-03-26 17:05:02 | Firmante

emQaYXLh4Yf44IndAJig8Gwyfi8qpKRDglX7WC17uYJVbdAR+wScxblrg4XZ9Q2oWwhfE9oN5ArzF1Iu9yIn0CVHwbCMU5wZb6aC4R5GEk2JEIPI3byiiJMfa66PUSANL6OI0p7je hDgp/sBjwZ5kSYAJ4a1im21WV4T46B9D7s1S6ibkzSlrFg1P+sd1fJJoAz3vNVK0JkEZAMPYp6+T45tRuENBGBI7vWll5dvJ7bwo4/PBQdn3MzAECLuCXOUExhulKQD+WDO6Lo YrwScd194I9oQcpJY9rM7uED7vBlD8NjFB+gQ9A+Ve+mD8q+KOYB97EWD98nH+JfOuHyw==

PATRICIA ESCOBAR CASTAÑEDA | Fecha:2021-03-30 14:06:55 | Firmante

BXMKhrw6H9piq2WZSFuKRDIJMaxJOMB/PbAnAi0nizGP4Yk7CfyNTbnzxFI34YTsmTv1+6A5v2cU9wKi+Yt66IzWm+JSr6t7Lu7eJkuPjMzTLbWxsiod5rC8YUCZUCLFPnugPxH18 JTg+d3kQSBKLI2IOrp3RVp/qzpvmlbC9gKxc4D22aXdtzoYSq/POE7oZ0sAgxZsiOVp7JA+C5TnJrjphmt+y8od74ST1MAAmNyZZk3EvsR+QQY8vqxi/tFJ37KfW3pt8sl66cUdWQo nbWueP8T+t2Sp/efZfyBySckrB0gJXz2amQFnQT01hkmCk3WJVRI0Ih0excZag==

PEDRO ROMERO GUIDO | Fecha:2021-04-11 00:00:03 | Firmante

armsHfIEAo0BkmVe8zTAK4Mt9NhJZZCHI3xOboWuxvw+TChskcks53RraEgZMJRBHHS//rVMbf7zduby/7b4evN/IRoPKWKQGTsQKcNZUilibPjaTHlgNkUQ7rwQv2V6i41F3jzfoF QueNUF3GFurSe1W/qJqoMuVqc6ENy9iHK3v5J0ge6xl2hni6CFRUIldP9NI+7kdjKcLpnRaBKaPy5IvKUED6q3BoL4A0EmKMlplAzeTTJdGiD3neegKtimSeTOARqL9K6n+vwGgLV 7er0G5PB/JG9zdy79xFjdroUBecVBck3Pt7zXOjR1dkzyooOHO1DNXHkg6KeY3VauSg==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2021-04-12 09:32:38 | Firmante

BNYx5+U/Ai/bFngMUQ0NZ+YaVtGIP4AS4t47SiJixRV62PMFFaGBbO7agbXCHXKUYMH1dX28DPoX1XlpmxTFFtnSnyFL5/f8NKBw7PvCg5ODBSFAXATextHo1xFxwEsmM0fZ fBgKfCef2I2NOOcmDXta8WTxoeJmGxrwW5IV2QMhFygpbj91DAnO+kVGO3QuheSf6XstkLIVEs5VMGHO7bwvejRgiUn2Jze3LhBI6OLu4L9uMByIR27zrJNStCxt/okgmvgjxmE Ri+1dVwmYldNL2Og1zhUZyHgTXZqwa0BZpoCw+Bwiy+1gmJ3YyPVxlVwo3Mm0b4TGr2BwpcA==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2021-04-14 11:18:50 | Firmante

MBTqbrMErRU+dVqpRdOyNTzNdXT2rcppVnjd2tBydAH2KzKBLIIAwXw/kpRvgBP04yrsawQppTyeaafJ2lBTKxsFi2NBVB98bgqOeEv7r8qI5HuGiLPXaIEBi9PH0WloswWP8aN3 Mizd0kxlnreMdO3TMT3DO4st7Naw5SMc7kIMZfwfZbLkgPtZjZQB6CaJHRIREwM/CR0VRdwMQb15zAjaQkCN7Nn1ttDKm+g4bI9UhbLnfNf6xhq6OfDZOQFM+Xz2CBlvBbx02 OBvhqrQsBMRHMOGNHlmq2EeFVHW9SSvrTx1mRQwkeA8U+6EfuT/eBCeM4Uf+0qp56/MISA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UGh8qX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WUk5AKmubsjXgwrA5c8L2nywUMr1hQFV>



El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama, por permitirme trabajar en este proyecto dentro de su laboratorio, por su apoyo, por sus acertados consejos, por sus observaciones oportunas que hicieron de este trabajo un trabajo de calidad, y principalmente por brindarme sus conocimientos.

A los integrantes de mi comité evaluador durante la elaboración de la tesis, a la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, a la Dra. Gabriela Rosas Salgado, a la Biol. Patricia Escobar Castañeda, a la M. en C. Josefina Benítez Salgado y al M. en C. Pedro Romero Guido, por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas a este trabajo.

Al M. en C. Juan Carlos Villegas García, auxiliar de laboratorio, por el soporte que da en el laboratorio, y por tener la disponibilidad de ayudar.

A mis compañeras de laboratorio Alicia, Omar, Emmanuel y Cristian, por su apoyo, por compartir sus conocimientos conmigo y por regalarme momentos divertidos.

Mi logro personal no es solo obtener un grado, sino haber encontrado a grandes amigas. Gracias Cinthya, Vianey, Brenda, Dalia, Kristal, Daniela, Paola y Kenia, por haber compartido grandes momentos dentro y fuera de la facultad, por el conocimiento compartido, por los trabajos en equipo. Además gracias por regalarme risas y muchas aventuras.

Finalmente, hago el agradecimiento más extensivo a mi familia, quienes depositaron su entera confianza en mí, que siempre estuvieron impulsándome a hacer las cosas lo mejor posible, las que apoyó incondicionalmente este sueño,

Recuerda mirar arriba, a las estrellas, y no abajo, a tus pies.
Intenta encontrar el sentido a lo que ves y pregúntate qué es lo
que hace que el Universo exista. Sé curioso.
Por muy difícil que te parezca la vida, siempre hay algo que
puedes hacer y en lo que puedes tener éxito.
Lo único que cuenta es no rendirse.

Stephen Hawking

RESUMEN

Los virus influenza A son miembros de la familia *Orthomyxoviridae* y causan epidemias estacionales y pandemias con alta morbilidad y mortalidad que generan grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

El genoma de los virus influenza A está compuesto de 8 segmentos de ARN de cadena sencilla en sentido negativo; junto con el complejo de polimerasa (PA, PB1 y PB2) y la nucleoproteína (NP), forman las ribonucleoproteínas virales (RNPs). Estas RNPs son responsables de la replicación y transcripción de los genes del virus en el núcleo de las células infectadas. Aunque en la actualidad tenemos antivirales disponibles que se dirigen al bloqueo de la diseminación del virus, la aparición de virus mutantes resistentes plantea una grave limitación para su uso generalizado. Por lo tanto, la ausencia de una vacuna universal y la rápida aparición de cepas resistentes a los antivirales disponibles, ha generado interés por profundizar sobre los factores virales involucrados en la modulación de la respuesta inmune que pudieran ser utilizados como potencial blanco terapéutico.

Evidencias sugieren que la proteína de exportación nuclear (NEP) del virus influenza A, que causó el brote pandémico en el 2009 (A/H1N1/pdm09), pudiera ser uno de los factores virales que contribuyen a la inducción de una respuesta inmune exacerbada, por lo tanto es importante contar con herramientas de investigación que nos permitan realizar estudios detallados del papel de esta proteína en la infección por el virus.

En un trabajo previo del Laboratorio, se generó una batería de anticuerpos monoclonales (AcM) específicos contra NEP del virus pandémico A/H1N1/pdm9 (7.30, 3F10.70 y 3F10.82). La inmunización de los ratones y la determinación de la especificidad de los

AcM obtenidos se realizó con proteína NEP recombinante producida en bacteria. De esta manera, el objetivo principal de este estudio fue el determinar la capacidad de estos AcM para reconocer la proteína nativa sintetizada en infección mediante ensayos de western blot y ELISA sobre células fijadas. Así, células MDCK fueron infectadas *in vitro* con el virus influenzaA/H1N1/pdm9 y otras cepas virales estacionales con diferente serotipo.

Los resultados obtenidos demuestran que mediante ensayos de western blot todos los AcMs reconocen a la proteína NEP recombinante, como era de esperarse; sin embargo, solamente el AcM 7.30 fue capaz de reconocer a NEP producida en células infectadas con el virus pandémico y con los virus estacionales. Lo mismo sucedió en un ensayo de ELISA sobre células infectadas con el virus pandémico. Esto indica que el AcM 7.30 reconoce un epítipo conservado de NEP entre los diferentes virus analizados, por lo que este AcM será de gran utilidad para estudiar en detalle la biología de NEP en células infectadas.

Finalmente, con los resultados obtenidos no se puede descartar aún que los AcM 3F10.70, 3F10.70.1 y 3F10.82 no reconozcan NEP producida en infección. Es posible estos AcM tengan menor afinidad por NEP que el AcM 7.30 y bajo las condiciones empleadas en este estudio no se pueda detectar su actividad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Generalidades del virus.....	1
Estructura del virus.....	2
Ciclo viral.....	5
La proteína NEP del virus influenza.....	7
Propiedades bioquímicas.....	7
Función de NEP en la infección.....	8
Posible papel NEP en la respuesta inmune innata.....	9
Anticuerpos monoclonales.....	10
ANTECEDENTES.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Isotipificación de los anticuerpos monoclonales.....	15
Producción de los anticuerpos monoclonales.....	15
Purificación de los AcMs.....	16
Cuantificación de proteínas.....	16
Virus.....	17
Proteína NEP recombinante.....	17
Lisados de células infectadas con el virus influenza.....	17
Electroforesis SDS-PAGE.....	18
Western Blot.....	18
ELISA sobre células infectadas.....	19
RESULTADOS.....	21
Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.....	21

Producción y purificación de los anticuerpos monoclonales	21
Reconocimiento de NEP producido en infección por los AcMs en un ensayo de Western blot.....	23
Reconocimiento de NEP producido en infección por los AcMs en un ensayo de ELISA con células fijadas	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIÓN	34
REFERENCIAS	35

INTRODUCCIÓN

Generalidades del virus

La influenza es una infección viral aguda de las vías respiratorias, altamente contagiosa. Los síntomas son parecidos al del catarro común o resfriado; sin embargo, pueden llegar a ser graves y su inicio es generalmente abrupto. La infección por el virus influenza es considerada por la OMS como un problema de salud a nivel mundial, esto debido a su gran capacidad de generar brotes estacionales y pandemias, causando de 250 a 500 mil muertes al año (WHO,2013).

El virus influenza pertenece a la familia *Orthomixoviridae* y se divide en tres tipos: A, B y C. El virus tipo A es el de mayor interés ya que afecta a varias especies de aves y mamíferos, incluyendo a los humanos (Kapoor y Dhama, 2014). Sin embargo, el virus tipo B también infecta a humanos, aunque su incidencia no es tan alta como el tipo A.

Una ventaja evolutiva de los virus influenza, es su capacidad de mutar la secuencia codificante de las proteínas externas, cambiando su composición antigénica, provocando la evasión del sistema inmune, por lo que la población previamente infectada se vuelve vulnerable a una nueva infección. Esta característica es denominada deriva antigénica o “antigenic drift”, y es el causal de que las vacunas contra el virus Influenza formuladas con anterioridad se vuelvan obsoletas, teniendo que reformular nuevas vacunas con las cepas circulantes anualmente generando un gasto continuo y problemas logísticos para cubrir las necesidades de la población (Nicholls, 2016).

Por otro lado, los virus influenza pueden generar virus completamente nuevos mediante la adquisición de genes de otras especies principalmente de virus aviares y porcinos cuando hay coinfecciones con virus humanos. Esto resulta en una progenie viral mucho más virulenta para el ser humano, fenómeno que genera la mayoría de los brotes pandémicos que ocurren de manera cíclica cada 20 o 30 años. Este cambio antigénico total se conoce como “antigenic shift” y las vacunas que anualmente se producen no son capaces de proteger contra el surgimiento de estas nuevas cepas (Nicholls, 2016).

