

Silvia Valledor Martín

Diseño y generación de partículas  
virales recombinantes de rna para  
su uso en productos de  
diagnostico molecular.

Director/es

Tomás Mateo, Elena De  
Gómez-Moreno Calera, Carlos

**EXTRACTO**

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral [Extracto]

DISEÑO Y GENERACIÓN DE PARTÍCULAS  
VIRALES RECOMBINANTES DE RNA PARA SU  
USO EN PRODUCTOS DE DIAGNOSTICO  
MOLECULAR.

Autor

Silvia Valledor Martín

Director/es

Tomás Mateo, Elena De  
Gómez-Moreno Calera, Carlos

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Escuela de Doctorado

2021



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**DISEÑO Y GENERACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES  
RECOMBINANTES DE RNA PARA SU USO EN  
PRODUCTOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Memoria presentada por Silvia Valledor Martín para optar al Grado de Doctora  
por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por los Doctores

Elena de Tomás Mateo y Carlos Gómez-Moreno Calera

Zaragoza, Septiembre 2021

**CerTest**  
BIOTEC



**Esta Tesis Doctoral se ha realizado con una beca de formación de doctores en empresas “Doctorados Industriales” otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad a Silvia Valledor Martín y a la empresa CerTest Biotec S.L. (DI-16-08705), durante los años 2017-2021.**



**D.ª ELENA DE TOMÁS MATEO**, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Zaragoza e Investigadora en CerTest Biotec S.L.

Y

**D. CARLOS GÓMEZ-MORENO CALERA**, Doctor en Ciencias (Biológicas) y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

#### **CERTIFICAN**

Que la Tesis Doctoral “Diseño y generación de partículas virales recombinantes de RNA para su uso en productos de diagnóstico molecular” ha sido realizada en la empresa CerTest Biotec S.L., bajo su dirección y tutela, y que reúne, a su juicio, las condiciones para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza.

Para que así conste, firman el presente certificado en Zaragoza, 1 de Septiembre de 2021.

Fdo. D.ª Elena de Tomás Mateo

Fdo. D. Carlos Gómez-Moreno Calera



# AGRADECIMIENTOS

---



En primer lugar, quiero agradecer a Carlos Genzor y Óscar Landeta, socios fundadores de CerTest Biotec S.L., por hacer posible esta realidad. Para mí CerTest Biotec S.L. es sinónimo de éxito, crecimiento, oportunidades, innovación y excelente equipo humano. No puedo sentirme más agradecida de formar parte de esta empresa y haber podido desarrollar la Tesis Doctoral en ella. Gracias a Carlos Genzor por el apoyo, la confianza, la cercanía y por poner a mi alcance siempre los recursos y las herramientas en el momento preciso.

En segundo lugar, agradecer a Elena de Tomás, como Directora de Tesis, por ser la promotora de este proyecto, por sus conocimientos y amplia experiencia en el campo de la Biología Molecular y en el trabajo con vectores lentivirales, por su implicación, apoyo y continua supervisión. Agradecer a Carlos Gómez-Moreno, como Director de Tesis, porque tras su extensa carrera científica es un privilegio estar bajo su dirección, por los consejos recibidos durante todo este tiempo y, sobre todo, por mostrar su confianza y apoyo en los momentos más necesarios.

En tercer lugar, agradecer a Laura Llobet por ser parte de este proyecto, saber escuchar, ser mi guía y apoyo. Agradecer a Javier Garfella todas sus aportaciones en este proyecto y todas las reuniones que, sin excepción, fueron inspiradoras y motivantes. Agradecer enormemente a Juan Martínez su implicación en la última etapa del proyecto, por el esfuerzo, el tiempo invertido y las aportaciones en la revisión de la memoria escrita.

Gracias a todo el equipo de CerTest Biotec S.L., especialmente al área de Biología Molecular, a los que han estado siempre y siguen estando, porque han sido unos años increíbles gracias a vosotros. A todas las personas que de algún modo han formado parte de este proyecto, a las que me han enseñado algo valioso tanto a nivel personal como profesional y con las que he compartido momentos dentro y fuera de la empresa. Agradecer especialmente a Eva Machetti, por ser más que una compañera, una amiga que me ha ayudado enormemente durante este recorrido, por ser la primera en iniciarse en este mundo, abrir y facilitar el camino.

Gracias a Lara Berdiel, Elisa Gascón, María Fuertes, Inés Serrano, Yolanda Jiménez y Andrea Ramírez, por compartir la ilusión por este proyecto, ser unas compañeras excelentes, dar cada día lo mejor de vosotras mismas y por seguir sumando retos juntas.

Gracias al Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO) (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza), especialmente a Carmen Cons y Clementina Rodellar, por acercarnos la técnica de PCR digital, por vuestra disposición, amabilidad, conocimientos y tiempo invertido. Al Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), especialmente a María de Toro, por acercarnos la técnica de secuenciación masiva y explicarnos con precisión y detalle cada paso del procedimiento. Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza), especialmente a Patricio Silva, por el uso de la ultracentrífuga y ayudarnos con cualquier cuestión técnica.

Gracias a mis amigos por todos los momentos de desconexión, alegría, risas, conversación, apoyo y por seguir sumando experiencias juntos. Gracias a mi familia por su apoyo incondicional, por preocuparse y cuidarme siempre. A mi abuela, ojalá estuvieras aquí, siempre seguirás con nosotros. A mi abuelo, por ser nuestra historia, por cómo eres y lo que nos transmites. A Fadi, gracias por tu apoyo y por aportarnos calma y felicidad. A mis padres, gracias por transmitirnos con vuestro ejemplo el valor del esfuerzo y el sacrificio, la motivación por conseguir cualquier objetivo, por hacernos felices, acompañarnos en todo momento y poder contar siempre con vuestra ayuda. A Inés, mi hermana, por absolutamente todo, que gran suerte tenerte, gracias por estar ahí siempre.



## ABREVIATURAS

---



<b>A<sub>260nm</sub></b>	Absorbancia medida a 260 nm
<b>A<sub>280nm</sub></b>	Absorbancia medida a 280 nm
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>AT</b>	Adenina-timina
<b>atm</b>	Atmósfera
<b>b</b>	Longitud de paso de la cubeta
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina, del inglés <i>bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	Concentración
<b>CA</b>	Cápside
<b>CB05</b>	<i>Cell Boost 5</i>
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, del inglés <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CDM-HD</b>	Medio químicamente definido para cultivo celular de alta densidad, del inglés <i>Chemically Defined Medium for High Density cell culture</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CIBIR</b>	Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
<b>cm</b>	Centímetro(s)
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>cPPT</b>	Tracto central de polipurina, del inglés <i>central polypurine tract</i>
<b>C<sub>q</sub></b>	Ciclo de cuantificación, del inglés <i>quantification cycle</i>
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>D</b>	Dilución
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>DIS</b>	Señal de inicio de la dimerización, del inglés <i>dimer initiation signal</i>
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco, del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena, del inglés <i>double-stranded DNA</i>
<b>DTNB</b>	5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>E</b>	Eficiencia de la reacción de qPCR
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EGFP</b>	Proteína fluorescente verde mejorada, del inglés <i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>Env</b>	Proteína de envuelta
<b>FC</b>	Factor de concentración
<b>g</b>	Gramo(s)
<b>GC</b>	Guanina-citosina
<b>GMP</b>	Buenas prácticas de fabricación, del inglés <i>good manufacturing practices</i>
<b>h</b>	Hora(s)
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HBSS</b>	Solución salina balanceada de Hanks, del inglés <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
<b>HSA</b>	Albúmina sérica humana, del inglés <i>human serum albumin</i>
<b>IA2</b>	Instituto Agroalimentario de Aragón

<b>IN</b>	Integrasa
<b>JCTLM</b>	Comité Conjunto para la Trazabilidad en Medicina de Laboratorio, del inglés <i>Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine</i>
<b>k</b>	Número de particiones positivas en PCR digital
<b>kb</b>	Kilobase(s)
<b>kDa</b>	Kilodalton(s)
<b>LAGENBIO</b>	Laboratorio de Genética Bioquímica
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LCR</b>	Lentivirus competente para la replicación
<b>Log<sub>10</sub></b>	Logaritmo en base 10
<b>LTR</b>	Repeticiones terminales largas, del inglés <i>long terminal repeat</i>
<b>MA</b>	Proteína de matriz
<b>mbar</b>	Milibar(es)
<b>MERS-CoV</b>	Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>ml</b>	Mililitro(s)
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección, del inglés <i>multiplicity of infection</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MWCO</b>	Peso molecular de corte, del inglés <i>molecular weight cut off</i>
<b>n</b>	Número total de particiones en PCR digital
<b>NA</b>	Neuraminidasa
<b>NC</b>	Nucleocápside
<b>NCPV</b>	Colección Nacional de Virus Patogénicos, del inglés <i>National Collection of Pathogenic Viruses</i>
<b>NERT</b>	Retrotranscripción endógena natural, del inglés <i>natural endogenous reverse transcription</i>
<b>ng</b>	Nanogramo(s)
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación, del inglés <i>next-generation sequencing</i>
<b>NIBSC</b>	Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos, del inglés <i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
<b>nm</b>	Nanómetro(s)
<b>NP</b>	Nucleoproteína
<b>NS</b>	Proteína no estructural
<b>nt</b>	Nucleótido(s)
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidad óptica medida a 600 nm
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura, del inglés <i>open reading frame</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Sitio de unión del cebador, del inglés <i>primer binding site</i> o Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i> (según contexto)
<b>PCA</b>	Ensamblaje cíclico de la polimerasa, del inglés <i>polymerase cycling assembly</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>poliA</b>	Señal de poliadenilación
<b>ppt</b>	Región de polipurina, del inglés <i>polypurine tract</i>
<b>PR</b>	Proteasa
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación de Pearson
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RRE</b>	Elemento de respuesta a Rev, del inglés <i>Rev-response element</i>
<b>RSV</b>	Virus respiratorio sincitial, del inglés <i>respiratory syncytial virus</i>

<b>RT</b>	Retrotranscriptasa
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa, del inglés <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>S</b>	Espícula
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
<b>SD</b>	Donador principal de corte-empalme, del inglés <i>major splice donor</i>
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SIN</b>	Autoinactivado, del inglés <i>self-inactivating</i>
<b>SL</b>	Estructura de tallo-bucle, del inglés <i>stem-loops</i>
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena simple, del inglés <i>single-stranded DNA</i>
<b>TAR</b>	Elemento de respuesta a la transactivación, del inglés <i>trans-activation response element</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Th</b>	Umbral de fluorescencia, del inglés <i>threshold</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión, del inglés <i>melting temperature</i>
<b>Tris-HCl</b>	Tris-(hidroximetil) aminometano clorhidrato
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>U</b>	Unidad(es)
<b>UTR</b>	Región del mRNA no traducida, del inglés <i>untranslated region</i>
<b>V<sub>0</sub></b>	Volumen inicial
<b>V<sub>f</sub></b>	Volumen final
<b>VIH-1</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
<b>VIH-2</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
<b>V<sub>p</sub></b>	Volumen de la partición
<b>VSV-G</b>	Glicoproteína de envuelta del virus de la estomatitis vesicular
<b>WPRE</b>	Elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota, del inglés <i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
<b>ΔC<sub>q</sub></b>	Diferencia en el valor de C <sub>q</sub>
<b>ε</b>	Coeficiente de extinción molar
<b>λ</b>	Media de moléculas diana que se encuentran por partición en PCR digital
<b>μg</b>	Microgramo(s)
<b>μl</b>	Microlitro(s)
<b>μm</b>	Micrómetro(s)
<b>σ</b>	Desviación típica
<b>Ψ</b>	Señal de empaquetamiento, PSI
<b><math>\bar{x}</math></b>	Media



# ÍNDICE

---



<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>II.1 INTRODUCCIÓN A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>7</b>
II.1.1 Fundamentos básicos de la reacción en cadena de la polimerasa	7
II.1.2 PCR en Tiempo Real	9
II.1.2.1 Interpretación de resultados obtenidos por PCR en Tiempo Real	11
II.1.2.2 Relevancia de la PCR en Tiempo Real en el diagnóstico clínico y otras aplicaciones	13
II.1.3 PCR Digital	14
<b>II.2 MATERIALES DE REFERENCIA PARA PCR EN TIEMPO REAL</b>	<b>17</b>
II.2.1 Materiales de referencia para el control del proceso de amplificación por qPCR	18
II.2.1.1 Secuencias sintéticas de DNA	19
II.2.1.2 RNA transcrito <i>in vitro</i>	23
II.2.2 Materiales de referencia para el control del proceso de extracción del material genético y amplificación por qPCR	23
II.2.2.1 Virus salvaje ( <i>wild-type</i> )	23
II.2.2.2 Partículas virales recombinantes	24
<b>II.3 VECTORES VIRALES</b>	<b>25</b>
II.3.1 Introducción a los vectores virales	25
II.3.2 Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)	27
II.3.2.1 Genoma y estructura del VIH-1	27
II.3.2.2 Ciclo vital del VIH-1	29
II.3.3 Generación de partículas virales recombinantes mediante el sistema lentiviral	36
II.3.3.1 Desarrollo de diferentes generaciones de plásmidos lentivirales	38
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>43</b>
<b>III.1 ELECCIÓN DEL TIPO DE VECTOR VIRAL UTILIZADO PARA LA GENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA</b>	<b>43</b>
<b>III.2 DISEÑO DEL PLÁSMIDO LENTIVIRAL DE TRANSFERENCIA</b>	<b>43</b>
III.2.1 Diseño del inserto	43
III.2.2 Selección de la cepa de referencia	44
<b>III.3 CULTIVOS BACTERIANOS</b>	<b>44</b>
III.3.1 Preparación de medios de cultivo	44
III.3.2 Transformación de bacterias competentes	45
III.3.3 Extracción de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano	46
<b>III.4 CULTIVOS CELULARES DE EUCARIOTA</b>	<b>47</b>
III.4.1 Medios de cultivo	47
III.4.2 Mantenimiento del cultivo	48
III.4.3 Recuento celular	48
III.4.4 Congelación y descongelación de células	49
III.4.5 Ensayos de infectividad de las partículas virales sobre un cultivo celular	49
III.4.5.1 Curva de muerte de las células 293T en presencia de puromicina	50

III.4.5.2	Determinación de la multiplicidad de infección	51
III.4.5.3	Análisis de la capacidad infectiva de las partículas virales y determinación de la viabilidad celular tras la infección	53
<b>III.5</b>	<b>PURIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES</b>	<b>55</b>
III.5.1	Tratamiento con nucleasas del sobrenadante viral	56
III.5.1.1	Comparativa de nucleasas comerciales	56
III.5.1.2	Diferentes tratamientos con DNasa	57
III.5.1.3	Optimización del tampón de digestión con DNasa	58
III.5.2	Purificación por ultracentrifugación del sobrenadante viral	59
III.5.2.1	Ultracentrifugación en una solución de sacarosa	59
III.5.2.2	Ultracentrifugación en gradiente de velocidad	60
III.5.2.3	Reacción de Ellman	62
<b>III.6</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES</b>	<b>63</b>
<b>III.7</b>	<b>CUANTIFICACIÓN</b>	<b>64</b>
III.7.1	Cuantificación de DNA plasmídico	64
III.7.2	Cuantificación de RNA viral por fluorescencia	65
<b>III.8</b>	<b>ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL</b>	<b>66</b>
III.8.1	Realización de ensayos qPCR y RT-qPCR	66
<b>III.9</b>	<b>ENSAYOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES</b>	<b>67</b>
III.9.1	Compatibilidad con diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos	68
III.9.2	Compatibilidad con diferentes ensayos de PCR en Tiempo Real	69
III.9.3	Ensayos de precisión	70
<b>III.10</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES</b>	<b>71</b>
III.10.1	Envejecimiento acelerado	72
III.10.2	Estabilidad en uso	73
III.10.3	Estabilidad en el transporte	74
<b>III.11</b>	<b>SECUENCIACIÓN MASIVA</b>	<b>74</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>V.1</b>	<b>DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA GENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA</b>	<b>81</b>
V.1.1	Diseño del inserto y clonación en el vector lentiviral	82
V.1.2	Selección del sistema de extracción de los plásmidos lentivirales	84
V.1.3	Estrategias para la purificación de los sobrenadantes virales	85
V.1.3.1	Tratamiento con nucleasas del sobrenadante viral	85
V.1.3.2	Transfección con un plásmido de empaquetamiento defectivo para la retrotranscriptasa	94
V.1.3.3	Purificación por ultracentrifugación del sobrenadante viral	96
V.1.3.4	Modificación del proceso de transfección	102
<b>V.2</b>	<b>ELABORACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA Y VALIDACIÓN PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO DE ENSAYOS RT-qPCR</b>	<b>105</b>
V.2.1	Selección de los virus sobre los que implementar un sistema de generación <i>in vitro</i> de partículas virales recombinantes de RNA	105
V.2.1.1	Virus SARS-CoV-2	105
V.2.1.2	Virus respiratorio sincitial	106
V.2.1.3	Virus de influenza A e influenza B	106

V.2.2	Diseño de los diferentes plásmidos de transferencia que contienen el genoma de los virus de interés	107
V.2.3	Cuantificación absoluta del RNA contenido en las partículas virales recombinantes generadas <i>in vitro</i> mediante el sistema lentiviral	110
V.2.4	Evaluación de la funcionalidad de las partículas virales recombinantes de RNA para su uso como control positivo de ensayos de RT-qPCR	112
V.2.4.1	Análisis de compatibilidad con diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos	113
V.2.4.2	Análisis de compatibilidad con diferentes ensayos de PCR en Tiempo Real	115
V.2.4.3	Análisis de la reproducibilidad y repetibilidad de las partículas virales recombinantes de RNA.	118
V.2.5	Evaluación de la estabilidad de las partículas virales recombinantes de RNA	120
V.2.5.1	Determinación de la vida útil de las partículas virales mediante envejecimiento acelerado	120
V.2.5.2	Análisis de la estabilidad en uso de las partículas virales recombinantes de RNA	122
V.2.5.3	Análisis de la estabilidad en el transporte de las partículas virales recombinantes de RNA	124
V.2.6	Evaluación de la capacidad infectiva de las partículas virales recombinantes de RNA	125
V.2.7	Secuenciación masiva del RNA contenido en las partículas virales recombinantes	130

---

**VI. DISCUSIÓN** **133**

---

**VII. CONCLUSIONES** **143**

---

**VIII. BIBLIOGRAFÍA** **147**

---

**IX. ANEXOS** **163**



## I. RESUMEN

---



La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se ha convertido en una de las técnicas de elección en el diagnóstico clínico por su rapidez, sensibilidad y especificidad. Esta técnica se ha implementado como reemplazo o apoyo a las técnicas de diagnóstico convencionales, ya que su rapidez y fiabilidad permiten, además de identificar al agente etiológico de la enfermedad, orientar el tratamiento del paciente, contener la infección y frenar los contagios. Recientemente, su papel en el control de la pandemia por el Coronavirus de tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) ha sido crucial para llevar a cabo un buen control epidemiológico. Además, esta técnica permite cuantificar el número de copias de un gen diana en particular, lo que resulta muy valioso como indicador de la evolución de un paciente a un determinado tratamiento.

El incremento de la disponibilidad de ensayos qPCR debe ir asociado a una mayor disponibilidad de materiales de referencia, esto es, controles del proceso que permitan validar la técnica y detectar posibles resultados falsos positivos o negativos, los cuales podrían tener un impacto desfavorable en la salud del paciente y en el control de la enfermedad. Por otra parte, estos controles son necesarios para comparar la sensibilidad y especificidad entre diferentes ensayos qPCR, interpretar los resultados de los análisis inter- e intra-laboratorio o llevar a cabo estudios de validación de ensayos qPCR cumpliendo la normativa vigente. Sin embargo, a pesar de su relevancia, la disponibilidad de controles del proceso para ensayos qPCR es limitada, ya sea por la escasa disponibilidad de muestras clínicas, en el caso de patógenos emergentes, exóticos y/o endémicos, la dificultad técnica de su cultivo o la necesidad de instalaciones de alto nivel de bioseguridad para su manipulación.

Un control de proceso debe cumplir idealmente los siguientes requisitos: monitorizar todas las etapas del proceso, presentar una estructura similar a la muestra testada, ser no infeccioso, reproducible, estable en el tiempo, y aplicable a una amplia gama de ensayos.

Existen en el mercado diferentes tipos de controles, en su mayoría consistentes en secuencias sintéticas de DNA, plásmidos que contienen el DNA de interés o secuencias de RNA obtenidas por transcripción *in vitro*. Estos controles permiten monitorizar la reacción de qPCR, pero no monitorizan con fidelidad el paso previo de extracción de ácidos nucleicos, ya que no imitan al patógeno que se desea identificar, carecen de estructura externa y son susceptibles a la degradación por nucleasas; y, en el caso de las secuencias sintéticas de DNA o DNA plasmídico, tampoco se monitoriza la etapa previa de retrotranscripción. Por otra parte, se comercializan cepas de diferentes bacterias, virus o parásitos que son aislados de pacientes con infección y permiten la monitorización completa del proceso de qPCR (incluyendo la extracción de ácidos nucleicos), pero, en algunos casos, su manipulación requiere medidas y contención propia de un nivel de bioseguridad 3 o superior, por lo que se precisa de instalaciones muy concretas y personal experimentado.

En este proyecto de investigación se propone una estrategia, basada en la transfección de células 293T con plásmidos lentivirales, para la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes, no infecciosas y de genoma RNA, dando respuesta a las limitaciones anteriormente comentadas. Los vectores lentivirales están ampliamente extendidos en el campo de la terapia génica, en virología o en el desarrollo de vacunas, sin embargo, su aplicación para la generación de controles de proceso de los ensayos de qPCR es novedosa.

Esta tecnología explota la capacidad que poseen los virus de empaquetar un ácido nucleico exógeno, siempre que su tamaño no exceda el límite del sistema y su secuencia contenga unas

mínimas señales de empaquetamiento. Se trata de un sistema muy versátil, mediante el cual es posible crear infinidad de controles, cuya estructura externa sea común a todos ellos (correspondiente a lentivirus) y el genoma empaquetado variable, en función del control de proceso diseñado.

En el presente proyecto, para la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de genoma RNA ha sido necesario, en primer lugar, la confección de una colección de plásmidos que contengan fragmentos del genoma o el genoma completo de los virus de interés. En segundo lugar, la puesta a punto de un protocolo de generación de partículas virales y, finalmente, la purificación de las partículas virales, su cuantificación por PCR digital y su estabilización mediante liofilización. Las partículas virales desarrolladas se han validado para su uso como control positivo de ensayos de RT-qPCR, evaluando su funcionalidad tras ser procesadas por diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos y diferentes ensayos de PCR en tiempo real, así como su reproducibilidad y repetibilidad. También se han realizado diferentes ensayos orientados a determinar la vida útil del producto y su estabilidad en diferentes condiciones. Por último, se ha evaluado su capacidad infectiva y se ha verificado, mediante secuenciación masiva, la secuencia del RNA contenido en las partículas virales.

Los resultados obtenidos indican que las partículas virales sintetizadas en este proyecto:

- Son partículas virales no infecciosas y defectivas para la replicación. Todas las partículas virales creadas mediante este sistema pueden ser manipuladas en nivel de bioseguridad tipo 2.
- Son un control fiable del proceso de extracción de ácidos nucleicos, ya que mimetizan la estructura de un virus salvaje, por lo que se consigue una monitorización completa del proceso, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la amplificación por qPCR, incluyendo la etapa previa de retrotranscripción.
- Se trata de un producto reproducible y estable en el tiempo. Se presenta en formato liofilizado, por lo que se puede transportar y almacenar a temperatura ambiente, y presenta una vida útil de dos años.
- De uso universal. Son compatibles con cualquier sistema optimizado de extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real y accesibles a cualquier laboratorio, sin necesidad de instalaciones y medidas de contención propias de un nivel de bioseguridad elevado.

## II. INTRODUCCIÓN

---



## II.1 INTRODUCCIÓN A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El término biología molecular fue acuñado en 1938 por Warren Weaver, matemático y director del departamento de ciencias naturales de la Fundación Rockefeller [1]. Años más tarde (1944), el físico cuántico Erwin Schrödinger publicó el libro «¿Qué es la vida?», donde contemplaba la estructura molecular de la vida desde un punto de vista físico, sugería que el código básico de la vida tenía la estructura de un «cristal aperiódico» y planteaba por primera vez la existencia de un código genético [2]. Sus ideas sirvieron de inspiración a James Watson y Francis Crick, quienes en 1953 descubrieron la estructura de doble hélice del DNA, apoyados por los resultados de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins [3].

Años más tarde (1958) Francis Crick postuló el dogma central de la biología molecular, el cual afirma que el DNA dirige su propia replicación y transcripción, dando lugar a un RNA mensajero (mRNA) y este mRNA es traducido a aminoácidos para constituir las proteínas [4]. En la década de 1960 se consiguió descifrar el código genético, gracias a las contribuciones de Marshall W. Nirenberg y Har Gobind Khorana [5], y se reveló así la correspondencia entre las 4 bases nitrogenadas que componen la secuencia del RNA y los 20 aminoácidos que conforman las proteínas. Gracias a este descubrimiento en décadas posteriores se comenzaron a desarrollar las diferentes tecnologías que hoy en día conforman el campo de la biología molecular, entre otras destacan, la tecnología del DNA recombinante, técnicas de amplificación y detección de ácidos nucleicos, técnicas de clonaje, síntesis de genes o técnicas de secuenciación.

Dentro de este contexto, en 1983 se produjo un hito que marcó la historia de la biología molecular: la invención por Kary Mullis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [6]. Esta técnica, desarrollada en profundidad en los siguientes apartados, ha trascendido a numerosas áreas de conocimiento y hoy en día cuenta con múltiples aplicaciones.

### II.1.1 FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la amplificación de un fragmento de DNA sin necesidad de su clonaje. Este fragmento de DNA es copiado millones de veces en presencia de los siguientes componentes esenciales [7]:

**-Cebadores específicos (*primers*):** son oligonucleótidos que presentan un tamaño aproximado de 20-25 nucleótidos (nt) que flanquean e hibridan en sentido directo (*forward*) o reverso (*reverse*) con una de las dos hebras del DNA molde.

**-Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs):** son el sustrato de la reacción y están constituidos por una base nitrogenada (adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C)) unida a una molécula de desoxirribosa, a la cual a su vez se le unen tres grupos fosfato. En la reacción de PCR se añaden los siguientes dNTPs en cantidades equimolares: desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxitimidina trifosfato (dTTP), desoxicitidina trifosfato (dCTP) y desoxiguanosina trifosfato (dGTP).

**-DNA polimerasa:** enzima que cataliza la síntesis de DNA, este proceso es dependiente de un DNA molde, sobre el cual la enzima va añadiendo los dNTPs complementarios. La enzima DNA polimerasa utilizada en un inicio era termolábil, por lo que se inactivaba tras la primera etapa de la PCR (etapa de desnaturalización que tiene lugar a elevada temperatura) y, por tanto, era necesaria su adición continuada en cada ciclo de PCR. El descubrimiento de una DNA polimerasa

termoestable (derivada de la bacteria *Thermus aquaticus*) [8] simplificó enormemente la metodología ya que esta enzima se mantiene activa durante todo el proceso.

**-Cationes divalentes:** la actividad de la DNA polimerasa es dependiente de este tipo de iones. En los ensayos de PCR generalmente se incluyen iones  $Mg^{+2}$ .

**-Solución tampón:** mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa. Generalmente se suele trabajar con el tampón Tris-(hidroximetil) aminometano clorhidrato (Tris-HCl) en un valor de pH próximo a 8.

**-DNA molde:** contiene el fragmento de DNA que se desea amplificar.

Los primeros ensayos de PCR utilizaban DNA como material de partida, pero pronto se extendió su aplicación a RNA [9-11]. En este caso se requiere un componente adicional:

**-Retrotranscriptasa (RT) o transcriptasa inversa:** es una enzima de tipo DNA polimerasa que sintetiza DNA de doble hebra utilizando como molde RNA monocatenario, es decir, cataliza la conversión del RNA en DNA complementario (cDNA).

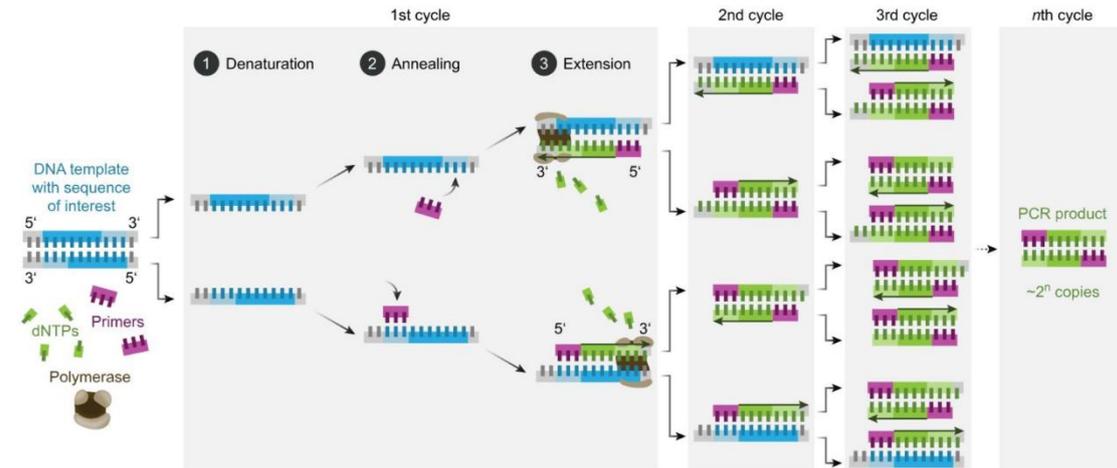
La reacción de amplificación por PCR es exponencial y requiere de repetidos ciclos, generalmente 30-40 ciclos. Teóricamente en cada ciclo (n) se duplica la cantidad de DNA molde, por lo que al finalizar la reacción habrá  $2^n$  copias del DNA molde inicial. Un esquema de las diferentes etapas que se suceden de forma repetida en cada ciclo de PCR [6, 12] se muestra en la **Figura 1** y las particularidades de cada una de ellas se detallan a continuación:

Etapa 1-Desnaturalización: en esta etapa se produce la separación de la doble hebra del DNA molde, generalmente a una temperatura superior a  $90^{\circ}C$ .

Etapa 2-Hibridación: durante esta etapa se produce la unión de los cebadores específicos directo y reverso con el DNA molde, habitualmente la unión tiene lugar a una temperatura entre  $3^{\circ}C$  y  $5^{\circ}C$  inferior a la temperatura de fusión de los cebadores ( $T_m$ , del inglés *melting temperature*). El valor de  $T_m$  indica la temperatura a la cual el 50% del DNA de doble hebra se encuentra desnaturalizado, es decir, sus hebras se han separado. Este valor es dependiente de la secuencia y longitud que presente el cebador del cual se quiere averiguar su  $T_m$ , ya que este parámetro se calcula en base a su contenido de guanina-citosina (GC) y adenina-timina (AT). Las bases nitrogenadas GC se unen por complementariedad mediante tres puentes de hidrógeno, mientras que la unión AT tiene lugar a través de dos puentes de hidrógeno. De este modo, un cebador con un alto porcentaje de GC presentará una mayor dificultad para separar sus hebras, lo que conducirá a un valor de  $T_m$  más elevado.

Etapa 3-Extensión: en la etapa de extensión se produce la amplificación del DNA molde por la DNA polimerasa, mediante la adición de dNTPs. Generalmente la extensión tiene lugar en el rango de temperaturas de  $55^{\circ}C$ - $75^{\circ}C$ . Hoy en día es frecuente encontrar protocolos optimizados donde los pasos de hibridación y extensión se realizan de forma simultánea, ya que la hibridación de los cebadores con el DNA molde y la extensión de este mediante la DNA polimerasa pueden realizarse a la misma temperatura.

En el caso de utilizar RNA como material de partida de la reacción de PCR, en lugar de DNA, se requiere un paso adicional, previo a la etapa de desnaturalización, en el cual se convierte el RNA en cDNA. Este paso se lleva a cabo por la enzima retrotranscriptasa, habitualmente a una temperatura entre  $45^{\circ}C$  y  $55^{\circ}C$ , que varía en función de la enzima utilizada.



**Figura 1.** Esquema de las diferentes etapas que se suceden repetidamente en cada ciclo ( $n$ ) de PCR, dando lugar a  $2^n$  copias del DNA de partida. Etapa 1: Desnaturalización (separación de la doble hebra del DNA molde); Etapa 2: Hibridación (unión de los cebadores específicos con el DNA molde); Etapa 3: Extensión (amplificación por la DNA polimerasa del DNA molde mediante la adición de dNTPs). Fuente: [13].

A partir de la técnica de PCR desarrollada por Kary Mullis, denominada PCR convencional, han ido surgiendo diferentes variantes, como las técnicas de PCR en tiempo real (qPCR), PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) o PCR digital, las cuales se abordan en profundidad en los siguientes apartados.

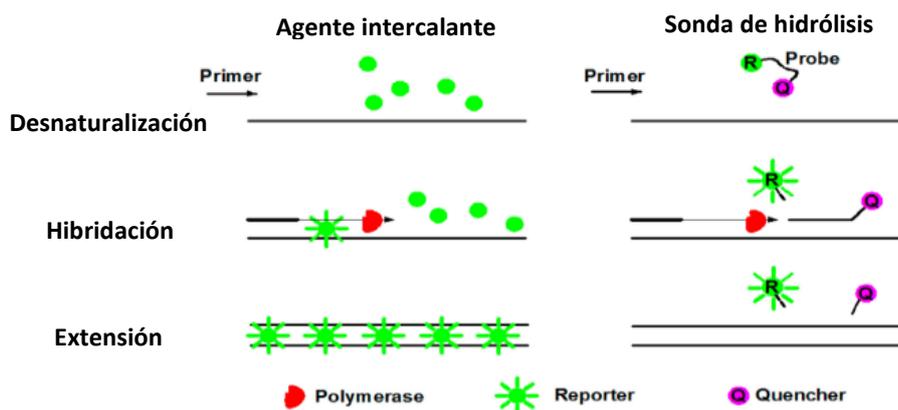
## II.1.2 PCR EN TIEMPO REAL

La técnica de PCR en tiempo real se diferencia de la PCR convencional por la incorporación en la reacción de una molécula fluorescente, denominada fluoróforo. De este modo, es posible visualizar los resultados a tiempo real, sin necesidad de realizar una electroforesis posterior. Cuando el material de partida que se desea amplificar es DNA, la técnica se denomina PCR en tiempo real, mientras que si el material de partida es RNA se requiere un paso previo de retrotranscripción y se denomina PCR en tiempo real con transcriptasa inversa.

La implementación de la técnica de PCR en tiempo real requiere la utilización de un equipo específico denominado termociclador, el cual debe contar con un bloque de resistencia eléctrica que permita realizar los ciclos de PCR a la temperatura y tiempo requeridos, además de con un sistema óptico capaz de excitar a los fluoróforos y de recoger la señal emitida. Esta señal es convertida en una curva de amplificación que refleja la cantidad de producto amplificado [14]. Existen diferentes tipos de termocicladores que difieren, entre otros, en formato, capacidad o sistema óptico. Algunos de los termocicladores más extendidos son AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform (Linear).

A principios de los noventa Higuchi et al. (1992, 1993) [15, 16] describieron el proceso de qPCR utilizando como molécula fluorescente bromuro de etidio y Becker et al. (1996) [17] utilizaron en su lugar SYBR Green I. Ambas moléculas se intercalan en la doble hebra de DNA de forma inespecífica y, por tanto, son los cebadores directo y reverso los que determinan la especificidad de la reacción. Con el objetivo de incrementar dicha especificidad, se comenzó a incluir en la reacción de qPCR un tercer oligonucleótido específico (sonda) unido a una molécula fluorescente, como alternativa a los agentes intercalantes inespecíficos [18-20].

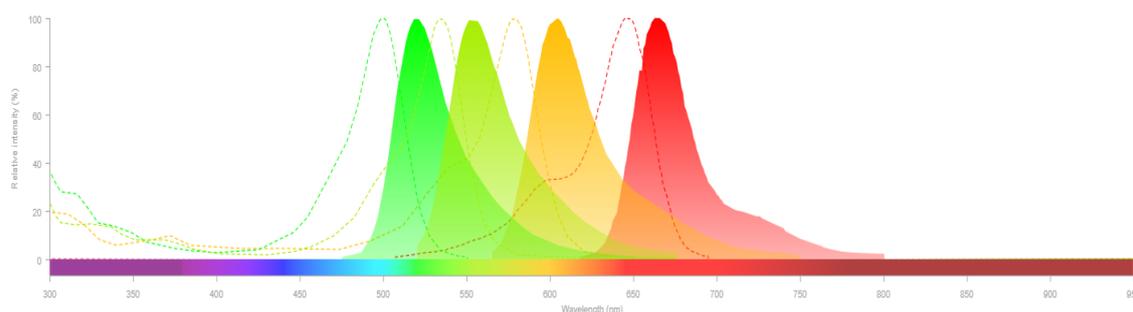
Hoy en día existen multitud de sondas basadas en diferentes tecnologías y con aplicaciones diversas [21]. El tipo de sonda cuyo uso está más extendido son las sondas de hidrólisis (en concreto el tipo TaqMan®) [18]. Estas sondas poseen en 5' una molécula donadora de fluorescencia (fluoróforo o *reporter*) y en 3' una molécula receptora de fluorescencia (*quencher*). La sonda en solución no emite señal debido a la proximidad de ambas moléculas. Sin embargo, durante la fase de extensión de la qPCR, la actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa degrada la sonda liberando ambas moléculas con la consiguiente emisión de fluorescencia. Un esquema del mecanismo de acción de los agentes intercalantes inespecíficos, tipo SYBR Green, frente al mecanismo de acción de las sondas de hidrólisis, tipo TaqMan®, se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema comparativo del mecanismo de acción de un agente intercalante, tipo SYBR Green, frente a una sonda de hidrólisis, tipo TaqMan®, durante las diferentes etapas (desnaturalización, hibridación y extensión) de la reacción de qPCR. Fuente: [22].

La incorporación de sondas en la reacción no solo incrementa su especificidad y sensibilidad, sino que además permite la detección simultánea de varias dianas en una misma reacción. En estos ensayos de qPCR, denominados multiplex, cada sonda se encuentra unida a un fluoróforo diferente, entre los más comunes destacan FAM (o su equivalente Alexa Fluor 488), HEX (o su equivalente Alexa Fluor 532), ROX y Cy5. Cada fluoróforo se excita a una determinada longitud de onda y emite a otra longitud de onda mayor, tal y como se muestra en la **Figura 3**.

Si los espectros de emisión de los fluoróforos empleados en el ensayo multiplex presentan zonas de solapamiento, se puede incurrir en un fenómeno de paso de fluorescencia o *cross-talk*. En este caso, la señal de un fluoróforo concreto puede ser leída en un canal adyacente, lo que conduce a la aparición de falsos positivos. Debido a ello, en la configuración de ensayos multiplex se recomienda trabajar con fluoróforos cuyos espectros se encuentren lo más distantes entre sí, aunque existen en el mercado ensayos específicos para corregir este fenómeno y en algunos termocicladores la corrección ocurre de forma automática.



**Figura 3.** Espectros de absorción (en línea discontinua) y emisión (en línea continua y área de la curva coloreada) correspondientes a los fluoróforos Alexa Fluor 488 (verde oscuro), Alexa Fluor 532 (verde claro), ROX (naranja) y Cy5 (rojo). Se representa la intensidad relativa (%) frente a la longitud de onda (nm). Fuente: [23].

### II.1.2.1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS POR PCR EN TIEMPO REAL

Durante la amplificación por qPCR se genera una señal fluorescente que refleja la cantidad de producto amplificado y se traduce en una curva de amplificación. La cinética de la reacción consta de 4 fases: 1) fase basal, 2) fase exponencial o logarítmica, 3) fase lineal y 4) fase estacionaria o *plateau* (Figura 4A).

Durante la fase inicial, la cual suele estar comprendida entre los 10-15 primeros ciclos, el nivel de fluorescencia es mínimo, no se consigue discriminar la señal del ruido basal y no se supera el umbral conocido como *threshold* (Th). El *threshold* se fija manual o automáticamente en la región exponencial de la curva de amplificación y determina el nivel a partir del cual el valor de fluorescencia es significativo.

En la fase exponencial, los reactivos de la reacción se encuentran en exceso, por lo que la eficiencia (E) de la amplificación se sitúa próxima al 100%. En esta fase se duplica la cantidad de DNA en cada ciclo, por lo que, pasado un determinado número de ciclos (n), la cantidad de producto será  $2^n$ .

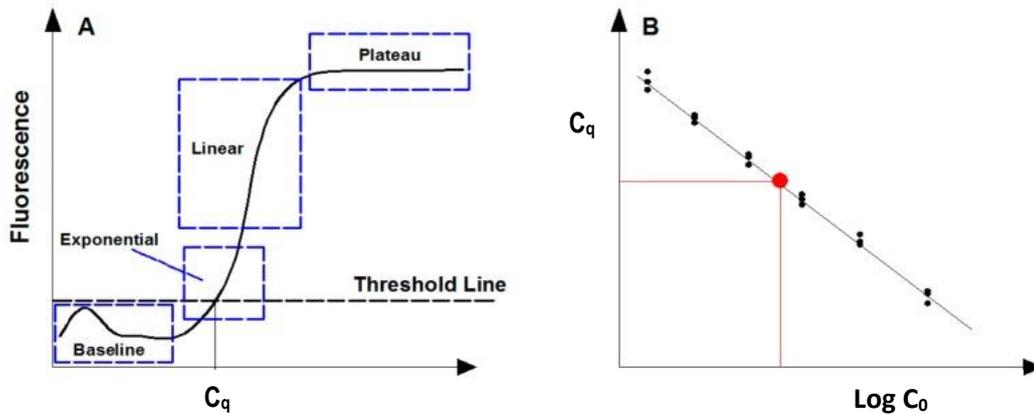
La fase lineal comienza cuando alguno de los reactivos comienza a ser limitante, lo que conduce a una disminución de la eficiencia. Por último, en la fase estacionaria la amplificación se detiene debido a que algún componente se ha agotado, por lo que la señal de fluorescencia es constante y no aumenta a pesar de incrementar el número de ciclos.

El nivel de fluorescencia alcanzado es directamente proporcional a la cantidad de DNA molde de partida y el ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral, esto es, el punto en el que la línea de *threshold* corta con la curva de amplificación, se denomina ciclo de cuantificación ( $C_q$ , del inglés *quantification cycle*) [24, 25]. Cuanto mayor sea la cantidad inicial de DNA, antes se alcanzará el nivel de fluorescencia umbral y, por tanto, menor será el valor de  $C_q$ .

La detección por fluorescencia en qPCR no solo evita la realización posterior de una electroforesis, sino que también permite la cuantificación relativa de la muestra analizada, mediante el valor de  $C_q$ . Para ello, se requiere la presencia de un estándar de concentración conocida, del cual se realizan diluciones seriadas y se analizan por qPCR. Los valores de  $C_q$  obtenidos se representan frente al logaritmo en base 10 de la concentración inicial de cada una de las diluciones seriadas. Se crea, de este modo, una recta estándar, a partir de la cual es posible

determinar la concentración de una muestra problema mediante extrapolación de su valor de  $C_q$  (**Figura 4B**), siguiendo las ecuaciones 11 y 12.

Las diluciones seriadas del estándar deben entrar en el rango dinámico de la qPCR (habitualmente de  $6-9 \log_{10}$ ), es decir, deben estar dentro del rango de concentraciones en el que la reacción tiene un comportamiento lineal [25, 26].



**Figura 4.** (A) Curva típica sigmoide de la evolución de fluorescencia durante la reacción de qPCR donde se destacan las diferentes fases: basal, exponencial, lineal y estacionaria o plateau. Se representan los términos  $C_q$  y threshold. (B) Recta estándar obtenida mediante la representación del valor de  $C_q$  frente al logaritmo de la concentración inicial ( $\text{Log } C_0$ ) de las diluciones seriadas de un estándar de concentración conocida. Se marca con un punto rojo la extrapolación del valor de  $C_q$  de una muestra problema en la recta estándar, con el objetivo de determinar la concentración de la muestra problema. Fuente: Adaptado de [22].

Es posible valorar el comportamiento lineal de la reacción de qPCR mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ), el cual debe ser próximo a 1. Otro parámetro que debe ser considerado es la eficiencia de la reacción, una eficiencia del 100% implica que en cada ciclo se está duplicando la cantidad de DNA molde. En la práctica, la eficiencia de la reacción suele situarse en el rango 90-105% y se calcula a partir de la pendiente ( $a$ ) de la recta estándar [26, 27]:

$$E = 10^{\frac{-1}{a}} - 1 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Los ensayos de qPCR no siempre van acompañados de la realización de una curva estándar. En ese caso, es posible comparar la concentración inicial de dos muestras ( $C_A$  y  $C_B$ ) mediante la diferencia de su valor de  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ), aplicando la siguiente ecuación [28]:

$$\frac{C_A}{C_B} = 2^{\Delta C_q} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En el supuesto de que la muestra A presentase un  $C_q$  3 veces mayor que la muestra B (Ejemplo:  $C_{qA}= 18$ ;  $C_{qB}= 15$ ;  $\Delta C_q=3$ ), la muestra B estaría 8 veces más concentrada que A.

En la ecuación 2 se ha considerado una eficiencia de la reacción del 100%, debido a que se asume esta eficiencia en la fase exponencial de la reacción, fase donde se asigna el valor de  $C_q$ . Si no se cumple este supuesto teórico de eficiencia 100% debe aplicarse la ecuación 3, donde se tiene en cuenta la eficiencia propia de cada ensayo:

$$\frac{C_A}{C_B} = (1 + E)^{\Delta C_q} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

### II.1.2.2 RELEVANCIA DE LA PCR EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y OTRAS APLICACIONES

La técnica de qPCR se ha incorporado en numerosas áreas como la virología, bacteriología, parasitología y micología, debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad. En el ámbito del diagnóstico clínico, esta técnica ha reemplazado a los métodos convencionales como el cultivo, la microscopía o los ensayos inmunológicos basados en la detección de antígenos o anticuerpos.

El cultivo ha sido, durante muchos años, la técnica estándar de referencia (*gold standard*) para el aislamiento del agente etiológico de la enfermedad. En base a la sospecha clínica se utilizan unos determinados medios de cultivo selectivos, diferenciales y de enriquecimiento, para favorecer el crecimiento del patógeno buscado, frente a otros patógenos. El cultivo es un proceso lento y laborioso, que requiere la presencia de personal experimentado, especialmente en el cultivo de aquellos microorganismos con requerimientos de crecimiento muy específicos. Un ejemplo de ello es el virus del papiloma humano, los norovirus o las bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*, cuyo crecimiento en cultivo es complejo y, en algunos casos, inaccesible [29, 30]. A su vez, el cultivo puede verse afectado en aquellos casos en los que no se puedan garantizar unas condiciones adecuadas de conservación de la muestra, ya que resulta crítico mantener la viabilidad de los microorganismos desde la toma de muestra del paciente. Además, el cultivo suele requerir la realización posterior de pruebas confirmatorias (mediante diferentes pruebas bioquímicas o tinciones específicas y visualización por microscopía) o de tipado (mediante técnicas como la espectrometría de masas MALDI-TOF® o aglutinaciones con antisueros específicos). En la mayoría de los casos, el diagnóstico final no se encuentra disponible hasta pasadas 1-4 semanas. Resulta crucial reducir este tiempo de respuesta para administrar el tratamiento adecuado en un inicio temprano de la enfermedad, así como para aislar al paciente y contener la enfermedad, evitando su propagación.

Los métodos inmunológicos también se encuentran ampliamente extendidos en el diagnóstico clínico, siendo frecuentes las pruebas rápidas de detección de antígenos o anticuerpos. Estas pruebas suelen presentar valores de sensibilidad y especificidad variables y, en algunos casos, se observan fenómenos de reactividad cruzada en la detección de anticuerpos. Un ejemplo de ello es la reactividad cruzada observada entre virus del género *Flavivirus*, al cual pertenecen el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla o el virus de Zika [31]. Por otra parte, el diagnóstico por serología no es aplicable en los inicios de la infección y, en ocasiones, resulta complicado discernir si se trata de una infección presente o pasada.

Otra técnica frecuentemente utilizada en el diagnóstico clínico es la microscopía, ya que suele ser la técnica de elección en la identificación de diferentes hongos y parásitos, como *Pneumocystis jirovecii* o *Entamoeba* spp. [32]. Para su identificación se requiere de personal muy experimentado y, en algunos casos, no es posible la diferenciación morfológica entre especies, como la diferenciación entre *Entamoeba histolytica* (patógena) y *Entamoeba dispar* (no patógena, forma parte de la flora intestinal) [33].

Todo ello ha motivado la implementación de la técnica de qPCR en numerosos algoritmos diagnósticos, como reemplazo o apoyo a las técnicas convencionales [34-37]. La técnica de qPCR destaca por su elevada sensibilidad y especificidad, además de ofrecer resultados en un tiempo reducido (2-4h). Este tiempo de respuesta ha jugado un papel crucial en el control y detección de virus emergentes como el virus de Zika, virus del Ébola o SARS-CoV-2. Por otra parte, la elevada sensibilidad de la qPCR permite identificar a un patógeno presente a muy baja

concentración (en muchos casos 1 copia por reacción) en una matriz compleja. Esto ha motivado la sustitución de ciertas técnicas invasivas, como la realización de una biopsia, por el análisis mediante qPCR de otro tipo de muestras de fácil obtención [29].

Hoy en día, la técnica de qPCR está muy presente en el campo del diagnóstico clínico, donde es frecuente encontrar paneles de qPCR comerciales constituidos por diferentes ensayos multiplex, los cuales permiten la identificación, en una misma reacción, de un gran número de patógenos. Los patógenos que permite identificar cada panel de qPCR suelen ser todos ellos causantes de un mismo tipo de patología (gastrointestinal, respiratoria, enfermedades de transmisión sexual...etc). De este modo, se selecciona el panel de qPCR acorde a la sintomatología del paciente, realizando un cribado de los posibles agentes infecciosos y, a su vez, siendo más probable la detección de posibles coinfecciones, las cuales pasan inadvertidas en el diagnóstico por técnicas convencionales. Dentro del diagnóstico clínico, la utilización de la técnica de qPCR también es muy frecuente en la detección de bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos, como la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina o la identificación de las cepas de *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae* que son portadoras de betalactamasas de espectro extendido [29]. Respecto al diagnóstico de virus, la obtención de resultados cuantitativos mediante la técnica de qPCR permite realizar un seguimiento exhaustivo de la carga viral en pacientes con enfermedades crónicas, como las causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C. Este seguimiento de la carga viral es un indicador de la respuesta a diferentes terapias antivirales y permite detectar resistencias incipientes. Por último, otra aplicación destacada de la técnica de qPCR en el campo del diagnóstico clínico es el genotipado de bacterias y virus, ya que esta caracterización molecular contribuye a detectar los focos de infección y es una parte importante de los estudios epidemiológicos.

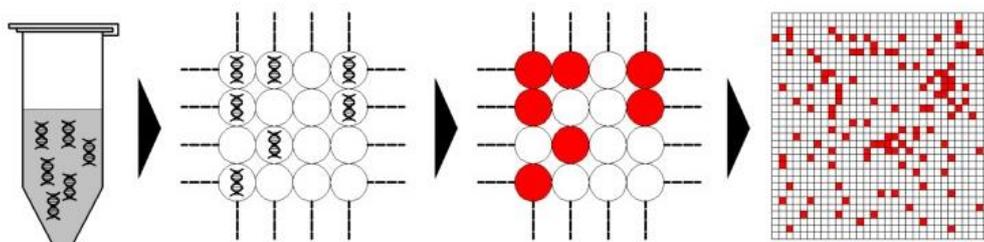
Las aplicaciones de la qPCR se extienden más allá de la microbiología clínica, siendo una técnica muy utilizada en farmacogenética para la elaboración de un tratamiento personalizado por paciente. Este tratamiento personalizado se basa en un análisis del genoma del paciente por qPCR, en el cual es posible inferir la respuesta del paciente a diferentes fármacos. Para ello, se analiza la secuencia de aquellos genes implicados en el metabolismo de fármacos, como los genes que codifican para el citocromo P450 o la N-acetiltransferasa [38]. Mediante el estudio por qPCR del genoma humano también es posible realizar estudios de expresión génica, la detección de enfermedades hereditarias o determinar la predisposición a sufrir ciertas enfermedades [39]. Por otra parte, la técnica de qPCR está muy presente en el campo de la medicina forense para identificación de sujetos, relaciones de parentesco o incluso para inferir las características físicas de un sujeto a partir de su genoma [38]. Por último, la qPCR juega un papel importante en la industria alimentaria, mediante el control de calidad de alimentos y la verificación del correcto funcionamiento de los procesos de esterilización, en los que se analiza la presencia de diferentes microorganismos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* o *Listeria monocytogenes* [40].

### II.1.3 PCR DIGITAL

En la evolución de la técnica de PCR en tiempo real cabe destacar la aparición de la PCR digital, término descrito por primera vez por Vogelstein y Kinzler en 1999 [41]. La PCR digital se basa en la división de la muestra en multitud de particiones, en las cuales ocurre la reacción de PCR de forma independiente, permitiendo la cuantificación absoluta de la muestra sin necesidad de un

estándar [14, 42]. Se considera una partición como positiva cuando presenta una intensidad de fluorescencia superior al nivel basal, por tanto, la fluorescencia final es utilizada para realizar una clasificación binomial: 1 (partición positiva: contiene al menos una molécula diana) y 0 (partición negativa: no contiene ninguna molécula diana).

Esta técnica comparte la misma metodología que la PCR en tiempo real en cuanto a preparación de la reacción de amplificación [43, 44], pero difiere en el método de carga de la muestra, ya que esta debe añadirse a un soporte que permita su distribución en multitud de particiones. También difiere en la lectura e interpretación de resultados. Un esquema de los diferentes pasos que constituyen el proceso de PCR digital se muestra en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Esquema de los diferentes pasos del proceso de PCR digital: preparación de la mezcla de reacción, división de la mezcla en particiones, amplificación y análisis de resultados. Fuente: [22].

Existen en el mercado diferentes plataformas de PCR digital que utilizan distintos métodos para la dispersión de la muestra en multitud de particiones [45, 46]. Los métodos más extendidos se describen a continuación y las características propias de cada sistema se recogen en la **Tabla 1**.

**-Creación de gotas mediante una emulsión de agua y aceite.** La muestra se distribuye en multitud de gotas, las cuales se crean mediante equipos específicos como los sistemas comerciales QX100™ y QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad) y RainDrop® System (RainDance™ Technologies).

**-Chips compuestos por micropocillos.** Los chips suministrados por el fabricante ya contienen particiones en las que se distribuirá la muestra. El sistema comercial QuantStudio® 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific) utiliza este método de dispersión de la muestra.

**-Chips compuestos por microcanales.** Son análogos a los chips compuestos por micropocillos, ya que el soporte contiene de fábrica las particiones, pero difieren en los parámetros recogidos en la **Tabla 1**. En este método se basan los sistemas comerciales BioMark™ System y EP1™ System (Fluidigm).

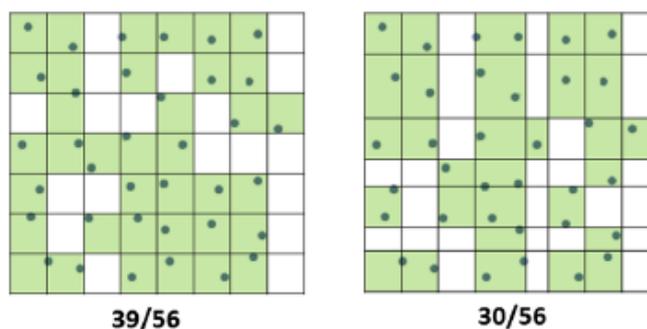
También se han descrito otros métodos de dispersión de la muestra, basados en partículas de hidrogel [47] o técnicas de impresión [48], cuyo uso está menos extendido. Los estudios reportados en la bibliografía sobre la comparativa entre diferentes plataformas comerciales de PCR digital muestran una elevada reproducibilidad y repetibilidad, independientemente del sistema utilizado [46, 49, 50]. Se recomienda, con el objetivo de asegurar una correcta dispersión de la muestra y una mayor fiabilidad en la medición, trabajar con un tamaño y volumen de partición ( $V_p$ ) reducidos, un alto número de particiones, una buena estabilidad térmica de la reacción y un elevado ratio de dispersión [45].

**Tabla 1.** Características de las distintas plataformas de PCR digital, las cuales emplean diferentes estrategias de dispersión de la muestra. Se utiliza el símbolo \* para indicar el nivel de estabilidad térmica de la reacción. Cuanto mayor sea el número de \*, mayor es la estabilidad térmica en ese sistema. Fuente: Adaptado de [45].

Método de dispersión de la muestra	Tamaño de partición (mm)	Parámetros de dispersión			
		Volumen de partición (nl)	Número de particiones	Estabilidad térmica de la reacción	Ratio de dispersión (min <sup>-1</sup> )
Gotas	0,1-0,01	0,001-1	20.000-10.000.000	**	2.000
Micropocillos	0,01-0,001	0,8-1	20.000	****	60.000
Canales	0,1-0,01	6,25	14.112	***	10.000
Partículas	0,1-0,01	Variable	10.000.000	**	3.000.000
Impresión	0,1	0,8 nL	400	***	100

En el proceso de PCR digital se asumen los siguientes supuestos [51]:

**1) Todas las particiones presentan el mismo volumen.** Este volumen viene determinado por el fabricante. Diferentes autores han encontrado cierta desviación del volumen real de cada partición, respecto al volumen teórico determinado por el fabricante, lo que puede ser una fuente de variabilidad [52, 53]. Un volumen desigual entre particiones conduce a una infraestimación de la concentración de la muestra, como se refleja en la **Figura 6**.



**Figura 6.** (A) El volumen de todas las particiones es idéntico, se observan 39/56 particiones positivas. (B) El volumen de las particiones es variable, se observan 30/56 particiones positivas. Fuente: [54].

**2) Las moléculas diana se distribuyen aleatoriamente entre las particiones.** En este caso todas las particiones tendrían la misma probabilidad de contener moléculas diana [55].

Cumpliendo estos dos supuestos es posible determinar la concentración de una muestra problema siguiendo las ecuaciones 4 y 5, fundamentadas en la distribución de Poisson [56].

En primer lugar, se debe calcular el parámetro  $\lambda$  que hace referencia a la media de moléculas diana presentes por partición. Se entiende por  $k$ , el número de particiones positivas, y  $n$ , el número total de particiones.

$$\lambda = -\ln\left(1 - \frac{k}{n}\right) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

En segundo lugar, es posible calcular la concentración (C) de la muestra problema considerando el valor  $\lambda$  obtenido en la ecuación 4, el volumen de la partición y la dilución (D) que ha sufrido la muestra durante el proceso.

$$C = \lambda \times \left(\frac{1}{Vp}\right) \times D \quad \text{(Ecuación 5)}$$

El modelo teórico indica que la varianza alcanza su mínimo en un valor de  $\lambda = 1,59$  copias por partición, el cual es equivalente al 20% de las particiones vacías, por lo que la fiabilidad en la cuantificación disminuye conforme nos alejamos de dicho valor [53, 57]. Esto implica que la precisión en la cuantificación no es constante a lo largo de su rango dinámico, sino que es inferior en los extremos de dicho rango [42]. En el caso de cuantificar una muestra muy concentrada (alto valor de  $\lambda$ ), en la mayoría de las particiones se encontrarían varias moléculas diana. Esto conduciría a una infraestimación de la concentración, puesto que no hay modo de diferenciar las particiones que contienen 1 molécula frente a las que contienen múltiples moléculas.

La PCR digital destaca frente a la PCR en tiempo real por una mayor sensibilidad en la detección de secuencias que se encuentran en baja proporción en la muestra analizada, así como por una menor susceptibilidad a los inhibidores de fluorescencia. Ambas características son consecuencia de la distribución de la muestra en particiones, en las cuales ocurre la reacción de PCR de forma independiente y, por tanto, disminuye la competencia entre reactivos [43]. En su contra, las particiones condicionan la escalabilidad de la PCR digital, la cual es más limitada que la PCR en tiempo real, al igual que su rango dinámico [42, 58]. Por otra parte, el hecho de poder prescindir de un estándar en la cuantificación por PCR digital conduce a una mejora en la reproducibilidad entre laboratorios y en el tiempo y, a su vez, asegura una correcta trazabilidad respecto al Sistema Internacional de Unidades [59].

Debido a las ventajas expuestas anteriormente, la PCR digital ha sido el método de elección por diferentes autores para la cuantificación de materiales de referencia [52, 59-62]. A su vez, es el primer método de medición de ácidos nucleicos aceptado como referencia por el Comité Conjunto para la Trazabilidad en Medicina de Laboratorio (JCTLM, *Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine*), debido a su elevada repetibilidad y reproducibilidad [46, 51].

## II.2 MATERIALES DE REFERENCIA PARA PCR EN TIEMPO REAL

Se define como estándar biológico aquella muestra de referencia positiva que se incluye en un ensayo biológico para garantizar que dicho ensayo funciona correctamente. Este estándar debe permitir la calibración y armonización de los datos del ensayo. A su vez debe funcionar en una amplia gama de ensayos y reflejar cómo se comportaría una muestra problema en estos ensayos [63].

El uso de estándares biológicos se remonta a 1890 con el descubrimiento por Behring y Kitasato de la antitoxina diftérica, la cual se obtenía al inyectar toxina diftérica a cobayas. El suero de estos animales servía para inmunizar a la población y evitar así la propagación de la enfermedad. Surgió entonces la necesidad de estandarizar la medición de la cantidad de antitoxina presente en diferentes lotes de suero, con el objetivo de administrar la misma dosis de antitoxina, independientemente del lote utilizado [64, 65]. En 1897 Paul Ehrlich suplió esta necesidad creando el primer estándar biológico consistente en suero liofilizado y preservado a bajas temperaturas, garantizando así su estabilidad a largo plazo [66, 67].

Años más tarde (1972) se fundó el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos (NIBSC, del inglés *National Institute for Biological Standards and Control*), el cual produce actualmente

más del 95% de los estándares biológicos (antígenos, anticuerpos, hormonas, productos terapéuticos, virus, vacunas...) de todo el mundo [63, 68].

El origen de los materiales de referencia para la estandarización de las técnicas moleculares, como la técnica de PCR en tiempo real, se sitúa en 1997 con la aparición del primer liofilizado de plasma con altos títulos del virus de la Hepatitis C [69]. Desde entonces distintos materiales de referencia (principalmente virus), cuya intención de uso es servir como control en las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, se han sumado a la lista de materiales de referencia proporcionados por NIBSC. Actualmente, se encuentran en desarrollo nuevos materiales como los virus causantes de fiebres hemorrágicas: virus de Lassa, virus de Marburgo, virus de Nipah, coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo [68, 70].

Los materiales de referencia se pueden clasificar en 3 grandes grupos en función de su diseño e intención de uso [70]:

**-Estándares internacionales:** son diseñados y validados según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [71], su concentración se expresa en Unidades Internacionales y son los únicos materiales de referencia con los que es posible calibrar un ensayo en Unidades Internacionales. Estos estándares deben estar accesibles por un largo periodo de tiempo (5-10 años) para asegurar un comparador consistente e invariable. Un estándar internacional puede tardar 2-3 años en establecerse y suelen estar disponibles en cantidades relativamente limitadas, por lo que se recomienda su uso para la caracterización y calibración de estándares secundarios [63].

**-Estándar secundario o control externo:** se recomienda su calibración mediante el estándar internacional. Sirven para monitorizar el rendimiento de un ensayo, cuantificar una muestra o establecer comparativas entre ensayos realizados en diferentes días, por distintos operadores o laboratorios...etc.

**-Control interno:** este tipo de control suele suministrarse con el ensayo y sirve para validar los resultados de cada reacción. En la técnica de PCR en tiempo real el control interno suele incluirse en la mezcla de reacción junto con los cebadores, sondas, enzimas u otros reactivos esenciales.

A continuación, se realiza una revisión de las diferentes metodologías y estrategias llevadas a cabo en la síntesis de materiales de referencia para su aplicación en ensayos qPCR. En esta revisión se han clasificado los materiales de referencia según su capacidad de monitorizar el proceso de amplificación por qPCR o el proceso completo, incluyendo en este último caso el paso previo de extracción del material genético.

## II.2.1 MATERIALES DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN POR QPCR

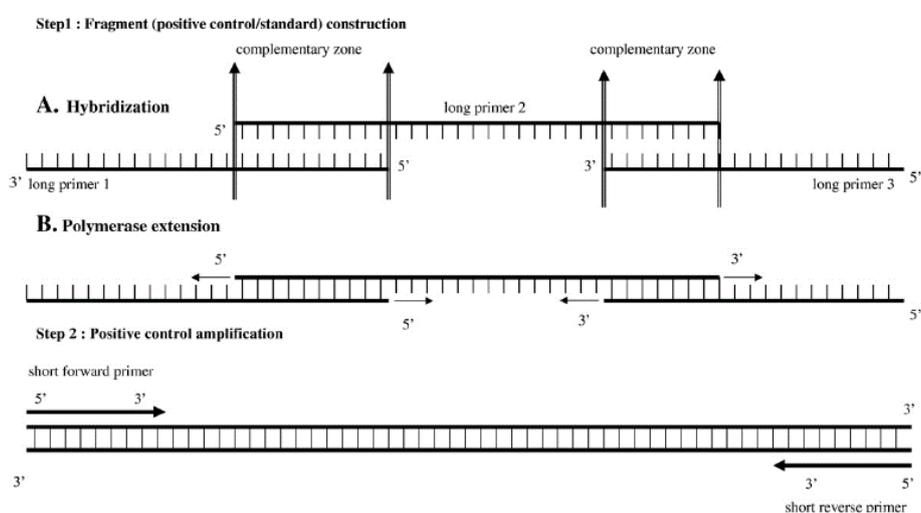
Los materiales de referencia contemplados en este apartado se basan en secuencias sintéticas de DNA o RNA transcrito *in vitro* y, por tanto, permiten monitorizar únicamente el proceso de amplificación por qPCR (y la reacción de retrotranscripción en el caso de los materiales de RNA).

## II.2.1.1 SECUENCIAS SINTÉTICAS DE DNA

La síntesis *de novo* de DNA mediante síntesis química permite la creación de fragmentos de tamaño aproximado de hasta 100 pares de bases (pb) [72, 73], ya que cuanto mayor es la longitud del oligonucleótido sintetizado, mayor es la tasa de error [74]. La necesidad de construir fragmentos con un tamaño superior ha conducido al desarrollo de diferentes estrategias para la creación de largas construcciones de DNA [75].

### II.2.1.1.1 MÉTODOS BASADOS EN EL ENSAMBLAJE CÍCLICO DE LA POLIMERASA

El ensamblaje cíclico de la polimerasa (PCA, del inglés *polymerase cycling assembly*) permite la creación de largos constructos de DNA mediante la utilización de oligonucleótidos con zonas de solapamiento, que son extendidas por la actuación de la DNA polimerasa (**Figura 7**). Es una reacción diferente a la PCR estándar, puesto que no se añaden cebadores ni se da una amplificación exponencial, aunque una vez sintetizado el fragmento de interés se suele realizar una PCR para su multiplicación. Habitualmente este producto de PCR es clonado en un plásmido para su crecimiento y selección en bacterias.

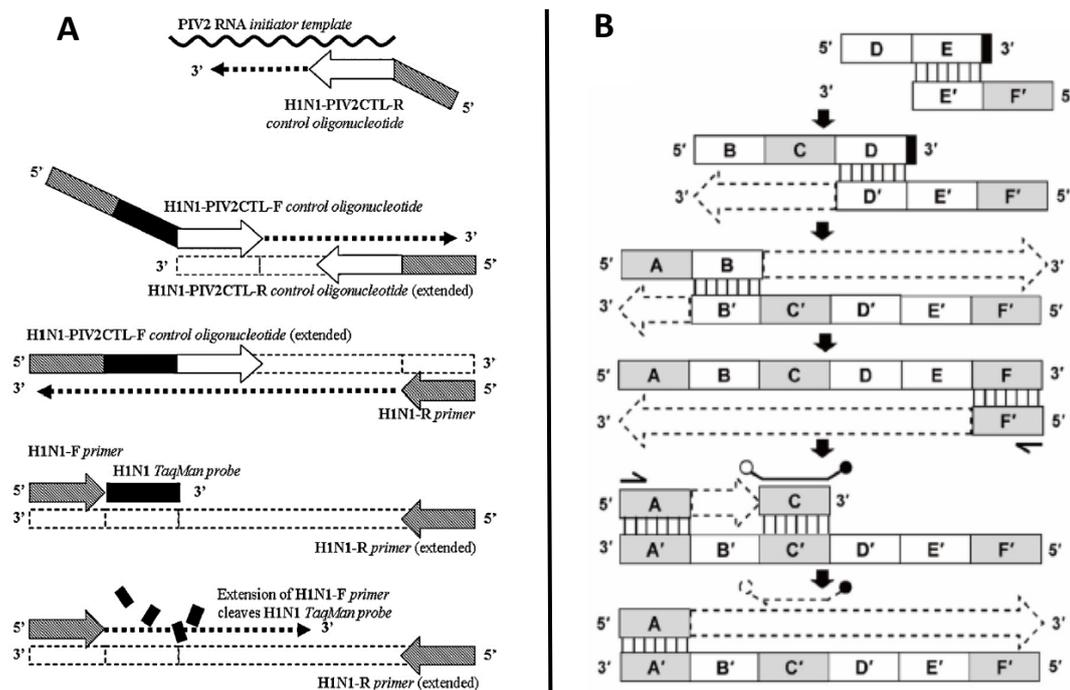


**Figura 7.** Esquema de síntesis de un control positivo (secuencia sintética de DNA) para su uso en ensayos qPCR. Paso 1: hibridación de los oligonucleótidos en zonas complementarias y extensión por la DNA polimerasa. Paso 2: amplificación por PCR del fragmento de DNA generado en el paso 1. Fuente: [76].