Estructura del virus

El virus influenza A tiene una forma esférica o pleomorfa (aunque también se han observado algunas formas filamentosas) con un diámetro aproximado de 100-200 nm (Ortín, 2006; Szewczyk, *et al.*, 2014). La envoltura viral se origina de la membrana plasmática de la célula hospedera (Talledo y Zumaeta, 2009) y contiene glicoproteínas tales como neuraminidasa (NA), hemaglutinina (HA), además de la proteína de la matriz M1 que contiene el genoma viral; este se encuentra organizado en ocho segmentos de RNA de cadena sencilla (ssRNA) y de polaridad negativa que contiene cerca de 14,000 nucleótidos. Cada segmento de RNA está asociado a varias moléculas de nucleoproteína (NP) y a una RNA polimerasa (formada por varias proteínas), que en conjunto forman las ribonucleoproteínas virales (RNPv) (Fig.1B) (Ortín, 2006; Szewczyk, *et al.*, 2014). Dentro del virión, también se encuentran algunas moléculas de la proteína de exportación nuclear (NEP), que posee diferentes funciones en la replicación y morfogénesis viral. De manera general cada segmento del genoma codifica para una proteína, aunque hay excepciones (Lamb y Krug, 1996; Ortín, 2006).

Los 3 segmentos génicos más largos (1, 2 y 3) codifican para las subunidades del complejo de polimerasa: PB2, PB1 y PA, respectivamente. El núcleo de este se encuentra formado por PB1 quien es responsable de llevar a cabo la replicación. El segmento 2 además de codificar para PB1, también codifica para PB1-F2 que contribuye a la virulencia al inducir apoptosis de las células infectadas (Chen, *et al.*, 2001), lo que aumenta la gravedad de la neumonía secundaria (McAuley, *et al.*, 2007). PB2 se encarga de unir RNA con *cap* para posteriormente iniciar la transcripción viral. Mientras que PA tiene un papel importante en la replicación del RNA viral debido a que tiene actividad de proteasa.

El segmento 4 codifica para la HA que forma trímeros, que funcionan principalmente para llevar a cabo la hemaglutinación y fijación del virus mediante la unión con ácido siálico que es receptor en la superficie de la célula hospedera, además genera la fusión de membrana celular y viral (Ortín, 2006; Kapoor y Dhama, 2014).

La nucleoproteína (NP), corresponde al segmento 5 y es una proteína estructural que cumple un papel importante en la protección del ARN viral debido a que se encuentran asociados, pues rodea y envuelve cada segmento.

El segmento 6 codifica para la neuraminidasa (NA) que forma tetrámeros, tiene actividad enzimática y contribuye en la liberación de los nuevos virus (Kapoor y Dhama, 2014).

El segmento 7 codifica para las proteínas M1 y M2. La proteína M1 es el principal componente del virión y es de gran importancia debido a que es el factor mínimo para la formación de partículas virales, así como su participación en la fijación de las RNPv, además posee una señal de localización nuclear (NLS) que permite su localización en el núcleo cuando comienza la infección, donde permite establecer interacciones con NP, NEP y RNAv durante el ciclo de la infección (Ortín, 2006; Szewczyk, *et al.*, 2014). Por otro lado, la proteína M2 es un homotetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro, tiene actividad de canal iónico activado a pH ácido por lo que es muy selectivo para protones y tiene una función muy importante en el ciclo de infección viral (Holsinger y Lamb, 1991; Mould, *et al.*, 2000).

Finalmente, el segmento 8, que es el más pequeño, codifica para dos proteínas; la proteína no estructural NS1 y NEP. NS1 inhibe la producción del interferón, así como el procesamiento y la exportación nuclear del ARNm de la célula huésped (Paterson y Fodor, 2012). En cuanto a NEP, se abordará más adelante ya que es la proteína de nuestro interés.

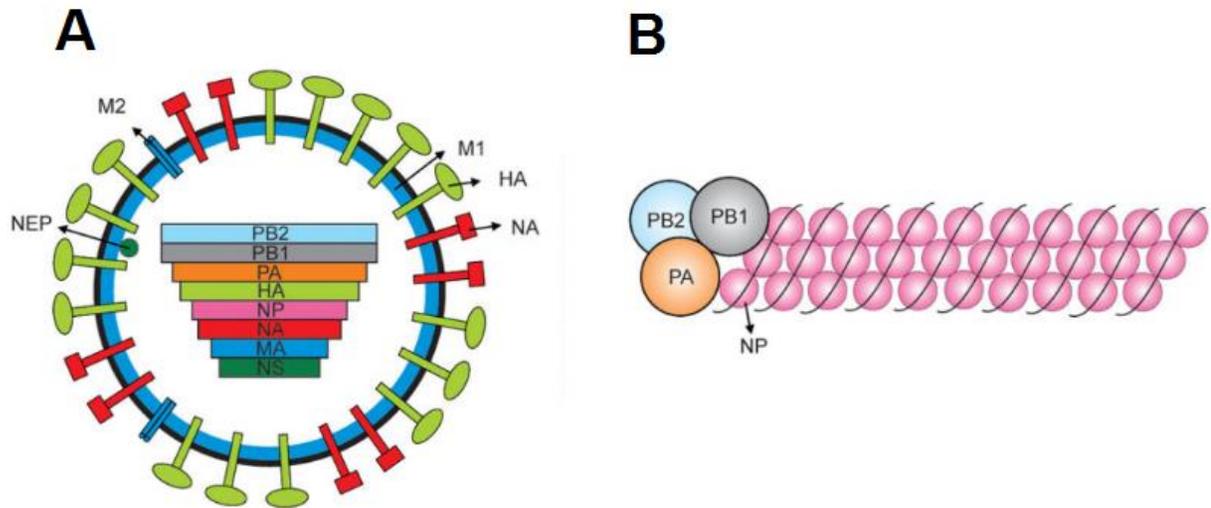


Figura 1. Virus influenza A. (A) Estructura del virus Influenza A, esquematizando el genoma viral. (B) Esquema de una RNPv, donde se puede observar claramente un segmento de ARNv asociado al complejo de polimerasa y NP (Imagen tomada de: Schrauwen *et al.*, 2014).

Ciclo viral

El ciclo del virus influenza, como se muestra en la figura 2, comienza cuando la HA se adhiere a las células blanco a través de residuos de ácido siálico presentes en la membrana celular. En mamíferos la unión se da por enlaces glicosídicos α 2,6 mientras que en aves se unen mediante enlaces α 2,3 (Ortín, 2006; Szewczyk, *et al.*, 2014). Después de la unión al receptor, el virus es internalizado a la célula utilizando el mecanismo de endocitosis mediada por clatrina. Conforme maduran, estas vesículas reducen su pH, lo que genera un cambio conformacional en la estructura de la HA que induce la activación de un péptido fusogénico, fusionando la membrana del endosoma con la membrana del virión. Concomitante a este evento, el pH bajo también activa los canales iónicos formados por la proteína M2, permitiendo el flujo de protones hacia el interior de la partícula viral, por lo que desestabiliza la interacción entre la capa proteica de M1 con el genoma viral. De esta manera, después de la fusión de las membranas, el genoma viral, ya libre de la interacción con M1, es liberado al citoplasma celular (Zhirnov, 1992; Ortín, 2006).

Una vez en el citoplasma celular, el genoma viral es transportado al núcleo donde se lleva a cabo la transcripción y replicación. En el núcleo, el RNA de polaridad negativa es usado como molde para generar los RNAs mensajeros que codifican para las diferentes proteínas virales y como templado para llevar a cabo la síntesis de RNA genómico viral (Plotch, Bouloy, y Krug, 1979), en estos procesos NEP juega un papel importante. Las proteínas externas del virus son ensambladas en la membrana celular donde reciben a la proteína M1 asociada a los diferentes fragmentos de la ribonucleoproteína viral, provenientes del núcleo.

Los nuevos viriones se generan a partir de la membrana celular por gemación y liberados de la membrana celular por la acción de la NA que corta los enlaces de la HA con los ácidos siálicos celulares (O'Neill, Talon, y Palase, 1998). Las nuevas partículas virales son liberadas para posteriormente infectar más células y comenzar nuevamente el ciclo (Ortín, 2006).

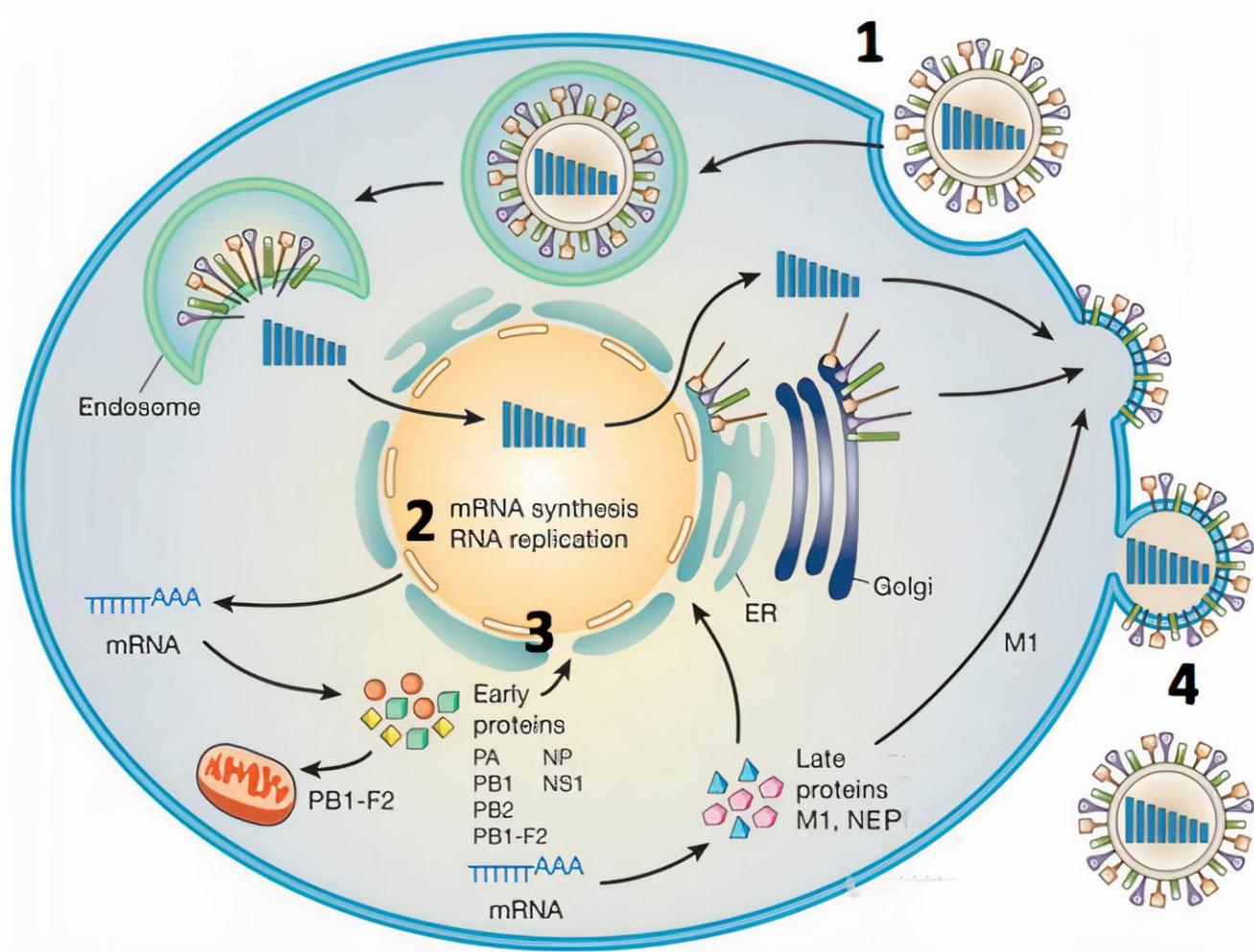


Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del virus Influenza A. (1) Entrada del virus a la célula. (2) Transcripción y replicación. (3) Regulación de la expresión de genes. (4) Transporte y ensamble de los componentes del virus (Imagen tomada de: Landreau, 2016).