El ensamblaje cíclico de la polimerasa fue utilizado por primera vez por Dillon y Rosen (1990) [77] para la síntesis del gen *rev* (303 pb) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2). Años más tarde, Stemmer et al. (1995) [78] utilizaron este método para ensamblar en una única reacción 56 oligonucleótidos de 40 pb cada uno, crearon así un fragmento de 1.100 pb que contenía el gen de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1. Posteriormente, este método fue utilizado para el desarrollo de controles positivos que permitieron monitorizar la reacción de qPCR. David et al. (2008) [76] crearon controles positivos para los genes *recA* y *tceA*, presentes en la bacteria *Dehalococcoides ethenogenes*, y para el gen *todC*, presente en la bacteria *Pseudomonas putida*. Conrad et al. (2012) desarrollaron diferentes controles positivos, todos ellos dirigidos a su utilización en aquellos ensayos de qPCR que permiten identificar los nueve serotipos patogénicos de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

Una estrategia similar, denominada método Uni-Control, fue descrita por Whiley et al. (2010) [79], donde también se requiere la actuación de la DNA polimerasa, pero en este caso es necesaria la presencia de dos oligonucleótidos sintéticos y un ácido nucleico no específico que

actúe como molde iniciador. Whiley et al. describieron la síntesis de los controles positivos del virus de influenza A (H1N1) y del metapneumovirus humano, para la monitorización de la reacción de qPCR. Esta síntesis se realizó a partir de dos ácidos nucleicos no específicos, correspondientes al virus de parainfluenza tipo 2 y al virus del herpes equino, respectivamente, (**Figura 8A**). En este estudio se observó que el oligonucleótido que contenía la sonda tendía a dimerizar a bajas concentraciones de control positivo, dando una señal residual en qPCR, por lo que se desaconsejó este tipo de control positivo para el cálculo del límite de detección de un ensayo de qPCR. Recientemente, Cho et al. (2020) [80] han solventado esta limitación con una optimización del método, mediante el cual han sintetizado un control positivo de DNA que contiene los genes *RdRP*, *E* y *N* del virus SARS-CoV-2 (**Figura 8B**).



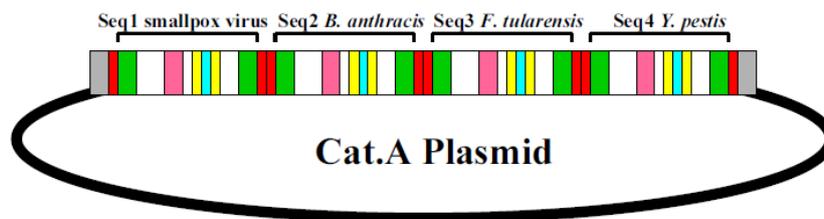
**Figura 8.** Esquema del proceso de síntesis de controles positivos basado en la presencia de un ácido nucleico no específico (ácido nucleico iniciador). **A.** RNA del virus parainfluenza tipo 2 como ácido nucleico iniciador para la síntesis del control positivo del virus influenza A. **B.** Secuencias inespecíficas B, D y E para la síntesis del control positivo del virus SARS-CoV-2 a partir de la secuencia de los cebadores forward (A), reverse (F) y sonda (C). Fuente: [79, 80].

Estrategias similares basadas en la actuación de la DNA polimerasa, junto con ligasas, han sido utilizadas en el campo de la biología sintética para reconstituir genomas completos y, por tanto, también pueden ser aplicadas en la generación de materiales de referencia para qPCR. Destacan los experimentos de Smith et al. (2003) [81], quienes lograron reconstituir de forma sintética el genoma completo del bacteriófago  $\phi$ X174 (5.386 pb), a partir del ensamblaje de múltiples oligonucleótidos.

### II.2.1.1.2 MÉTODOS BASADOS EN EL ENSAMBLAJE DE FRAGMENTOS DE DNA SOBRE UN PLÁSMIDO

La incorporación de diferentes fragmentos de DNA sobre un DNA plasmídico para su uso como control positivo de ensayos qPCR ha sido ampliamente reportada [72, 82-84]. Generalmente se describe un ensamblaje secuencial que es mediado por la digestión con enzimas de restricción y posterior ligación de los fragmentos de DNA con el plásmido.

Charrel et al. (2004) [85] publicaron un método orientado al diseño de controles positivos de qPCR para aquellos patógenos clasificados como posibles agentes de bioterrorismo, debido a la necesidad de este tipo de controles por su elevada peligrosidad y escasa disponibilidad. En primer lugar, sintetizaron *de novo* las secuencias específicas de cada patógeno y las amplificaron por PCR de forma independiente. A partir de este punto se procedió a trabajar en grupos de 2 secuencias que fueron digeridas mediante enzimas de restricción, unidas con la enzima T4 DNA ligasa y clonadas en un plásmido. Este proceso es repetido tantas veces como sea necesario, en función de los fragmentos que interese incluir en el control positivo. El resultado final es un DNA plasmídico circular que contiene secuencias específicas de los patógenos de interés. Un esquema del mismo se muestra en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Esquema de control positivo sintético basado en el plásmido PGEM-T al cual se han introducido secuencias específicas de agentes de bioterrorismo de categoría A (*virus causante de la viruela*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* y *Yersinia pestis*). Se compone de secuencias estabilizadoras (gris), sitios de restricción de *SacI* (rojo), sitios de hibridación de los cebadores (verde), secuencias específicas de patógeno (blanco), sitios de hibridación de la sonda (rosa) y secuencias exógenas (amarillo) que contienen el sitio de restricción de *NotI*. Fuente: [85].

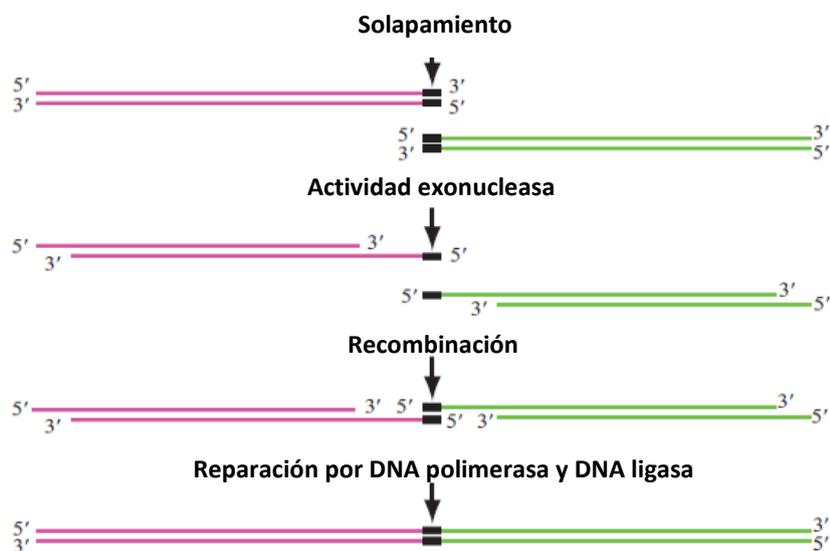
Kodumal et al. (2004) [86] utilizaron una estrategia similar para la síntesis de un DNA plasmídico (31.700 pb) que incluyese todos aquellos genes comprendidos en el complejo policétido sintasa. Así mismo, Sakai et al. (2017) [87] sintetizaron los controles positivos pNUversa (DNA plasmídico circular de tamaño 10.873 pb) y NUversa (DNA lineal de tamaño 8.175 pb) que destacan por el gran número de dianas incorporadas. Ambos controles contienen las 67 dianas requeridas para la identificación de los 94 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*.

### II.2.1.1.3 MÉTODOS BASADOS EN RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

El método de ensamblaje en serie de fragmentos de DNA contemplado en el apartado anterior II.2.1.1.2, basado en sucesivas reacciones con enzimas de restricción y ligación, resulta lento y laborioso. Por este motivo, surge el método de ensamblaje de Gibson, basado en la unión de fragmentos de DNA mediante recombinación homóloga. El proceso se basa en el diseño de fragmentos con zonas complementarias que solapen entre sí. En presencia de estos fragmentos se añade una mezcla de enzimas y polietilenglicol, este último actúa como estimulante del proceso de recombinación.

Inicialmente, este proceso se realizaba en 2 etapas a diferentes temperaturas. En un primer paso (en ausencia de dNTPs a 37°C), se añadía una exonucleasa (T4 DNA polimerasa) que eliminaba los nucleótidos de los extremos de la doble hebra de DNA. Después se inactivaba la enzima a 75°C y se descendía la temperatura a 60°C para permitir la recombinación de los fragmentos. En un segundo paso (en presencia de dNTPs a 45°C), los huecos generados eran completados por la actuación de la *Taq* DNA polimerasa y las mellas selladas por la *Taq* DNA ligasa [88], tal y como se muestra en la **Figura 10**.

Actualmente, es posible llevar a cabo la reacción en un único paso a temperatura constante de 50°C. Esto es posible gracias al reemplazo de la enzima T4 DNA polimerasa por la T5 exonucleasa, esta última no tiene actividad DNA polimerasa y puede ejercer su función en presencia de dNTPs. Además, se recomienda el reemplazo de la enzima *Taq* DNA polimerasa por la enzima Phusion® DNA polimerasa, ya que esta última es de alta fidelidad. Esta estrategia fue utilizada por Gibson et al. (2010) [89] para sintetizar el genoma mitocondrial de ratón completo (16.299 pb), a partir de 600 fragmentos solapantes de 60 pb cada uno.



**Figura 10.** Esquema de las diferentes etapas que constituyen el método de ensamblaje de Gibson basado en la recombinación homóloga de fragmentos con zonas de solapamiento. Fuente: Adaptado de [88].

En la revisión anterior observamos la existencia de dos tipos de estándar: DNA lineal y DNA plasmídico. Diferentes autores han evaluado su rendimiento en ensayos qPCR y su estabilidad a largo plazo. Sakai et al. (2017) [87] evaluaron el comportamiento de los controles positivos sintéticos pNUversa (DNA plasmídico) y NUversa (DNA lineal), en comparación con un DNA genómico. Observaron que ambos controles mostraban altos valores de linealidad (pNUversa  $R^2 = 0,996$ ; NUversa  $R^2 = 0,991$ ) y eficiencia (pNUversa  $E = 98,8\%$ ; NUversa  $E = 97,0\%$ ), similares a los obtenidos en DNA genómico ( $R^2 = 0,994$ ;  $E = 97,3\%$ ). Sin embargo, la reacción de qPCR se veía afectada en presencia del plásmido pNUversa, como demuestra su valor de  $y$ -intercepto ( $y$ -intercepto = 42,942), el cual es superior respecto al de NUversa ( $y$ -intercepto = 40,302) y al del DNA genómico ( $y$ -intercepto = 39,837). Se demostró que esta diferencia observada era estadísticamente significativa y que, por tanto, la cuantificación realizada considerando como estándar el plásmido pNUversa conducía a una sobreestimación de la concentración.

Estas observaciones coinciden con la información aportada por diferentes autores [90, 91], cuyas investigaciones revelan que la conformación superenrollada que adopta un DNA plasmídico afecta negativamente a la reacción de qPCR. Generalmente no se observa una disminución de la eficiencia de la reacción, pero sí valores de  $C_q$  más retrasados respecto al DNA lineal, por lo que la precisión en la cuantificación mediante este tipo de controles es menor.

Debido a que el DNA plasmídico es más estable a largo plazo que el DNA en su forma lineal, ya que es menos susceptible a degradación por exonucleasas, se recomienda disponer de un DNA plasmídico como estándar para su almacenamiento y linealizarlo en el momento previo a la reacción de qPCR [91-93]. También existen en el mercado diferentes opciones de DNA lineal

como es el caso de las secuencias sintéticas gBlocks™ Gene Fragments o Ultramer™ DNA Oligonucleotides (Integrated DNA Technologies), que muestran elevados valores de linealidad, eficiencia y reproducibilidad al utilizarse como materiales de referencia en ensayos qPCR, así como una elevada estabilidad a largo plazo [93-95]

### **II.2.1.2 RNA TRANSCRITO *IN VITRO***

Los materiales de referencia basados en una secuencia sintética de DNA o cDNA pueden monitorizar la reacción de PCR propiamente dicha, pero no el paso previo de retrotranscripción, es decir, el número de moléculas que pasan de RNA a cDNA. Recientemente, Madala et al. (2021) [96] ofrecen una monitorización más exhaustiva del proceso con la creación de controles positivos sintéticos de RNA. Su objetivo es suministrar un control positivo de SARS-CoV-2 que contenga las dianas de PCR contempladas en los protocolos de la OMS. Para ello clonan estas dianas en un DNA plasmídico, concretamente en una región flanqueada por el promotor T7 y una señal de poliadenilación (poliA). Estos elementos permiten la transcripción *in vitro* del DNA plasmídico a RNA, generando un control positivo sintético de RNA. A su vez, proponen distribuir las dianas de SARS-CoV-2 en dos plásmidos para lograr que un mismo plásmido actúe de forma simultánea como control positivo o negativo, en función de la diana analizada.

Anteriormente, diferentes autores habían recurrido ya a esta metodología, Cello et al. (2002) [97] crearon un RNA sintético de poliovirus; Martínez-Martínez et al. (2011) [98] sintetizaron un RNA que incluía las dianas más comunes en la detección por qPCR de virus entéricos; Kodani et al. (2011) [99] incluyeron en un mismo RNA fragmentos de 20 patógenos diferentes causantes de patología en humanos; Bermúdez de León et al. (2013) [100] diseñaron un RNA del virus de influenza A (H1N1) y Dimaculangan et al. (2020) [101] desarrollaron un control positivo de RNA para el virus Sindbis y el virus del Nilo Occidental.

## **II.2.2 MATERIALES DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO Y AMPLIFICACIÓN POR QPCR**

El principal inconveniente de los controles positivos basados en secuencias sintéticas de DNA o RNA transcrito *in vitro*, descritos en el apartado II.2.1, es su incapacidad para monitorizar el proceso de extracción de ácidos nucleicos, junto con su susceptibilidad a ser degradados por nucleasas. Ambas limitaciones son consecuencia de la ausencia de una estructura externa que proteja al ácido nucleico.

A continuación, se realiza una revisión de los materiales de referencia disponibles para la monitorización completa del proceso de qPCR, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la reacción de amplificación. La siguiente revisión se centra en materiales de referencia para el diagnóstico de virus, ya que son el objetivo central de este trabajo de investigación.

### **II.2.2.1 VIRUS SALVAJE (*WILD-TYPE*)**

La mayoría de los materiales de referencia suministrados por NIBSC consisten en virus salvajes (*wild-type*). Estos generalmente han sido aislados de un cultivo procedente de una muestra clínica y conservan su capacidad infectiva. A su vez, casas comerciales como Vircell con la gama de productos AmpliRun®Total, Zeptomatrix con los productos NATtrol™ Molecular Controls, o Thermo Fisher Scientific con los productos AcroMetrix™, ofrecen preparaciones de virus

salvajes. En este caso, suelen ser preparaciones inactivadas mediante diferentes tratamientos fisicoquímicos.

La manipulación de este tipo de controles, especialmente aquellos no inactivados, requiere de personal experimentado y de diferentes medidas de bioseguridad y contención. Suelen ser materiales cuya accesibilidad está restringida, tanto por su elevada peligrosidad como por su cantidad limitada. En algunos casos el cultivo de estos virus es lento, laborioso y presenta un rendimiento bajo, siendo incluso algunos de ellos no cultivables [98]. Como ventaja destaca su fiabilidad, puesto que su estructura y genoma son idénticos al virus que interesa diagnosticar, pero debido a su accesibilidad limitada no se puede garantizar su universalidad.

Cabe destacar el estudio de Bateman et al. (2017) [61], quienes realizaron un análisis exhaustivo del estándar internacional de la OMS del virus BK, el cual es suministrado por NIBSC y consiste en una preparación del virus salvaje que ha sido obtenido por cultivo. En el estudio reportaron la existencia de subpoblaciones de virus BK que presentaban deleciones en la región del antígeno T. Este tipo de deleciones también ocurren con frecuencia durante el cultivo de otro poliomavirus denominado virus John Cunningham (JC). Estos hallazgos demostraron la importancia de validar los materiales de referencia mediante la aplicación de técnicas de secuenciación, como la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *next-generation sequencing*), con el objetivo de verificar la secuencia del genoma viral.

## II.2.2.2 PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES

La generación *in vitro* de partículas virales recombinantes permite disponer de forma rápida y segura de materiales de referencia para ensayos qPCR. Estos materiales imitan al virus salvaje y son capaces de monitorizar el proceso completo de qPCR.

Las partículas virales recombinantes se generan principalmente mediante el uso de bacteriófagos o mediante el uso de vectores virales. Dentro de los materiales de referencia derivados de bacteriófagos se encuentran en el mercado los controles Armored RNA Quant® de Asuragen, basados en el bacteriófago MS2. Por otra parte, dentro de los controles positivos derivados de vectores virales destaca la gama de productos Accuplex™ de Seracare (basados en alphavirus) o los productos AcroMetrix™ de Thermo Fisher Scientific (basados en el virus de la diarrea bovina).

Los principios básicos del sistema basado en el uso de bacteriófagos se desarrollan a continuación, mientras que los vectores virales, por el interés que presentan en el proyecto actual, se abordan en profundidad en el apartado II.3.

### II.2.2.2.1 PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES BASADAS EN BACTERIÓFAGOS

Pickett y Peabody demostraron en 1993 la capacidad del bacteriófago MS2 de empaquetar una secuencia de RNA exógena, es decir, diferente al propio genoma viral. Este descubrimiento puso de manifiesto la posibilidad de sintetizar infinidad de virus recombinantes de genoma variable y estructura externa común (propia del bacteriófago MS2). El bacteriófago MS2 es un virus que infecta a *Escherichia coli* (*E. coli*) y presenta una estructura externa formada por 180 proteínas, en cuyo interior se encuentra el genoma viral consistente en un RNA monocatenario positivo de longitud 3,6 kilobases (kb) [102].

Cuatro años más tarde, DuBois et al. (1997) [103] patentaron el proceso de producción de este virus recombinante no infeccioso basado en el bacteriófago MS2 y cuyo ácido nucleico, gracias

a la estructura exterior proteica que lo contiene, es resistente a la digestión por ribonucleasas. A su vez, destacaron su potencial aplicación como estándar para la cuantificación de virus de genoma RNA como el VIH-1 y el virus de la hepatitis C.

Pasloske et al. (1998) [104] continuaron los experimentos con el bacteriófago MS2 con el empaquetamiento de insertos de RNA de diferente tamaño (0,5, 1, 1,5, 2, 3 y 4 kb) y observaron que únicamente las partículas virales que contenían el inserto de 0,5 kb eran homogéneas en el tamaño del inserto. En el resto de las construcciones se observaba una amplia variedad de tamaños en el RNA empaquetado. De este trabajo se concluyó que únicamente resultaba eficiente el empaquetamiento de insertos de tamaño máximo 0,5 kb. En consecuencia, se observaba que a medida que aumentaba el tamaño del inserto, incrementaba la preferencia del bacteriófago MS2 por empaquetar RNAs de *E. coli*, bacteria donde tenía lugar la producción de estos virus, frente al RNA de interés.

Este sistema basado en el bacteriófago MS2 ha sido ampliamente estudiado y utilizado [105-109], ya que, a pesar de sus limitaciones en cuanto a tamaño del inserto, es capaz de suministrar de forma rápida, eficaz, segura y versátil un control positivo de RNA resistente a nucleasas. A su vez, un mayor conocimiento del sistema ha permitido optimizar el tamaño máximo del RNA que es posible empaquetar de forma eficaz. Zhan et al. (2009) [110] publicaron el empaquetamiento exitoso en el bacteriófago MS2 de un inserto de RNA del VIH-1 de longitud 3.034 pb. Años más tarde, Zhang et al. (2015) [111] demostraron que este sistema no solo era compatible con genoma RNA sino que también era posible encapsular DNA de doble cadena (dsDNA, del inglés *double-stranded DNA*) hasta un máximo de 6,5 kb.

Hoy en día, este método sigue siendo una alternativa ante la necesidad de desarrollo de controles positivos para la monitorización de ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, destinados a la detección de patógenos emergentes como el virus Zika [112] o SARS-CoV-2 [113]. Sin embargo, otros autores [114, 115] se decantan por la utilización del bacteriófago Q $\beta$ , frente a MS2, para el desarrollo de partículas virales recombinantes por su mayor estabilidad [116, 117].

La producción de partículas virales basadas en bacteriófagos tiene lugar en bacterias (principalmente *E. coli*), cuya multiplicación permite la obtención de altos títulos virales. Los bacteriófagos no presentan la capacidad de infectar células eucariotas, lo cual constituye una ventaja en términos de bioseguridad. En su contra, destacan dos limitaciones previamente comentadas: el tamaño máximo del ácido nucleico empaquetado y la incorporación de RNAs celulares no específicos (baja especificidad del empaquetamiento).

## II.3 VECTORES VIRALES

### II.3.1 INTRODUCCIÓN A LOS VECTORES VIRALES

A principios de los años 80, se publicaron los primeros experimentos donde se demostraba con éxito la posibilidad de reemplazar parte del genoma de un virus por un gen exógeno (transgén). A estos virus modificados, que actúan como vehículo para introducir material genético exógeno en una célula, se les denominó vectores virales. Los primeros experimentos fueron realizados en virus de genoma DNA como el virus simio 40 [118, 119] y en virus de genoma RNA como retrovirus [120, 121].

Los vectores virales, debido a su capacidad de portar genes exógenos e infectar células eucariotas, se han convertido en la base de los ensayos de terapia génica. Hacen posible la investigación en el tratamiento de diferentes enfermedades, principalmente el tratamiento del cáncer, de enfermedades monogénicas y enfermedades cardiovasculares. Mediante los vectores virales es posible transferir un gen terapéutico que corrija el defecto genético, aporte una función adicional o bloquee una función no deseada. A principios de los noventa, Rosenberg et al. llevaron a cabo el primer ensayo autorizado de transferencia génica en humanos, en el cual trataron a 2 pacientes, que padecían melanoma avanzado, con retrovirus modificados que expresaban el factor de necrosis tumoral [122-124]. Desde entonces, se han sucedido numerosos ensayos de terapia génica [125, 126] y con ellos ha incrementado el conocimiento de los vectores virales y sus posibles aplicaciones. Entre ellas destacan el desarrollo de vacunas [127], avances en el campo de la neurociencia [128], en el campo de la virología [129] o la generación *in vitro* de partículas virales para su uso como controles positivos de ensayos qPCR [130].

Los vectores virales cuyo uso está más extendido, junto con sus características más notables, se recogen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Características principales de los vectores virales cuyo uso es más frecuente. Fuente: Adaptado de [126].

	Gammaretrovirus	Lentivirus	Adenovirus	Virus adeno- asociados
Genoma	RNA	RNA	DNA	DNA
Tamaño máximo del transgen	7 kb	18 kb	37 kb	4,9 kb
Transducción de células quiescentes	No	Sí	Sí	Sí
Integración	Sí	Sí	No	Poco frecuente
Tipo de expresión	Permanente	Permanente	Temporal	Temporal
Respuesta inmunológica	Baja	Baja	Alta	Baja
Inmunidad preexistente	Improbable	Improbable	Sí	Sí

En función de su aplicación, las características a valorar difieren. Por ejemplo, en aquellos estudios donde interesa modificar células neuronales, los vectores virales con capacidad de transducir células quiescentes poseen un valor añadido.

En ensayos de terapia génica se valora, entre otros, el riesgo biológico, la inmunidad preexistente y el grado de respuesta inmunológica asociado a cada vector viral. En estos casos la respuesta inmunológica e inflamatoria, que sufre el paciente tratado mediante terapia génica, debe ser mínima. A su vez, se valora si el sistema viral utilizado conduce a la integración del transgén en el genoma de la célula infectada. En caso afirmativo la expresión es permanente, pero conviene considerar el patrón de integración, ya que ciertos virus como los retrovirus suelen presentar una disposición natural para integrarse cerca de promotores, con el consiguiente riesgo de activación de proto-oncogenes [131].

En la generación de partículas virales para su uso como controles positivos de ensayos qPCR interesa seleccionar aquel sistema viral que imite con mayor precisión al virus salvaje, del cual se desea elaborar un control positivo. Será determinante, por tanto, seleccionar el sistema viral considerando si el control positivo requiere genoma de tipo DNA o RNA. Otro factor clave es el

tamaño del transgén, cuanto mayor sea la capacidad del sistema viral de albergar fragmentos de gran tamaño, mayor será la universalidad del control positivo generado, ya que será posible introducir un mayor número de dianas de qPCR. Generalmente, el tamaño máximo que admite cada sistema viral suele corresponderse con el tamaño del genoma del virus salvaje. No ocurre así en el caso de lentivirus cuyo genoma posee un tamaño aproximado de 9 kb y, sin embargo, se han conseguido crear partículas lentivirales con un genoma de tamaño de 18 kb. Cabe destacar que el incremento del tamaño del transgén conduce a una disminución del título viral, como consecuencia de una menor eficiencia durante el empaquetamiento [132].

Los vectores lentivirales han sido el método de elección para fabricar los materiales de referencia del virus del Ébola y SARS-CoV-2 (suministrados por NIBSC) [130], así como el método seleccionado por diferentes autores para la creación de partículas virales recombinantes de los virus chikungunya [133], MERS-CoV [134, 135] o SARS-CoV-2 [129, 136, 137].

Los sistemas que se contemplan en la **Tabla 2** son los más estudiados, pero no los únicos existentes. El virus del mosaico del tabaco ha sido utilizado para la creación de controles positivos del virus del Ébola [138, 139], mientras que el virus del mosaico del caupí se ha utilizado para la creación de partículas virales del virus de la fiebre aftosa [140, 141] y del virus de la enfermedad vesicular porcina [141].

La gama de productos desarrollada en este proyecto de investigación deriva del trabajo con vectores lentivirales, en concreto del VIH-1, cuyo genoma, estructura y ciclo vital se detallan en el siguiente apartado II.3.2.

## II.3.2 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

En 1970 los investigadores Temin y Baltimore [142, 143] describieron por primera vez la existencia de una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA, a la cual denominaron transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. Se encontró así la excepción al dogma central de la biología molecular que afirmaba que la transferencia de información ocurre de DNA a RNA y no en sentido inverso. Esta enzima dio nombre a la familia de virus que hoy en día conocemos como *Retroviridae*, la cual se clasifica en 2 subfamilias: *Spumaretrovirinae* y *Orthoretrovirinae*. Esta última se compone de 6 géneros:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -retrovirus y lentivirus, mientras que *Spumaretrovirinae* únicamente se compone del género spumavirus [126].

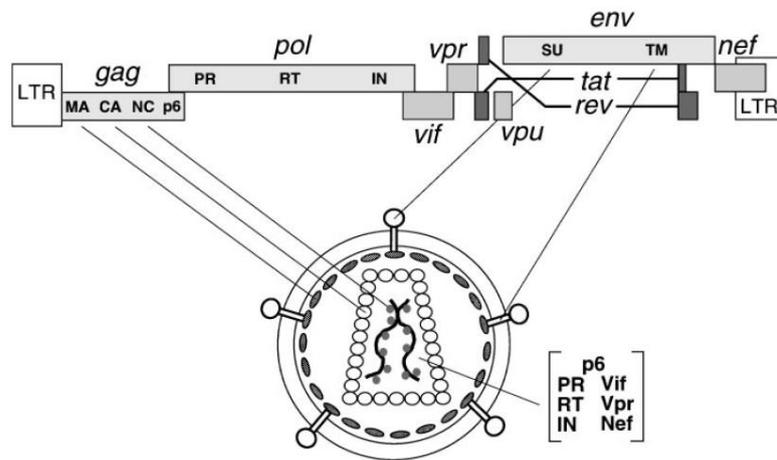
El VIH-1, perteneciente al género lentivirus, dentro de la familia *Retroviridae*, es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se distinguen 2 tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se ha extendido a lo largo de todo el mundo, mientras que el VIH-2 se localiza principalmente en África Occidental.

### II.3.2.1 GENOMA Y ESTRUCTURA DEL VIH-1

El VIH-1 presenta forma esférica y mide aproximadamente 100 nm de diámetro [144]. Su genoma de tamaño aproximado 9 kb está flanqueado por dos secuencias de nucleótidos específicas denominadas repeticiones terminales largas (LTR, del inglés *long terminal repeat*) que engloban 9 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*); un esquema de su genoma se muestra en la **Figura 11**.

Cada secuencia LTR se compone de 3 regiones: secuencia única U3 + secuencia repetida R + secuencia única U5. Estas secuencias LTR no están presentes en el genoma viral, sino que se

forman como consecuencia del proceso de retrotranscripción (ver apartado II.3.2.2.2). La secuencia comprendida entre ambas regiones LTR será el fragmento que se inserte en el genoma de la célula infectada (denominado provirus). Los 9 ORFs presentan funciones diversas: estructurales (*gag* y *env*), enzimáticas (*pol*), reguladoras (*tat* y *rev*) y accesorias (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*). Su implicación en el ciclo vital del VIH-1 se desarrolla en el siguiente apartado II.3.2.2.



**Figura 11.** Esquema del genoma del VIH-1 y estructura del virión. MA: matriz, CA: cápside, NC: nucleocápside, PR: proteasa, RT: retrotranscriptasa, IN: integrasa, SU: subunidad de superficie, TM: subunidad transmembrana, LTR: repeticiones terminales largas. Fuente: [145].

Las proteínas Vif, Vpr, Vpu y Nef se denominan accesorias puesto que su función es prescindible en la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes.

La proteína Vif participa en los procesos de desensamblaje del virión y retrotranscripción. A su vez, se ha observado que mutantes defectivos en la proteína Vif muestran una infectividad reducida, hecho que solo ocurre en unos determinados tipos celulares. En las denominadas células permisivas, esto es, tolerantes a la infección por virus, la infectividad no se ve alterada en ausencia de Vif [145, 146].

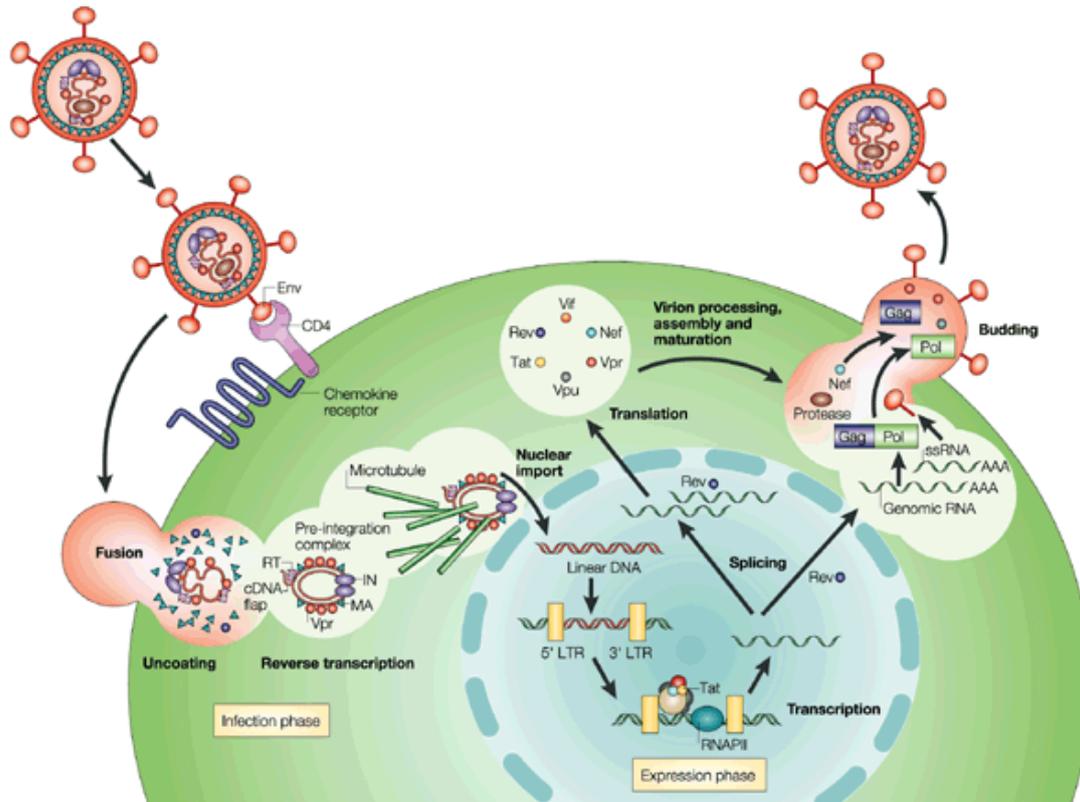
La proteína Vpr presenta funciones asociadas a los procesos de importación del complejo de pre-integración al núcleo de las células infectadas, transactivación de las LTR, apoptosis celular, detención del ciclo celular y activación de la respuesta al daño del DNA [147].

La proteína Vpu degrada las moléculas CD4 presentes en el retículo endoplasmático para evitar su interacción con las proteínas de envuelta recién sintetizadas en este orgánulo y permitir así su transporte a la membrana celular para el ensamblaje de las partículas virales [145]. La proteína Vpu también facilita el proceso de salida del virión al exterior celular mediante la formación de un canal iónico en el aparato de Golgi que altera el potencial de la membrana y contribuye de este modo a la liberación del virión al exterior celular [147, 148].

La proteína Nef, al igual que la proteína Vpu, disminuye la expresión de CD4, pero no actúa a nivel de retículo endoplasmático sino en la membrana celular. Evita la interacción de la proteína de envuelta con CD4, induciendo la endocitosis de CD4 para su posterior degradación en el lisosoma [146].

### II.3.2.2 CICLO VITAL DEL VIH-1

Mediante el ciclo vital, el virus es capaz de replicarse aprovechando la maquinaria celular y producir así nuevos viriones infectivos. En la **Figura 12** se representan las diferentes etapas que constituyen el ciclo vital del VIH-1.



**Figura 12.** Ciclo replicativo del VIH-1. El VIH-1 accede al interior celular mediante la unión de la proteína de envuelta viral (Env) con el receptor CD4 y un co-receptor. Se produce la entrada del virus mediante fusión de membranas, una vez en el interior se produce el desensamblaje del virus y la formación del complejo de retrotranscripción. Mediante este complejo, en el cual está presente la RT viral, se produce la conversión del RNA viral en cDNA. Este cDNA junto con diferentes proteínas virales forman el complejo de pre-integración que es importado al núcleo, lugar donde tiene lugar la inserción del cDNA viral en el genoma celular. El cDNA viral se integra a través de las secuencias LTR en un proceso mediado por la integrasa viral, dando lugar al provirus. El cDNA es transcrito mediante la maquinaria celular y el mRNA resultante es transportado al citoplasma aprovechando la maquinaria celular o mediante la ayuda de la proteína Rev. Una vez en el citoplasma, el mRNA se traduce dando lugar a las proteínas virales que migran junto con el RNA viral a la membrana plasmática, localización donde tiene lugar el ensamblaje del virus y su liberación al exterior. Fuente: [149].

#### II.3.2.2.1 ENTRADA Y DESENSAMBLAJE

El VIH-1 presente en el medio extracelular es capaz de infectar células mediante la unión de su glicoproteína de envuelta con el receptor celular CD4 [150]. Este receptor se expresa en la superficie de diversas células como linfocitos T, monocitos y células dendríticas [151], por tanto, la afinidad de la proteína viral por un determinado receptor celular es lo que determina el tropismo del virus, es decir, el tipo de células que infecta.

La unión de la proteína viral con el receptor celular provoca un cambio conformacional que conduce a una segunda unión de la proteína de envuelta con un co-receptor celular, el cual varía en función del tipo célula. El proceso finaliza con la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula [152]. El virus en el interior celular sufre un proceso de desensamblaje,

en el que tras una reorganización interna se produce la formación del complejo de retrotranscripción [153].

### II.3.2.2 RETROTRANSCRIPCIÓN

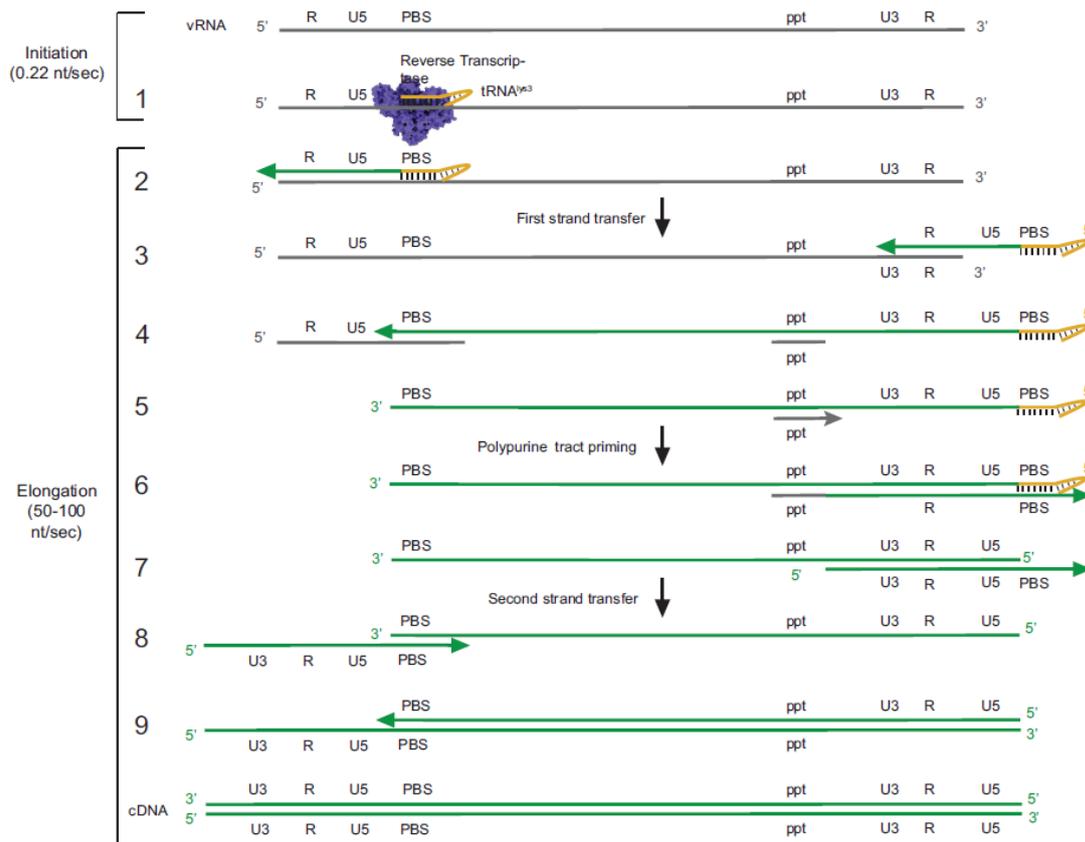
La retrotranscripción, proceso en el cual se convierte el RNA viral en cDNA mediante la actuación de la RT viral, tiene lugar de acuerdo con el esquema mostrado en la **Figura 13**. Debe considerarse que la RT viral tiene doble actividad: actividad polimerasa (tanto DNA polimerasa RNA dependiente como DNA polimerasa DNA dependiente) y actividad ribonucleasa (elimina el RNA de moléculas híbridas DNA-RNA).

El proceso de retrotranscripción se inicia por la unión del RNA de transferencia de lisina ( $\text{tRNA}^{\text{lys}_3}$ ) al sitio de unión del cebador (PBS, del inglés *primer binding site*), localizado en el extremo 5' del RNA viral. Este  $\text{tRNA}^{\text{lys}_3}$  procede del interior del virión, ya que entre 20 y 770 moléculas de  $\text{tRNA}^{\text{lys}_3}$  son empaquetadas junto al RNA viral durante el ensamblaje del virión [154-156].

La RT viral comienza a sintetizar el cDNA a partir del RNA viral gracias a su actividad DNA polimerasa RNA dependiente y cuando alcanza el extremo 5', el DNA recién sintetizado (hebra negativa) se transfiere al extremo 3' del RNA (proceso denominado transferencia de la primera hebra). Ambas hebras se unen por complementariedad en la región R y, conforme va avanzando la retrotranscripción, el RNA del híbrido DNA-RNA va siendo degradado por la actividad ribonucleasa de la RT. La región de polipurina (ppt, del inglés *polypurine tract*) es resistente a la actividad ribonucleasa y actúa como cebador para la síntesis de la hebra positiva de DNA, la cual tiene lugar mediante la actividad DNA polimerasa DNA dependiente de la RT.

Cuando se alcanza la región PBS, se produce la transferencia de la segunda hebra, que se une por complementariedad en la región PBS del extremo 3' y posteriormente finaliza la síntesis de la hebra positiva de DNA. A su vez, se completa la síntesis de la hebra negativa de DNA. El DNA de doble cadena recién sintetizado presenta un tamaño superior al genoma viral, puesto que se han añadido las regiones U3 y U5 en los extremos 5' y 3', respectivamente. A las secuencias U3+R+U5 se les conoce como LTR y se forman como consecuencia del proceso de retrotranscripción. Estas secuencias, por tanto, no están presentes en el genoma viral, únicamente se encuentran en el provirus [156].

Durante el proceso de retrotranscripción pueden ocurrir eventos de recombinación entre las 2 hebras del RNA viral, las cuales se han empaquetado de forma conjunta en el mismo virión [157, 158]. La presencia de estas 2 cadenas de RNA garantiza la supervivencia del virión en el caso de que una se encuentre dañada. Además, los eventos de recombinación entre hebras, sumados a la elevada tasa de error de la RT viral, constituyen una notable fuente de variabilidad, lo que le otorga al virión una importante ventaja evolutiva [159].



**Figura 13.** Esquema del mecanismo de retrotranscripción del RNA del VIH-1. El proceso se inicia con la unión de tRNA<sup>lys3</sup> a la región PBS y se comienza a sintetizar la hebra negativa. Una vez se alcanza el extremo 5' se produce la transferencia de la primera hebra, la cual se va extendiendo por la acción de la RT. A su vez se comienza a sintetizar la hebra positiva a partir de la región ppt que actúa como cebador. Cuando se alcanza la región PBS se produce la transferencia de la segunda hebra, cuya síntesis finaliza casi al mismo tiempo que se completa la síntesis de la hebra negativa, dando lugar al cDNA viral. Fuente: [156].

El proceso de retrotranscripción tiene lugar mayoritariamente en la célula infectada (tras el desensamblaje del virión), pero se ha demostrado que existe cierta actividad retrotranscriptasa durante el ensamblaje del virión o justo momentos después en su salida al exterior celular. Trono (1992) [160] y Lori et al. (1992) [161] sugirieron la existencia de cDNA viral en el interior del VIH-1, ya que realizaron las siguientes observaciones:

-La señal de DNA no se veía reducida al digerir con desoxirribonucleasa (DNasa) las partículas virales íntegras, pero esta señal desaparecía si la digestión tenía lugar sobre partículas virales lisadas. Esta observación apoya la idea de la localización del DNA en el interior del virión.

-Se encontró un exceso de retrotranscritos “tempranos” frente a retrotranscritos “tardíos”. Se cree que esto es debido a un inicio prematuro de la retrotranscripción, la cual estaría ocurriendo en diferentes moléculas de RNA viral. Este proceso no llegaría a completarse y se pararía en diferentes puntos, generando cDNAs de distinto tamaño. Se supone que la retrotranscripción volvería a retomarse una vez el virión se encontrase en el interior de la célula infectada.

Este proceso denominado retrotranscripción endógena natural (NERT, *natural endogenous reverse transcription*) se fundamenta en 2 hechos:

-La RT en su forma inmadura (formando parte de la poliproteína Gag-Pol) presenta actividad. Es por ello por lo que puede iniciar la retrotranscripción durante el ensamblaje del virión o en momentos posteriores, cuando aún está en su forma inmadura [160, 161].

-Los dNTPs (sustrato de la RT) pueden atravesar la membrana viral y no la membrana plasmática, puesto que la membrana viral presenta una mayor permeabilidad [162].

Estudios más recientes indican que la nucleoproteína del VIH-1 sería la encargada de bloquear en gran medida el inicio de la retrotranscripción, hasta una vez finalizado el desensamblaje del virión en la célula infectada. En concreto esta función se asocia a los dominios dedos de zinc que presenta la nucleoproteína viral. Se ha demostrado que la mutación en uno o ambos dominios conduce a un inicio temprano de la retrotranscripción, lo que conlleva a la generación de viriones con un alto contenido de cDNA en su interior [153, 163].

### II.3.2.2.3 IMPORTACIÓN AL NÚCLEO E INTEGRACIÓN EN EL GENOMA CELULAR

La etapa anterior de retrotranscripción concluye con la formación de un complejo de pre-integración, compuesto por el cDNA viral y diferentes proteínas virales. Este complejo es transportado al núcleo mediante la actuación conjunta de algunas proteínas virales, como la proteína de matriz, la integrasa o la proteína Vpr, y la maquinaria celular [164]. Una vez en el núcleo, la integrasa viral es la encargada de insertar el cDNA viral en el genoma celular. Esta integración puede ocurrir en múltiples localizaciones, aunque experimentos *in vitro* sugieren cierta preferencia por regiones con alta densidad de genes y alta actividad transcripcional [165-167]. Una vez integrado, el cDNA viral está listo para ser transcrito por la maquinaria celular.

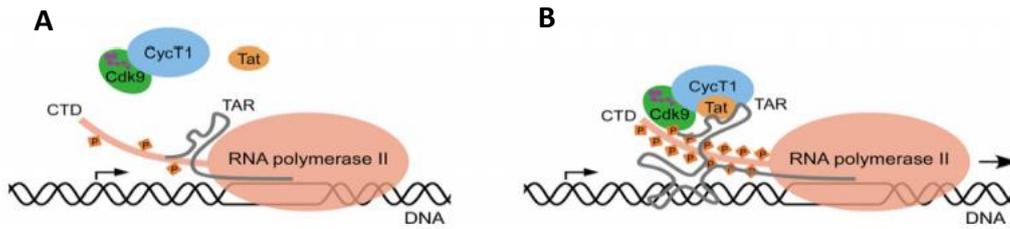
### II.3.2.2.4 TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

La transcripción del genoma del VIH-1 se produce mediante la RNA polimerasa II celular, que reconoce la secuencia promotora situada en la región 5'LTR. Esta región contiene sitios de unión a diferentes factores de transcripción celulares como NF- $\kappa$ B y Sp1. La transcripción finaliza en el último nucleótido de la región R situada en el extremo 3' donde tiene lugar la poliadenilación [146]. A continuación, el mRNA es procesado a nivel post-transcripcional, en el núcleo de la célula infectada, y transportado al citoplasma para su traducción. En estas etapas intervienen las proteínas Tat y Rev, cuya implicación se desarrolla a continuación.

#### TAT

La proteína Tat es codificada en 2 exones (**Figura 11**) y funciona como activador transcripcional mediante su unión a un elemento en *cis*, denominado elemento de respuesta a la transactivación (TAR, del inglés *trans-activation response element*), localizado en el extremo 5' del mRNA viral naciente [168]. La unión Tat-TAR incrementa la procesividad de la RNA polimerasa II, es decir, mejora la capacidad de la polimerasa celular para poder transcribir secuencias de gran tamaño, como es el caso del genoma del VIH-1 que posee un tamaño aproximado de 9 kb [146, 147, 169].

La proteína Tat se une a la estructura secundaria TAR, lo que permite la unión del factor de elongación de la transcripción positiva (P-TEFb). Este factor de elongación está compuesto por una ciclina T1 (CycT1) y una quinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9). La función de la quinasa es fosforilar a la RNA polimerasa II en su extremo C-terminal (CTD), confiriéndole una mayor afinidad por el DNA molde y, por consiguiente, un incremento de la procesividad [170]. Un esquema del mecanismo de actuación de la proteína Tat se muestra en la **Figura 14**.

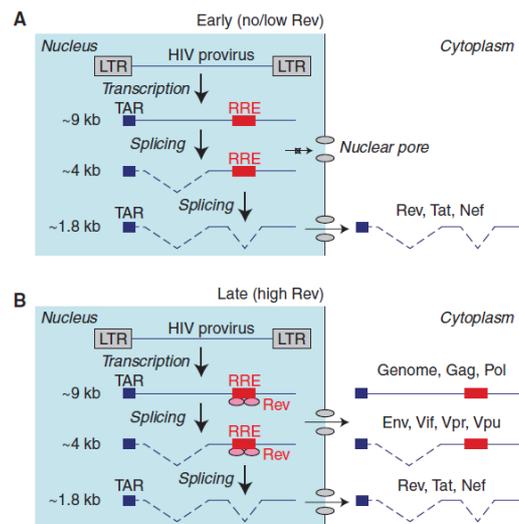


**Figura 14.** Modelo del complejo de activación de la transcripción mediado por la unión Tat-TAR. (A) RNA polimerasa II pausada. (B) RNA polimerasa II tras activación por unión Tat-TAR. Fuente: [170].

REV

El mRNA viral está compuesto por exones e intrones, estos últimos son eliminados mediante un mecanismo de corte-empalme conocido como *splicing*. Generalmente los mRNAs celulares que no han sufrido un proceso de *splicing* completo son degradados en el núcleo. El VIH-1 ha desarrollado un mecanismo, en el que interviene la proteína Rev, para evadir este sistema celular. La proteína Rev se une a la estructura secundaria conocida como elemento de respuesta a Rev (RRE, del inglés *Rev-response element*), la cual está presente en el gen de la envuelta (*env*). Esta unión Rev-RRE permite el transporte del núcleo al citoplasma del mRNA que contiene intrones. Sin embargo, el transporte al citoplasma del mRNA viral libre de intrones, que presenta un tamaño de 1,8 kb, es independiente de la proteína Rev, ya que aprovecha el mismo sistema celular de transporte que los mRNAs celulares.

Por otra parte, la proteína Rev en su unión con RRE actúa bloqueando uno de los sitios de *splicing* del mRNA viral, de este modo, se favorece la producción de las proteínas Gag y Pol (derivan del mRNA sin *splicing* que presenta un tamaño de 9 kb) y de las proteínas Env, Vif, Vpr y Vpu (derivan del mRNA con un único sitio de *splicing* que presenta un tamaño de 4 kb). La producción de estas proteínas se produce en una fase tardía ya que su síntesis es dependiente de la presencia de Rev a elevadas concentraciones [171]. Por tanto, las proteínas que se producen en una fase temprana son las proteínas Rev, Tat y Nef, ya que derivan del mRNA viral con dos sitios de *splicing*, tal y como se esquematiza en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Esquema de las fases temprana (A) y tardía (B) de la expresión del mRNA del VIH-1. Fuente: [171].

Durante la traducción del RNA viral, que tiene lugar en el citoplasma celular, se produce un fenómeno de desplazamiento del marco de lectura. Esto ocurre ya que se comienza a traducir

la proteína Gag y, una vez se alcanza el final de la secuencia que la codifica, el ribosoma retrocede un nucleótido para comenzar la traducción de Pol en un nuevo marco de lectura, originando la poliproteína Gag-Pol. La frecuencia con la que tiene lugar este fenómeno es del 5-10% [145, 172], lo que implica un ratio de proteínas Gag:Gag-Pol equivalente a 20:1 [173, 174].

### II.3.2.2.5 ENSAMBLAJE DEL VIRIÓN

Todos los componentes sintetizados en la etapa anterior, los cuales conformarán la partícula viral, migran a las proximidades de la membrana plasmática celular. En el caso de las proteínas de envuelta, incluso se insertan en ella [151]. La proteína de matriz, enriquecida en aminoácidos básicos en su región N-terminal, facilita este proceso [145, 175].

El proceso de ensamblaje del virión presenta una duración media de 5-9 min [176, 177] y se produce mayoritariamente en las regiones de la membrana celular conocidas como balsas lipídicas. Estas regiones están enriquecidas en colesterol, fosfolípidos y proteínas de membrana [178]. El proceso de ensamblaje consiste en la internalización del RNA viral y en la creación de múltiples interacciones entre las poliproteínas Gag-Gag y Gag-GagPol, que conformarán la estructura externa del virión.

El virión del VIH-1 contiene en su interior 2 moléculas de RNA (**Figura 11**). Estas 2 moléculas de cadena simple corresponden, en su gran mayoría, al RNA viral que no ha sufrido *splicing* [179]. Este RNA, por tanto, conserva la región comprendida entre la región no traducida en 5' (5'UTR, del inglés 5'-*untranslated región*) y la primera parte del gen *gag*. En esta región se forman cuatro estructuras secundarias de tallo-bucle (SL, del inglés *stem-loops*) que intervienen en diferentes procesos:

- SL1**: contiene la señal de inicio de la dimerización (DIS, del inglés *dimer initiation signal*)
- SL2**: donador principal de *splicing* (SD, del inglés *major splice donor*)
- SL3**: señal de empaquetamiento ( $\Psi$ , *psi*)
- SL4**: contiene el sitio de inicio (AUG) de la traducción

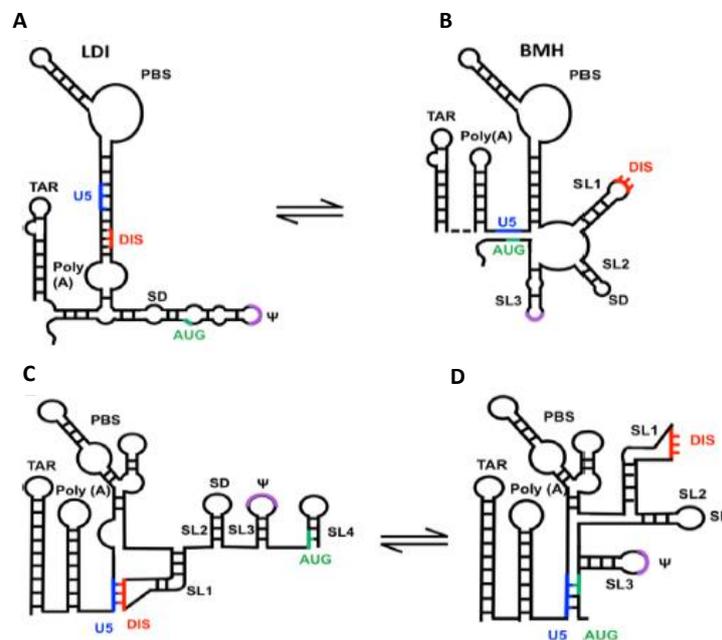
En esta región también encontramos el elemento TAR, la región PBS o la señal poliA, cuyas funciones se asocian con los procesos de transcripción y replicación.

Se ha demostrado que las 2 hebras de RNA viral que se empaquetan de forma conjunta interactúan previamente en el citoplasma de la célula formando un dímero [180]. El proceso de dimerización del RNA se inicia mediante interacciones en la región DIS.

Sakuragi et al. (2001) [181] crearon mutantes cuyo RNA viral presentaba 2 veces la región de dimerización y observaron que en estos mutantes se producían preferentemente interacciones intramoleculares, frente a interacciones intermoleculares. Esta preferencia dio lugar a la formación mayoritaria de partículas virales en cuyo interior se encontraba una única molécula de RNA. En experimentos posteriores postularon que la estructura secundaria o terciaria que adopta la molécula de RNA durante la dimerización, es el factor clave para que el empaquetamiento tenga lugar [159, 182]. A su vez, determinaron la región mínima necesaria para que tenga lugar la dimerización *in vivo*. Esta región presenta un tamaño de 144 pb e incluye los *stem-loops* SL1, SL3 y SL4 (se prescinde de SL2) [159]. Sin embargo, a pesar de observarse una correcta dimerización y empaquetamiento, se observó una replicación e infectividad reducida en los viriones carentes de SL2.

El RNA viral completo (sin *splicing*) cumple una doble función: constituye el genoma de los viriones recién formados y, a su vez, es el molde para la síntesis de las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Se han postulado varias teorías sobre cómo se consiguen equilibrar ambas funciones, todas ellas se fundamentan en el hecho de que un mismo RNA puede adoptar diferentes estructuras secundarias. Se proponen 2 posibles estructuras de la molécula de RNA viral. Una de ellas dejaría inaccesible DIS pero accesible el codón de inicio AUG, favoreciendo el inicio de la traducción y, por tanto, la síntesis de Gag y Gag-Pol. La segunda estructura dejaría expuesta la secuencia DIS favoreciendo el proceso de dimerización del RNA viral y, por tanto, el empaquetamiento del RNA.

Diferentes modelos de interacciones han sido propuestos: Abbink y Berkhout (2003) [183] consideran la interacción DIS-poliA como responsable de la estructura secundaria que favorece el inicio de la traducción (**Figura 16A**) y la interacción U5-AUG como favorecedora del proceso de dimerización (**Figura 16B**), mientras que Lu et al. (2011) [184] señalan las interacciones U5-DIS (**Figura 16C**) y U5-AUG (**Figura 16D**), respectivamente.



**Figura 16.** Esquema de las posibles estructuras secundarias que adopta el RNA del VIH-1, favoreciendo su traducción (izquierda) o dimerización y empaquetamiento (derecha). Modelo propuesto por Abbink y Berkhout (2003) (estructuras A y B), frente a modelo propuesto por Lu et al. (2011) (estructuras C y D). Fuente: [178].

El paso de una estructura a otra estaría marcado por la nucleoproteína viral, esta proteína está enriquecida en aminoácidos básicos y presenta 2 dominios de zinc mediante los cuales interacciona con el RNA viral. También presenta actividad chaperona que estabiliza el dímero RNA. Aldovini y Young afirmaron en 1990 [185] que el ensamblaje viral tenía lugar incluso en ausencia del RNA viral. Experimentos recientes confirman que en ausencia de RNA viral se produce el ensamblaje, pero estas cápsides no están vacías, sino que contienen RNA celular. Gag se une al RNA tanto de forma específica (mediante  $\Psi$ ) como inespecífica (mediante interacciones electrostáticas). El empaquetamiento preferencial del RNA viral frente al RNA celular se explicaría por una velocidad de nucleación mayor cuando se dan ambas interacciones [186].

### II.3.2.2.6 SALIDA AL EXTERIOR Y MADURACIÓN DEL VIRIÓN

Una vez formado el virión en el interior celular, este se libera al exterior llevando consigo una parte de la membrana celular, que formará parte de la estructura externa del virión [187].

Durante el empaquetamiento, la proteína Gag se ha dispuesto recubriendo la cara interna de la membrana celular. Es en esta etapa de salida al exterior y maduración del virión cuando la proteasa viral se activa y escinde las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Gag da lugar a las proteínas MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6 y Pol da lugar a las proteínas PR (proteasa), RT (retrotranscriptasa) e IN (integrasa) (**Figura 11**). La escisión de estas poliproteínas conduce a una reorganización del virión, ya que tras la escisión la proteína MA permanece asociada a la cara interna de la membrana, la proteína CA pasa a conformar la cápside y la proteína NC recubre el RNA genómico situado en el interior del virión [188-190] (**Figura 11**).

En el interior del virión también se encuentran el resto de las proteínas virales: PR, RT, IN, p6, Vif, Vpr y Nef. Durante esta etapa no solo se producen cambios en la estructura externa sino también en la interna ya que la nucleoproteína madura provoca un cambio conformacional en el RNA viral [173].

### II.3.3 GENERACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES MEDIANTE EL SISTEMA LENTIVIRAL

El sistema lentiviral permite la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes, cuya estructura externa pertenece al VIH-1 y cuyo genoma puede consistir en cualquier secuencia de RNA, siempre que no supere el tamaño máximo que puede ser empaquetado mediante este sistema y siempre que contenga las señales mínimas para garantizar este empaquetamiento. Las partículas virales son comúnmente denominadas en la bibliografía como vectores virales, término no utilizado en este documento en aquellos casos donde sea probable su confusión con el DNA plasmídico que se utiliza durante su síntesis.

El proceso de producción de las partículas virales mediante el sistema lentiviral se resume en la **Figura 17**. En primer lugar, los componentes que conformarán la partícula viral se segmentan en diferentes plásmidos:

**1-Plásmido de transferencia:** contiene la información genética que constituirá el genoma de la partícula viral.

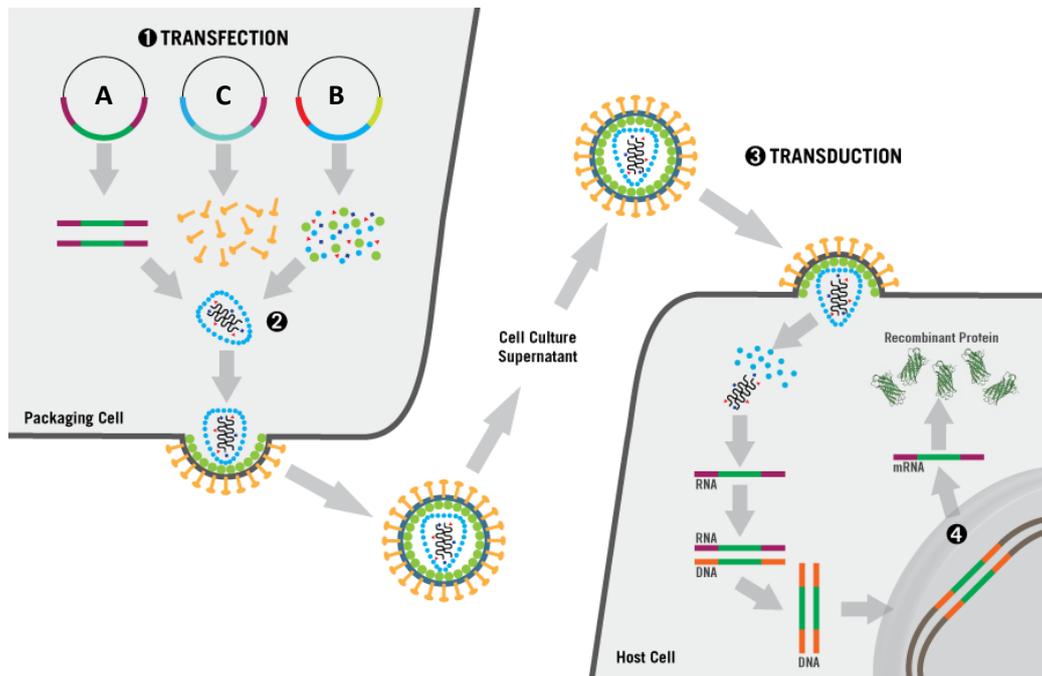
**2-Plásmido de empaquetamiento:** contiene los genes que codifican para las diferentes proteínas del VIH-1, tanto funcionales como estructurales. Estas últimas son las que conformarán la estructura externa de la partícula viral.

**3-Plásmido de envuelta (opcional):** contiene el gen que codifica para la proteína de envuelta. Esta proteína se inserta en la membrana plasmática de la célula y se sitúa en la cara externa de la partícula viral. Determina el tropismo del virus y es posible sustituirla por la proteína de envuelta de otro virus, en un proceso denominado pseudotipaje [191].

Los elementos no esenciales del genoma del VIH-1 se eliminan en este sistema para reducir al máximo la probabilidad de que se reconstituya el virus original por eventos de recombinación homóloga. La composición detallada de los plásmidos lentivirales de transferencia, empaquetamiento y envuelta se contempla en el siguiente apartado II.3.3.1

Una vez segmentados los componentes virales en diferentes plásmidos, estos deben ser introducidos en el interior de células eucariotas mediante co-transfección. Las células HEK 293T son muy utilizadas en este proceso. Son células que crecen en adherencia y derivan de las células HEK 293, las que a su vez proceden de células renales embrionarias humanas que fueron transformadas con DNA de Adenovirus tipo 5. El antígeno largo T del virus de simio 40 fue introducido en las células HEK 293 originando las células HEK 293T, las cuales son altamente transfectables y dan lugar a títulos virales significativamente superiores que las células HEK 293 [192, 193].

Una vez en su interior, el DNA plasmídico se transcribe a RNA y este se traduce gracias a la maquinaria celular. Los diferentes componentes del virus migran a la membrana plasmática celular, donde se produce el ensamblaje (empaquetamiento) de la partícula viral y su posterior liberación al medio extracelular. Ambos procesos tienen lugar del mismo modo que lo descrito para el VIH-1 salvaje (apartados II.3.2.2.5 y II.3.2.2.6, respectivamente). Las partículas virales liberadas al medio extracelular se denominan viriones y pueden infectar células adyacentes, mediante un proceso denominado transducción. Las etapas de entrada al interior celular, desensamblaje, retrotranscripción, importación al núcleo e integración ocurren de forma análoga al VIH-1 salvaje (ver apartado II.3.2.2).



**Figura 17.** Esquema del proceso de producción de partículas virales recombinantes de RNA mediante el sistema lentiviral. Los plásmidos de transferencia (A), empaquetamiento (B) y envuelta (C) son introducidos en células eucariotas (transfección), donde el DNA plasmídico se transcribe a RNA y se sintetizan las diferentes proteínas virales. En las proximidades de la membrana celular tiene lugar el empaquetamiento de la partícula viral, la cual es liberada al exterior y puede infectar una célula adyacente mediante un proceso denominado transducción. Una vez en su interior el virus se comporta de forma similar al VIH-1 salvaje, insertando su genoma en forma de DNA de doble hebra en el genoma de la célula infectada. Fuente: [194].

El diseño de los plásmidos lentivirales ha evolucionado de acuerdo con tres objetivos: incrementar su seguridad, albergar genes exógenos de gran tamaño y aumentar la eficiencia del proceso [195]. A lo largo de la historia han surgido diferentes generaciones de plásmidos que se contemplan en el siguiente apartado.

### II.3.3.1 DESARROLLO DE DIFERENTES GENERACIONES DE PLÁSMIDOS LENTIVIRALES

Los elementos del genoma del VIH-1 se pueden clasificar en dos grupos: elementos que actúan en “cis” y, por tanto, se mantienen en el mismo plásmido que el transgén (plásmido de transferencia) y elementos que actúan en “trans” y, debido a ello, se localizan en plásmidos independientes. Cuanto mayor sea el número de plásmidos utilizados, menor será el riesgo de obtener un lentivirus competente para la replicación (LCR) ya que se requerirán más eventos de recombinación homóloga para reconstituir el virus original. La estrategia en la evolución de los plásmidos lentivirales ha sido incrementar la segmentación del genoma del VIH-1 y reducir los elementos esenciales al mínimo, aumentando así la bioseguridad y la capacidad de albergar un transgén de mayor tamaño [195].

Los primeros plásmidos diseñados se denominaron plásmidos de **primera generación**. Naldini et al., describieron en 1996 un sistema basado en 3 plásmidos [196]:

El plásmido de transferencia de primera generación (**Figura 18A**) utiliza la actividad promotora de la secuencia LTR viral para dirigir la expresión del transgén. El promotor LTR es un promotor débil que requiere la presencia de la proteína Tat, codificada en el plásmido de empaquetamiento. Este plásmido contiene dos elementos en “cis”: la señal de empaquetamiento  $\psi$  (Psi) y RRE.

El plásmido de empaquetamiento de primera generación (**Figura 18D**) contiene la mayoría de los genes lentivirales, excepto las secuencias  $\psi$  y LTR presentes en el plásmido de transferencia y el gen de la envuelta que se sitúa en un plásmido independiente (plásmido de envuelta)[197].

El plásmido de envuelta de primera generación codifica para la proteína de envuelta que, como se ha mencionado anteriormente, no tiene que ser necesariamente del VIH-1. Es muy común la utilización de plásmidos que codifican para la glicoproteína de envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) dado su amplio tropismo y la elevada estabilidad que confiere a la partícula viral, lo que facilita su purificación mediante técnicas como ultrafiltración o ultracentrifugación [191, 196, 198, 199].

En el sistema de **segunda generación**, el avance respecto a la primera generación reside en el plásmido de empaquetamiento (**Figura 18E**), en el cual se han eliminado los genes de las proteínas accesorias Vif, Vpr, Vpu y Nef, cuya función es prescindible para la generación *in vitro* de partículas virales [200, 201]

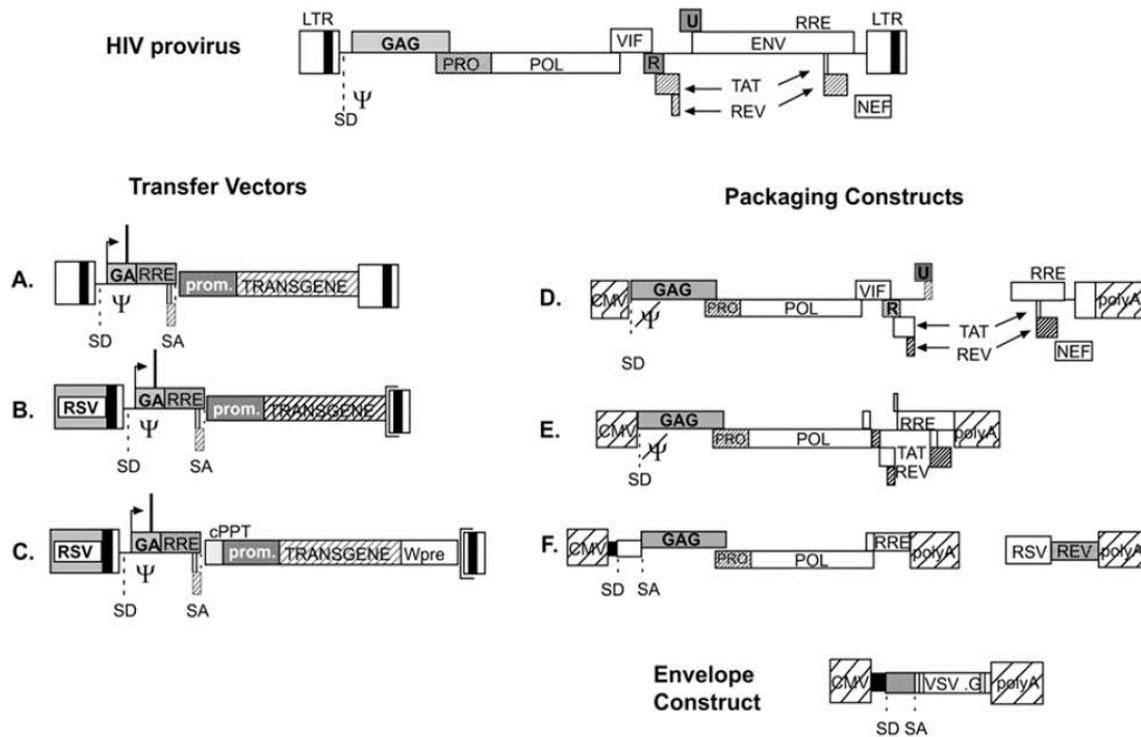
En el sistema de **tercera generación**, el genoma del VIH-1 se segmenta en 4 plásmidos [202].

El plásmido de transferencia de tercera generación (**Figura 18B**) presenta una delección en la región U3 del extremo 3'. Esta delección se transferirá al extremo 5' durante la retrotranscripción previa a la formación del provirus. Se suprime de este modo la actividad promotora de la secuencia LTR y, en su lugar, se incorpora un promotor heterólogo que dirigirá la expresión del transgén. Esta modificación permite prescindir de la actuación de la proteína Tat, cuya secuencia será eliminada del plásmido de empaquetamiento [201]. Por este motivo, los plásmidos de empaquetamiento de tercera generación (**Figura 18F**), al carecer del gen que codifica para la proteína Tat, son compatibles únicamente con los plásmidos de transferencia de tercera generación. Sin embargo, un plásmido de transferencia de tercera generación sí que es compatible con un plásmido de empaquetamiento de segunda generación.