La proteína NEP del virus influenza

La proteína NEP es codificada por el segmento viral 8, tiene un peso molecular de aproximadamente 11-15 kDa y es un polipéptido de 121 aminoácidos que en un principio se creía que no tenía función estructural, posteriormente se encontró que participaba en la exportación de RNPv del núcleo hacia el citoplasma, asegurando así el empaquetamiento de estas para la formación de una nueva partícula viral. Las mutaciones de NEP son las principales responsables de la adaptación de un virus de influenza aviar hacia un nuevo hospedero y como consecuencia permite una mejor replicación en células de mamíferos (Paterson y Fodor, 2012).

Propiedades bioquímicas

Como se muestra en la Figura 3 esta proteína se encuentra dividida en un dominio N-terminal (1-53 aminoácidos) sensible a proteasas y un dominio C-terminal (54-121 aminoácidos) resistente a proteasas. El dominio efector fue asignado al N-terminal, pues se encontró una secuencia de exportación nuclear (NES) asociada con los aminoácidos 11-23, aunque aún no se tiene suficiente información estructural definida (O'Neill, Talon, y Palase, 1998; Paterson y Fodor, 2012). Mientras que la estructura del dominio C-terminal (dominio de unión a M1) consiste en dos hélices α C1 (64-85 aminoácidos) y α C2 (94-115 aminoácidos) conectadas por un giro interhelical, formando una horquilla (Paterson y Fodor, 2012).

Los aminoácidos que forman esta proteína están altamente conservados en las cepas de influenza A, dando como resultado una identidad de 99,52% al 98% (Salahuddin & Khan, 2010), siendo la mejor conservada la hélice α C2 que muestra identidad del 96.3% (Salahuddin y Khan, 2010; Paterson y Fodor, 2012).

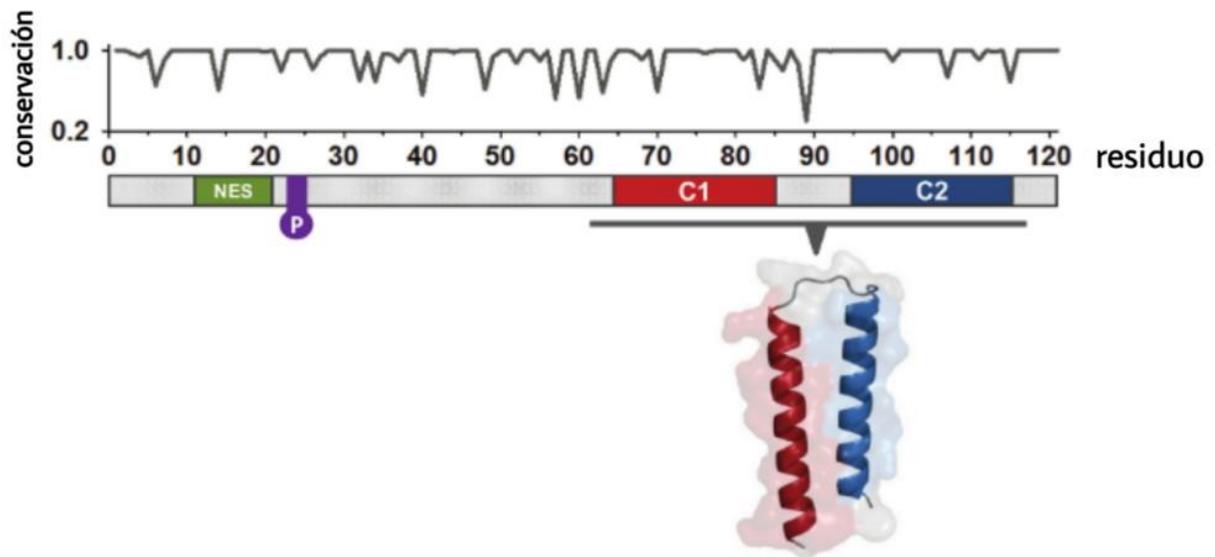


Figura 3. Estructura de NEP del virus influenza A
 (Imagen tomada de: Paterson y Fodor, 2012)

Función de NEP en la infección

Es una proteína muy importante en cuanto al ciclo viral puesto que participa en la regulación de la acumulación de ARNm, ARNc y ARNv, debido a que bajas concentraciones de NEP podrían estimular la acumulación del virus. Tiene un papel relevante en la exportación nuclear de RNPv y al parecer este proceso es dependiente de importinas (β - importina Crm1) que asociado a su cofactor RanGTP reconocen una NES (Paterson y Fodor, 2012). Finalmente, NEP también al proceso de liberación viral a través de la interacción con la F1F0-ATPasa que está involucrada en la gemación de las nuevas partículas virales.

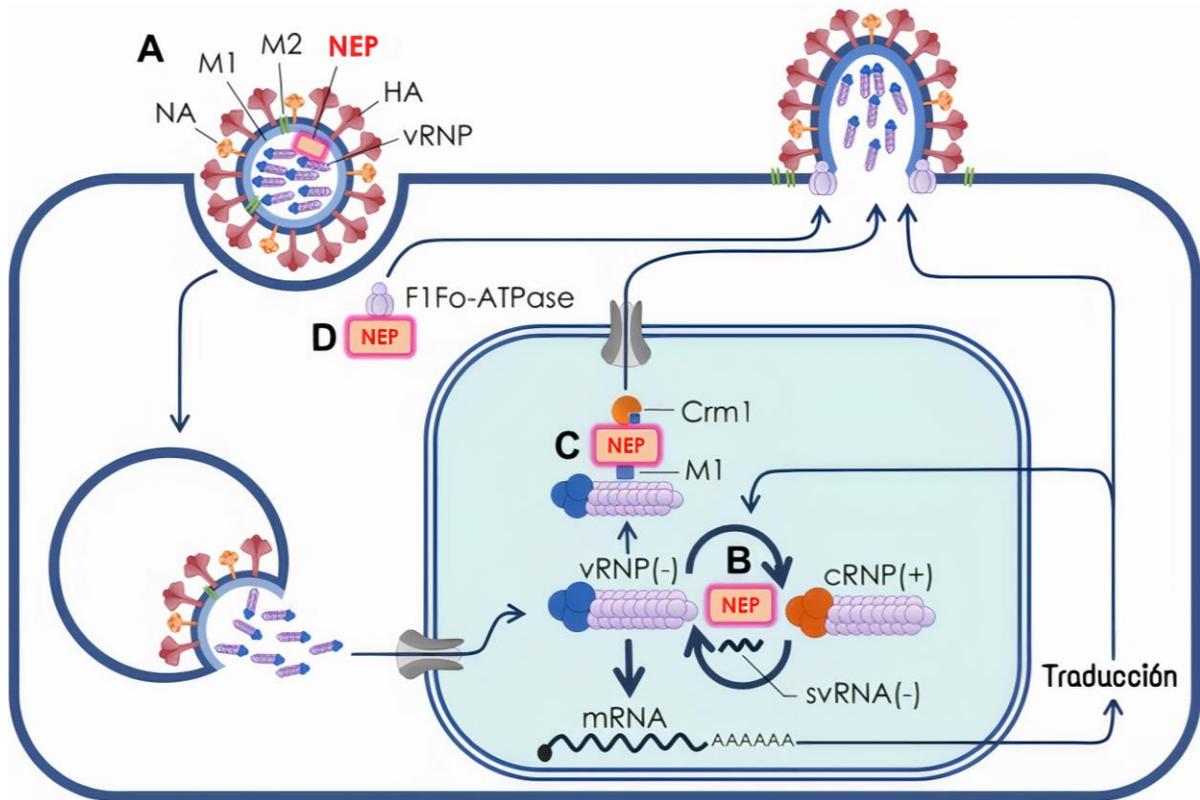


Figura 4. Papel de NEP en la replicación viral
(Imagen tomada de: Paterson y Fodor, 2012).

Posible papel NEP en la respuesta inmune innata

Trabajos previos (Lara-Sampablo, *et al.*, 2014), demostraron que células Hela transfectadas con NEP del virus influenza pandémico A/H1N1/Pdm/09 presentaban un incremento del RNAm así como la secreción de TNF α a las 12-48 hr. También se encontró que el factor transcripcional NF- κ B está involucrado en esta respuesta. De esta manera, la evidencia sugiere que además de su papel en la exportación de complejos vRNP y la regulación de la transcripción, NEP podría participar en la inducción de una respuesta inmune innata exacerbada, característica de las infecciones con el virus influenza pandémico. Sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar esta función, así como para determinar de manera más precisa como NEP podría estar induciendo esta respuesta.

Anticuerpos monoclonales

En 1975, Köhler y Milstein desarrollaron la tecnología de la generación de hibridomas, mediante la cual fue posible la producción de anticuerpos monoclonales (AcM). Como se muestra en la figura 5, esta técnica consiste en la fusión de un linfocitos B de un animal que haya sido inmunizado previamente con el antígeno de interés, haciendo que produzca anticuerpos específicos para este, y una célula mieloide cancerosa que aportara su propiedad de inmortalidad. Esta célula mieloide (pareja de fusión) carece de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), característica que es fundamental en la selección de los hibridomas.

La fusión se induce utilizando polietilén glicol, los resultados pueden variar, ya que se pueden generar híbridos como: célula de mieloma con célula de mieloma (M-M), linfocito con linfocito (Lc-Lc) y linfocito con célula de mieloma (Lc-M) o células no fusionadas.

Para seleccionar los hibridomas de nuestro interés (Lc-M), es necesario incubar la mezcla de células con medio que contenga hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), logrando así que los híbridos Lc-Lc y los no fusionados mueran porque tienen un periodo de vida corto, mientras que los híbridos M-M y células mieloide no fusionadas también mueran debido a la ausencia de la enzima HGPRT, que forma parte de una de las vías de salvación para la síntesis de DNA.

Finalmente, ya seleccionados los hibridomas se cultivan en un medio enriquecido para asegurar la proliferación de estos y la producción al medio de cultivo de los AcM. Los AcM presentes en el medio de cultivo se purifican y se usan en diferentes ensayos biológicos.

En la actualidad, los AcM son fundamentales en investigaciones biomédicas, diagnóstico de patologías y tratamiento de enfermedades. De esta manera, es de suma importancia la generación de nuevos AcM que enriquezcan la disponibilidad de reactivos específicos para la investigación (Rojas-Espinosa, 2006).

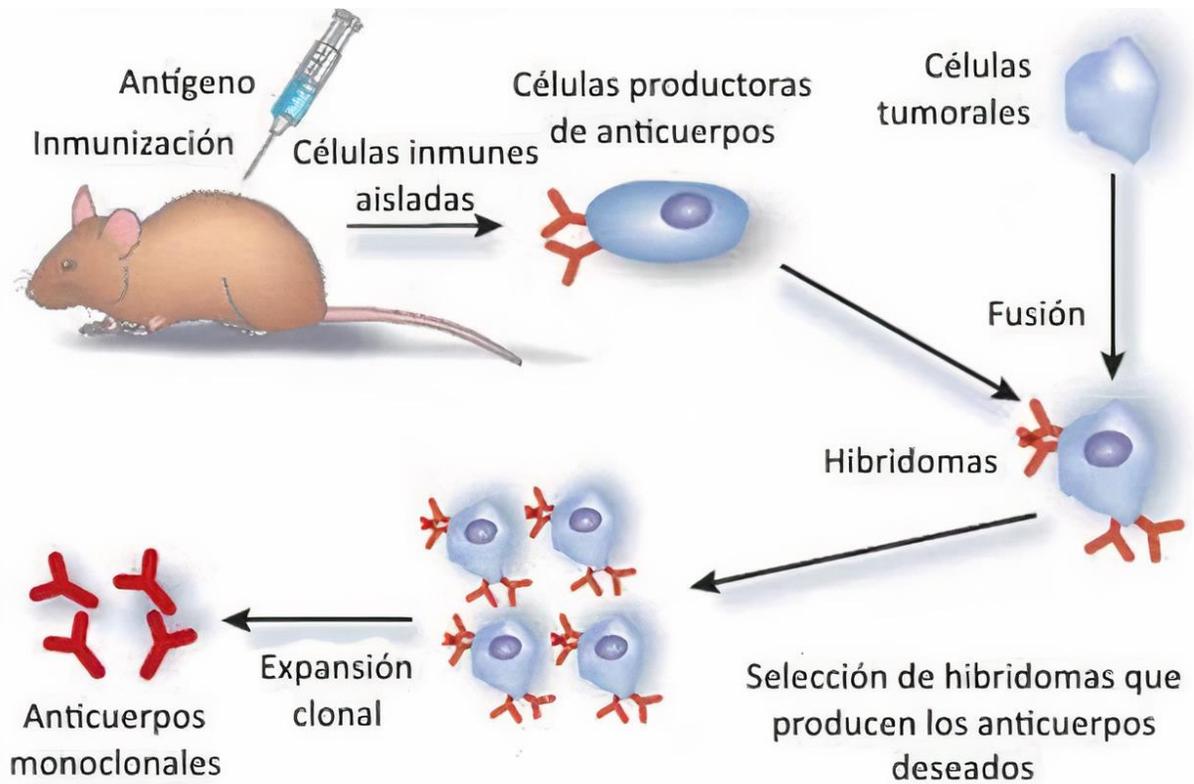


Figura 5. Representación esquemática de la obtención de anticuerpos monoclonales.
 (Imagen tomada de: Michnick y Sidhu, 2008).