A este tipo de vectores que presentan una delección en la región U3 y que, por tanto, han perdido su actividad transcripcional, se les conoce como vectores autoinactivados (o **vectores SIN**, del

inglés *self-inactivating vector*). Los vectores SIN reducen el riesgo de activación de proto-oncogenes vecinos en su inserción en el genoma de la célula huésped [203].

En el plásmido de empaquetamiento de tercera generación se han eliminado los genes que codifican para las proteínas Tat y Rev y este último se ha separado en un cuarto plásmido (**Figura 18F**).



**Figura 18.** Esquema del provirus HIV y diferentes plásmidos de transferencia, empaquetamiento y envuelta. Plásmido de transferencia de primera y segunda generación (A), de tercera generación (plásmido SIN, B) y plásmido SIN mejorado (C). Plásmido de empaquetamiento de primera (D), segunda (E) y tercera (F) generación. Fuente: [204].

El plásmido que codifica para la proteína Rev no es indispensable, de acuerdo con los hallazgos reportados por Kotsopoulou et al. (2000) [205]. La proteína Rev actúa principalmente a nivel de regulación post-transcripcional, favoreciendo el transporte del mRNA viral del núcleo al citoplasma y también participa en otros procesos como la estabilización del mRNA viral. El genoma del VIH-1 presenta regiones con alto contenido en nucleótidos Adenina-Uracilo, estas y otras regiones (localizadas en los genes *gag*, *pol* y *env*) se asocian con una alta inestabilidad del mRNA, la cual es compensada por la presencia de la proteína Rev. Debido a estas regiones ricas en UA, el uso de codones en el genoma del VIH-1 difiere del uso de codones en genes humanos.

Kotsopoulou et al. (2000) [205] diseñaron un nuevo gen *gag-pol* completamente diferente al gen del VIH-1 salvaje, para ello, realizaron modificaciones en la secuencia de nucleótidos del gen salvaje, pero mantuvieron la misma secuencia de aminoácidos. Esta optimización de codones condujo a una mejora en la estabilidad del mRNA viral, que supuso un incremento en la expresión de la poliproteína GagPol, permitiendo así prescindir de la proteína Rev y el elemento RRE. Esta modificación supuso una mejora en la seguridad de los vectores lentivirales, ya que al prescindir de las secuencias que codifican para la proteína Rev y el elemento RRE se disminuyen aún más las probabilidades de que tenga lugar un fenómeno de recombinación homóloga, minimizando así la posibilidad de formación de un lentivirus competente para la replicación.

Otra mejora en términos de bioseguridad consiste en la utilización de plásmidos de empaquetamiento defectivos en integrasa. La acción de la integrasa viral no es específica de sitio, pero tampoco completamente aleatoria [206]. Por este motivo, la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped puede desencadenar, entre otros, eventos de mutagénesis insercional, la alteración de genes supresores de tumores o la activación de la expresión de oncogenes. Los plásmidos defectivos en integrasa presentan mutaciones en la secuencia que codifica para la poliproteína GagPol [207]. De este modo, el DNA viral no se inserta en el genoma de la célula infectada, evitando así la posible activación de proto-oncogenes. En su contra, si el transgen no se integra en el genoma celular, su permanencia es limitada ya que se va perdiendo durante la división celular. Debido a ello, esta estrategia suele combinarse con el uso de maquinaria de integración específica de sitio o maquinaria para mantener el transgen en una unidad extracromosómica (episoma replicativo) [199].

Los plásmidos lentivirales han evolucionado no solo en términos de bioseguridad, sino también de eficiencia del sistema. La incorporación de los elementos cPPT (tracto central de polipurina, del inglés *central polypurine tract*) y WPRE (elemento de regulación post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota, del inglés *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) (**Figura 18C**) ha sido clave en la mejora de diferentes puntos del proceso:

**-cPPT:** este elemento incrementa la eficiencia de la transducción, ya que facilita los procesos de retrotranscripción e importación nuclear del complejo de pre-integración en las células infectadas [208, 209].

**-WPRE:** este elemento conduce a un aumento del título viral, ya que se ve incrementada la expresión del transgen. WPRE modifica la señal de poliadenilación del mRNA viral, lo que conduce a un aumento de la vida media del mRNA y favorece su exportación nuclear [204, 210].

El protocolo más extendido, descrito anteriormente, en la generación *in vitro* de partículas lentivirales es la co-transfección de células eucariotas con los plásmidos de transferencia, empaquetamiento y envuelta. Sin embargo, este protocolo se puede ver reemplazado por la utilización de líneas celulares empaquetadoras, que expresen de forma estable los genes que codifican para las proteínas Gag-Pol y VSV-G. De este modo, es posible prescindir de los plásmidos de empaquetamiento y envuelta. Este sistema suele ser un sistema inducible que permite la expresión controlada de las proteínas Gag-Pol y VSV-G, ya que pueden ocasionar toxicidad celular. La utilización de líneas empaquetadoras supone una ventaja en términos de coste, reproducibilidad y escalabilidad, pero resulta limitante por el tiempo requerido para establecer una nueva línea celular (generalmente 6 meses), la complejidad del proceso y la pérdida de flexibilidad. Este sistema no resulta útil en ensayos de pseudotipaje, donde se analizan distintas proteínas de envuelta, ya que esto supone la creación de una línea celular diferente para cada una de las proteínas de envuelta analizadas [195, 211, 212].

Hoy en día existen multitud de posibilidades en el campo de los vectores lentivirales, por lo que la elección del método utilizado debe cubrir los requerimientos en función de la aplicación buscada y ser un compromiso entre bioseguridad y eficiencia del sistema

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## MÉTODOS

### III.1 ELECCIÓN DEL TIPO DE VECTOR VIRAL UTILIZADO PARA LA GENERACIÓN *IN VITRO* DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

En este proyecto se seleccionó el sistema lentiviral, cuyas características se recogen en la **Tabla 2**, para la generación de partículas virales recombinantes de RNA. Mediante este sistema es posible empaquetar cualquier genoma de RNA, siempre que su tamaño no exceda la longitud máxima que puede ser empaquetada y su secuencia contenga unas mínimas señales de empaquetamiento. Los vectores lentivirales, además de ser un sistema muy estudiado y conocido debido a sus múltiples aplicaciones (ver apartado II.3.1), destacan frente a otros vectores virales en la capacidad de albergar insertos de gran tamaño [132]. Esta característica es una ventaja añadida en la aplicación de las partículas virales como control positivo de ensayos de RT-qPCR, ya que cuanto mayor sea la longitud del genoma de la partícula viral, mayor universalidad presentará el control positivo desarrollado puesto que contendrá un mayor número de dianas de RT-qPCR.

Por otra parte, los lentivirus destacan frente al uso de bacteriófagos, ya que imitan con mayor fidelidad a los virus que causan patología en humanos y presentan una mayor especificidad durante el empaquetamiento, discriminando con mayor precisión el RNA viral del RNA celular (ver apartado II.2.2.2.1).

El sistema lentiviral conduce a la generación de partículas virales deficientes para la replicación, ya que el genoma del VIH-1 salvaje se encuentra segmentado en diferentes plásmidos (ver apartado II.3.3.1), por lo que las partículas virales generadas solo se pueden multiplicar en las células donde son empaquetadas. En el caso de que estas partículas virales infectasen nuevas células, el RNA viral se convertiría en cDNA y este cDNA se integraría en el genoma celular. Pero en ningún caso se formarían nuevas partículas virales en las células infectadas, ya que este cDNA no contiene los genes que codifican para las diferentes proteínas estructurales y funcionales que conforman la partícula viral.

### III.2 DISEÑO DEL PLÁSMIDO LENTIVIRAL DE TRANSFERENCIA

La gran mayoría de plásmidos contienen, por una parte, una región para su replicación y transcripción en procariontes y, por otra parte, una región para su replicación y posterior transcripción en eucariotas. El RNA resultante de la transcripción en eucariotas es una secuencia flanqueada por las regiones R y U5 del VIH-1. Este RNA se compone de una secuencia común a todos los diseños y una secuencia variable (denominada inserto), la cual es específica de patógeno. Debido a ello, la longitud del RNA viral es la suma del tamaño de la región específica de patógeno (inserto) y de la región común. La región común del plásmido de transferencia B, utilizado en este proyecto, presenta una longitud aproximada de 3.700 pb (variable en función de los sitios de restricción utilizados durante el clonaje del inserto).

#### III.2.1 DISEÑO DEL INSERTO

En el diseño del inserto se consideró la longitud máxima del RNA viral que puede ser empaquetada por el sistema lentiviral. Esta longitud suele coincidir con la longitud del genoma

del virus salvaje, por lo que el tamaño máximo de RNA que puede ser empaquetado por el sistema lentiviral se encontraría en aproximadamente 9 kb, ya que es la longitud que presenta el VIH-1 salvaje. Sin embargo, se ha demostrado en la bibliografía el empaquetamiento efectivo mediante el sistema lentiviral de un genoma de hasta 18 kb, aunque la eficiencia del proceso se ve comprometida conforme aumenta el tamaño del genoma que debe ser empaquetado [132]. Por este motivo, el diseño de los insertos contemplados en este proyecto se realizó con el objetivo de no superar un tamaño de RNA viral de 9 kb (considerando las regiones común y específica), para evitar que la eficiencia durante la generación *in vitro* de partículas virales se viera comprometida. Por último, se incluyeron en la secuencia del inserto varios codones de parada como medida de bioseguridad, para evitar la posible traducción del mRNA viral en el interior celular.

La síntesis y clonaje, en el plásmido de transferencia B, de cada uno de los insertos diseñados se solicitó al proveedor externo GenScript, dando lugar a tantos plásmidos de transferencia como insertos fueron diseñados.

### III.2.2 SELECCIÓN DE LA CEPA DE REFERENCIA

Durante el diseño del inserto se seleccionó para cada virus una cepa de referencia, cuyo genoma se tomó como modelo y, por tanto, la secuencia de nucleótidos del inserto se sintetizó con el objetivo de presentar un 100% de homología con el genoma de la cepa seleccionada como referencia. El genoma de la cepa de referencia se seleccionó entre todos los genomas depositados en la base de datos de GenBank, priorizando aquellos genomas cuya fecha de depósito fuese reciente, puesto que el genoma del control positivo desarrollado debe aproximarse a aquellas variantes del virus que se encuentren en circulación recientemente. Por otra parte, se priorizaron aquellos genomas que se encontraban completamente anotados, descartando los números de acceso de GenBank que correspondían a genomas parciales. Además, se priorizaron los genomas cuyo depósito fue realizado por la OMS o, en su defecto, aquellos que habían sido seleccionados como cepa de referencia en la bibliografía o por diferentes casas comerciales dedicadas a la comercialización de controles positivos.

### III.3 CULTIVOS BACTERIANOS

Se recurrió al cultivo bacteriano para la multiplicación de los plásmidos lentivirales, los cuales se introdujeron en el interior de las bacterias mediante transformación, posibilitando de este modo su replicación durante el crecimiento del cultivo bacteriano. La cepa bacteriana utilizada para este fin fue la cepa *E. coli* DH5- $\alpha$ , ya que su transformación suele presentar una elevada eficiencia [213].

El trabajo en cultivos bacterianos fue llevado a cabo en condiciones asépticas y los residuos biológicos se desecharon en los contenedores de bioseguridad apropiados.

#### III.3.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Las células *E. coli* DH5- $\alpha$  fueron cultivadas tanto en medio líquido Luria-Bertani (LB, Lennox) como medio sólido LB-agar (Lennox), ambos suplementados con ampicilina (Sigma) a concentración final 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Para preparar 1 L de medio LB líquido se disolvieron 20 g de medio LB (composición: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio) en agua Elix®. El medio se esterilizó en una botella de vidrio en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 20 min. Una vez finalizado el proceso, se dejó enfriar hasta 50°C para su utilización inmediata o se almacenó a 4°C. Previamente a su utilización, se tomó una alícuota con la cantidad requerida de medio LB, se atemperó a 37°C y se añadió el volumen necesario de ampicilina (almacenada a -20°C a concentración de 50 mg/ml) para alcanzar una concentración final de 100 µg/ml de ampicilina.

Para preparar 1 L de medio LB-agar se disolvieron 35 g de medio LB-agar (composición: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio y 15 g agar) en agua Elix®. El medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 1 atm de presión durante 20 min. Una vez finalizado el proceso, se dejó enfriar hasta 50°C. A continuación, se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y se vertieron 25 ml de medio LB-agar por placa de 100 mm de diámetro. El medio LB-agar, contenido en las placas, se dejó solidificar durante mínimo dos horas a temperatura ambiente. Una vez solidificado, las placas se almacenaron hasta su uso a 4°C, de forma invertida y precintadas.

### III.3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Los plásmidos lentivirales fueron introducidos en el interior de las bacterias químicamente competentes “Subcloning Efficiency™ DH5α Competent Cells” (Thermo Fisher Scientific), mediante transformación por choque térmico. Este proceso conduce a la permeabilización de la membrana celular sin afectar a su integridad. Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado a continuación.

En primer lugar, se descongeló en hielo una alícuota (de volumen 50 µl) de las bacterias comerciales *E. coli* DH5-α. Posteriormente, se añadió un volumen de 2 µl-5 µl (equivalente a una cantidad de 10 ng-500 ng) del DNA plasmídico a transformar. Se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó en hielo durante 30 min. Seguidamente, se incubó a 42°C en termobloque sin agitación durante 20 segundos y, rápidamente, se transfirió el vial a un baño de hielo, donde se incubó durante 2 min. A continuación, se añadieron 950 µl de medio LB líquido (sin suplementar con ampicilina) atemperado a 37°C. Las bacterias contenidas en medio LB líquido se incubaron a 37°C durante 1h en agitación, para permitir su crecimiento. Por último, se sembró un volumen de 10 µl-500 µl del cultivo anterior en una placa de LB-agar suplementada con ampicilina a concentración 100 µg/ml. La siembra se realizó añadiendo con una micropipeta el volumen del cultivo en un extremo de la placa de LB-agar y extendiendo este con ayuda de un asa de siembra estéril. Una vez realizada la siembra, la placa se incubó en posición invertida a 37°C durante 16h.

De este modo, únicamente las bacterias *E. coli* DH5-α que incorporaron el DNA plasmídico durante el proceso de transformación, adquirieron el gen de resistencia a ampicilina y, por tanto, crecieron en la placa de LB-agar suplementada con este antibiótico. Una de las colonias aisladas que crecieron en esta placa fue el material de partida para la extracción del DNA plasmídico a pequeña (miniprep) o gran escala (maxiprep).

Cuando interesó conservar a largo plazo las colonias de *E. coli* DH5-α que habían incorporado el DNA plasmídico de interés, estas fueron congeladas a -80°C en presencia de glicerol (Fisher Scientific) al 30%, debido a su función crioprotectora. Para ello, se aplicó el siguiente procedimiento: se inoculó una colonia aislada de la placa de LB-agar en un volumen de 10 ml-15 ml de medio LB líquido (suplementado con ampicilina a concentración 100 µg/ml) y se incubó a

37°C en agitación, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica medida a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,5-1. Se determinó este rango de valores de densidad óptica ya que es indicativo de que el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento. A continuación, se dispensaron 150  $\mu$ l de glicerol por vial y los viales con glicerol fueron autoclavados a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Finalmente, se añadieron 350  $\mu$ l del cultivo de interés, el cual se encontraba a una  $OD_{600} = 0,5-1$ , a cada uno de los viales del paso anterior y estos fueron almacenados a -80°C.

### III.3.3 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PARTIR DE UN CULTIVO BACTERIANO

La extracción de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano se realizó a pequeña escala (miniprep) o gran escala (maxiprep), en función de las necesidades. Ambos protocolos se iniciaron del mismo modo: se tomó una colonia aislada de la placa de LB-agar (resultante del proceso de transformación) o un volumen de 10  $\mu$ l del cultivo bacteriano conservado en glicerol y se inoculó en un volumen de 10 ml-15 ml de medio LB líquido, previamente atemperado a 37°C y suplementado con ampicilina a concentración final de 100  $\mu$ g/ml. El crecimiento se llevó a cabo en un recipiente estéril con 1/4 del volumen total vacío, para permitir la correcta oxigenación del cultivo. Este recipiente se introdujo en un incubador a 37°C con agitación durante 16h, en el caso de realizar miniprep, o durante 6h, para la realización de maxiprep.

En el caso de maxiprep, el inóculo obtenido tras 6h de incubación se diluyó 1/1000 (generalmente en un volumen final de 250 ml) en medio LB líquido, previamente atemperado a 37°C y suplementado con ampicilina a concentración de 100  $\mu$ g/ml, y se incubó nuevamente a 37°C con agitación durante 16h.

El crecimiento del cultivo bacteriano se midió de forma indirecta mediante espectrofotometría. Para ello, se añadió 1 ml del cultivo bacteriano a la cubeta del espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico, obteniéndose el valor de  $OD_{600}$ , el cual es proporcional al número de bacterias presentes en el cultivo. En función del valor de  $OD_{600}$  obtenido, se determinó el volumen de cultivo de partida necesario para iniciar la miniprep o maxiprep, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Masa celular del cultivo} = OD_{600} \times \text{Volumen del cultivo (ml)} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Este cálculo se realizó con el objetivo de adecuar cada ensayo de miniprep o maxiprep a las recomendaciones del fabricante, las cuales se recogen en la **Tabla 3**. Se analizaron un total de seis ensayos comerciales: los ensayos de miniprep E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit II (Omega), NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel) e Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two (Stratec); y los ensayos de maxiprep E.Z.N.A.<sup>®</sup> Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit (Omega), NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel) y GenElute<sup>™</sup> Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma).

Todos ellos se aplicaron siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante y, en aquellas extracciones en las cuales se requería obtener DNA plasmídico más concentrado o fue necesario eliminar la presencia de etanol residual, se siguió el protocolo de precipitación por isopropanol descrito en el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit.

**Tabla 3.** Recomendaciones de uso de los diferentes ensayos comerciales de miniprep y maxiprep utilizados en este estudio. \*El rendimiento teórico hace referencia a la cantidad ( $\mu\text{g}$ ) máxima de DNA plasmídico que teóricamente se consigue recuperar.

Nombre kit comercial	Aplicación	Masa celular inicial	Volumen inicial (ml)	Volumen de elución ( $\mu\text{l}$ )	Rendimiento teórico ( $\mu\text{g}$ )*
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II	Miniprep	30	10-15	80-100	75
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Miniprep	15-16	2-10	50	30
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	Miniprep	No especificada	0,5-2	50-100	20
E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit	Maxiprep	300-400	50-200	1,5-3	1.000
NucleoBond® Xtra Maxi EF	Maxiprep	1.200	120-600	15	2.000
GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit	Maxiprep	300	25-200	3-5	1.200

### III.4 CULTIVOS CELULARES DE EUCARIOTA

Se recurrió al cultivo de células eucariotas para la generación, mediante el sistema lentiviral, de partículas virales recombinantes de RNA. La línea celular utilizada para este fin fue la línea HEK 293T (obtenida de la colección alemana de cultivos tipo, ATCC®CRL-3216™), ya que son células embrionarias de riñón humano altamente transfectables y que conducen a elevados títulos virales [192, 193]. El trabajo en cultivos celulares de eucariota fue llevado a cabo en cabina de seguridad biológica tipo II. El material se roció con etanol al 70% antes de cada sesión de trabajo y, tanto el material como la superficie de trabajo, se desinfectó con una solución de etanol absoluto al 56% e isopropanol al 12% después de cada sesión de trabajo. La superficie de trabajo, además, se sometió a radiación UV durante 20 minutos. Los residuos biológicos y el material que estuvo en contacto directo con el cultivo celular se desecharon en los contenedores de bioseguridad apropiados.

La estufa se desinfectó periódicamente con etanol al 70% y el agua de la bandeja se trató, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el producto Incuwater-Clean™ (PanReac AppliChem) para prevenir el crecimiento de microorganismos. A su vez, el agua contenida en el baño de agua se trató con el producto Aquabator-Clean™ (PanReac AppliChem), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### III.4.1 MEDIOS DE CULTIVO

La línea celular 293T se creció de manera rutinaria en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Sigma) a concentración final 5% y con una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% (Gibco). Este medio se denominó medio DMEM completo.

En algunos casos se recurrió al cultivo de las células 293T en los siguientes medios libres de SFB: OptiMEM (Thermo Fisher Scientific), medio DMEM completo en el cual se reemplazó el SFB por CB05 (Cell Boost 5, Fisher Scientific) a concentración final 5% o medio DMEM completo en el cual se reemplazó el SFB por CDM-HD (medio químicamente definido para cultivo celular de alta densidad, del inglés *Chemically Defined Medium For High Density Cell Culture*, FiberCellSystems)

a concentración final 5%. La procedencia de los medios CB05 y CDM-HD, a diferencia del SFB, no es de origen animal, su composición está libre de proteínas y contienen diferentes lípidos, aminoácidos, vitaminas, así como diferentes factores de crecimiento para favorecer el crecimiento de las células 293T.

### III.4.2 MANTENIMIENTO DEL CULTIVO

Se cultivaron las células 293T en placas de 60 mm de diámetro (VWR, superficie de la placa de 21,2 cm<sup>2</sup>) o de 100 mm de diámetro (VWR, superficie de la placa de 60 cm<sup>2</sup>), en función de las necesidades. Se añadió un volumen aproximado de 0,25 ml de medio DMEM completo por cada cm<sup>2</sup> de superficie de placa. Las células se sembraron a una densidad variable en función del experimento realizado.

Los cultivos de células 293T se mantuvieron en incubador a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió con asiduidad y se tripsinizaron las células cada 2-4 días, cuando estas alcanzaron una confluencia del 80-100%. Las células 293T crecen en adherencia, cubriendo por completo la superficie de la placa, por lo que para el mantenimiento del cultivo es necesario despegar estas células de la superficie de la placa, diluirlas y llevar a cabo su resiembra en una nueva placa, proceso conocido como tripsinización. Para ello, en primer lugar, se retiró el medio DMEM completo de la placa y se realizó un lavado de esta con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) (Gibco) a concentración final 1X, con el objetivo de eliminar las proteínas del SFB que inhiben el efecto de la tripsina. En segundo lugar, se añadió un volumen de 0,033 ml de tripsina (Sigma) por cada cm<sup>2</sup> de superficie de placa y se incubó la placa a 37°C durante 2 min. Transcurrido este tiempo, se comprobó bajo microscopio invertido que las células se habían despegado de la placa y se neutralizó la acción de la tripsina por adición de una mezcla de PBS y SFB al 10%, de la cual se añadió un volumen 4 veces superior al volumen añadido de tripsina. Esta suspensión celular se trasvasó a un falcon y se centrifugó en rotor oscilante a 300 g durante 5 min, para favorecer la sedimentación de las células. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido (contiene las células 293T) se resuspendió en el volumen de medio DMEM completo requerido, el cual fue variable en función de la dilución deseada para su resiembra o para el recuento celular previo a la resiembra.

Todos los reactivos utilizados durante este proceso se atemperaron en un baño de agua a 37°C previamente a su uso.

### III.4.3 RECUENTO CELULAR

Para el recuento celular se utilizó una cámara de recuento Blaubrand<sup>TM</sup> Neubauer (Fisher Scientific) con 4 cuadrantes de volumen 10<sup>-4</sup> ml por cuadrante. Se mezclaron 50 µl de suspensión celular junto con 50 µl de azul tripán (Sigma) y se cargaron 10 µl de la mezcla anterior en la cámara, sobre la cual se colocó previamente un cubreobjetos de cristal. El azul tripán es un colorante que únicamente tiñe las células muertas, ya que estas células no presentan una membrana plasmática íntegra, permitiendo la entrada del colorante.

Se contaron las células vivas (no coloreadas) de cada uno de los 4 cuadrantes y se calculó el número de células vivas por unidad de volumen (No. células/ml) presentes en la solución inicial, siguiendo la ecuación 7:

(Ecuación 7)

$$\text{No. células /ml} = \frac{(\text{No. células})}{4} \times \text{Dilución} \times 10^4$$

El número de células es la suma de las células vivas presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara de recuento y el factor de dilución fue de 2, ya que el ratio volumen suspensión celular: volumen azul tripán fue 1:1.

La ecuación 7 se aplicó de nuevo tras el conteo de las células muertas (coloreadas) y, teniendo en cuenta la suma de células vivas y muertas (células totales), se determinó la viabilidad aplicando la ecuación 8:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{No. células vivas} \times 100}{\text{No. células totales}} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

#### III.4.4 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Diferentes alícuotas de células 293T se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo, con el fin de evitar la pérdida de la línea celular por una contaminación puntual del cultivo y minimizar la acumulación de cambios genéticos, los cuales ocurren tras la tripsinización continuada y el mantenimiento de las células en cultivo por largos periodos de tiempo.

Las células 293T, crecidas de rutina en una placa de 100 mm de diámetro con medio DMEM completo, se tripsinizaron para su congelación cuando la confluencia fue del 80-90%, siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.4.2. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 2 ml de medio de congelación, consistente en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) al 10%. Los 2 ml de suspensión celular fueron repartidos en 4 crioviales (500 µl/criovial) (Thermo Scientific), los cuales se depositaron en un contenedor de congelación con isopropanol (Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container de NALGENE®) y se congelaron a -80°C durante mínimo un día. De este modo, se garantizó una congelación progresiva con un descenso de temperatura de aproximadamente 1°C por minuto. Al día siguiente, los crioviales se llevaron al tanque de nitrógeno líquido, donde pueden mantenerse durante largos periodos de tiempo (años) sin que se vea comprometida su viabilidad.

El DMSO es un agente crioprotector que protege a las células durante el proceso de congelación, pero a su vez resulta tóxico a temperatura ambiente, por este motivo el proceso de descongelación debe ser rápido. En el proceso de descongelación de las células almacenadas en nitrógeno líquido, los crioviales a descongelar se transfirieron rápidamente a un baño de agua a 37°C hasta su descongelación. A continuación, se añadió medio DMEM completo al criovial y se sembró la totalidad del volumen en una placa de cultivo, a la cual se había adicionado previamente medio DMEM completo. Transcurridas 16h, las células ya se encontraban adheridas a la superficie de la placa, por lo que se cambió el medio de cultivo con el objetivo de eliminar el DMSO residual.

#### III.4.5 ENSAYOS DE INFECTIVIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES SOBRE UN CULTIVO CELULAR

Durante la generación *in vitro* de las partículas virales recombinantes de RNA se implementaron varias medidas con el objetivo de generar partículas virales no infecciosas. En primer lugar, se prescindió del plásmido de envuelta en el proceso de transfección, con el objetivo de generar

partículas virales carentes de la proteína de envuelta y, por tanto, sin capacidad de acceder al interior celular mediante la unión de la proteína de envuelta viral con el receptor celular. En segundo lugar, se incorporó, tras la digestión con DNasa del sobrenadante viral, un paso de incubación a 75°C 10 min, el cual cumple la doble función de inactivar la DNasa e inactivar la partículas virales [214-216].

Para verificar si las medidas implementadas conducían al objetivo buscado, se evaluó la capacidad infectiva de las partículas virales sobre un cultivo de células 293T mediante selección con puromicina. Se utilizó este antibiótico ya que el plásmido de transferencia B contiene el gen que confiere resistencia a puromicina. La secuencia del gen de resistencia a puromicina se encuentra en la región del plásmido de transferencia B comprendida entre las secuencias LTR, por lo que esta secuencia es transcrita en el interior celular formando parte del RNA viral. Si el RNA viral se encuentra contenido en partículas virales con capacidad de acceder al interior celular, una vez el virus haya accedido al interior de las células infectadas, el RNA viral será convertido a cDNA y este cDNA se integrará en el genoma de las células infectadas. Por tanto, si las partículas virales desarrolladas en este proyecto son infectivas, conferirán la resistencia a puromicina a las células infectadas. Debido a ello, para poder realizar este tipo de análisis se debe trabajar con una concentración de puromicina a la que las células no infectadas sean sensibles. De este modo, si las células no han sido infectadas no sobrevivirán en un medio suplementado con puromicina a la concentración determinada, mientras que si han sido infectadas, las células serán resistentes a puromicina y su crecimiento no se verá perjudicado en este medio.

#### **III.4.5.1 CURVA DE MUERTE DE LAS CÉLULAS 293T EN PRESENCIA DE PUROMICINA**

Previamente a la evaluación de la capacidad infectiva de las partículas virales, mediante selección con puromicina en un cultivo de células 293T, se crecieron las células en un medio con diferentes concentraciones de puromicina. El objetivo fue determinar la concentración mínima a la que las células 293T (no infectadas con partículas virales) son sensibles.

El protocolo seguido se detalla a continuación, el cual se elaboró siguiendo las recomendaciones del fabricante de puromicina:

##### **DÍA -1. Siembra de células**

Se tripsinizaron las células 293T mantenidas rutinariamente en cultivo y el *pellet* obtenido se resuspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 5% para su recuento celular, siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.4.2 y III.4.3, respectivamente. Se sembraron 1,6E+05 células 293T en cada pocillo (de superficie 9 cm<sup>2</sup>) de una placa de 6 pocillos, a los cuales se añadieron previamente 2 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 5%. Si se utiliza una placa diferente, el número de células y el volumen de medio indicados deben corregirse en función de la superficie que presente dicha placa. Las células sembradas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

Se sembraron un total de 14 pocillos, ya que se planificó el experimento para el análisis por duplicado del crecimiento de las células 293T en presencia de 7 concentraciones diferentes de puromicina.

#### DÍA 0. Selección con puromicina

Transcurridas 24h desde la siembra, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y se prepararon diferentes medios de cultivo compuestos por DMEM, SFB al 5% y las siguientes concentraciones finales de puromicina: 0 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml y 6 µg/ml. Para la preparación de cada uno de los medios, se añadió la cantidad necesaria de una solución de puromicina de concentración 10 mg/ml. Esta solución fue preparada previamente mediante disolución de 25 mg de puromicina (Sigma) en 2,5 ml de agua Milli-Q®. Posteriormente, se filtró por 0,2 µm y se alícuotó para su almacenamiento a -20°C.

Los 2 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 5%, que fueron añadidos a cada pocillo el día -1, se reemplazaron por 2 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 5% y con la cantidad correspondiente de puromicina, para alcanzar de este modo las diferentes concentraciones finales requeridas en el estudio. Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### DÍA +1. Visualización de las células

Transcurridas 24h desde la adición de puromicina, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido. En este punto es esperable comenzar a observar un comportamiento diferencial en el crecimiento de las células 293T, en función de la concentración de puromicina presente en el medio de cultivo. Las placas se incubaron de nuevo en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### DÍA +2. Visualización de las células y selección con puromicina

Pasadas 48h desde el inicio de la selección, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y en cada pocillo se reemplazó el medio de cultivo correspondiente por ese mismo medio fresco. Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 72h.

#### DÍA +5. Visualización de las células y selección con puromicina

A las 120h, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y en cada pocillo se reemplazó el medio de cultivo correspondiente por ese mismo medio fresco. Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### DÍA +6. Visualización de las células

Transcurridas 144h, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y se dio por finalizado el experimento.

### **III.4.5.2 DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN**

La multiplicidad de infección (MOI, del inglés *multiplicity of infection*) es un parámetro indicativo de la capacidad infectiva de un determinado virus sobre un cultivo celular, el cual se define como el ratio entre el número de partículas virales infecciosas y el número de células presentes en el momento de la infección [217]. Se recurrió a este cálculo con el objetivo de comparar la capacidad infectiva de las partículas virales con proteína de envuelta, frente a las partículas virales sin proteína de envuelta. Estas últimas presumiblemente no infecciosas. Para el cálculo de la MOI es necesario infectar con aquella dilución del sobrenadante viral que conduzca a la observación de colonias aisladas de células 293T resistentes a puromicina. De este modo, es posible determinar el número de partículas virales infecciosas contenidas en el sobrenadante

viral evaluado, debido a que se asume que cada colonia resistente procede de la infección de una célula por una única partícula viral.

El cálculo de la MOI se realizó aplicando la ecuación 9:

$$MOI = \frac{\text{No. partículas virales infecciosas}}{\text{No. células}} = \frac{\text{No. colonias resistentes a puromicina} \times \text{Dilución}^*}{\text{No. células 293T}^{**}} \quad (\text{Ec. 9})$$

\*Dilución aplicada al sobrenadante viral con el que se han infectado las células

\*\*Número de células 293T resultantes del contaje celular realizado el día 0 del experimento, que refleja el número de células presentes en el cultivo en el momento de la infección.

El protocolo seguido para determinar la dilución del sobrenadante viral adecuada para realizar los experimentos de infección y calcular la MOI se detalla a continuación:

### DÍA -1. Siembra de células

Se tripsinizaron las células 293T mantenidas rutinariamente en cultivo y el *pellet* obtenido se resuspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 5% para su recuento celular, siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.4.2 y III.4.3, respectivamente. Se sembraron 0,3E+06 células 293T en cada pocillo (de superficie 9 cm<sup>2</sup>) de una placa de 6 pocillos, a los cuales se les añadió previamente 2 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 5%. Si se utiliza una placa diferente, el número de células y el volumen de medio indicados deben corregirse en función de la superficie que presente dicha placa. Las células sembradas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

### DÍA 0. Infección de células con un sobrenadante viral

Transcurridas 24h desde la siembra, se llevó a cabo la infección de las células 293T con diferentes diluciones de un sobrenadante viral que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta, con el objetivo de determinar en cuál de ellas se observaban colonias aisladas resistentes a puromicina. Para ello, se reemplazó el medio DMEM suplementado con SFB al 5% por ese mismo medio fresco y, posteriormente, en cada pocillo se añadió gota a gota 1 ml de la dilución correspondiente del sobrenadante viral en presencia de polibreno (Sigma) a concentración final 8 µg/ml [217]. Se añadió este reactivo siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía. El polibreno potencia la entrada de la partícula viral al interior celular mediante adsorción de la partícula a la membrana.

Se analizaron un total de 15 condiciones diferentes: células 293T sin infectar (control I); células 293T sin infectar, pero sometidas el día +1 a selección con puromicina a concentración 1 µg/ml (control II); y células 293T infectadas con un sobrenadante viral diluido 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup>, 1/10<sup>6</sup> y 1/10<sup>7</sup>. Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

### DÍAS +1 a +6. Selección con puromicina y contaje de colonias resistentes

Transcurridas 24h desde la infección, tiempo suficiente para la internalización de las partículas virales en las células 293T [217], se retiró el medio de los pocillos y este se reemplazó por medio DMEM suplementado con SFB al 5% y puromicina a concentración final 1 µg/ml. A excepción de la condición control I, en la cual se añadió medio DMEM completo. Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento se repitió en los 5 días posteriores, visualizando las células al microscopio y anotando la confluencia observada.

El experimento concluyó el día +6, cuando se seleccionó la dilución del sobrenadante viral que conducía a la observación de colonias aisladas de células 293T resistentes a puromicina. Una vez seleccionada la dilución óptima, se repitió el procedimiento descrito anteriormente con un sobrenadante viral diluido que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta y con un sobrenadante viral que contenía partículas virales de chikungunya sin proteína de envuelta, con el objetivo de determinar la MOI en ambos casos.

El experimento de determinación de la MOI se realizó en placa de 60 mm de diámetro (superficie 21,2 cm<sup>2</sup>), para poder observar con mayor claridad las colonias aisladas. Por tanto, se escalaron las cantidades del protocolo anterior considerando la superficie de la nueva placa. Se sembraron 0,7E+06 células 293T en cada placa en un volumen final de medio de 5 ml y se infectó con un volumen de 2 ml del sobrenadante viral correspondiente. En este caso se incluyó un paso adicional el día 0 consistente en la tripsinización y el conteo celular de una placa control I, siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.4.2 y III.4.3, respectivamente, para determinar el número de células presentes en el momento de infección y poder, de este modo, determinar la MOI. En este caso el experimento se prolongó hasta el día +9, ya que fue cuando se observaron con claridad las colonias aisladas resistentes a puromicina y se calculó la MOI aplicando la ecuación 9.

### **III.4.5.3 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR TRAS LA INFECCIÓN**

El protocolo de infección descrito en el apartado anterior III.4.5.2 se modificó levemente, ya que se prescindió del reactivo polibreno, con el objetivo de simular las condiciones reales de infección, sin potenciar mecanismos alternativos de entrada de las partículas virales al interior celular. Por otra parte, se redujo el tiempo de infección de 24h a 4h para acortar el tiempo del experimento, puesto que se verificó, incluyendo un control positivo de infección, que 4h era tiempo suficiente para la internalización de las partículas virales. Se realizaron dos ensayos diferenciados, denominados A y B. El objetivo del ensayo A fue analizar la capacidad de entrada de las partículas virales al interior celular y la posterior integración del cDNA en el genoma celular, mientras que el objetivo del ensayo B fue analizar si la proliferación, viabilidad y morfología celular resultaban equivalentes en células 293T infectadas, frente a células 293T sin infectar.

Por tanto, se recurrió a los ensayos A y B, detallados a continuación, para evaluar la infectividad de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, todas ellas generadas sin proteína de envuelta y posteriormente incubadas a 75°C durante 10 min. Se conservó una alícuota de cada tipo de partícula viral sin someter al paso de incubación a 75°C, para evaluar si este tratamiento conducía a la inactivación de las partículas virales. En ambos ensayos A y B se incluyó como control positivo de infección un sobrenadante viral que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta. También se analizó este mismo sobrenadante viral incubado a 75°C durante 10 min.

#### **DÍA -1. Siembra de células. Protocolo común para ensayos A y B**

Se tripsinizaron las células 293T mantenidas rutinariamente en cultivo y el *pellet* obtenido se resuspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 5% para su recuento celular, siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.4.2 y III.4.3, respectivamente. Se sembraron 0,7E+06 células 293T por placa de 60 mm de diámetro, a la cual se añadieron previamente 5 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 5%. Si se utiliza una placa diferente, el número de células y el

volumen de medio indicados deben corregirse en función de la superficie que presente dicha placa. Las células sembradas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### DÍA 0. Infección de células con un sobrenadante viral. Protocolo común para ensayos A y B

Transcurridas 22-24h desde la siembra, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y se llevó a cabo la infección de las células 293T con el sobrenadante viral que contenía las partículas virales cuya infectividad se quería evaluar. Se reemplazó el medio DMEM suplementado con SFB al 5% por ese mismo medio fresco y, posteriormente, en cada pocillo se añadió gota a gota el volumen requerido del sobrenadante viral correspondiente. Se analizaron un total de 12 condiciones diferentes, cada una por duplicado para cubrir los ensayos A y B:

- 1-** Control I: células 293T sin infectar.
- 2-** Control II: células 293T sin infectar, pero sometidas el día 0 a selección con puromicina a concentración 1 µg/ml.
- 3 y 4-** Células 293T infectadas con partículas virales de SARS-CoV-2 sin proteína de envuelta (sin y con tratamiento posterior a 75°C durante 10 min).
- 5 y 6-** Células 293T infectadas con partículas virales de RSV sin proteína de envuelta (sin y con tratamiento posterior a 75°C durante 10 min).
- 7 y 8-** Células 293T infectadas con partículas virales de influenza A sin proteína de envuelta (sin y con tratamiento posterior a 75°C durante 10 min).
- 9 y 10-** Células 293T infectadas con partículas virales de influenza B sin proteína de envuelta (sin y con tratamiento posterior a 75°C durante 10 min).
- 11 y 12-** Control positivo: células 293T infectadas con partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta (sin y con tratamiento posterior a 75°C durante 10 min).

El volumen de sobrenadante viral con el que se infectaron las células 293T se ajustó con el objetivo de infectar con el mismo número de partículas virales que de células 293T había en la placa en el momento de la infección. Para ello, en primer lugar, se tripsinizó una placa de la condición control I y se realizó el conteo del número de células 293T siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.4.2 y III.4.3, respectivamente. Posteriormente, una vez conocido el número de partículas virales a añadir en cada placa, se calculó el volumen requerido de sobrenadante viral considerando que los sobrenadantes virales analizados se encontraban a una concentración de 5E+06 partículas virales infectivas/ml. Esta concentración se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.4.5.2, a partir de un sobrenadante viral que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta. Se realizó esta aproximación para el resto de los diseños ya que la cuantificación del RNA viral por PCR digital indicó que la generación de partículas virales mediante el sistema lentiviral conducía a un título viral equivalente en todos los diseños.

Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### DÍA 0. Selección con puromicina (A) / Cambio de medio (B)

Transcurridas 4h desde la infección, se visualizó la confluencia de las placas bajo microscopio invertido y se retiró el medio de las placas, el cual fue reemplazado por medio DMEM completo suplementado con puromicina a concentración final 1 µg/ml (en todas las placas del ensayo A,

excepto en el control I) o por medio DMEM completo (en todas las placas del ensayo B y en la placa control I del ensayo A).

Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento se repitió los días +1 y +2.

#### DÍA +3. Selección con puromicina (A) / Recuento celular y análisis de viabilidad (B)

El procedimiento seguido el día +3 en las placas del ensayo A fue idéntico a lo descrito el día 0. Respecto a las placas del ensayo B, estas fueron tripsinizadas y se realizó su contaje celular y la determinación de la viabilidad celular siguiendo los protocolos III.4.2 y III.4.3, respectivamente.

El ensayo A se prolongó varios días puesto que el día +3 aún no se observaban colonias resistentes a puromicina, sin embargo, el ensayo B concluyó en este punto, ya que los resultados obtenidos de concentración, viabilidad celular y observación al microscopio permitieron determinar si la presencia de partículas virales conducía a una alteración en la proliferación, viabilidad o morfología celular.

#### DÍA +6. Contaje de colonias resistentes (A)

Las placas del ensayo A fueron visualizadas al microscopio para la identificación de colonias de células 293T resistentes a puromicina. Posteriormente las placas se inactivaron con lejía y se descartaron en el contenedor de residuos biológico apropiado.

### **III.5 PURIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES**

Las diferentes estrategias de purificación planteadas en este proyecto se orientaron a la eliminación del DNA presente en el sobrenadante viral, por lo que tras su realización se analizó la cantidad de DNA antes y después del tratamiento, mediante un ensayo de qPCR específico para la detección del DNA de interés. Este ensayo no contiene retrotranscriptasa y el valor de C<sub>q</sub> obtenido se expresó como C<sub>q</sub> -RT. Además, en aquellos tratamientos de purificación donde interesó averiguar la cantidad de RNA se realizó un análisis adicional por RT-qPCR, cuyo valor de C<sub>q</sub> se expresó como C<sub>q</sub> +RT. El ensayo de RT-qPCR contiene retrotranscriptasa y refleja la suma de la cantidad de DNA y RNA presente en la muestra. Por tanto, para analizar únicamente la señal de RNA obtenida en RT-qPCR debe sustraerse la contribución de DNA a la señal de DNA + RNA, mediante el cálculo de la diferencia ( $\Delta C_q$ ) entre el valor de C<sub>q</sub> obtenido en el ensayo qPCR y el valor de C<sub>q</sub> obtenido en el ensayo RT-qPCR, siguiendo la ecuación 10.

En aquellos casos en los que interesó determinar la concentración de DNA (en copias/ $\mu$ l), esta se calculó por extrapolación en la recta estándar (diferente en función de la diana analizada) del valor de C<sub>q</sub> obtenido en el ensayo qPCR (C<sub>q</sub> -RT), siguiendo la ecuación 11. En el caso de la concentración de RNA (en copias/ $\mu$ l), para su cálculo fue necesario determinar, en primer lugar, la concentración de DNA + RNA y la concentración de DNA por extrapolación en la recta estándar del valor de C<sub>q</sub> obtenido en los ensayos de RT-qPCR (C<sub>q</sub> +RT) y qPCR (C<sub>q</sub> -RT), respectivamente. En segundo lugar, se calculó la diferencia entre ambas concentraciones, tal y como se muestra en la ecuación 12.

En la elaboración de la recta estándar se representaron los valores de C<sub>q</sub> (eje y) frente al logaritmo en base 10 de la concentración de los estándares que constituyen dicha recta (eje x), siendo a la pendiente de la recta y b la ordenada en el origen (ver apartado II.1.2.1).

$$\Delta C_q = C_{q-RT} - C_{q+RT} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

$$\text{Concentración DNA} = 10^{\frac{b-(C_q-RT)}{a}} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

$$\text{Concentración RNA} = 10^{\frac{b-(C_q+RT)}{a}} - 10^{\frac{b-(C_q-RT)}{a}} \quad \text{(Ecuación 12)}$$

Con el objetivo de determinar la eficiencia en la eliminación del DNA, en cada uno de los tratamientos de purificación analizados se calculó la reducción de la cantidad de DNA. Este cálculo se realizó en términos de diferencia de  $C_q$  antes y después del tratamiento evaluado ( $\Delta C_q^*$ ), siguiendo la ecuación 13, y/o en términos de reducción logarítmica ( $\log_{10}$ ), siguiendo la ecuación 14.

$$\Delta C_q^* = C_{q-RT} \text{ (después del tratamiento)} - C_{q-RT} \text{ (antes del tratamiento)} \quad \text{(Ecuación 13)}$$

$$\text{Log}_{10} = \log_{10} \frac{\text{Concentración DNA (antes del tratamiento)}}{\text{Concentración DNA (después del tratamiento)}} \quad \text{(Ecuación 14)}$$

Previamente al cálculo de  $\log_{10}$ , siguiendo la ecuación 14, se calculó la concentración de DNA (en copias/ $\mu$ l), siguiendo la ecuación 11. El tratamiento evaluado debería conducir a un valor elevado de desplazamiento de  $C_q$  ( $\Delta C_q$ ) o de reducción logarítmica ( $\log_{10}$ ), ya que estos son indicativos de una elevada eficiencia en la eliminación del DNA plasmídico.

Los valores de  $C_q$  obtenidos por qPCR y RT-qPCR se corrigieron en todos los experimentos de purificación, aplicando la ecuación 2, en función del factor de dilución o concentración asociado a cada uno de los tratamientos de purificación evaluados. De este modo, fue posible comparar de forma precisa el valor de  $C_q$  obtenido antes y después del tratamiento, evitando interpretaciones erróneas consecuencia del factor de dilución o concentración que sufre la muestra durante su purificación.

### III.5.1 TRATAMIENTO CON NUCLEASAS DEL SOBRENADANTE VIRAL

#### III.5.1.1 COMPARATIVA DE NUCLEASAS COMERCIALES

Una de las estrategias abordadas para la eliminación del DNA presente en el sobrenadante viral fue la digestión con nucleasas. Se comenzó trabajando con la desoxirribonucleasa comercial *DNase I (New England BioLabs, NEB)*. Se trata de una endonucleasa, en concreto una DNasa de tipo 1 obtenida de páncreas bovino, que degrada indistintamente DNA de doble cadena, DNA de cadena simple (ssDNA, del inglés *single-stranded DNA*) o DNA presente en híbridos DNA-RNA.

Se evaluó la digestión de un sobrenadante viral, recogido a las 48h después de la transfección y donde hubo formación de partículas virales de EGFP, con la DNasa de NEB a 37°C a las concentraciones de enzima de 2 U/ml, 10 U/ml, 50 U/ml y 200 U/ml, durante los tiempos de digestión de 30 min, 1h y 3h. El objetivo fue seleccionar la condición óptima de digestión. Los ajustes de concentración y tiempo de digestión se realizaron de acuerdo con la bibliografía [130, 218, 219] y las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, se analizó la digestión del mismo sobrenadante viral con diferentes nucleasas comerciales, a 37°C a una concentración de enzima de 50 U/ml durante 3h. El objetivo fue la selección de aquella enzima que eliminase de forma más eficiente el DNA presente en el sobrenadante viral. Tras la digestión con nucleasas, el sobrenadante viral fue extraído con el kit

MagDEA DxSV (Volumen inicial,  $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ; Volumen final,  $V_f = 200 \mu\text{l}$ ) (Precision System Science Co.) y después analizado por qPCR y RT-qPCR. El objetivo de esta extracción de ácidos nucleicos fue valorar no solo la reducción en la cantidad de DNA, sino también si la cantidad de RNA permanecía invariable tras el tratamiento de digestión con las diferentes enzimas analizadas. Las particularidades de cada enzima se detallan a continuación:

-*Benzonase® Nuclease (Sigma)*: es una endonucleasa aislada de *Serratia marcescens* que degrada indistintamente DNA y RNA.

-*TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific)*: se trata de una endonucleasa que procede de una DNasa de tipo 1, la cual degrada indistintamente cualquier tipo de DNA. Esta enzima ha sido modificada por ingeniería genética para presentar una mayor afinidad por el DNA y ser especialmente efectiva ante bajas concentraciones de DNA. El fabricante especifica una actividad de hasta 50 veces superior respecto a las DNasas convencionales y una eficiencia catalítica del 350% respecto a la DNasa I de tipo salvaje. La habilidad de esta enzima para unir DNA presente a baja concentración sugiere que esta enzima es particularmente eficaz para eliminar trazas de DNA.

-*DENARASE® (c-LEcta GmbH)*: es una endonucleasa de *Serratia marcescens* que ha sido modificada genéticamente y degrada indistintamente DNA y RNA en fragmentos de 5-8 pb. Su producción tiene lugar en *Bacillus spp.*, asegurando una fabricación de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación (GMP, del inglés *good manufacturing practice*). Esta producción tiene lugar a partir de materias primas de origen no animal, sin el uso de antibióticos y en un medio libre de endotoxinas.

### III.5.1.2 DIFERENTES TRATAMIENTOS CON DNASA

A lo largo del proyecto de investigación se recurrió a los siguientes tratamientos con el objetivo de eliminar el DNA presente en el sobrenadante viral y analizar la cantidad de DNA y RNA tras el tratamiento.

**Tratamiento 1- DNasa:** Las muestras sometidas al tratamiento 1 se digirieron con DNasa I (NEB) a concentración 50 U/ml a 37°C (en termobloque) durante 3h. La digestión con DNasa se realizó en un ratio volumen muestra: volumen mezcla de digestión = 1:1. La mezcla de digestión consistió en DNasa, tampón NEB (composición detallada en el apartado III.5.1.3) a concentración final 1X y agua de grado biología molecular. Tras aplicar este tratamiento, los resultados se analizaron por qPCR con un conjunto de cebadores y sonda dirigido a la región de interés.

**Tratamiento 2- DNasa + Extracción:** Las muestras sometidas al tratamiento 2 se digirieron con DNasa I (NEB) en las mismas condiciones descritas en el tratamiento 1 y, a continuación, se realizó una extracción de ácidos nucleicos, mediante alguno de los sistemas mostrados en la **Tabla 11**. Los resultados se analizaron por qPCR y RT-qPCR con un conjunto de cebadores y sonda dirigido a la región de interés.

**Tratamiento 3- Extracción + DNasa:** Las muestras sometidas al tratamiento 3 fueron extraídas mediante alguno de los sistemas mostrados en la **Tabla 11**, y, a continuación, se digirieron con DNasa I (NEB) en las mismas condiciones descritas en el tratamiento 1. Los resultados se analizaron por qPCR y RT-qPCR con un conjunto de cebadores y sonda dirigido a la región de interés.

En los tratamientos 2 y 3, a diferencia del tratamiento 1, la realización de una extracción de ácidos nucleicos permitió detectar la cantidad de RNA presente en la muestra, ya que el RNA se encuentra en el interior de la partícula viral y únicamente queda accesible para su detección una vez extraída la muestra.

### III.5.1.3 OPTIMIZACIÓN DEL TAMPÓN DE DIGESTIÓN CON DNASA

Se llevó a cabo la digestión con DNasa en presencia de diferentes formulaciones del tampón de digestión, ya que se consideró que la disponibilidad de los iones divalentes, requeridos por la DNasa, podría estar variando en función del medio en el que se encontrase contenido el DNA plasmídico a digerir. Esto se explicaría por la presencia de diferentes agentes quelantes en función del medio, los cuales presentan afinidad por un tipo concreto de ion. Por otra parte, en la bibliografía se ha reportado que el tipo de corte originado por la DNasa difiere en función del ion utilizado. En presencia de iones  $Mg^{+2}$  el corte se produce en cada hebra del DNA de forma independiente y de manera aleatoria, mientras que en presencia de iones  $Mn^{+2}$  la DNasa corta ambas hebras de DNA en el mismo punto. Además, se ha descrito que la digestión con DNasa en presencia de iones  $Mg^{+2}$  origina fragmentos con extremos que se solapan entre sí y que estos “artefactos” originan una señal en los ensayos de RT-qPCR, la cual no desaparece a pesar de incrementar la concentración de DNasa [220]. A su vez, estudios similares se refieren al ion  $Mn^{+2}$  como mejor activador de la DNasa, frente al ion  $Mg^{+2}$  [221].

Por otra parte, se ha reportado en la bibliografía que la utilización conjunta de iones  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , además de producir un efecto sinérgico, provoca un cambio en el tipo de digestión de la DNasa, pasando de un corte en una sola hebra de DNA a un corte simultáneo en ambas hebras. En este mismo estudio no se observa un efecto sinérgico en la utilización conjunta de los iones  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ . También se determina que el máximo de actividad de la DNasa se alcanza en el rango de concentración 5-10 mM de iones  $Mg^{+2}$ , observándose inhibición en la reacción a concentraciones de iones  $Mg^{+2}$  superiores a 10 mM [222]. La composición de los diferentes tampones de digestión que fueron preparados en este proyecto se detalla en la **Tabla 4**, los cuales fueron filtrados por 0,2  $\mu m$ , alícuotados y almacenados a  $-20^{\circ}C$ .

**Tabla 4.** Composición de los diferentes tampones de digestión utilizados durante la optimización de la reacción de digestión con DNasa. Se muestra el ejemplo del volumen a adicionar para la preparación de 1 ml de tampón. Abreviaturas: C: concentración. \*pH = 7,6, medido a  $25^{\circ}C$ .

	C <sub>inicial</sub>	C <sub>final</sub>	Volumen
<b>Tampón NEB 10X</b>			
Tris-HCl*	1 M	100 mM	100 $\mu l$
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	25 mM	250 $\mu l$
CaCl <sub>2</sub>	200 mM	5 mM	25 $\mu l$
H <sub>2</sub> O	N/A	N/A	625 $\mu l$
<b>Tampón Mn 10X</b>			
Tris-HCl*	1 M	100 mM	100 $\mu l$
MnCl <sub>2</sub>	1 M	100 mM	100 $\mu l$
H <sub>2</sub> O	N/A	N/A	800 $\mu l$
<b>Tampón Mn-Ca 10X</b>			
Tris-HCl*	1 M	100 mM	100 $\mu l$
MnCl <sub>2</sub>	1 M	10 mM	10 $\mu l$
CaCl <sub>2</sub>	200 mM	5 mM	25 $\mu l$
H <sub>2</sub> O	N/A	N/A	865 $\mu l$

Una vez preparados los diferentes tampones de digestión mostrados en la **Tabla 4**, se calculó el volumen necesario a añadir de cada uno de ellos en la mezcla de digestión, para alcanzar las concentraciones de iones divalentes mostradas en la **Tabla 5**. Las diferentes condiciones de digestión mostradas en la **Tabla 5** se evaluaron sobre el plásmido de transferencia B-CHI1 diluido en distintos medios: en una solución acuosa, en medio DMEM y en un sobrenadante celular, donde no hubo formación de partículas virales y que estuvo en contacto con células 293T durante 48h. La digestión con DNasa se llevó a cabo según el protocolo descrito para el tratamiento 1 en el apartado III.5.1.2, a excepción del tampón de digestión, ya que el tampón utilizado de rutina en la digestión con DNasa fue el tampón NEB, pero en este estudio se evaluaron los tampones alternativos recogidos en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Descripción de los diferentes tampones de digestión evaluados durante la digestión con DNasa de un DNA plasmídico contenido en solución acuosa, en medio DMEM o en un sobrenadante celular de 48h.

Nombre condición	Concentración final de iones divalentes en la mezcla de digestión
Tampón NEB 1X	[Mg <sup>+2</sup> ] = 2,5 mM; [Ca <sup>+2</sup> ] = 0,5 mM
Tampón NEB 2X	[Mg <sup>+2</sup> ] = 5 mM; [Ca <sup>+2</sup> ] = 1 mM
Tampón NEB 4X	[Mg <sup>+2</sup> ] = 10 mM; [Ca <sup>+2</sup> ] = 2 mM
Tampón Mn 1X	[Mn <sup>+2</sup> ] = 10 mM
Tampón Mn 0,1X	[Mn <sup>+2</sup> ] = 1 mM
Tampón Mn-Ca 1X	[Mn <sup>+2</sup> ] = 1 mM; [Ca <sup>+2</sup> ] = 0,5 mM

## III.5.2 PURIFICACIÓN POR ULTRACENTRIFUGACIÓN DEL SOBRENADANTE VIRAL

### III.5.2.1 ULTRACENTRIFUGACIÓN EN UNA SOLUCIÓN DE SACAROSA

La ultracentrifugación en gradiente de densidad, mediante una solución de sacarosa, es una de las técnicas más extendidas en la purificación y concentración de partículas virales. A menudo suele ser implementada junto con otras técnicas de purificación para incrementar el rendimiento global del proceso [223]. En este proyecto se planteó la realización de una ultracentrifugación en una solución de sacarosa, previa a la digestión con DNasa, con el objetivo de analizar si este paso previo de ultracentrifugación del sobrenadante viral conducía a la eliminación de ciertas sustancias inhibitorias, las cuales podrían estar condicionando la actividad de la DNasa, o de diferentes complejos en los que podría estar presente el DNA plasmídico inaccesible para la DNasa.

Para ello, se tomó como modelo el protocolo de centrifugación al 10% de sacarosa propuesto por Jiang et al. (2015) [224] y el protocolo de ultracentrifugación al 20% de sacarosa propuesto por Kutner et al. (2009) [225], ambos específicamente descritos para la purificación de lentivirus. Los protocolos anteriores fueron modificados en este proyecto ajustando diferentes parámetros en función del tipo de rotor y (ultra)centrífuga disponibles para la realización de estos ensayos, dando lugar a los protocolos A y B, respectivamente, cuyas condiciones específicas se recogen en la **Tabla 6**. El protocolo propuesto por Jiang et al. está optimizado para su realización en una centrífuga convencional a velocidad de 10.000 g. Esto supone una ventaja añadida, ya que el equipamiento es más económico y accesible para la gran mayoría de laboratorios, frente al protocolo propuesto por Kutner et al., que requiere disponer de una ultracentrífuga para alcanzar la velocidad de 82.700 g.

**Tabla 6.** Condiciones de ultracentrifugación con sacarosa de un sobrenadante viral, siguiendo los protocolos A y B. \*10 g de sacarosa por cada 100 ml de tampón \*\*20 g de sacarosa por cada 100 ml de tampón #pH=7,4. Abreviaturas: sobr. viral: sobrenadante viral; FC: factor de concentración. El FC se ha calculado teniendo en cuenta el volumen inicial de sobrenadante viral (20 ml en el protocolo A y 26,56 ml en el protocolo B) y el volumen final de resuspensión del pellet, que fue de 100 µl en el protocolo A y 200 µl en el protocolo B, así como la dilución 1/10 que se aplica posteriormente sobre el pellet resuspendido.

	Tampón centrifugación	Ratio sobr.viral : tampón	Condiciones (ultra) centrifugación	Centrífuga o Ultracentrífuga	Tipo de rotor	FC
<b>Protocolo A</b>	10% sacarosa* 50 mM Tris-HCl# 100 mM NaCl 0,5 mM EDTA	4:1 (20 ml:5 ml)	10.000 g 4h 4°C	Centrífuga 5804R (Eppendorf)	Fijo (F-34-6-38)	20,0
<b>Protocolo B</b>	20% sacarosa** 100 mM NaCl 20 mM HEPES# 1 mM EDTA	8:1 (26,56 ml:3,32 ml)	82.700 g 2h 4°C	Ultracentrífuga Optima XE-90 (Beckman Coulter)	Fijo (70Ti)	13,5

El procedimiento seguido consistió, en primer lugar, en añadir al tubo de centrifugación el tampón correspondiente, cuya composición se detalla en la **Tabla 6** y, en segundo lugar, el sobrenadante viral hasta llenar el tubo en su totalidad. Los volúmenes adicionados tanto de tampón como de sobrenadante viral en cada protocolo se recogen en la **Tabla 6**. Tras aplicar las condiciones específicas de centrifugación (protocolo A) o ultracentrifugación (protocolo B), recogidas en la **Tabla 6**, se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido (el cual teóricamente contenía las partículas virales purificadas) se resuspendió con 100 µl de tampón PBS (protocolo A) o 200 µl de tampón PBS (en protocolo B). Posteriormente, se realizó una dilución 1/10 en PBS del *pellet* resuspendido, para disponer de mayor volumen, y se aplicaron los tratamientos 1 y 2 descritos en el apartado III.5.1.2. La digestión con DNasa se realizó a concentración de 50 U/ml a 37°C durante 3h, mientras que la extracción de ácidos nucleicos se realizó con QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( $V_0 = 140 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ).

### III.5.2.2 ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE VELOCIDAD

La ultracentrifugación en gradiente de velocidad, mediante el reactivo Optiprep™ (compuesto por 60% de iodixanol), en teoría permitiría la separación de partículas virales y exosomas, estos últimos potencialmente presentes en el sobrenadante viral [226, 227]. Los exosomas son estructuras muy similares a las partículas virales y comparten la misma ruta de síntesis en el interior celular [228]. Además, presentan una densidad (1,13-1,21 g/L) muy similar a las partículas lentivirales (1,16-1,18 g/L), por lo que se co-purifican durante la ultracentrifugación en gradiente de densidad [226]. Debido a ello, se recomienda recurrir a la ultracentrifugación en gradiente de velocidad para su correcta separación.

Los exosomas podrían ser un inconveniente si estos hubieran incorporado DNA en su interior, ya que este quedaría inaccesible para la digestión con DNasa, a menos que se realice una extracción de ácidos nucleicos. La incorporación de DNA en el interior de exosomas podría haber tenido lugar tanto en el interior celular (durante su síntesis) como en el exterior celular.

Durante este proyecto se analizaron diferentes protocolos de ultracentrifugación en gradiente de velocidad, en los cuales se tomó como modelo el protocolo propuesto por Dettenhofer et al. (1999) [229]. Este protocolo fue ajustado en función del tipo de rotor y ultracentrífuga disponibles, dando lugar a los protocolos C1, C2, D1 y D2, cuyas condiciones específicas se recogen en la **Tabla 7**. La ultracentrífuga L8-60M (Beckman Coulter) con rotor oscilante SW 41

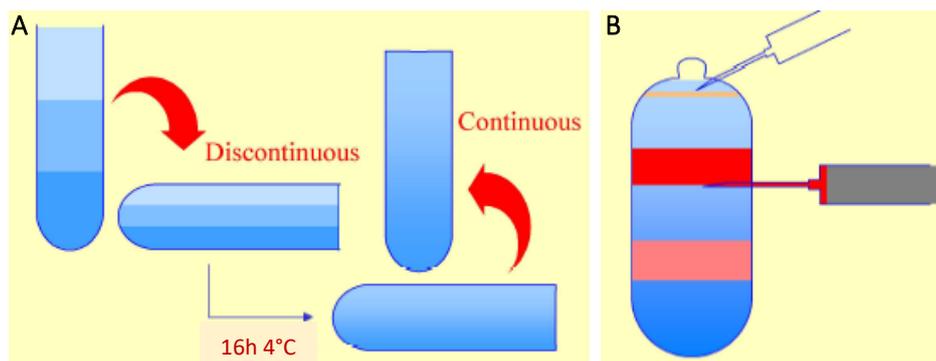
Ti es propiedad de la Universidad de Zaragoza y fue facilitada para realizar el experimento de ultracentrifugación en gradiente de velocidad siguiendo los protocolos D1 y D2.

**Tabla 7.** Condiciones de ultracentrifugación en gradiente de velocidad de un sobrenadante viral siguiendo los protocolos C1, C2, D1 y D2.

	Condiciones centrifugación	Ultracentrífuga	Tipo de rotor	Tipo de gradiente	Recogida de fracciones
Protocolos C1/C2	250.000 g 1h 4°C	Optima XE-90 (Beckman Coulter)	Fijo (70Ti)	Continuo (C1) / Discontinuo (C2)	Desde parte superior
Protocolos D1/D2	250.000 g 2h 4°C	L8-60M (Beckman Coulter)	Oscilante (SW 41 Ti)	Discontinuo	Desde parte superior (D1) o perforando el tubo con aguja (D2)

En ambos protocolos (C y D) se ultracentrifugó a velocidad de 250.000 g en un gradiente realizado a partir de 11 disoluciones de diferente concentración del reactivo Optiprep™. Las disoluciones se prepararon en tampón PBS en el rango de concentración de 6-18% de Optiprep™, por lo que la diferencia de concentración de Optiprep™ entre las 11 disoluciones fue de 1,2%. El volumen adicionado, de cada una de las disoluciones, al tubo de centrifugación varió en función del tipo de rotor utilizado. Los tubos empleados en los protocolos C y D presentan una capacidad de 32,4 ml y 13,2 ml, respectivamente. Debido a ello, se adicionaron 2,5 ml y 1 ml de cada una de las 11 disoluciones de Optiprep™ en los protocolos C y D, respectivamente. La adición de las disoluciones debe comenzar por la más densa y finalizar por la menos densa. En último lugar, se adiciona el sobrenadante viral, cuyo volumen no debe superar el 10-15% del volumen total, según las recomendaciones del fabricante. Por este motivo, se añadieron 2,5 ml y 1 ml de sobrenadante viral en los protocolos C y D, respectivamente.

La principal diferencia entre los protocolos C y D fue el tipo de rotor utilizado: rotor fijo en protocolo C y rotor oscilante en protocolo D. El protocolo C se subdividió en C1 y C2, en función de si se utilizó un gradiente de Optiprep™ continuo (C1) o discontinuo (C2). El gradiente continuo se creó a partir del discontinuo colocando el tubo en posición horizontal, incubando este durante 16h en nevera a 4°C y pasado este tiempo colocando de nuevo el tubo en posición vertical, tal y como se muestra en la **Figura 19A**. Por otra parte, el protocolo D se subdividió en D1 y D2, en función de si la recogida de las diferentes fracciones se realizó comenzando desde la parte superior (D1) o recogiendo cada fracción mediante una aguja capaz de perforar el tubo (D2), tal y como se muestra en la **Figura 19B**. Según el fabricante habría que perforar el tubo en la tercera banda inferior, ya que teóricamente las partículas virales se concentrarían en esta fracción. Por tanto, en un gradiente de 11 fracciones, la fracción enriquecida en partículas virales sería la fracción 9. Para lograr una correcta purificación de las partículas virales, estas deberían localizarse en una única o varias fracciones, pero no deberían encontrarse distribuidas a lo largo de todo el gradiente. Por otra parte, sería esperable que las fracciones donde se localizan las partículas virales difieran de aquellas fracciones donde se localiza el DNA.



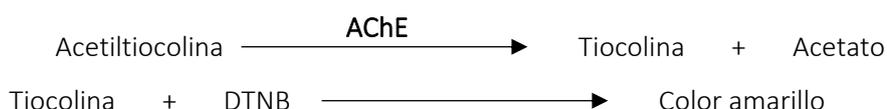
**Figura 19.** A. Gradiente discontinuo y continuo. B. Recogida de fracciones desde la parte superior o recogida de una fracción determinada perforando el tubo con una aguja unida a una jeringuilla. Fuente: [230] (A); [231] (B).

Una vez finalizado el proceso de ultracentrifugación, se recogieron diferentes fracciones de volumen aproximado 2,5 ml (protocolo C) o 1 ml (protocolo D) y estas fracciones se sometieron a los tratamientos 1 y 2, descritos en el apartado III.5.1.2. La digestión con DNasa se realizó a concentración de 50 U/ml a 37°C durante 1h, mientras que la extracción de ácidos nucleicos se realizó con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ).

### III.5.2.3 REACCIÓN DE ELLMAN

Para la identificación de exosomas se debe recurrir a marcadores específicos que únicamente se encuentren presentes en estas estructuras. Existe cierta controversia sobre los marcadores específicos de exosomas que permiten su identificación: Cantin et al. (2008) [226] señalan la presencia de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como exclusiva de exosomas, mientras que Liao et al. (2019) [227] desaconsejan su utilización como marcador específico y utilizan en su lugar el marcador CD63.

En este proyecto se recurrió a la detección de la enzima AChE mediante la reacción de Ellman [232], en la cual el sustrato 5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) se vuelve amarillo en presencia de AChE, tal y como se muestra en la **Figura 20**.



**Figura 20.** Esquema de la reacción de Ellman. En presencia de acetilcolinesterasa (AChE), la acetilcolina se escinde en tiocolina y acetato. La tiocolina reacciona con el DTNB (5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman) dando un color amarillo. Se realiza su lectura a 405 nm tras incubación a temperatura ambiente durante 20 min.

En primer lugar, se prepararon las siguientes disoluciones a partir de diferentes reactivos, siguiendo el protocolo descrito por Ellman et al. (1961) [232]:

**-Tampón fosfato a concentración 0,1M (pH=8):** constituido por fosfato de sodio dibásico (94,7%) y fosfato de sodio monobásico (5,3%). Para ello, se disolvieron 0,67 g de fosfato de sodio dibásico (Sigma) y 0,032 g de fosfato de sodio monobásico (Sigma) en un volumen final de 50 ml de agua destilada.

**-Tampón fosfato a concentración 0,1M (pH=7):** constituido por fosfato de sodio dibásico (61,0%) y fosfato de sodio monobásico (39,0%). Para ello, se disolvieron 0,43 g de fosfato de

sodio dibásico (Sigma) y 0,23 g de fosfato de sodio monobásico (Sigma) en un volumen final de 50 ml de agua destilada.

**-Yoduro de acetiltiocolina a concentración 0,075M:** se disolvieron 21,67 mg de yoduro de acetiltiocolina (Sigma) en un volumen final de 1 ml de agua destilada.

**-DTNB a concentración 0,01M:** se disolvieron 39,6 mg del reactivo DTNB (Sigma) en un volumen final de 10 ml del tampón fosfato 0,1M (pH=7) preparado anteriormente. A continuación, se adicionaron 15 mg de bicarbonato de sodio (Sigma). Esta solución debe prepararse el mismo día de realización del ensayo.