ANTECEDENTES

En nuestro Laboratorio, en colaboración con la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Martínez, 2017), se generaron los hibridomas 7.30, 3F10.70 y 3F10.82 que producen AcMs contra la proteína NEP de la cepa de influenza pandémica A/H1N1/pdm/09. Estos AcMs fueron obtenidos a partir de células de bazo de un ratón BALB/c inmunizado con la proteína recombinante NEP del virus pandémico producida en bacterias y purificada por columnas de afinidad.

Los AcMs se seleccionaron en base a ensayos de ELISA directos, donde la misma proteína NEP que se utilizó para inmunizar el ratón fue adherida a la placa de ELISA. La posible especificidad de estos AcMs contra proteínas bacterianas residuales fue descartada cuando se usaron las proteínas NS1 del virus influenza y VP6 de rotavirus purificadas de la misma manera. Por medio de ensayos de Western blot, se encontró que todos los AcMs reconocían 3 formas de la proteína recombinante NEP; monómeros, dímeros y trímeros.

Los resultados mencionados demuestran que los AcM anti-NEP reconocen a la proteína recombinante, sin embargo, esto no asegura que los AcMs reconozcan a la proteína nativa producida en células infectadas con el virus pandémico. También es importante conocer si estos AcMs pueden reconocer de manera cruzada a la proteína NEP sintetizada en células infectadas con virus estacionales circulantes. Por otro lado, para estudios futuros sobre la biosíntesis de la proteína en las células infectadas, sería interesante determinar en cual compartimiento celular (por ejemplo: núcleo, citosol etc) estos anticuerpos reconocen a la proteína. Por último, en trabajos futuros sería deseable que se definieran los epítomos específicos que reconocen cada uno de los cuatro AcMs. Esta caracterización es muy importante para trabajos futuros sobre la biología de NEP.

JUSTIFICACIÓN

El virus de influenza A es un patógeno importante responsable de epidemias estacionales y pandemias con alta morbilidad y mortalidad que generan grandes pérdidas económicas a nivel mundial. La ausencia de una vacuna universal y la rápida aparición de cepas resistentes a los antivirales disponibles, ha generado interés por profundizar sobre los factores virales involucrados en la modulación de la respuesta inmune que pudieran ser utilizados como potencial blanco terapéutico. Especialmente aquellos factores capaces de generar una respuesta inmune inflamatoria exacerbada, ya que se ha demostrado que un gran porcentaje de la mortalidad inducida en pacientes infectados por este virus pudiera estar causada por este tipo de respuesta inmune (Hilleman, 2010; Castillo, *et al.*, 2010).

Evidencias recientes sugieren que la proteína NEP del virus influenza A, que causó el brote pandémico en el 2009 (A/H1N1/pdm09), pudiera ser uno de los factores virales que contribuyen a la inducción de una respuesta inmune exacerbada, por lo tanto, es importante contar con herramientas de investigación que nos permitan realizar estudios detallados del papel de esta proteína en la infección por el virus (Lara-Sampablo, *et al.*, 2014).

En un estudio previo se generó una batería de AcMs específicos contra NEP del virus pandémico A/H1N1/pdm9. La inmunización de los ratones y la determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos se realizó con proteína NEP recombinante producida en bacterias, por lo que no se tiene la certeza si estos anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer la proteína producida en una infección viral. De esta manera, es importante determinar si los AcMs reconocen a NEP sintetizada en células infectadas *in vitro*, si esto es así nos permitirá caracterizar en más detalle la biosíntesis y el procesamiento de NEP en la infección, así como su papel en la inducción de una respuesta inmune exacerbada.

HIPÓTESIS

Los anticuerpos monoclonales anti-NEP reconocerán a la proteína sintetizada en células infectadas con los virus influenza pandémico y estacionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar una batería de anticuerpos monoclonales específicos para la proteína NEP del virus influenza A.

Objetivos específicos

- Determinar el isotipo de los anticuerpos
- Determinar si los anticuerpos reconocen a la proteína sintetizada en células infectadas con el virus influenza pandémico A/H1N1/ Pdm/ 09.
- Determinar si los anticuerpos reconocen de manera cruzada a NEP de células infectadas con virus influenza estacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Isotipificación de los anticuerpos monoclonales

El isotipo de los anticuerpos monoclonales se determinó por medio de ELISA usando un kit comercial de InvitroGen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, sobrenadantes de cultivo de los diferentes hibridomas a evaluar fueron diluidos 1:50 en TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7.4) y 50 μ L de la dilución adicionados a placas de 96 pozos precargadas con anticuerpos específicos para los isotipos de ratón IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA y contra las cadenas ligeras κ y λ . Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente (TA), los pozos se lavaron 3 veces con buffer de lavado y se adicionaron 50 μ L de una mezcla de anticuerpos policlonales contra IgG, IgM e IgA marcados con peroxidasa. Después de 1 h de incubación a TA, los pozos se lavaron 3 veces con buffer de lavado, se adicionaron 75 μ L del substrato TMB y se incubó por 5-15 min a TA. La reacción se paró con 75 μ L de H₂SO₄ 2 M y los pozos se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (BIOTEK).

Producción de los anticuerpos monoclonales

La producción de los AcM se llevó a cabo de dos maneras; mediante cultivo *in vitro* o por inyección de los hibridomas en el peritoneo de ratones BABL/c para la generación de ascites rico en AcM.

Los hibridomas fueron cultivados y mantenidos *in vitro* en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 5x10⁻⁵ M 2- β -mercaptoetanol (2-ME) y 10 μ g/mL de gentamicina (GIBCO) e incubados a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Para la producción de los AcMs, los hibridomas se adaptaron al medio CD Hybridom (GIBCO) con concentraciones decrecientes de SFB, hasta alcanzar una concentración del 1%. En este momento los hibridomas fueron sembrados en 250 mL de medio en frascos de 162 cm² (Costar), y una vez que alcanzaron una confluencia del 90% las células se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante rico en AcMs, se adicionó 0.02% azida de sodio y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para la producción de ascites, ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de nacidos fueron inyectados con 0.5 mL de Pristane (Sigma). Siete días después, de 3.5 a 4×10^6 células del hibridoma de interés fueron colectadas, centrifugadas a 1,200 rpm por 10 min a 4°C , resuspendidas en 0.5 mL de PBS e inoculadas intraperitonealmente (i.p.). Después de 15 a 20 días, se extrajo el líquido ascítico por medio de la introducción i.p. de una aguja con un bisel de 18G. El líquido fue colectado en un tubo de 15 mL (Costar) y centrifugado a 5,000 rpm por 10 minutos a 4°C . Se retiró la capa superior de grasa y el líquido ascítico se almacenó a -80°C hasta su uso.

Purificación de los AcMs

La purificación de los AcMs se llevó a cabo por cromatografía de afinidad usando un cartucho de 5 mL de proteína G (High trap; General Electric). El cartucho se equilibró con un buffer de fosfatos (20 mM fosfato de sodio; pH 7.0) y el sobrendante rico en AcM se pasó de 2 a 3 veces por el cartucho. Posteriormente, se lavó con el buffer de fosfatos y el AcM capturado por la proteína G se eluyó con 2-5 volúmenes de glicina 100 mM (pH 2.7). Se colectaron fracciones de 1 mL en tubos de ensayo de vidrio conteniendo 50 μL de buffer de neutralización (1.0 M Tris; pH 9), y se leyó la absorbancia a 280 nm de cada fracción en un lector de celdas. Se graficaron los valores de absorbancia y las fracciones que presentaron la mayor concentración de proteínas se combinaron y se concentraron por centrifugación en filtros amicón con membranas de 30 kDa, a la muestra final se le se adicionó 0.02% de azida de sodio y se almacenaron alícuotas a -20°C hasta su uso. Para la purificación de AcM a partir de ascites, se siguió el mismo protocolo con la diferencia que de 1 a 2 mL del ascites fue diluido 1:10 con el buffer de fosfatos.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó por el método del ácido bicinoninico (BCA; Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. En placas de 96 pozos de fondo plano (Costar) se adicionaron 25 μL por duplicado de albumina de suero bovina (BSA; Sigma) en PBS en concentraciones decrecientes de 60 μg a 5 μg , para establecer la curva de referencia. Para las muestras problema se adicionaron de 5 a 10 μL a 20 o 15 μL ,

respectivamente, de PBS. Posteriormente, a todas las muestras se les adicionaron 200 μ L de una mezcla del reactivo A con reactivo B en un radio de 50:1 y se incubó por 30 min a 37 °C. Al término de la incubación, la placa se dejó reposar a TA y la absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 562 nm.

Virus

Para la infección de las células se usaron lisados de células epiteliales MDCK de riñón de perro infectadas con los virus influenza estacionales A/H3N2/NT/60/6 y A/H1N1/New Caledonia/20/99 o el virus pandémico A/H1N1/ Pdm/ 09. Los tres lisados virales tuvieron un título de 1600 unidades de hemaglutinación (UHA) por mL

Proteína NEP recombinante

La proteína NEP recombinante, del virus influenza pandémico A/H1N1/ Pdm/ 09, fue purificada a partir de cuerpos de inclusión de bacterias transformadas con el plásmido pQE-80L que dirige la síntesis de NEP con 6-His (Martínez, 2017). Se purificó por medio de columnas de Níquel, se determinó la concentración de proteína por el método de BCA y se almacenó a -20 °C en alícuotas hasta su uso.

Lisados de células infectadas con el virus influenza

Cien mil células MDCK se sembraron en placas de 24 pozos con medio DMEM alto en glucosa (GIBCO) suplementado con 2% de SFB, 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin y se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂. Una vez que alcanzaron un 90% de confluencia las células se infectaron con los virus influenza estacionales A/H1N1/NewCaledonia/20/99, A/H3N2/NT/60/68 o el virus pandémico A/H1N1/ Pdm/ 09 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 y una concentración de tripsina TPCK (Sigma) de 1 μ g/mL. Después de 16 hr de incubación, se adicionaron a los pozos 1 mL de buffer de lisis (10 mM Hepes, 1.5 mM MgCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5% Tritón y cocktail de inhibidores de proteasas Mini Roche; pH 7.2) y se mantuvieron en hielo por 30 min agitándose cada 10 min.

Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se hicieron alícuotas de 50 µL a una concentración final de 800 µg/ml de proteína y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Como control negativo, se realizaron lisados de células no infectadas.

Electroforesis SDS-PAGE

El análisis de las proteínas por SDS-PAGE se realizó en geles de acrilamida a la concentración indicada en cada experimento. Para esto, las muestras de proteínas se mezclaron con buffer de carga (35 mM de Tris pH 6.8, 2% SDS, 5% v/v glicerol y 0.1% de azul de bromofenol) en un volumen final de 20 µl, se hirvieron por 5 min, se enfriaron en hielo y se cargaron en los diferentes pocillos del gel. En algunos casos se adicionó 1% de 2-β-mercapto etanol (2-ME) para reducir las muestras. Como control de corrida se utilizaron 4 µl de una mezcla de marcadores de peso molecular con un rango de 250-10 KDa (Fermentas). Las proteínas se corrieron aplicando una corriente inicial de 5 mAmp por 5 min y posteriormente de 20 mAmp por 60-80 minutos. Al término de la corrida el gel fue colocado en una solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético) por 20 min. Finalmente, el gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (50 % metanol, 0.05% p/v azul de Coomassie R-250 y 10 % de ácido acético) por 1 hr. El exceso de tinción fue eliminado por agitación en una solución de 10 % de ácido acético. Finalmente, el gel fue escaneado en una impresora multifuncional para su almacenamiento digital.