En segundo lugar, se preparó la mezcla de reacción constituida por 102,5 µl de tampón fosfato 0,1M (pH=8); 1 µl de yoduro de acetiltiocolina 0,075M; 5 µl de DTNB 0,01M; y 50 µl de la muestra a analizar. Esta mezcla se incubó durante 15-20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 405 nm. Un valor elevado de absorbancia es indicativo de una concentración elevada de AChE en el medio analizado y, por tanto, si esta enzima es un buen marcador específico de exosomas, también es reflejo de una concentración elevada de exosomas en el medio analizado.

### III.6 CONCENTRACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

La concentración de las partículas virales fue necesaria para la secuenciación masiva del RNA viral contenido en su interior, ya que se precisaba de una concentración mínima del RNA viral de 1 ng/µl. Para ello, las partículas virales se sometieron a ultrafiltración con las columnas Amicon™ Ultra (Merck Millipore). Se utilizó para este fin una columna con capacidad de 4 ml, compuesta por una membrana de celulosa regenerada Ultracel™ y con un peso molecular de corte (MWCO, del inglés *molecular weight cut off*) de 100 kilodaltons (kDa). Este último fue seleccionado teniendo en cuenta el diámetro aproximado de 90-100 nm que presentan las partículas lentivirales y la asociación de este valor con otros parámetros mostrados en la **Figura 21**.

**Figura 21.** Recomendaciones de uso de diferentes membranas clasificadas en función de su peso molecular de corte (MWCO). Se especifica, para cada membrana, el peso (MW) y el tamaño molecular (molecular size) de la proteína que queda retenida en ella; la longitud (en pares de bases) del DNA de doble hebra (dsDNA) y hebra sencilla (ssDNA) que queda retenido en cada tipo de membrana; y el tamaño estimado (estimated pore size) de los poros que constituyen cada tipo de membrana. Fuente: [233].

MWCO	Protein MW	Molecule Size	BPCO (dsDNA)	BPCO (ssDNA)	Estimated Pore Size
1,000 K	>3000 kDa	300 - 600 nm	>5000 bp	>9000 sb	100 nm
300 K	900 - 1800 kDa	90 - 200 nm	>1500 bp	>2900 sb	30 nm
100 K	300 - 900 kDa	30 - 90 nm	>600 bp	>900 sb	10 nm
50 K	150 - 300 kDa	15 - 30 nm	>300 bp	>475 sb	7 nm
30 K	90 - 180 kDa	9 - 15 nm	>50 bp	>275 sb	4 nm
10 K	30 - 90 kDa	5 - 9 nm	>30 bp	>90 sb	2.5 nm
5K	15 - 30 kDa	3 - 5 nm	>20 bp	>50 sb	1.5 nm
3 K	10 - 20 kDa	2.5 - 3.6 nm	>15 bp	>30 sb	1.2 nm
2 K	3 - 10 kDa	2 - 3 nm	>10 bp	>10 sb	1 nm

Se observa en la **Figura 21** que un diámetro de 90 nm se asocia con un peso molecular de 900 kDa. En este caso se recomienda la ultrafiltración a través de membranas de 100 kDa o 300 kDa, ya que generalmente se aconseja la utilización de una membrana cuyo peso molecular de corte sea por lo menos 3 veces inferior al peso molecular de la muestra que se desea someter a

ultrafiltración. Entre estas dos opciones, la membrana de 100 kDa, a pesar de requerir una mayor velocidad de centrifugación, ha demostrado ser más eficaz en la concentración de lentivirus [234], por lo que se recurrió a ella aplicando el siguiente procedimiento, basado en las recomendaciones del fabricante:

**1)** Antes de su utilización, se realizó un lavado de la membrana contenida en la columna. Para ello, se añadió 1 ml de agua Milli-Q®, se centrifugó con rotor fijo a velocidad 5.000 g durante 1 min y se descartó la fase filtrada. El objetivo fue la eliminación de posibles restos de glicerina, ya que el fabricante advierte de su presencia y su posible interferencia durante el proceso. Durante todo el proceso se evitó el secado de la membrana, cubriéndola con cierta cantidad de agua Milli-Q® cuando fue necesario.

**2)** Se añadieron a la columna 4 ml del sobrenadante viral, el cual contenía las partículas virales de interés, y se centrifugó con rotor fijo a velocidad 5.000 g durante 10 min. Se descartó la fase filtrada (fase inferior, la cual atravesó la membrana) y se recuperó el volumen de la fase concentrada (fase superior, retenida en la membrana), que fue de aproximadamente 50 µl. El volumen de la fase concentrada, en la que teóricamente se encuentran las partículas virales, varía en función del tiempo y velocidad de centrifugación.

**3)** Se añadieron a la columna empleada anteriormente 4 ml adicionales del mismo sobrenadante viral y se repitió el mismo procedimiento detallado en el paso 2. De este modo, si se asume un rendimiento del 100%, el sobrenadante viral se concentró 80 veces, ya que el volumen de partida fue de 8 ml y el volumen de elución de 100 µl.

## III.7 CUANTIFICACIÓN

### III.7.1 CUANTIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Se determinó la concentración del DNA plasmídico en el biofotómetro BioPhotometer®D30 (Eppendorf). Para ello, se cargaron 2 µl de la muestra a cuantificar en la cubeta del equipo y se midió la absorbancia a 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) y 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ). Tras la medición, el software devuelve la siguiente información: valor de  $A_{260\text{nm}}$ , ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  y valor de concentración (µg/ml).

El valor de concentración (ng/µl) es calculado por el equipo de forma automática aplicando la ley de Beer-Lambert:

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad \text{(Ecuación 15)}$$

Siendo A, la absorbancia medida a 260 nm;  $\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar propio de DNA de doble cadena, cuyo valor es de 0,02 µl/ng × cm; y b, la longitud de paso de la cubeta, cuyo valor es de 0,1 cm.

El valor del ratio  $A_{260}/A_{280}$  debe situarse dentro del rango 1,8-2,0, puesto que un valor inferior a 1,8 indica contaminación proteica, mientras que un valor superior a 2 indica presencia de RNA.

### III.7.2 CUANTIFICACIÓN DE RNA VIRAL POR FLUORESCENCIA

Para la cuantificación del RNA viral por fluorescencia, previa a su secuenciación masiva, se utilizó el kit *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit* (Fisher Scientific), ya que permite cuantificar de forma fiable una concentración de RNA desde 1 ng/ml hasta 1 µg/ml. Este kit se basa en la utilización de un fluoróforo denominado RiboGreen™, el cual presenta afinidad por los ácidos nucleicos. El máximo de excitación de este fluoróforo en su unión con el RNA ocurre a 500 nm y el máximo de emisión a 525 nm. Este reactivo no solo tiene afinidad por el RNA, sino que también se une al DNA. Por este motivo, las muestras a ser cuantificadas, una vez fueron extraídas con el kit de extracción MagDEA DxSV en el equipo MagLEAD® 12gC ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ), fueron digeridas con DNasa (NEB) a concentración 50 U/ml a 37°C durante 1h. Posteriormente, la ausencia de DNA se comprobó por qPCR con un conjunto de cebadores y sonda dirigido a la región de interés.

El proceso seguido para la cuantificación del RNA viral se detalla a continuación:

**1)** Se preparó TE 1X a partir del reactivo *20X TE Buffer* (suministrado con el kit). Para ello, se añadieron 250 µl de TE 20X en 4.750 µl de agua de grado biología molecular, libre de DNasas y RNasas (PanReac AppliChem).

**2)** Se dejó atemperar el reactivo *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent* (suministrado con el kit) antes de su uso, ya que el fluoróforo RiboGreen™ se encuentra disuelto en una solución que contiene DMSO y este último en frío absorbe partículas del ambiente que afectan al correcto funcionamiento del reactivo.

**3)** Se realizó una dilución 1/200 del reactivo *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent*, ya que es la dilución recomendada por el fabricante para una cuantificación óptima en el rango 20 ng/ml-1.000 ng/ml de RNA. Si el valor de concentración que se desea medir es inferior a 20 ng/ml se debe trabajar con una dilución de RiboGreen™ de 1/2000, en lugar de 1/200. Para obtener la dilución 1/200 se añadieron 2 µl de RiboGreen™ en 398 µl de la solución TE 1X, preparada en el paso 1, y se mezcló con ayuda de un agitador. Esta solución debe protegerse de la luz durante su uso y únicamente es estable durante varias horas, por lo que para una cuantificación fiable debe prepararse en el momento del ensayo.

**4)** Se prepararon diferentes diluciones seriadas a partir del estándar de RNA ribosómico 16S y 23S de *E. coli* (suministrado con el kit), con el objetivo de elaborar una recta estándar. En primer lugar, se realizó una dilución intermedia a concentración 2.000 ng/ml del estándar de RNA. Para ello, se añadieron 20 µl del vial madre (a concentración 100 µg/ml) en 980 µl de TE 1X. En segundo lugar, a partir de la dilución intermedia anterior se prepararon seis diluciones de concentración conocida, tal y como se indica en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Diluciones aplicadas en el estándar de RNA ribosómico 16S y 23S de *E. coli* para la elaboración de una recta estándar que permita la cuantificación del RNA viral por fluorescencia. \*Volumen a añadir de la dilución intermedia (concentración 2.000 ng/ml) del estándar de RNA.

Nombre	Concentración 2X RNA (ng/ml)	Volumen de dilución intermedia de RNA* (μl)	Volumen de TE 1X (μl)
Control negativo	0	N/A	10
Estándar 1	50	1	39
Estándar 2	250	5	35
Estándar 3	500	10	30
Estándar 4	800	16	24
Estándar 5	1.000	20	20
Estándar 6	1.500	30	10

5) Se inició el software asociado al fluoroespectrofotómetro NanoDrop™ 3300 y se seleccionó la longitud de onda de 523 nm para la realización de las mediciones. A continuación, se midieron 2 μl de TE 1X para hacer el blanco.

6) Previo a la medición en NanoDrop™ 3300 del control negativo y los diferentes estándares indicados en la **Tabla 8**, se mezclaron 10 μl de la solución de RiboGreen™ 1/200 (preparada en el paso 3) con 10 μl del estándar correspondiente. Se dejó incubar la mezcla durante 3-4 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Pasado este tiempo se realizaron 4 mediciones, siendo necesario cargar 2 μl de mezcla por medición en la cubeta del fluoroespectrofotómetro. El volumen final de la mezcla de RiboGreen™ y el estándar puede variar, pero siempre debe cumplirse un ratio volumen RiboGreen™: volumen muestra = 1:1. Esto implica que la concentración 2X de cada estándar, indicada en la **Tabla 8**, pasa a ser de 1X en la cubeta del fluoroespectrofotómetro. Las mediciones se realizaron en orden creciente de concentración, comenzando con el control negativo y finalizando con la medición del estándar 6.

7) Una vez realizada la recta estándar, se procedió a la medición de las muestras de concentración desconocida, siguiendo el mismo proceso detallado en el paso anterior (mediante la adición de un volumen de RiboGreen™ equivalente al volumen de muestra, esto es, ratio 1:1). El valor de fluorescencia obtenido en la muestra de concentración desconocida debe estar comprendido dentro de los valores que conforman la recta estándar. De este modo, la concentración de RNA (en ng/μl) se determinó por extrapolación en la recta estándar del valor de fluorescencia obtenido en cada una de las muestras.

## III.8 ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL

### III.8.1 REALIZACIÓN DE ENSAYOS qPCR Y RT-qPCR

Los ensayos de qPCR y RT-qPCR utilizados en este proyecto fueron, en su gran mayoría, ensayos comerciales incluidos en la gama de productos VIASURE Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.) o ensayos *in-house*. Ambos comparten el mismo procedimiento, consistente en rehidratar el líofilo, contenido en los pocillos del ensayo de qPCR o RT-qPCR, con 15 μl de la mezcla de reconstitución suministrada junto con el ensayo comercial y, posteriormente, añadir 5 μl de la muestra a evaluar. Finalmente, los pocillos se cubrieron con las tapas suministradas

en el ensayo comercial y se introdujeron en el termociclador correspondiente, para el desarrollo de la reacción de PCR de acuerdo con el protocolo térmico mostrado en la **Tabla 9**.

En la composición de los ensayos de RT-qPCR, a diferencia de los ensayos de qPCR, se incluye la enzima retrotranscriptasa, para la realización del paso previo de retrotranscripción, el cual permite la conversión del RNA en cDNA. Por este motivo, se observa en la **Tabla 9** la inclusión de un paso adicional en el protocolo térmico de RT-qPCR, respecto al protocolo de qPCR.

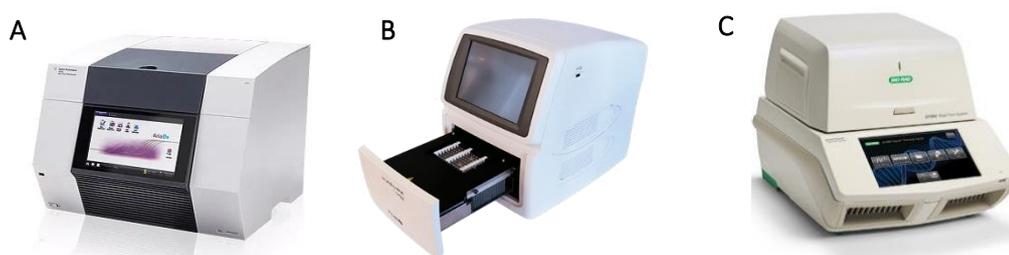
**Tabla 9.** Protocolo térmico utilizado en los ensayos de qPCR y RT-qPCR. \*En esta etapa se programa la detección de la señal fluorescente.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción (paso exclusivo de RT-qPCR)	45°C	15 min	1
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Amplificación	95°C	10 s	45
	60°C*	50 s	

En la interpretación de los resultados obtenidos tras el análisis por qPCR o RT-qPCR, con los productos VIASURE Real Time PCR Detection Kit o los ensayos *in-house*, se consideró un resultado negativo cuando el valor de  $C_q$  fue superior a 40, según lo indicado en las instrucciones de uso de los productos VIASURE, ya que se trata de un valor de  $C_q$  en el límite de detección de la técnica. En los ensayos *in-house* se aplicó el mismo  $C_q$  de corte puesto que se diseñaron de forma análoga a los productos VIASURE.

En aquellos casos en los que la reacción de qPCR o RT-qPCR se llevó a cabo mediante la utilización de ensayos comerciales diferentes a los mencionados anteriormente, se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los termocicladores utilizados en los diferentes ensayos de qPCR y RT-qPCR llevados a cabo en este proyecto fueron AriaMx Real-Time PCR System (**Figura 22A**), V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform (**Figura 22B**) y CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (**Figura 22C**).



**Figura 22.** A. Termociclador AriaMx Real-Time PCR System. B. V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform. C. CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System. Fuente: [235] (A); [236] (B); [237] (C).

### III.9 ENSAYOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

Los diferentes ensayos realizados para evaluar la funcionalidad de las partículas virales desarrolladas en este proyecto fueron planteados considerando su intención de uso, consistente en la monitorización completa del proceso de RT-qPCR, desde la extracción de ácidos nucleicos

hasta la retrotranscripción y los pasos posteriores de amplificación. Previamente a su evaluación las partículas virales fueron liofilizadas a una concentración concreta. En el momento de su evaluación el líofilo fue reconstituido con 220 µl de agua libre de DNasas y RNasas y en todos los ensayos de funcionalidad se procesó, de forma paralela junto con las partículas virales, un vial de control negativo, consistente en una solución acuosa.

Se evaluaron un total de diez partículas virales diferentes, correspondientes al virus de SARS-CoV-2, virus respiratorio sincitial (RSV, del inglés *respiratory syncytial virus*), virus de influenza A y virus de influenza B, por lo que se requirió la detección por RT-qPCR de diez dianas distintas. Los diferentes ensayos utilizados durante la evaluación de la funcionalidad de las partículas virales desarrolladas en este proyecto se recogen en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Recopilación de los diferentes ensayos de RT-qPCR utilizados para validar la funcionalidad y estabilidad de las partículas virales desarrolladas en este proyecto.

Control positivo	Partícula viral	Ensayo RT-qPCR utilizado para validar la partícula viral	Gen diana (canal)
Virus de SARS-CoV-2	NCO	VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.)	Gen <i>ORF1ab</i> (FAM)
			Gen <i>N</i> (ROX)
Virus respiratorio sincitial	RSV	VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.)	Gen <i>N</i> (Cy5)
Virus de influenza A	YIA1	VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.)	Gen <i>M</i> (FAM)
	YIA2	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>PB2</i> (FAM)
	YIA3	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>NS</i> (FAM)
	YIA4	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>PA</i> (FAM)
Virus de influenza B	YIB1	VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.)	Gen <i>M</i> (ROX)
	YIB2	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>NP</i> (FAM)
	YIB3	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>NA</i> (FAM)
	YIB4	Ensayo <i>in-house</i>	Gen <i>PB2</i> (FAM)

Los ensayos de funcionalidad se basaron en el análisis de compatibilidad con diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos, el análisis de compatibilidad con diferentes ensayos de PCR en tiempo real y la realización de diferentes ensayos de precisión.

### III.9.1 COMPATIBILIDAD CON DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se evaluó la funcionalidad de las partículas virales al ser procesadas mediante los sistemas de extracción mostrados en la **Tabla 11**, cuyo uso en la extracción del material genético de virus está ampliamente extendido. Previamente a la extracción, las partículas virales liofilizadas fueron rehidratadas con 220 µl de agua libre de DNasas y RNasas y, de este volumen, se tomaron 200 µl para iniciar el proceso de extracción, el cual finalizó con un paso de elución en un volumen final de 100 µl. La extracción de ácidos nucleicos se realizó en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el objetivo de obtener resultados representativos se evaluó la extracción de ácidos nucleicos en tres lotes independientes de cada una de las partículas virales analizadas y de cada lote se realizaron dos extracciones. Por tanto, por cada tipo de partícula

viral y sistema de extracción analizado se realizaron seis extracciones. Los ácidos nucleicos extraídos se testaron por duplicado por el ensayo correspondiente de RT-qPCR (**Tabla 10**).

**Tabla 11.** Recopilación de los diferentes sistemas de extracción utilizados en este proyecto.

Sistemas de extracción manuales	Sistemas de extracción automáticos	
	Kit de extracción	Equipo de extracción
1. QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)	3. MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)	KingFisher Flex System
2. Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek)	4. MagDEA DxSV (Precision System Science Co.)	MagLEAD® 12gC Instrument
	5. MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit (Roche Life Science)	MagNA Pure 24 System
	6. Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)	Maxwell® RSC Instrument
	7. MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience).	MagCore®HF16 automated Nucleic Acid Extractor System

La compatibilidad de uso de las partículas virales recombinantes de RNA con las diferentes plataformas o métodos de extracción se analizó en términos de variabilidad del valor de  $C_q$ , obtenido esta una vez la partícula viral fue extraída y analizada por RT-qPCR. Debido a que todos los sistemas de extracción incluidos en este proyecto son sistemas optimizados, los valores de  $C_q$  obtenidos tras analizar por RT-qPCR una misma partícula viral extraída por diferentes sistemas deberían ser similares. Teniendo en cuenta lo anterior se establecieron unos criterios, basados en la desviación típica ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación (CV) de los valores de  $C_q$ , para considerar si un determinado sistema de extracción resultaba compatible con las partículas virales sometidas a evaluación. La desviación típica y el coeficiente de variación se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 15 y 17, respectivamente. El criterio establecido fue diferente en función de si se valoró la variabilidad de los valores de  $C_q$  obtenidos dentro de un mismo sistema de extracción (intra-extractor) o entre diferentes sistemas de extracción (inter-extractor), tal y como se muestra en la **Tabla 12**, ya que en este último caso se asume una mayor variabilidad. Para asegurar una comparativa fiable entre los diferentes sistemas de extracción se consideró el mismo valor de *threshold* durante la interpretación de resultados por RT-qPCR.

**Tabla 12.** Criterio de aceptación definido en los análisis intra-extractor e inter-extractor.

Análisis	Valores de $C_q$ considerados para el cálculo estadístico	Criterio de aceptación
Intra-extractor	Valores de $C_q$ obtenidos en un mismo sistema de extracción	$\sigma \leq 1$ y $CV \leq 5\%$
Inter-extractor	Valores de $C_q$ obtenidos en los diferentes sistema de extracción incluidos en el análisis	$\sigma \leq 2$ y $CV \leq 10\%$

### III.9.2 COMPATIBILIDAD CON DIFERENTES ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL

Se evaluó la funcionalidad de las partículas virales mediante diferentes conjuntos de cebadores y sonda, con el objetivo de verificar que todas las dianas analizadas amplificaban correctamente

por RT-qPCR, independientemente del valor de  $C_q$  obtenido en cada ensayo, puesto que el objetivo de este experimento no fue la optimización de los ensayos de RT-qPCR.

Para el análisis de compatibilidad de las partículas virales con diferentes ensayos de RT-qPCR se consideró un mínimo de un conjunto de cebadores y sonda por cada fragmento o gen incluido en el diseño de cada partícula viral. La secuencia de los diferentes conjuntos de cebadores y sonda utilizados en este análisis se obtuvo, en algunos casos, de la bibliografía y, en otros casos, se recurrió a su diseño mediante diferentes herramientas bioinformáticas.

El análisis por RT-qPCR se realizó a partir de una mezcla liofilizada que contenía todos los reactivos necesarios para desarrollar la reacción de RT-qPCR, excepto los cebadores y sonda. Estos se añadieron a concentración final de 250 nM (cebadores directo y reverso) y 125 nM (sonda) al tampón de reconstitución y se rehidrató la mezcla liofilizada con 15  $\mu$ l de dicha solución (ver apartado III.8.1). A continuación, se añadieron 5  $\mu$ l de los ácidos nucleicos correspondientes, en función del tipo de partícula viral analizada. Los ácidos nucleicos utilizados fueron los extraídos del ensayo de compatibilidad con diferentes sistemas de extracción (apartado III.9.1). En este tipo de análisis, el sistema de extracción utilizado no es crítico, siempre que su compatibilidad haya sido demostrada previamente. Cada reacción de RT-qPCR se analizó por triplicado y el protocolo térmico de RT-qPCR que fue aplicado se muestra en la **Tabla 9**.

### III.9.3 ENSAYOS DE PRECISIÓN

Se evaluó la reproducibilidad y repetibilidad tras someter a las partículas virales a un mismo procedimiento de extracción de ácidos nucleicos y posterior análisis por RT-qPCR en un mismo termociclador, en diferentes escenarios: dentro de un mismo ensayo (intra-ensayo), entre ensayos realizados en días diferentes (inter-ensayo), por distintos operadores (inter-operador) o en diferentes lotes de partículas virales (inter-lote). Por otra parte, se estudió la reproducibilidad y repetibilidad tras someter a las partículas virales a diferentes procedimientos de extracción de ácidos nucleicos y posterior análisis por RT-qPCR en diferentes termocicladores (inter-equipamiento).

Las condiciones específicas de cada uno de los ensayos de precisión y el criterio de aceptación considerado en cada análisis, para determinar si las partículas evaluadas presentan una elevada reproducibilidad y repetibilidad, se recogen en la **Tabla 13**. La desviación típica y el coeficiente de variación se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 15 y 17, respectivamente.

El sistema de extracción de ácidos nucleicos utilizado durante los ensayos de precisión puede ser cualquier sistema siempre que su compatibilidad haya sido demostrada previamente (**Tabla 11**), siempre que se aplique el mismo sistema de extracción en todos los ensayos de precisión, a excepción del inter-equipamiento. Asimismo, el termociclador donde se desarrolla la reacción de RT-qPCR debe ser el mismo en todos los ensayos de precisión, a excepción del inter-equipamiento. Por otra parte, el ensayo de RT-qPCR utilizado varió en función del tipo de partícula viral analizada (**Tabla 10**) y el protocolo térmico de RT-qPCR que fue aplicado se muestra en la **Tabla 9**. Durante la interpretación de los resultados obtenidos por RT-qPCR dentro de un mismo ensayo de precisión se consideró el mismo valor de *threshold*, para unificar las condiciones de análisis.

**Tabla 13.** Criterio de aceptación definido en los diferentes ensayos de precisión y descripción de las condiciones específicas de cada uno de los ensayos.

Tipo de ensayo	Condiciones específicas	No. Lotes analizados	No. Réplicas de extracción	No. Réplicas de RT-qPCR	Criterio de aceptación
Intra-ensayo	Mismo ensayo	1	2	4	$\sigma \leq 1$ y $CV \leq 5\%$
Inter-ensayo	3 días	1	2	2	$\sigma \leq 1$ y $CV \leq 5\%$
Inter-operador	3 operadores	1	2	2	$\sigma \leq 1$ y $CV \leq 5\%$
Inter-lote	3 lotes	3	2	2	$\sigma \leq 1$ y $CV \leq 5\%$
Inter-equipamiento	3 flujos de trabajo diferentes	1	2	2	$\sigma \leq 2$ y $CV \leq 10\%$

### III.10 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

En la evaluación de la estabilidad de las partículas virales se consideró tanto la estabilidad del RNA viral como la integridad de la partícula viral. Para ello se realizaron dos tipos de análisis, los cuales fueron aplicados en todos los experimentos de estabilidad descritos a lo largo de este apartado.

**1) Partícula viral extraída:** las partículas virales liofilizadas se sometieron a una extracción de ácidos nucleicos (mediante uno de los sistemas de extracción incluidos en la **Tabla 11**) y el RNA viral extraído fue analizado por RT-qPCR (mediante uno de los ensayos de RT-qPCR incluidos en la **Tabla 10**). Con el objetivo de valorar la estabilidad del RNA viral se calculó la desviación típica y el coeficiente de variación de los valores de  $C_q$ , siguiendo las ecuaciones 15 y 17, respectivamente. En este cálculo se incluyeron los valores de  $C_q$  obtenidos por RT-qPCR en la condición evaluada y los valores de  $C_q$  obtenidos por RT-qPCR en la condición control. De este modo, si la estabilidad del RNA viral se ve afectada en la condición evaluada, los valores de  $C_q$  obtenidos en esa condición distarán de los valores de  $C_q$  de la condición control y, por tanto, se producirá un incremento en los valores de desviación típica y coeficiente de variación. El criterio de aceptación definido para este tipo de análisis se muestra en la **Tabla 14**.

**2) Partícula viral no extraída:** las partículas virales se analizaron directamente por RT-qPCR (mediante uno de los ensayos de RT-qPCR incluidos en la **Tabla 10**), sin realización de una extracción de ácidos nucleicos previa, con el objetivo de valorar la integridad de las partículas virales. Si estas se encuentran íntegras, no habrá liberación al exterior del RNA viral contenido en las partículas virales y, por tanto, no se observará señal por RT-qPCR. En el caso contrario, si se ha producido la lisis de las partículas virales, en el análisis por RT-qPCR de las partículas virales liofilizadas se observará una curva de amplificación en un determinado  $C_q$ , cuyo valor será más bajo (indicativo de una mayor cantidad de RNA viral) conforme más partículas virales se hayan lisado. Únicamente se asumió como válida una amplificación en un  $C_q \geq 33$ , ya que este valor tan elevado de  $C_q$  es indicativo de una apertura mínima de la cápside viral o incluso podría ser consecuencia de la presencia de trazas de DNA plasmídico en el sobrenadante viral, por lo que en ninguno de los dos casos la integridad de la partícula viral evaluada se ve comprometida de manera significativa.

En la **Tabla 14** se recogen los criterios de aceptación definidos para los dos tipos de análisis (partícula viral no extraída y partícula viral extraída), así como un sistema de calificación que

permite aunar los resultados de ambos análisis. La calificación 0 es indicativa de un fallo durante el proceso de RT-qPCR, que requiere la repetición del ensayo; la calificación 1 implica que la partícula viral no es estable en las condiciones analizadas; y las calificaciones 2 y 3 son indicativas de una elevada estabilidad (mayor en el caso de obtener una calificación 3) de la partícula viral en las condiciones analizadas. Los criterios recogidos en la **Tabla 14** aplican a todos los experimentos de estabilidad descritos a lo largo de este apartado [238].

**Tabla 14.** Sistema de calificación establecido para valorar la estabilidad de las partículas virales teniendo en cuenta los resultados del análisis de la partícula viral no extraída y del análisis de la partícula viral extraída.

Calificación		Tipo de análisis	Resultado observado
3	Correcto	Partícula viral no extraída	No se observa curva de amplificación en el ensayo RT-qPCR
		Partícula viral extraída	$\sigma < 0,5$ ; CV < 2,5%
2	Aceptable	Partícula viral no extraída	Valor $C_q \geq 33$
		Partícula viral extraída	$\sigma = 0,5-1$ ; CV = 2,5-5%
1	Inaceptable	Partícula viral no extraída	Valor $C_q < 33$
		Partícula viral extraída	$\sigma > 1$ ; CV > 5%
0	Error	Partícula viral extraída	No se observa curva de amplificación en el ensayo RT-qPCR

El sistema de extracción y el ensayo de RT-qPCR utilizado fue variable en los diferentes ensayos de estabilidad y en función del tipo de partícula viral analizada, pero se aplicó el mismo procedimiento dentro de un mismo experimento de estabilidad, para obtener de este modo resultados comparables. A su vez, durante la interpretación de los resultados obtenidos por RT-qPCR dentro de un mismo ensayo de estabilidad se consideró el mismo valor de *threshold*, para unificar las condiciones de análisis.

### III.10.1 ENVEJECIMIENTO ACELERADO

La vida útil de cada una de las partículas virales desarrolladas en este proyecto se determinó mediante un experimento de envejecimiento acelerado, consistente en someter al producto a una elevada temperatura para reducir así la duración del experimento. Los experimentos de envejecimiento acelerado deben realizarse en el mismo formato planteado para su potencial comercialización. Para ello, los viales que contenían las partículas virales liofilizadas se introdujeron en sobres de aluminio en cuyo interior se añadió gel de sílice, para la absorción de la humedad ambiental y evitar así la rehidratación del liofilo, y se incubaron en estufa a temperatura de 50°C.

Para calcular la equivalencia entre el tiempo a temperatura acelerada (50°C) y el tiempo a temperatura ambiente (25°C) se aplicó el método  $Q_{10}$ , siguiendo la guía estándar ASTM F1980 para el envejecimiento acelerado de sistemas de barrera estéril para dispositivos médicos [239].

En primer lugar, se determinó el factor de aceleración mediante la ecuación 18, siendo T2 la temperatura acelerada (50°C), T1 la temperatura ambiente (25°C) y el factor  $Q_{10} = 1,8$  [240].

$$\text{Factor de aceleración} = Q_{10}^{((T2 - T1)/10)} \quad \text{(Ecuación 16)}$$

En segundo lugar, se calculó la vida útil del producto mediante la ecuación 19:

$$\text{Vida útil} = (\text{Edad real} \times \text{Factor de aceleración}) + \text{Edad real} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

Para la determinación de la vida útil de la partícula viral de SARS-CoV-2 se analizó la estabilidad de la partícula viral transcurridos 7, 17, 30, 51, 70, 114 y 150 días de incubación a 50°C. En aquellas partículas virales desarrolladas posteriormente, es decir, las partículas virales de RSV, influenza A e influenza B, se redujeron los puntos de control a 30, 90 y 150 días de incubación a 50°C. En la evaluación de SARS-CoV-2 se realizó un análisis más exhaustivo por tratarse del primer diseño evaluado. Como control de cada experimento se analizaron las partículas virales correspondientes que no habían sido incubadas a 50°C (día 0). El tiempo de 30 días se estableció con el objetivo de disponer de un resultado preliminar. Los tiempos de 90 y 150 días se fijaron ya que el tiempo acelerado equivalente es de 1,3 años y 2,2 años, respectivamente. De este modo, si los resultados obtenidos en estos puntos de tiempo fuesen favorables, se confirmaría una vida útil del producto evaluado de mínimo 1 año y 2 años, respectivamente, a temperatura ambiente (25°C). De forma paralela al experimento de envejecimiento acelerado se llevó a cabo un experimento de envejecimiento real, a las temperaturas de almacenamiento más comunes (4°C y 25°C), pero en este caso deben transcurrir 1 y 2 años reales para la obtención de los resultados equivalentes a los obtenidos en los días 90 y 150 del experimento de envejecimiento acelerado.

En cada punto de tiempo ensayado, para cada una de las temperaturas evaluadas (4°C, 25°C y 50°C) se procesaron 3 lotes diferentes de la partícula viral correspondiente. Por tanto, en cada punto de tiempo ensayado se procesaron 9 viales, los cuales fueron sometidos a los dos tipos de análisis contemplados en el apartado III.10.

### III.10.2 ESTABILIDAD EN USO

Se evaluó la estabilidad en uso de las partículas virales, una vez reconstituido el liófilo, a las temperaturas más frecuentes de almacenamiento (25°C y 4°C). También se evaluó su estabilidad tras ser sometidas a un ciclo de congelación y descongelación a las temperaturas de -20°C y -80°C. En todos los casos el liófilo que contenía las partículas virales se rehidrató con 220 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas y fue sometido a los dos tipos de análisis contemplados en el apartado III.10.

Se analizó la estabilidad de las partículas virales de SARS-CoV-2 transcurridas 5h, 1 día, 2 días, 3 días y 8 días de incubación a 25°C y 4°C y la estabilidad de las partículas virales de RSV, influenza A e influenza B transcurridos 1 día, 3 días, 7 días y 14 días de incubación a 25°C y 4°C. En el análisis de la estabilidad de estos últimos diseños se amplió el tiempo evaluado en base a los resultados favorables obtenidos en la evaluación de las partículas virales de SARS-CoV-2. Por otra parte, se analizó la estabilidad de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B tras 30 días almacenadas a las temperaturas de -20°C y -80°C y la estabilidad del RNA viral tras ser sometido a 10 ciclos de congelación y descongelación (entre ciclos se estableció un tiempo mínimo de congelación de 1h 30 min) a las temperaturas de -20°C y -80°C.

Como control de cada experimento se analizaron las partículas virales correspondientes que fueron procesadas inmediatamente después de su rehidratación (día 0).

### III.10.3 ESTABILIDAD EN EL TRANSPORTE

Se evaluó la estabilidad durante el transporte de las partículas virales de SARS-CoV-2, influenza A e influenza B una vez fueron acondicionadas en el formato definido para su potencial comercialización. Para cada tipo de partícula viral se acondicionaron 6 kits con lotes idénticos de cada uno de los reactivos que conforman cada kit, 3 de ellos actuaron como control (no transportados) y los 3 kits restantes fueron transportados de ida y vuelta a Rumanía. El transporte consistió en un trayecto por carretera y otro trayecto aéreo durante un periodo de 11 días, en el cual se monitorizó la temperatura, realizando un total de 1.054 mediciones. La temperatura media durante todo el recorrido fue de 16,9°C, alcanzándose una temperatura mínima de 6,8°C y máxima de 29,2°C. Una vez se recibieron los 3 kits transportados, se procesó un vial de control positivo y un vial de control negativo de cada kit (total: 6 viales), junto con un vial de control positivo y un vial de control negativo de cada uno de los kits control (total: 6 viales). Los viales de control positivo se rehidrataron con 220 µl agua libre de DNAsas y RNAsas y se evaluaron (junto a los viales de control negativo) mediante los dos tipos de análisis contemplados en el apartado III.10. Las partículas virales de RSV se encuentran actualmente en proceso de evaluación bajo el mismo procedimiento comentado anteriormente.