Western Blot

Proteínas totales de los lisados celulares se resolvieron en geles de acrilamida (SDS-PAGE) a la concentración indicada en cada experimento. Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PerkinElmer) en una cámara de transferencia (Biorad). El gel y la membrana fueron embebidos en un buffer de transferencia (34 mM Tris, 276 mM Glicina y 162 ml de etanol absoluto por cada 700ml de buffer) y se aplicó una corriente de 200 mAmp por 1 hr. Al término de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con buffer de bloqueo (PBS, Tween 0.05%, y 10% de leche en polvo descremada Carnation) por 20 min a TA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS/Tween 0.05% y se agregaron los AcMs

anti-NEP o anti-M1 de influenza (ATCC; HB64) a la concentración apropiada, en solución de bloqueo con 0.02% de azida de sodio y se dejaron incubando toda la noche a 4 °C en agitación constante. Al día siguiente, la membrana se lavó y se incubó en agitación por 1 hr a TA con un segundo anticuerpo cabra anti-IgG de ratón- HRP (Jackson), en solución de bloqueo. La membrana se lavó y se adicionaron 300 µl de Luminol (PerkinElmer) más 300 µl de solución oxidativa y se capturó la señal en el equipo Odyssey Fc (LI-COR).

El anticuerpo policlonal de conejo contra NEP generado contra el virus influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) (GeneTex), fue usado a una dilución de 1:1000 en buffer de bloqueo seguido de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de conejo-HRP (ZYMEX), siguiendo el protocolo arriba mencionado.

En algunos casos la membrana usada para western blot fue tratada con una solución de extracción (25 mM glicina-HCl, 1% SDS; pH 2) para eliminar los anticuerpos enlazados a esta y poder reprobirla con otros anticuerpos.

ELISA sobre células infectadas

Se sembraron 1×10^4 células MDCK en placas de 96 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 2% de SFB, glutamina y penicilina/estreptomina y se incubaron por 48 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron infectadas el virus influenza pandémico A/H1N1/ Pdm/ 09 a una MOI de 5. Para esto, las células fueron lavadas 2 veces con medio DMEM sin suero e infectadas en un volumen final de 50 µL con 1 µg/ml de tripsina TPCK. Al término de la incubación, el inoculo fue retirado y se agregaron 100 µL de medio DMEM sin suero con 1 µg/mL de tripsina TPCK y las células se incubaron por 16 h. Al término de la incubación, las células fueron fijadas adicionando 100 µL de paraformaldehído al 4% por 10 min a TA. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS y las células se permeabilizaron con 50 µL de una mezcla fría de metanol- acetona 1:1 y se incubó por 20 min a TA. Las células se lavaron 3 veces con PBS y la presencia de proteínas virales se determinó por medio de ELISA usando diferentes AcM. Como control negativo de reconocimiento de los AcM, se usaron células sin infectar pero que fueron sometidas al mismo protocolo descrito arriba.

Se adicionaron por duplicados 50 μ L de diluciones seriadas de los AcM purificados anti-NEP 7.30, 3F10.70, 3F10.70.1 o 3F10.82 en buffer bloqueador (PBS, 0.05% Tween-20 y 5% de leche en polvo descremada) y se incubó por 1 hr a 37°C. Como control positivo, se usó un AcM anti-M1 específico contra influenza a una concentración de 5 μ g/mL. La placa se lavó 3 veces con PBS, se adicionaron 50 μ L de un anticuerpo policlonal de cabra contra Ig's totales de ratón-HRP (ZYMEX) diluido 1:1500 en buffer de bloqueo y se incubó por 1 hr a 37°C. Posteriormente, la placa se lavó 3 veces con PBS y se agregaron 50 μ L de buffer citratos-fosfatos (51.4 mM ácido cítrico y 24.3 mM de fosfato de sodio) con 2 μ L/mL H₂O₂ (30%; Sigma) y de 0.4 mg/mL de sustrato (orto-fenildiamina; Sigma), incubándose por 10-15 min a TA. La reacción se paró adicionando 50 μ L de H₂SO₄ 2 M y la absorbancia se leyó en un lector de ELISA a 492 nm (BIOTEK).

RESULTADOS

Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales

Conocer el isotipo de los AcM es importante para el diseño apropiado de diferentes metodologías inmunológicas. De esta manera, el isotipo de los AcMs anti-NEP se determinó por medio de un ensayo de ELISA usando un kit comercial y sobrenadantes de cultivo de los hibridomas. Se encontró que los AcM 7.30 y 3F10.82 son de isotipo IgG1 con cadena ligera κ . Sin embargo, el AcM 3F10.70 presentó un isotipo predominante IgG1, pero con señal baja, pero detectable, para IgG2b y una cadena ligera κ . Esto podría indicar que el hibridoma 3F10.70 en realidad es una mezcla de al menos dos hibridomas diferentes que producen anticuerpos IgG1 o IgG2b. Para explorar esta posibilidad, el hibridoma 3F10.70 se clonó por el método de dilución limitante en placas de cultivo de 96 pozos sembrando 1 célula/pozo. Los sobrenadantes de los hibridomas que crecieron se colectaron y su especificidad se analizó por medio de un ensayo de ELISA, usando la proteína NEP recombinante como antígeno. Se obtuvieron dos clonas capaces de reconocer NEP (datos no mostrados), las cuales se denominaron 3F10.70.1 y 3F10.70.6. Al igual que el AcM producido por el hibridoma madre 3F10.70, los anticuerpos producidos por las clonas mostraron una señal predominante para IgG1 y una señal menor para IgG2b. Este resultado sugiere que no existe mezcla de clonas que secretan anticuerpos con diferentes isotipos, sino que el AcM 3F10.70 y sus clonas son del isotipo IgG1 con una ligera reacción cruzada para el isotipo IgG2b.

Producción y purificación de los anticuerpos monoclonales

La producción de los AcM se llevó a cabo de dos maneras; por cultivo *in vitro* de los hibridomas en medio CD Hybridom con 1 % de SFB o por inyección de los hibridomas en el peritoneo de ratones BABL/c para la producción de ascites rico en AcM. En ambos métodos de producción, los AcMs fueron purificados por columnas de proteína G.

Los AcMs 7.30 y 3F10.70.1 fueron purificados a partir de sobrenadantes de cultivo y los AcMs 3F10.70 y 3F10.82 a partir de ascites. Como se puede observar en la figura 6, en

la purificación de los diferentes AcMs se colectaron de 20 a 25 fracciones y se seleccionaron aquellas fracciones con la mayor absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas se mezclaron y se concentraron en filtros amicón con un poro de 30 kDa. La cantidad final de los AcMs purificados se cuantificó por el método de BCA, obteniéndose los siguientes resultados; 7.30 0.518 mg, 3F10.70 1.77 mg, 3F10.70.1 5.44 mg y 3F10.82 0.645 mg.

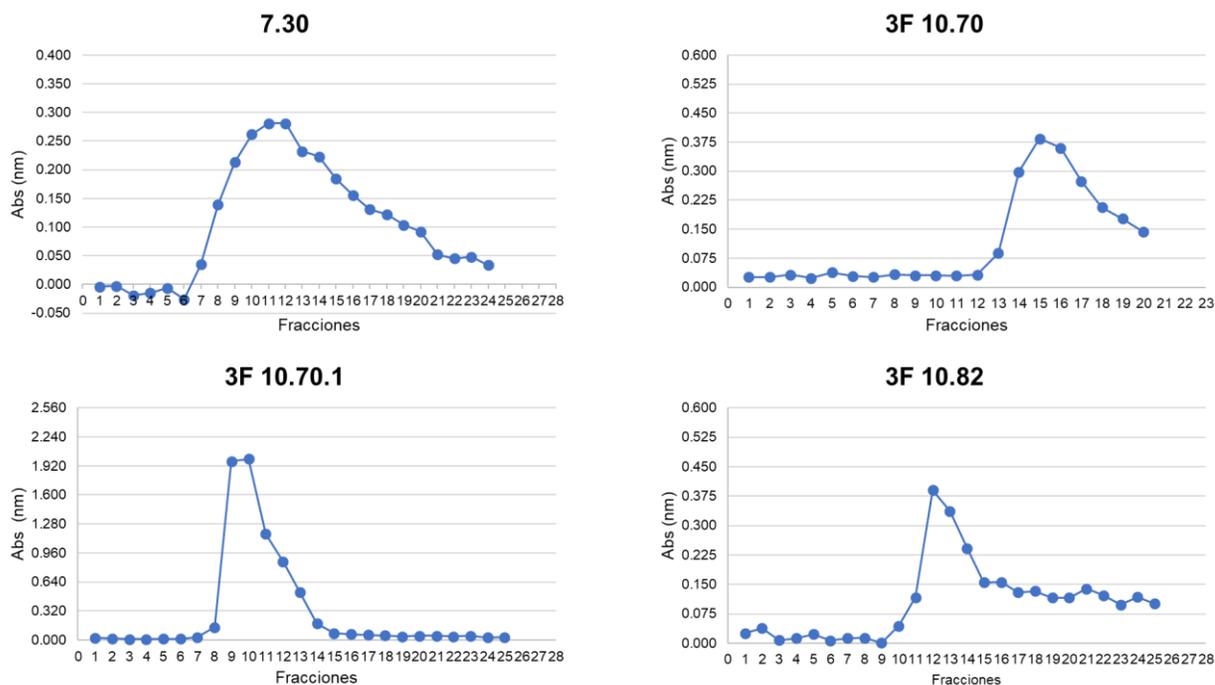


Figura 6. Representación gráfica de la purificación de anticuerpos monoclonales. Absorbancia de las fracciones obtenidas al pasar los sobrenadantes por la columna de proteína G.

Para verificar la pureza de los AcM, estos se resolvieron en un gel de acrilamida al 12% en condiciones reducidas y teñido con azul de Coomassie. En la figura 7 se muestra un gel representativo con los AcMs 7.30 y 3F10.1, Se observó que ambos anticuerpos generaron una banda de aproximadamente 50 kDa, correspondiente a la cadena pesada y otra banda de aproximadamente 24 kDa para el AcM 7.30 y de 28 kDa para el AcM 3F10.70.1, correspondiente a la cadena ligera. En ningún caso se observaron bandas contaminantes de importancia, lo que indica que los AcM tuvieron un alto nivel de pureza. Resultados similares al mostrado por el AcM 3F10.70.1 se obtuvieron con los AcMs 3F10.70 y 3F10.82. Los AcMs purificados fueron usados en los diferentes experimentos a lo largo de este estudio.

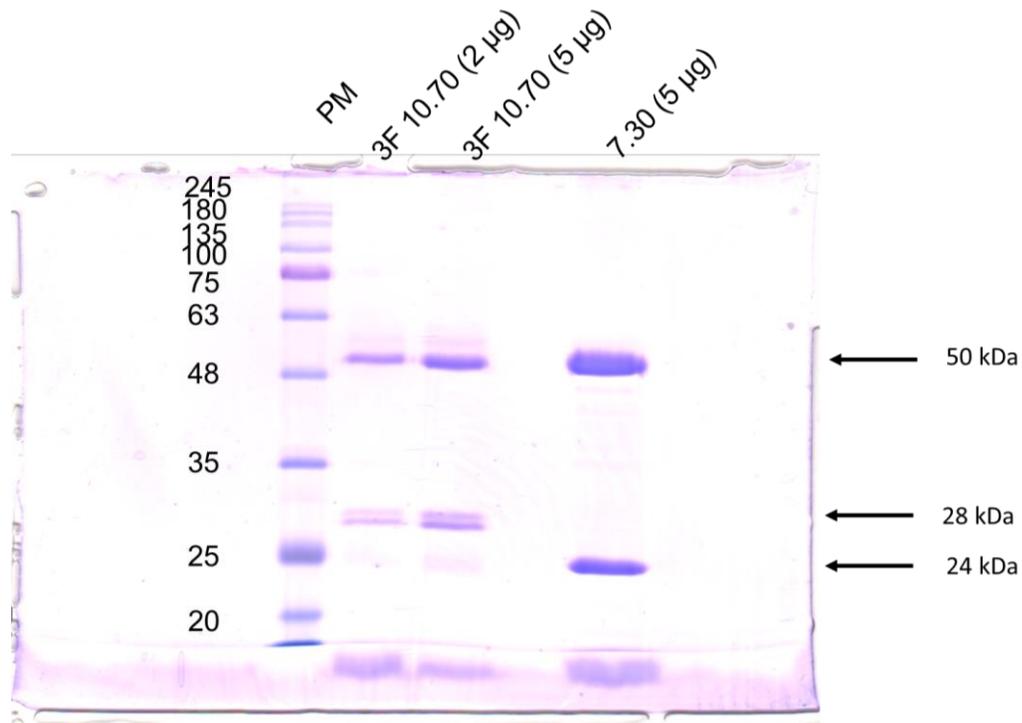


Figura 7. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12 % donde se muestran los AcM 3F 10.70 y 7.30. Se cargaron los µg de proteína indicados y se corrieron en condiciones reductoras. A la izquierda en el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular (PM). El gel fue fijado y teñido con azul de Commassie.

Reconocimiento de NEP producido en infección por los AcMs en un ensayo de Western blot

Para generar los AcMs ratones BALB/c fueron inoculados con la proteína NEP recombinante (producida en bacteria) y para determinar la especificidad de los AcM se realizaron ensayos de ELISA usando la misma proteína recombinante como antígeno (Martínez, 2017). De esta manera, era importante determinar si estos AcM son capaces de reconocer NEP nativa, esto es, sintetizada en una infección, para estudios futuros de la biología de NEP en el ciclo infeccioso del virus influenza. Por otro lado, la proteína NEP empleada para generar los AcM proviene del virus influenza A/H1N1/Pdm/09, por lo que también era importante determinar si los AcM pueden reconocer NEP proveniente de otros serotipos virales

Así, células MDCK fueron infectadas con el virus pandémico A/H1N1/Pdm/09 o con los virus estacionales A/H1N1/NewCaledonia/20/99 o A/H3N2/NT/60/68. Como control, se usaron células sin infectar. Después de 24 h de infección, las células fueron colectadas, lisadas y la concentración de proteína en cada lisado analizado por el método de BCA.

Para determinar la integridad de las proteínas en los lisados, se corrió un gel de acrilamida SDS-PAGE al 11 % con 6 μ g de proteína por cada lisado en condiciones desnaturizantes y no reductoras, el gel se fijó y se tiñó con azul de Coomassie. Como se puede observar en la figura 8, no se detectaron diferencias en las bandas de proteínas sintetizadas entre el lisado de células no infectadas y las infectadas. Esto nos indica que posiblemente la infección no fue tan potente a las 24 h como para evidenciar un cambio en el patrón de las proteínas predominantemente sintetizadas.

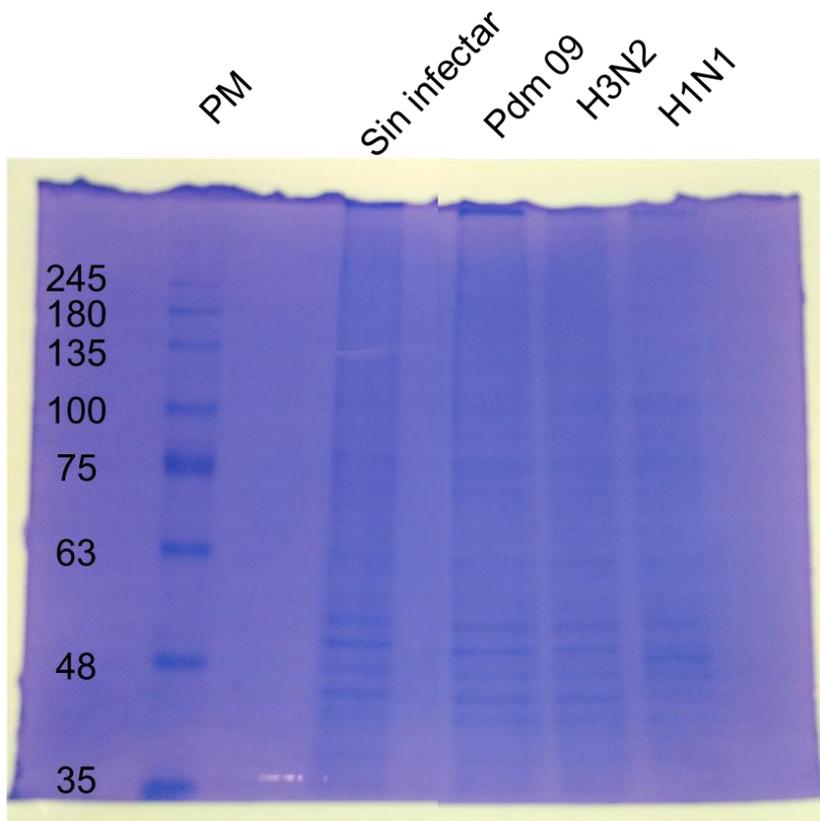


Figura 8. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 11 % donde se muestran las proteínas de los lisados celulares. Se cargaron 6 μ g de proteína de lisados celulares sin infectar o infectados con diferentes cepas de virus influenza y se corrieron en condiciones desnaturizantes no reductoras. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM). El gel se fijó y tiñó con azul de Coomassie.

Para determinar que efectivamente las células fueron infectadas se realizó un ensayo de Western blot usando un anticuerpo policlonal de conejo específico contra el virus influenza hecho en el laboratorio. Se corrieron los lisados en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12 % y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-influenza, seguido del anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP. Como se puede observar en la figura 9, los lisados de las células infectadas presentaron varias bandas específicas que no se observan en el lisado sin infectar que corresponden a las proteínas mayoritarias del virus influenza; como HA (70 KDa), NP (55 KDa), M1 (27 KDa) y M2 (17 KDa). Es importante señalar que este anticuerpo policlonal reconoció HA de los virus estacionales, pero no del pandémico A/H1N1/Pdm/09. Esto se puede deber a que el anticuerpo policlonal se generó contra los virus estacionales A/H1N1/NewCaledonia/20/99 y A/H3N2/NT/60/68 y es sabido que la HA del virus pandémico es totalmente diferente al de los virus estacionales. Las otras proteínas (NP, M1 y M2) están altamente conservadas en los 3 serotipos utilizados por lo que era de esperarse que este anticuerpo policlonal las reconociera.

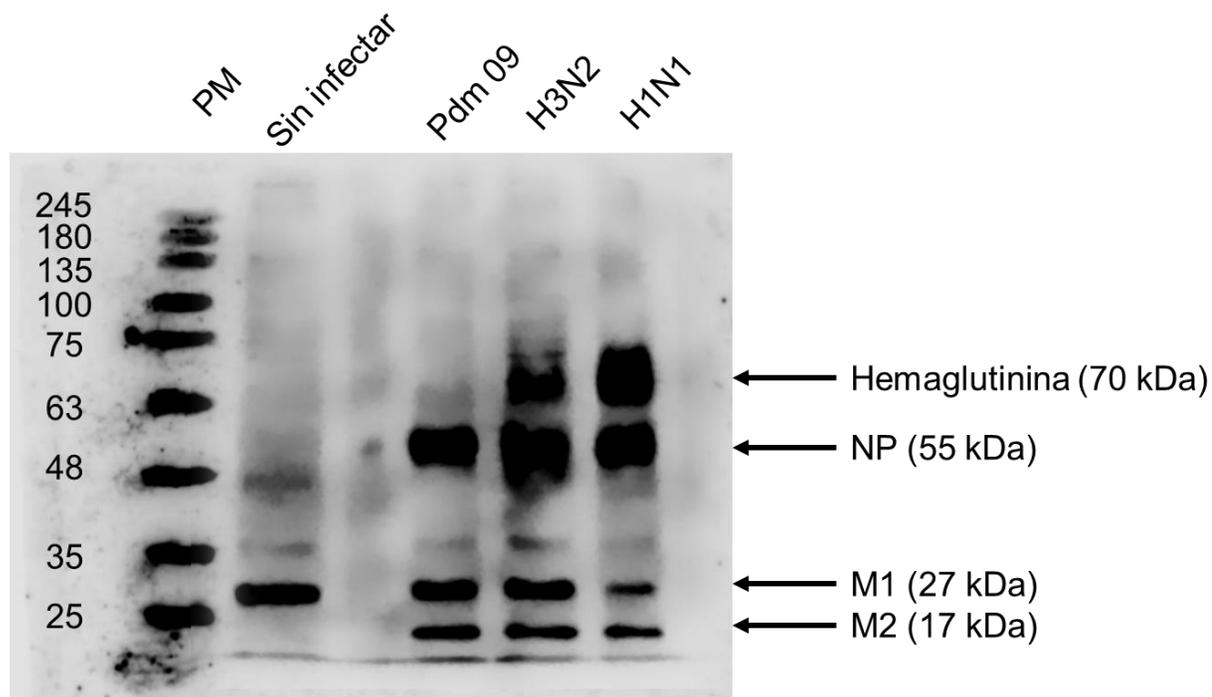


Figura 9. Western blot de lisados celulares donde se muestran las proteínas virales. Se cargaron 7 µg de proteína total de lisados en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 12 % en condiciones no reductoras y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal de conejo contra virus influenza, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra anti-

IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

El resultado anterior corrobora que las células realmente estaban infectadas con los diferentes virus, por lo que se procedió a determinar si los AcM podían reconocer el NEP del virus pandémico y de los otros dos virus estacionales. Primeramente, se realizó un western blot para evaluar la especificidad del anticuerpo policlonal de conejo anti-NEP comercial, con la finalidad de usarlo como control positivo en todos los análisis de western blot. Así, se corrió un gel de acrilamida al 15% con los lisados de las células sin infectar e infectadas con los tres diferentes virus y con la proteína recombinante NEP purificada. Se encontró que el anticuerpo policlonal anti-NEP no reconoció proteína de ningún virus, pero sí reconoció dos bandas predominantes de la proteína NEP recombinante (Figura 10); una de 12 kDa y otra de 24 kDa, que muy probablemente corresponden a monómeros y dímeros de la proteína. Este resultado fue inesperado ya que en la hoja técnica del producto se indica que el anticuerpo policlonal reconoce la proteína NEP sintetizada en una infección. De esta manera, el anticuerpo policlonal no pudo ser utilizado como control positivo en este trabajo.

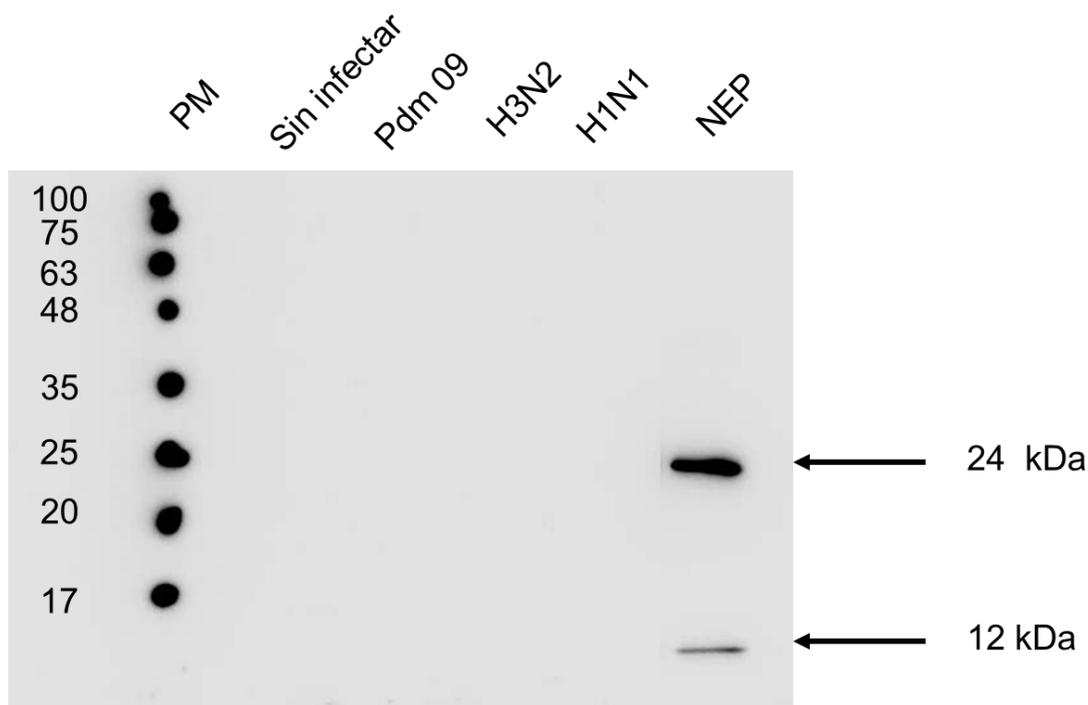


Figura 10. Western blot que muestra la especificidad de un anticuerpo policlonal comercial de conejo contra NEP del virus influenza. Se cargaron 7 μ g de proteína total de lisados o 2 μ g d NEP recombinante en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal de conejo NEP, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo acoplado a

peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Un ensayo similar se realizó usando el AcM 7.30 y revelando con un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón. En este caso el AcM 7.30 sí reconoció una banda de aproximadamente 25 kDa en los lisados de las células infectadas con los tres virus (Figura 11). Asimismo, también reconoció, al igual que el anticuerpo policlonal anti-NEP, el monómero y dímero de 14 y 28 kDa, respectivamente, de la proteína NEP recombinante. La banda reconocida de 25 kDa en las células infectadas muy probablemente es también un dímero de NEP, aunque difiere en el peso del dímero reconocido en NEP recombinante probablemente por diferencias postraduccionales.

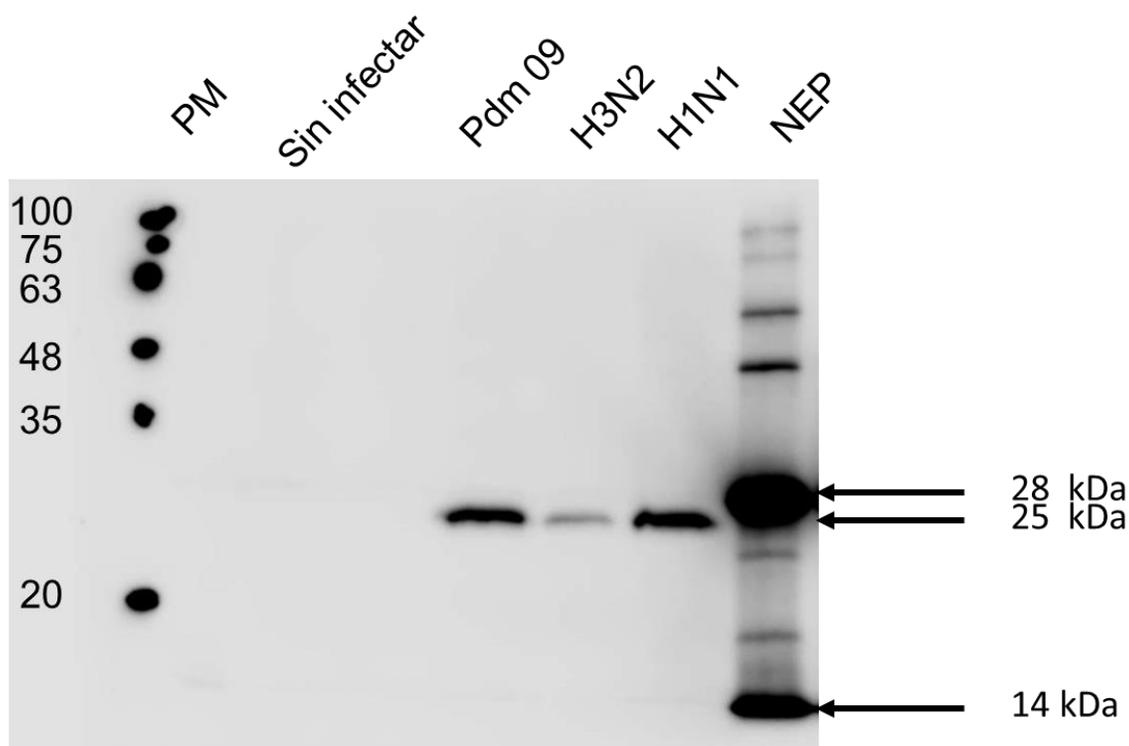


Figura 11. Western blot que muestra la especificidad del AcM anti-NEP 7.30. Se cargaron 6 µg de proteína total de lisados o 2 µg d NEP recombinante en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el AcM 7.30, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Para corroborar que los lisados tenían efectivamente proteínas de influenza, la membrana de nitrocelulosa fue tratada con glicina para eliminar los anticuerpos enlazados y se reanalizó usando un AcM contra la proteína M1 de influenza, seguido de

un anticuerpo de cabra contra IgG de ratón. Como se puede observar en la figura 12, solamente en los carriles de los lisados de células infectadas se detecta una banda de aproximadamente 23 KDa correspondiente a M1, lo que demuestra que los lisados mantenía la presencia de proteínas virales.

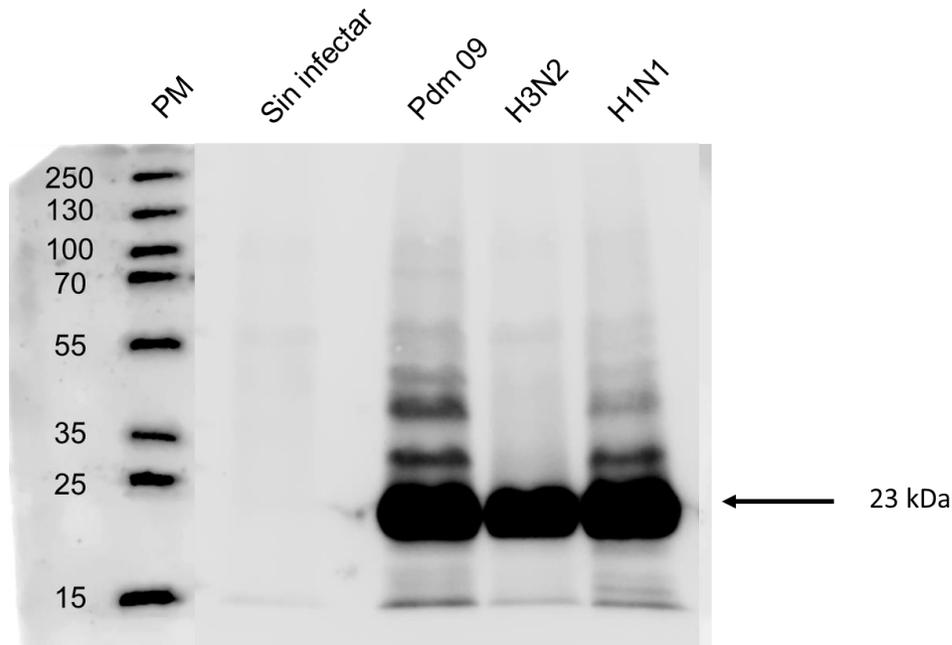


Figura 12. Western blot que muestra la proteína M1 del virus influenza. Se cargaron 6 µg de proteína total de lisados en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el AcM anti-M1 de influenza HB64, seguido de in anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Estos resultados sugieren que el anticuerpo 7.30 es capaz de reconocer NEP nativa sintetizada en una infección por el virus pandémico y al menos de dos virus estacionales.

Usando las mismas condiciones experimentales empleadas para el AcM 7.30, se analizó la especificidad de los AcM 3F10.70, 3F10.70.1 y 3F10.82. Se encontró que ningún AcMs reconoció a la proteína NEP producida en la infección por los tres diferentes virus, aunque sí reconocieron los monómeros y dímeros de la proteína NEP recombinante (datos no mostrados). En la figura 13 se muestra un ensayo representativo donde el AcM 3F10.70 no reconoce NEP producido en células infectadas por el virus pandémico, pero sí a la proteína NEP recombinante. Como control positivo se usó el AcM 7.30 que reconoció la proteína NEP del virus pandémico y a la proteína recombinante. Estos resultados nos

indican que a diferencia de del AcM 7.30, los AcM 3F10.70, 3F10.70.1 y 3F10.82 reconocen, como era de esperarse, a la proteína NEP recombinante pero no reconocen a la proteína sintetizada en infección por el virus pandémico ni de los virus estacionales en un ensayo de western blot.

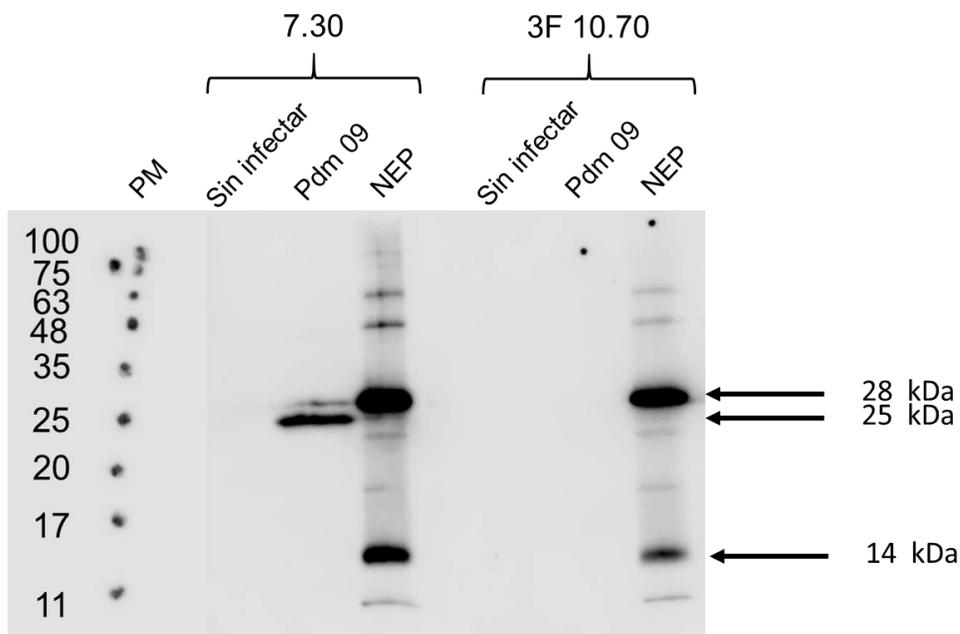


Figura 13. Western blot que muestra la especificidad de los AcMs anti-NEP 7.30 y 3F10.70. Se cargaron 6 μ g de proteína total de lisados o 2 μ g d NEP recombinante en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el AcM 7.30 o 3F10.70, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Un resultado interesante fue el hecho que el AcM 7.30 solo reconoce dímeros de la proteína NEP sintetizada en infección, pero puede reconocer dímeros y monómeros en la proteína NEP recombinante. De esta manera, se realizó un experimento para determinar si usando un agente reductor como β -2- mercaptoetanol se pudieran generar monómeros en NEP de células infectadas. Para esto, se realizó un western blot en el cual se usaron lisados de células sin infectar o infectados con el virus pandémico y como control positivo la proteína NEP recombinante en condiciones no reducidas y reducidas. El western blot se trató con el AcM 7.30 en las condiciones antes descritas en condiciones no reducidas y reducidas. Se encontró que en condiciones reducidas el AcM reconocía predominantemente la forma monomérica de la proteína NEP recombinantes, sin

embargo, en las células infectadas seguía reconociendo solamente la forma dimérica (Figura 14). Este resultado indica que el dímero de NEP producido en células infectadas es resistente al tratamiento con β -2- mercaptoenol y que muy probablemente el AcM 7.30 reconoce solamente a la forma dimérica de NEP de células infectadas, a pesar que es capaz de reconocer formas monoméricas de la proteína recombinante.

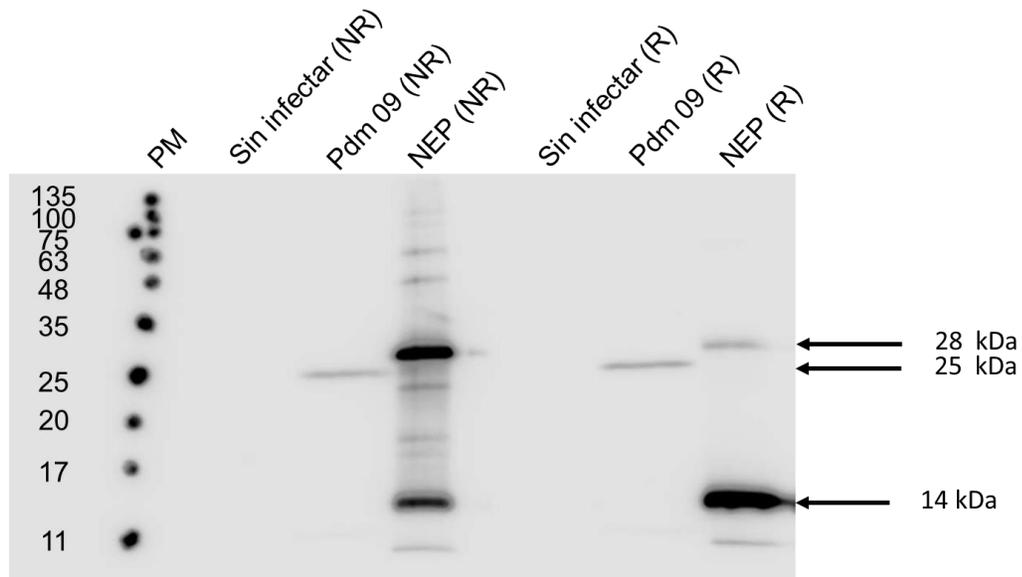


Figura 14. Western blot que muestra la especificidad del AcM 7.30 anti-NEP en condiciones reductoras o no reductoras. Se cargaron 6 μ g de proteína total de lisados o 2 μ g d NEP recombinante en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras (NR) o reductoras(R) y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el AcM 7.30, seguido de un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas se revelaron con Luminol. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Reconocimiento de NEP producido en infección por los AcMs en un ensayo de ELISA con células fijadas

El siguiente objetivo fue determinar si los AcM podían reconocer a la proteína NEP *in situ* en células infectadas. De esta manera, se realizó un ensayo tipo ELISA en células MDCK. Las células fueron infectadas por 16 h con el virus influenza pandémico, fijadas, permeabilizadas y tratadas con diferentes concentraciones de los AcM. Como controles positivos, se usaron el AcM anti-M1 y el anticuerpo policlonal anti-NEP. Células no

infectadas fueron tratadas de la misma manera y los valores de absorbancia obtenidos para cada AcM fue restado de los valores de absorbancia de las células infectadas. Se encontró que solamente el AcM 7.30 pudo reconocer a NEP en las células infectadas con el virus pandémico (Figura 15). Como se esperaba, el AcM anti-M1 tuvo un alto nivel de reconocimiento de las células infectadas, sin embargo al anticuerpo policlonal anti-NEP, al igual que los ensayos de western blot, no reconoció las células infectadas. Este resultado corrobora lo que se encontró con los ensayos de western blot, donde solamente el AcM 7.30 reconoció NEP de células infectadas.

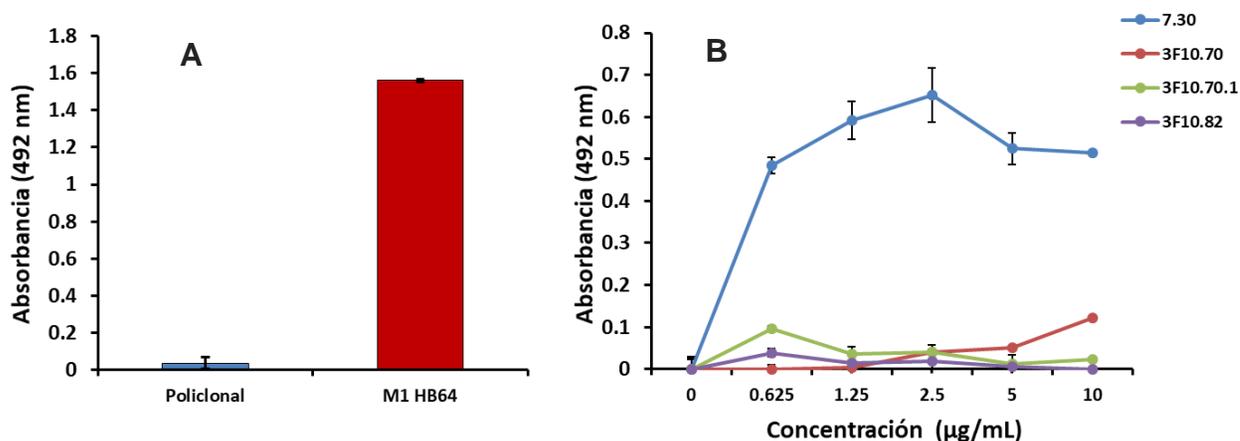


Figura 15. Ensayo de ELISA sobre células infectadas. Células MDCK fueron infectadas con el virus influenza A/H1N1/Pdm/09 por 16 hr, fijadas con formaldehído y permeabilizadas con metanol/acetona. Las células fueron incubadas con anticuerpos específicos, seguidos de anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo o ratón acoplados a peroxidasa y el ensayo revelado con orto-fenildiamina y leído en un lector de microplacas a 492 nm. (A) Anticuerpo policlonal comercial anti-NEP y anticuerpo monoclonal anti-M1 HB64 (control positivo). (B) Anticuerpos monoclonales anti-NEP. Las absorbancias de células sin infectar fueron restadas de las absorbancias de células infectadas.

DISCUSIÓN

La infección por el virus Influenza constituye un problema de salud pública importante a nivel mundial que se presenta como epidemias frecuentes y en ocasiones como pandemias imprevisibles (MINSA,2006).

Desde hace algunos años se han comenzado a emplear nuevas técnicas en la producción de AcM utilizando proteínas purificadas, fragmentos peptídicos de las mismas o bien proteínas recombinantes producidas en sistemas bacterianos. Todas estas alternativas tienen como atributo la simplificación en la obtención del monoclonal requerido dado que se inmuniza al animal con un producto químicamente definido facilitando la selección del AcM (Annibali, 1994).

Todos los AcM específicos para NEP evaluados; 7.30, 3F10.70, 3F10.82 y las clonas 3F1070.1 y 3F1070.6 pertenecen al isotipo IgG y al subtipo IgG1 con cadena ligera κ . Este dato es importante para futuros experimentos dirigidos a caracterizar en más detalle las propiedades de estos AcM.

Los AcM fueron generados usando la proteína NEP recombinante del virus influenza pandémico A/H1N1/Pdm/09 producida en bacterias como inmunógeno, por lo que era importante determinar si también podían reconocer a la proteína NEP nativa producida en una infección. Por ensayos de western blot se encontró, como se esperaba, que todos los AcM reconocen a la proteína NEP recombinante, pero solamente el AcM 7.30 fue capaz de reconocer a NEP producida en células infectadas con el virus pandémico A/H1N1/Pdm/09 y con los virus estacionales A/H1N1/NewCaledonia/20/99 y A/H3N2/NT/60/68. Lo mismo sucedió en un ensayo de ELISA sobre células infectadas con el virus pandémico. Esto indica que el AcM 7.30 reconoce un epítipo conservado de NEP entre los diferentes virus analizados, por lo que este AcM será de gran utilidad para estudiar en detalle la biología de NEP en células infectadas.

Sorpresivamente se encontró por western blot, que bajo condiciones desnaturalizantes y reducidas el AcM 7.30 reconoce lo que parece ser un dímero de NEP, a pesar de que es capaz de reconocer tanto dímeros como monómeros de la proteína NEP recombinante.

Más estudios son necesarios usando agentes desnaturalizantes más potentes para determinar si el dímero producido en las células infectadas se puede disgregar en monómeros.

El hecho que el AcM 7.30 reconozca a NEP sintetizada en infección por western blot y un ensayo de ELISA sobre células infectadas, sugiere que el epítipo que reconoce es lineal. Esto se podrá dilucidar en experimentos futuros dirigidos a determinar la secuencia del epítipo reconocido por este AcM.

Como resultado de este estudio, no se puede descartar aún que los AcM 3F10.70, 3F10.70.1 y 3F10.82 no reconozcan NEP producida en infección. Es posible estos AcM tengan menor afinidad por NEP que el AcM 7.30 y bajo las condiciones empleadas en este estudio no se pueda detectar su actividad. Sería interesante realizar más estudios usando técnicas de detección más potentes.

CONCLUSIÓN

En conclusión, de la batería de AcM específicos para NEP recombinante, solamente el AcM 7.30 fue capaz de reconocer la proteína sintetizada en una infección tanto del virus pandémico A/H1N1/Pdm/09 como de los virus estacionales A/H1N1/NewCaledonia/20/99 y A/H3N2/NT/60/68. De esta manera, este AcM será de gran importancia para futuros trabajos sobre la biología de NEP, ya que hasta este momento no está reportado en la bibliografía ningún AcM contra NEP del virus influenza A.

REFERENCIAS

- Annibali, N. (1994). Desarrollo de anticuerpos monoclonales para la identificación y caracterización de nuevos antígenos asociados a tumores (Tesis de posgrado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Castillo, O. O., Valdés, L. M., Moreno, M. d., Valle, D. G., y Negrín., J. G. (2010). Inmunopatología de la influenza A H1N1. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 14(1), 280-294. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942010000100029
- Cros, J. F., y Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Research*, 95(1-2), 3-12.
- Holsinger, L., y Lamb, R. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, 183(1), 32-43.
- Hilleman, M. R. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*, 20(25-26), 3068-3087.
- Kapoor, S., y Dhama, K. (2014). Chapter 2. Properties of influenza Viruses. En *Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans* (págs. 7-13). Springer.
- Lamb, R. A., y Krug, R. M. (1996). *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Philadelphia : Fields Virology.
- Landreau, F. (2016). Efecto de la infección con cepas circulantes en Argentina de virus influenza A durante la preñez sobre la población de neuronas dopaminérgicas en desarrollo. doi:<https://doi.org/10.13140/rg.2.2.23390.13122>
- Lara-Sampablo, A., Flores-Alonso, J. C., De Jesús-Ortega, N., Santos-López, G., Vallejo-Ruiz, V., Rosas-Murrieta, N., Reyes-Carmona, S., Herrera-Camacho, I., y Reyes-Leyva, J. (2014). Transfection of Influenza A Virus Nuclear Export Protein induces the expression of Tumor Necrosis Factor alpha. *ScienceDirect*, 185, 1-9.
- Martinez, M. (2017). Producción de las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 en *escherichia coli*, purificación y obtención de anticuerpos monoclonales. (tesis de maestría). BUAP, Puebla Pue.
- McAuley, J. L., Hornung, F., Boyd, K. L., Smith, A. M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J. W., y McCullers, J. A. (2007). Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the

- Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. *Cell Host Microbe*, 2(4), 240-249.
- Min, J.-Y., y Subbarao, K. (2010). Cellular targets for influenza drugs. *Nature Biotechnology*(28), 239–240. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt0310-239>.
- Ministerio de salud. (2006). *Influenza aviar A H5N1 en humanos* (Primera ed.). Lima, Perú: MINSA. Obtenido de <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417244/-422749421329913350420191106-32001-l3gw4q.pdf>
- Mould, J. A., Li, H.-C., Dudlak, C. S., Lear, J. D., Pekosz, A., Lamb, R. A., y Pinto, L. H. (2000). Mechanism for proton conduction of the M(2) ion channel of influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (12), 8592–8599.
- Nicholls, H. (2016). *Pandemic Influenza: The Inside Story*. Obtenido de PLOS BIOLOGY: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0040050>
- O'Neill, R. E., Talon, J., y Palase, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*, 17(1), 288-296.
- Ortín, J. (2006). 2. Biología molecular del virus de la gripe . En R. A. FARMACIA, *Monografía XXI. Influenza aviar y Gripe humana de origen aviario* (págs. 35-75). Madrid.
- Paterson, D., y Fodor, E. (2012). Emergin Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLOS PATHOGENS*, 8(12), e1003019.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., y Krug, R. M. (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(4), 1618–1622.
- Rojas-Espinoza, O. (2006). *Inmunología (de memoria)* (Tercera ed.). México: MÉDICA PANAMERICANA S.A. de C.V.
- Szewczyk, B., Biénkowska-Szewczyk, K., y Król, E. (2014). Intoduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 397-401.
- Talledo, M., y Zumaeta, K. (2009). Los virus influenza y la pandemia A/H1N1. *Revista peruana de biología*, 16 (2): 227-238.
- Weisan Chen, P. A. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*(7), 1306–1312.

WHO. (2013). *Influenza Update N° 191*. Obtenido de World Health Organization:
http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2013_08_02_surveillance_update_191.pdf

Zhirnov, O. (1992). Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*, 186(1), 324-330.