### III.11 SECUENCIACIÓN MASIVA

Previamente a la secuenciación, fue necesario concentrar los sobrenadantes virales, ya que se requería una concentración mínima del RNA viral de 1 ng/µl. Para ello, se utilizaron las columnas de ultrafiltración Amicon™ Ultra (Merck Millipore), siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.6. Posteriormente, el RNA viral fue cuantificado por fluorescencia en el equipo NanoDrop™ 3300 mediante el kit comercial RiboGreen® Assay for RNA Quantitation (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.7.2, con el objetivo de verificar que los sobrenadantes virales sometidos a ultrafiltración presentaban la concentración mínima de RNA requerida para su secuenciación.

La secuenciación masiva del RNA viral fue realizada por el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), con el equipo HiSeq1500 de Illumina. El posterior análisis bioinformático también fue realizado por este centro, procesando los datos crudos con diferentes herramientas bioinformáticas para la eliminación de las lecturas correspondientes a los adaptadores y las regiones de baja calidad, las lecturas correspondientes al RNA ribosómico y las lecturas correspondientes al RNA de origen humano. Una vez recibidos los resultados de la secuenciación en archivos BAM, se visualizó en el software Integrative Genomics Viewer (IGV) el mapeo de las lecturas de cada muestra respecto a la secuencia de referencia correspondiente. La secuencia de referencia es la secuencia del plásmido de transferencia que se transcribe dando lugar al RNA viral. Esta secuencia se compone de una región común y de una región específica de patógeno, tal y como se describe en el apartado III.2, y, por tanto, la secuencia de referencia difiere entre las 10 muestras secuenciadas.

## IV. OBJETIVOS

---



El principal objetivo de esta tesis es el desarrollo de partículas virales recombinantes de RNA para su uso como control positivo de diferentes ensayos de PCR en tiempo real. Se persigue la generación de partículas virales no infecciosas y no replicativas, capaces de monitorizar todas las etapas del proceso, de uso universal, reproducibles y estables en el tiempo.

Los objetivos específicos abordados en este proyecto se detallan a continuación:

1. Desarrollar y optimizar un sistema para la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de genoma RNA.
2. Elaborar una colección de partículas virales recombinantes de RNA, aplicando el sistema optimizado previamente para su generación *in vitro*.
3. Validar las partículas virales recombinantes de RNA para su uso como control positivo de ensayos de RT-qPCR.
4. Presentar un producto final con un potencial uso comercial, adaptado al usuario final y que cumpla la normativa vigente.



## V. RESULTADOS

---



## V.1 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA GENERACIÓN *IN VITRO* DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

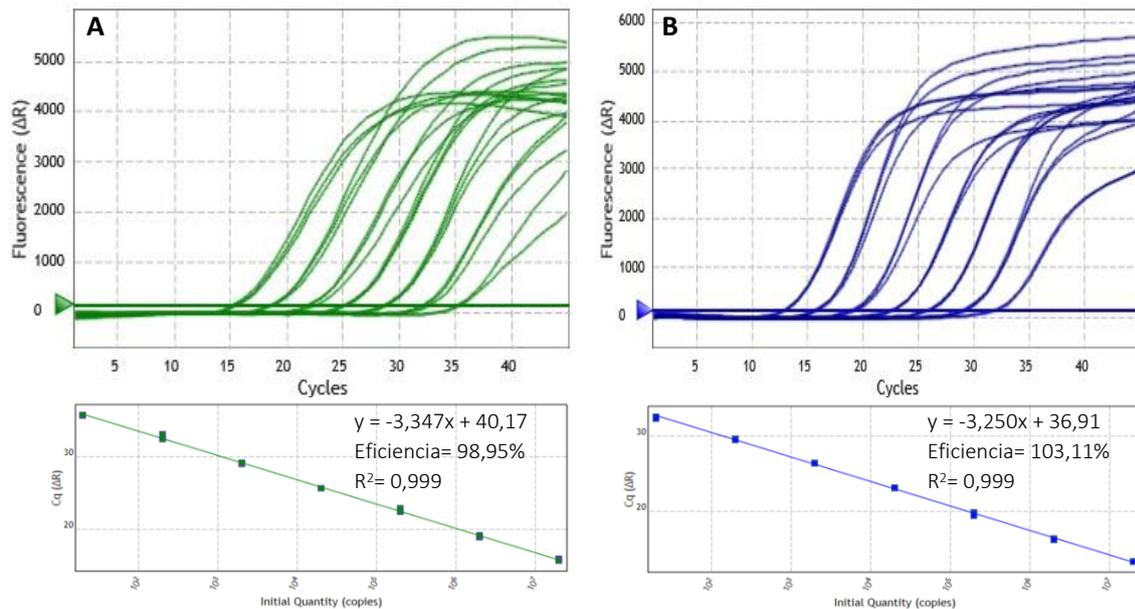
Los resultados expuestos en este apartado derivan del desarrollo y optimización de un sistema para la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de RNA. El tipo de sistema utilizado para la generación de partículas virales recombinantes fue el sistema lentiviral, derivado del VIH-1. Las características de este sistema y la justificación de elección quedan detalladas en el apartado III.1.

En este trabajo de desarrollo y optimización se generaron como modelo partículas virales que contenían el gen *EGFP* y partículas virales que contenían fragmentos del genoma del virus chikungunya.

En primer lugar, la generación *in vitro* de las partículas virales de *EGFP* tuvo lugar mediante la utilización del plásmido de transferencia A, el cual no requiere un paso previo de diseño y clonaje, debido a que la secuencia del gen *EGFP* se encuentra ya integrada en el esqueleto del vector. Este plásmido contiene todos los elementos necesarios para su uso en el sistema lentiviral y, además, permite la realización de pruebas adicionales de visualización por microscopía de fluorescencia, a las cuales finalmente no se llegó a recurrir en este proyecto.

En segundo lugar, la generación *in vitro* de las partículas virales de chikungunya tuvo lugar mediante la utilización del plásmido lentiviral de transferencia B. La elección del virus chikungunya como patógeno modelo, sobre el que desarrollar un control positivo basado en partículas virales recombinantes, atiende a los siguientes criterios: necesidad de elaborar un control positivo sintético, el cual imite al virus real pero no tenga capacidad infectiva; escasa disponibilidad, ya que su aislamiento por cultivo es lento y laborioso; y se trata de un virus cuya manipulación requiere de instalaciones de nivel de bioseguridad tipo 3 [241].

La generación de partículas virales recombinantes de RNA se evaluó por medio de la técnica de RT-qPCR, utilizando un conjunto de cebadores y sonda dirigidos a una región específica del genoma del virus chikungunya (gen *NSP1*) o del gen *EGFP*, en función de las partículas virales desarrolladas. El análisis por RT-qPCR se realizó generalmente de forma cualitativa y, en aquellos casos donde se recurrió a un análisis cuantitativo, se determinó la concentración de la muestra de interés por extrapolación de su valor de  $C_q$  sobre una recta estándar, realizada a partir de diluciones seriadas de concentración conocida del plásmido de transferencia A (**Figura 23A**) o del plásmido de transferencia B-CHI1 (**Figura 23B**), en función de si la diana a cuantificar contenía el gen *EGFP* o el gen *NSP1* del virus chikungunya, respectivamente.



**Figura 23.** A. Curvas de amplificación obtenidas por RT-qPCR correspondientes a siete diluciones seriadas 1/10 del plásmido de transferencia A en el rango de concentraciones  $2E+07$  copias/ $\mu$ l- $2E+01$  copias/ $\mu$ l. B. Curvas de amplificación obtenidas por RT-qPCR correspondientes a siete diluciones seriadas 1/10 del plásmido de transferencia B-CHI1 en el rango de concentraciones  $2E+07$  copias/ $\mu$ l- $2E+01$  copias/ $\mu$ l. En ambos casos se muestra la ecuación de la recta obtenida, así como los valores de eficiencia de la reacción y coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ).

### V.1.1 DISEÑO DEL INSERTO Y CLONACIÓN EN EL VECTOR LENTIVIRAL

La estrategia seguida para el desarrollo de un control positivo del virus chikungunya incluyó, en primer lugar, el diseño del genoma de la partícula viral. El genoma de la partícula viral se compone de una secuencia común a todos los diseños y una secuencia específica de patógeno, tal y como se describe en el apartado III.2. En el diseño de la secuencia específica, denominada inserto, se consideró la síntesis de un inserto de tamaño reducido para evitar que la eficiencia del proceso de transfección se viera comprometida, siguiendo las consideraciones detalladas en el apartado III.2.1. Debido a ello, la partícula viral de chikungunya desarrollada en este proyecto no contiene la secuencia de 12 kb que constituye el genoma del virus chikungunya salvaje, sino que contiene las regiones del genoma del virus chikungunya que son frecuentemente reportadas en la bibliografía como dianas para la detección de este patógeno por RT-qPCR. De esta forma, la partícula viral desarrollada, a pesar de no contener el genoma completo del virus salvaje, es compatible con un gran número de protocolos de RT-qPCR.

El virus chikungunya es un virus envuelto que pertenece al género *Alphavirus*, dentro de la familia *Togaviridae*. Su genoma es un RNA de cadena sencilla de sentido positivo y de tamaño aproximado 11,8 kb [242]. Este genoma se compone de dos marcos abiertos de lectura: ORF1, que codifica para las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4); y ORF2, que codifica para las proteínas estructurales (cápside (C), E3, E2, 6K y E1). Un esquema del genoma del virus chikungunya salvaje se muestra en la **Figura 24**.



**Figura 24.** Esquema del genoma del virus chikungunya salvaje. Se representan los 2 marcos abiertos de lectura: ORF1, que codifica para las proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) y ORF2, que codifica para las proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K, E1). Fuente: [242].

La cepa del virus chikungunya seleccionada como referencia (siguiendo los criterios detallados en el apartado III.2.2) y, por tanto, cuya secuencia de nucleótidos presenta un 100% de homología con el genoma de las partículas virales desarrolladas, fue la cepa Ross (número de acceso en GenBank: **AF490259.3**). Se trata de una cepa perteneciente al linaje del Este, Centro y Sur de África [243, 244], uno de los 9 linajes del virus chikungunya que a día de hoy han sido reportados [245]. Su uso como cepa de referencia ha sido descrito en la bibliografía [246-248] y fabricantes como la Colección Nacional de Virus Patogénicos (NCPV, del inglés *National Collection of Pathogenic Viruses*) la incluyen en su catálogo.

Se diseñaron dos versiones diferentes de control positivo del virus chikungunya. Estas difieren en el tamaño del inserto y, por tanto, en los fragmentos del genoma del virus chikungunya incluidos en la partícula viral, los cuales aparecen detallados en la **Tabla 15**. Ambos insertos (denominados CHI1 y CHI2) contienen las regiones del genoma del virus chikungunya cuyo uso está más extendido como dianas de los ensayos de RT-qPCR [248-252]. Sin embargo, el control positivo que contiene el inserto CHI2 presenta una mayor universalidad, ya que contiene un mayor número de fragmentos del genoma del virus chikungunya.

**Tabla 15.** Descripción de los fragmentos de los genes incluidos en los dos insertos (CHI1 y CHI2) diseñados para constituir el genoma de las partículas virales de chikungunya desarrolladas en este proyecto. Se especifica la localización de cada uno de los fragmentos indicando el nucleótido (nt) de inicio y fin de fragmento, respecto a la cepa del virus chikungunya considerada como referencia (número de acceso en GenBank: AF490259.3).

Inserto CHI1 (1.580 pb)		Inserto CHI2 (3.892 pb)	
Gen	Localización (nt)	Gen	Localización (nt)
NSP1	238...964	NSP1	87...964
NSP2	2575...2677	NSP2	1679...2393
			2575...2677
NSP4	6852...6983		3131...3639
			3852...3959
C	7715...7809	NSP4	6253...6405
E3	8349...8540		6852...6983
E1	10374...10510	E3	8346...8543
	11165...11358	E1	10293...11358

Los insertos CHI1 y CHI2 presentan una longitud total de **1.580 pb** y **3.892 pb**, respectivamente, lo que implica que las partículas virales desarrolladas en este proyecto presentan un genoma de longitud **5.355 pb** y **7.620 pb**; tamaño obtenido al sumar las regiones común y específica de patógeno, tal y como se detalla en el apartado III.2. El diseño de dos insertos de diferente tamaño permitió realizar un análisis preliminar para determinar si el tamaño del inserto (en el rango 5.355 pb-7.620 pb) o su secuencia condicionaba la eficiencia del proceso de transfección. La síntesis de los insertos CHI1 y CHI2 y su clonaje en el plásmido lentiviral B se solicitó al

proveedor externo GenScript. Los insertos CHI1 y CHI2 clonados en el plásmido de transferencia B dieron lugar a los plásmidos lentivirales de transferencia B-CHI1 y B-CHI2, respectivamente.

### V.1.2 SELECCIÓN DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS LENTIVIRALES

Los plásmidos lentivirales utilizados a lo largo de este proyecto fueron multiplicados a pequeña (miniprep) o gran escala (maxiprep) con el objetivo de disponer de la cantidad requerida durante el proceso de transfección. Para ello, en primer lugar, se transformaron bacterias *E. coli* DH5- $\alpha$  mediante choque térmico, tal y como se describe en el apartado III.3.2, y, posteriormente, se multiplicaron en medio LB-líquido las bacterias que habían incorporado el DNA plasmídico de interés. El DNA plasmídico fue extraído mediante diferentes kits comerciales de miniprep y maxiprep, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.3.3. Por último, se determinó su concentración, así como el ratio  $A_{260}/A_{280}$ , siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.7.1.

Se analizaron un total de seis kits comerciales diferentes, cuyas prestaciones se detallan en la **Tabla 3**, con el objetivo de seleccionar aquel que ofreciera una mayor ventaja a nivel de rendimiento (expresado en cantidad promedio de DNA plasmídico recuperada) y pureza (expresada en ratio  $A_{260}/A_{280}$ ).

Mediante la extracción a pequeña escala con el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit II se recuperó una cantidad promedio de DNA plasmídico de 76,5  $\mu\text{g}$  y se obtuvieron unos valores de  $A_{260}/A_{280}$  en el rango 1,91-1,95. Los resultados anteriores fueron más favorables que los resultados obtenidos en pruebas preliminares de extracción mediante los kits NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel) (cantidad promedio recuperada de 26,7  $\mu\text{g}$  y ratio  $A_{260}/A_{280} = 1,87$ -1,93) e Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini Two (Stratec) (cantidad promedio recuperada de 2,9  $\mu\text{g}$  y valor de  $A_{260}/A_{280} = 2,41$ ).

Por otra parte, en la extracción a gran escala con el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit se recuperó una cantidad promedio de DNA plasmídico de 641,6  $\mu\text{g}$  y unos valores de  $A_{260}/A_{280}$  en el rango 1,87-1,95. Estos resultados fueron superiores tanto en rendimiento como pureza frente a los resultados obtenidos en pruebas preliminares de extracción mediante los kits NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel) (cantidad promedio recuperada de 183,9  $\mu\text{g}$  y ratio  $A_{260}/A_{280} = 1,09$ -1,20) y GenElute<sup>™</sup> Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma) (cantidad promedio recuperada de 67,6  $\mu\text{g}$  y ratio  $A_{260}/A_{280} = 2,04$ -2,25).

El ensayo de miniprep de Stratec y los ensayos de maxiprep de Macherey-Nagel y Sigma no alcanzaron los valores de pureza recomendados para el DNA plasmídico extraído (ver apartado III.7.1), ya que los valores del ratio  $A_{260}/A_{280}$  se encontraron fuera del rango óptimo 1,8-2,0. Asimismo, cabe destacar que el ensayo de maxiprep de Macherey-Nagel precisa de un tratamiento posterior a la elución del plásmido ya que se requiere la utilización del producto NucleoBond<sup>®</sup> Finalizer, un paso añadido que complica el protocolo.

Los resultados expuestos anteriormente indican que aquellos kits comerciales orientados a la extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) y gran escala (maxiprep) que ofrecieron los mejores valores de rendimiento y pureza fueron E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit II y E.Z.N.A.<sup>®</sup> Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit, respectivamente, ambos del fabricante Omega. Por este motivo, ambos kits se utilizaron a lo largo del proyecto de investigación, recurriendo a la extracción a pequeña o gran escala en función del volumen inicial de cultivo disponible y la cantidad de plásmido requerida en el protocolo de transfección.

### V.1.3 ESTRATEGIAS PARA LA PURIFICACIÓN DE LOS SOBRENADANTES VIRALES

El objetivo de este proyecto de investigación es la generación de partículas virales recombinantes de RNA para su uso como control positivo de ensayos de RT-qPCR, debido a ello se precisa que el control positivo desarrollado se encuentre libre de DNA. La necesidad de eliminar el DNA presente en el sobrenadante viral se debe a la detección conjunta de DNA y RNA que ocurre en la reacción de RT-qPCR. Por tanto, la presencia de DNA puede conducir a una interpretación errónea de la cantidad de RNA presente en la muestra e impide monitorizar con precisión el paso de retrotranscripción. Por este motivo, los experimentos desarrollados en este apartado se centran en profundidad en la eliminación del DNA presente en el sobrenadante viral. A continuación, se exponen las diferentes estrategias abordadas para la consecución de este objetivo.

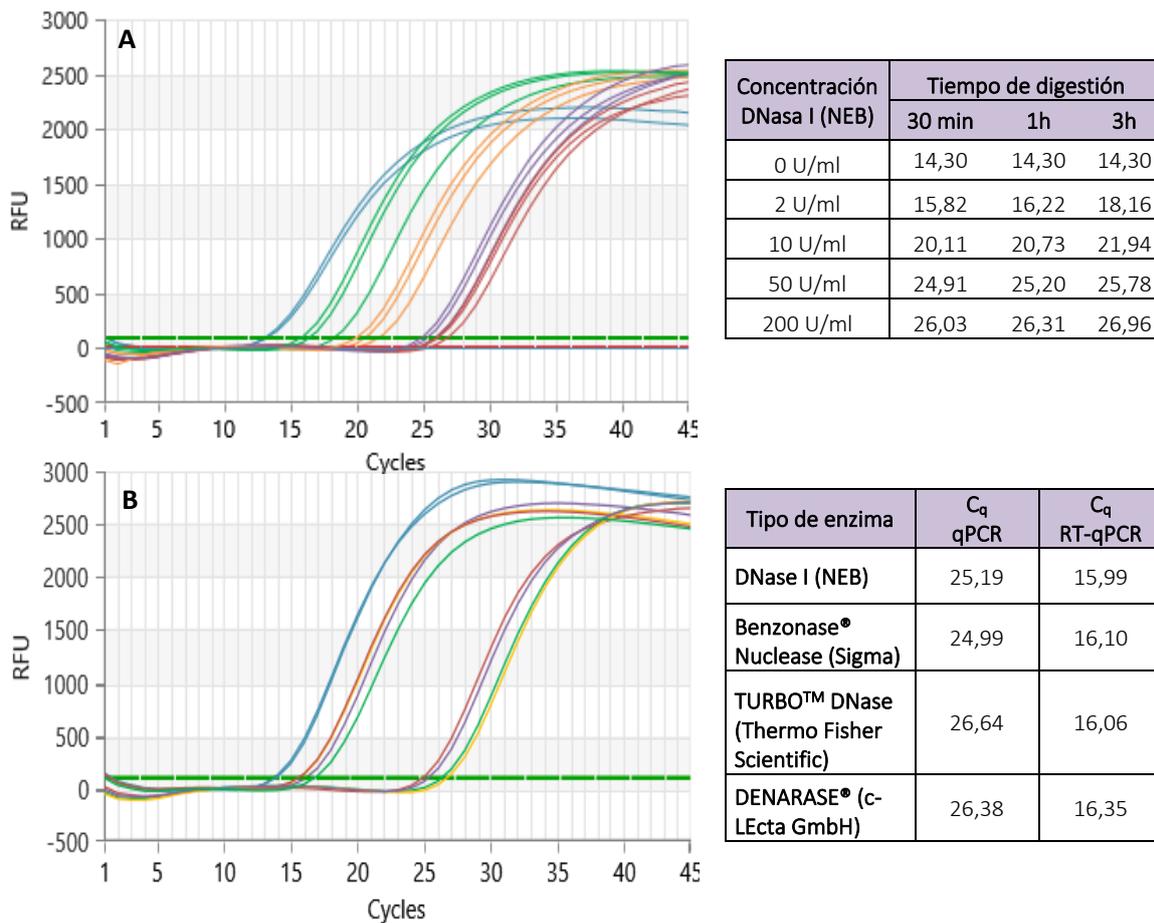
#### V.1.3.1 TRATAMIENTO CON NUCLEASAS DEL SOBRENADANTE VIRAL

El tratamiento con nucleasas es el método de elección por numerosos autores para la eliminación del DNA plasmídico presente en el sobrenadante viral, aunque la gran mayoría reportan la existencia de DNA remanente tras el tratamiento [130, 192, 193, 218, 219]. En este proyecto se comenzó trabajando con la desoxirribonucleasa I de NEB, cuya digestión se optimizó en términos de concentración de enzima y tiempo de digestión, los cuales se detallan en el apartado III.5.1.1. Posteriormente, se estableció una comparativa con distintas nucleasas comerciales, tal y como se detalla en el apartado III.5.1.1, con el objetivo de evaluar su eficiencia en la eliminación del DNA plasmídico, el cual fue incorporado durante la transfección y continúa presente en el sobrenadante viral.

La señal de DNA obtenida tras analizar por qPCR un sobrenadante viral no digerido y un sobrenadante viral digerido con DNasa (NEB), a diferentes concentraciones de enzima y tiempos de digestión, se muestra en la **Figura 25A**. Se observa una diferencia muy notable en el desplazamiento de  $C_q$  de la señal de DNA entre las concentraciones de enzima de 2 U/ml, 10 U/ml y 50 U/ml, observándose que conforme incrementa la concentración de enzima, mayor es el desplazamiento de  $C_q$ . Sin embargo, el incremento de concentración de 50 U/ml a 200 U/ml apenas conduce a un ligero desplazamiento de la señal de DNA. Por otra parte, se observa que cuanto mayor es el tiempo de digestión, más eficaz es la digestión con DNasa. Esta observación es más notable cuando la digestión tiene lugar a bajas concentraciones de enzima (2 U/ml y 10 U/ml), ya que conforme se incrementa la concentración de enzima, disminuye la dependencia de la eficiencia de la reacción con el tiempo de digestión. Para determinar la condición óptima de digestión se valoró un compromiso entre la cantidad de enzima utilizada y el desplazamiento de  $C_q$  ocasionado en la señal de DNA tras el tratamiento con DNasa (NEB). La condición óptima de digestión con DNasa (NEB) se estableció a 37°C a concentración de 50 U/ml durante 3h. En esta condición se observó un desplazamiento en la señal de DNA de 11,48  $C_{qs}$  respecto a la señal de DNA del sobrenadante viral sin digerir ( $C_q$  antes del tratamiento = 14,30 y  $C_q$  después del tratamiento = 25,78; ver tabla asociada a la **Figura 25A**).

A pesar de observar una reducción significativa de la cantidad de DNA tras la digestión con DNasa, esta no llega a anularse. Debido a ello, se analizaron otras nucleasas comerciales y se comparó su rendimiento respecto a la DNasa (NEB) en las condiciones detalladas en el apartado III.5.1.1. Las curvas de amplificación obtenidas tras el análisis por qPCR y RT-qPCR, de un sobrenadante viral que fue digerido con las distintas nucleasas comerciales y posteriormente

extraído, se muestran en la **Figura 25B**. Se observa, por una parte, una eficiencia en la eliminación del DNA plasmídico equivalente en todas las condiciones, siendo ligeramente superior en la digestión con las nucleasas DENARASE® y TURBO™ DNase. En este caso las curvas de amplificación se observan más desplazadas a la derecha de la gráfica, lo que se traduce en un valor de  $C_q$  ligeramente inferior al resto de condiciones. Por otra parte, se observa una cantidad de RNA viral equivalente en todas las condiciones analizadas, como se demuestra con la similitud entre los valores de  $C_q$  obtenidos por RT-qPCR. Estos resultados a su vez confirman la integridad de las partículas virales desarrolladas, puesto que las nucleasas Benzonase®Nuclease y DENARASE® tienen capacidad para degradar indistintamente DNA o RNA y, sin embargo, el hecho de no observar degradación del RNA viral indica que este se encuentra inaccesible en el interior de una cápside viral íntegra.



**Figura 25. A.** Curvas de amplificación obtenidas mediante análisis por qPCR para detectar el gen EGFP en un sobrenadante viral, recogido a las 48h desde la transfección, sin digerir (azul) y digerido con DNasa (NEB) durante 30 min, 1h y 3h a las concentraciones de 2 U/ml (verde), 10 U/ml (naranja), 50 U/ml (morado) y 200 U/ml (rojo). **B.** Curvas de amplificación obtenidas mediante análisis por qPCR y RT-qPCR para detectar el gen EGFP en un sobrenadante viral, recogido a las 48h desde la transfección, sometido a digestión con diferentes tipos de enzima a concentración 50 U/ml a 37°C durante 3h y posterior extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 200 \mu\text{l}$ ). Se representa el sobrenadante viral sin digerir (azul) y digerido con benzonasa (rojo), DNasa (NEB) (morado), DENARASE® (verde) y DNasa TURBO™ (amarillo). En las tablas anexas a las figuras se muestra el valor de  $C_q$  correspondiente a cada una de las curvas de amplificación. Resultados obtenidos en termociclador V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform.

Debido a que todas las nucleasas comerciales analizadas presentaron rendimientos similares, se optó por continuar los experimentos con la DNasa de NEB frente a las nucleasas Benzonase®Nuclease y DENARASE®, ya que a nivel productivo resulta preferible la utilización de

una enzima libre de RNasas para evitar posibles problemas de contaminación y degradación del RNA viral. A su vez, la DNasa de NEB destacó frente a la DNasa TURBO™ ya que es más rentable económicamente y, además, se demostró su inactivación completa a 75°C 10 min, frente a la inactivación de la DNasa TURBO™, en la cual se especifica como requerimiento de inactivación la adición de EDTA, el cual no solo inhibe la qPCR, sino que también puede afectar a la estabilidad de las partículas virales.

Los resultados obtenidos en el tratamiento con nucleasas del sobrenadante viral, ante diferentes tipos de enzima, concentración de enzima y tiempo de digestión, sugieren que estos parámetros no parecen ser el factor limitante en la eliminación completa del DNA plasmídico. Todas las condiciones de digestión analizadas condujeron a una disminución significativa de la cantidad de DNA plasmídico inicial, sin embargo, ninguna de ellas condujo a la eliminación total de dicho DNA. Los experimentos descritos anteriormente ponen de manifiesto la necesidad de seguir profundizando en las posibles causas de una digestión incompleta del DNA plasmídico presente en el sobrenadante viral. Por este motivo, se ampliaron los experimentos realizados con el fin de analizar las siguientes hipótesis:

- 1) La digestión con DNasa se ve condicionada por el medio en el que se encuentra contenido el DNA plasmídico.
- 2) La digestión con DNasa se ve condicionada por la presencia de partículas virales en el medio en el que se encuentra contenido el DNA plasmídico.

Para dar respuesta a las cuestiones anteriores se evaluaron diferentes tratamientos de digestión en distintos tipos de muestra. Los tratamientos evaluados, los cuales se describen en detalle en el apartado III.5.1.2, son brevemente resumidos a continuación:

**Tratamiento 1- DNasa:** Las muestras sometidas al tratamiento 1 se digirieron con DNasa y, tras aplicar este tratamiento, fueron analizadas por qPCR. El valor de  $C_q$  obtenido antes y después del tratamiento permitió realizar un seguimiento de la señal de DNA.

**Tratamiento 2- DNasa + Extracción:** Las muestras sometidas al tratamiento 2 se digirieron con DNasa y, a continuación, se realizó una extracción de ácidos nucleicos. Tras aplicar este tratamiento, los ácidos nucleicos fueron analizados por qPCR y RT-qPCR, realizando así un seguimiento de las señales de DNA y DNA + RNA, respectivamente.

**Tratamiento 3- Extracción + DNasa:** Las muestras sometidas al tratamiento 3 se sometieron a una extracción de ácidos nucleicos y, a continuación, se digirieron con DNasa. Tras aplicar este tratamiento, los ácidos nucleicos fueron analizados por qPCR y RT-qPCR, realizando así un seguimiento de las señales de DNA y DNA + RNA, respectivamente.

Los tratamientos descritos anteriormente fueron aplicados sobre diferentes tipos de muestras, con el objetivo de obtener unos resultados representativos de la eficiencia de la digestión con DNasa en diferentes escenarios. Las muestras incluidas en el análisis se describen a continuación:

-El plásmido de transferencia B-CHI1 en solución acuosa.

-Sobrenadantes celulares procedentes de 5 experimentos diferentes que contienen el plásmido de transferencia B-CHI1 y estuvieron en contacto con células 293T durante 48h. Este tipo de sobrenadante no contiene partículas virales puesto que no se transfectaron las células 293T.

-Sobrenadantes celulares procedentes de 4 experimentos diferentes que contienen el plásmido de transferencia B-CHI1 y estuvieron en contacto con células 293T durante 72h. Este tipo de sobrenadante no contiene partículas virales puesto que no se transfectaron las células 293T.

-Sobrenadantes virales procedentes de 5 experimentos de transfección diferentes que fueron recogidos a las 48h desde que tuvo lugar la transfección y contienen partículas virales de chikungunya. En los 5 experimentos de transfección se generaron partículas virales sin proteína de envuelta y, además, en 3 de ellos, se generaron partículas virales con proteína de envuelta, con el objetivo de analizar si los resultados observados eran equivalentes.

-Sobrenadantes virales procedentes de 4 experimentos de transfección diferentes que fueron recogidos a las 72h desde que tuvo lugar la transfección y contienen partículas virales de chikungunya. En los 4 experimentos de transfección se generaron partículas virales sin proteína de envuelta y, además, en 2 de ellos, se generaron partículas virales con proteína de envuelta, con el objetivo de analizar si los resultados observados son equivalentes.

Los resultados obtenidos tras aplicar los tratamientos 1, 2 y 3 en los diferentes tipos de muestras se recogen en la **Tabla 16**. Los diferentes cálculos realizados se contemplan en detalle en el apartado III.5.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se realizan las siguientes observaciones:

**1)** La digestión con DNasa (tratamiento 1) del plásmido B-CHI1 en solución acuosa conduce a la eliminación de casi la totalidad del DNA plasmídico. Se observa una disminución de la señal de DNA de  $6,06 \log_{10}$ . Sin embargo, la eliminación del DNA, a pesar de haber sido muy eficaz, no ha sido completa puesto que se observan trazas del mismo en un  $C_{q(1)-RT} = 32,41$ .

**2)** Los resultados obtenidos tras la digestión con DNasa de los sobrenadantes celulares que contienen el plásmido B-CHI1, en los cuales no hubo formación de partículas virales, muestran un valor de reducción del DNA superior en los sobrenadantes de 48h ( $2,95 \log_{10}$ ) frente a los sobrenadantes de 72h ( $2,35 \log_{10}$ ), siendo el  $C_q$  medio previo al tratamiento con DNasa de  $C_{q(0)-RT} = 18,15$  y  $C_{q(0)-RT} = 23,25$ , respectivamente. El ligero incremento en la eficiencia de la digestión con DNasa observado en los sobrenadantes de 48h, respecto a los sobrenadantes de 72h, podría ser explicado por la diferencia en el  $C_q$  de partida, ya que en el sobrenadante celular de 48h podría haber una mayor cantidad de DNA libre, pero la misma cantidad de DNA inaccesible para la DNasa. En ambos sobrenadantes celulares se observa una digestión con DNasa del plásmido B-CHI1 menos eficiente que la digestión con DNasa de ese mismo plásmido en solución acuosa. Por tanto, la digestión con DNasa podría estar condicionada por el medio en el que se encuentra contenido el DNA plasmídico.

Por otra parte, se demuestra que los sobrenadantes celulares son un buen control del proceso de digestión con DNasa en un medio libre de partículas virales, ya que se confirma la ausencia de estas con el valor de  $\Delta C_q$  próximo a 0 obtenido en los tratamientos 2 y 3. Este resultado implica que no hay contribución de RNA en la señal DNA + RNA obtenida por RT-qPCR y, por tanto, no hay partículas virales en estos medios. Sin embargo, como era esperable, queda demostrada la presencia de partículas virales en los sobrenadantes virales recogidos a las 48h y 72h, ya que se observa tras el tratamiento 2 una diferencia entre la señal de DNA + RNA y la señal de DNA de  $\Delta C_{q(2)} = 9,61$  y  $\Delta C_{q(2)} = 6,43$ , respectivamente, y tras el tratamiento 3 de  $\Delta C_{q(3)} = 18,15$  y  $\Delta C_{q(3)} = 17,90$ , respectivamente.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos por qPCR y RT-qPCR tras aplicar los tratamientos 1, 2 y 3 sobre diferentes tipos de muestra. Condiciones específicas de ensayo: extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( $V_0 = 140 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Los resultados negativos se muestran en la tabla como  $C_q = 40$ , para realizar los diferentes cálculos. Abreviaturas: Sin trat.: sin tratamiento; Exp: experimento; Env: proteína de envuelta.

	Sin trat.	Tratamiento 1 DNasa		Tratamiento 2 DNasa + Extracción				Tratamiento 3 Extracción + DNasa			
	$C_{q(0)}$ -RT	$C_{q(1)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ +RT	$\Delta C_{q(2)}$	$C_{q(3)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(3)}$ +RT	$\Delta C_{q(3)}$
<b>Plásmido B-CHI1 en solución acuosa</b>											
	12,72	32,41	<b>6,06</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Sobrenadante celular de 48h que contiene el plásmido B-CHI1</b>											
Exp 1	19,20	29,48	<b>3,16</b>	27,90	<b>2,68</b>	27,89	0,01	40,00	<b>6,40</b>	40,00	0,00
Exp 2	18,07	28,40	<b>3,18</b>	27,28	<b>2,84</b>	27,44	-0,16	40,00	<b>6,75</b>	39,05	0,95
Exp 3	19,40	28,53	<b>2,81</b>	27,67	<b>2,55</b>	27,57	0,11	40,00	<b>6,34</b>	39,67	0,33
Exp 4	16,96	26,25	<b>2,86</b>	25,39	<b>2,59</b>	25,77	-0,38	40,00	<b>7,09</b>	40,00	0,00
Exp 5	17,15	26,11	<b>2,76</b>	23,99	<b>2,10</b>	24,14	-0,15	38,29	<b>6,50</b>	36,79	1,50
	18,15	27,75	<b>2,95</b>	26,45	<b>2,55</b>	26,56	-0,11	39,66	<b>6,62</b>	39,10	0,56
<b>Sobrenadante celular de 72h que contiene el plásmido B-CHI1</b>											
Exp 2	23,02	31,44	<b>2,59</b>	30,75	<b>2,38</b>	30,94	-0,19	40,00	<b>5,22</b>	40,00	0,00
Exp 3	25,16	31,46	<b>1,94</b>	31,47	<b>1,94</b>	31,16	0,32	40,00	<b>4,57</b>	40,00	0,00
Exp 4	22,47	29,36	<b>2,12</b>	29,43	<b>2,14</b>	29,78	-0,34	39,92	<b>5,37</b>	40,00	-0,09
Exp 5	22,35	31,30	<b>2,75</b>	28,99	<b>2,04</b>	29,04	-0,05	40,00	<b>5,43</b>	39,04	0,96
	23,25	30,89	<b>2,35</b>	30,16	<b>2,13</b>	30,23	-0,07	39,98	<b>5,15</b>	39,76	0,22
<b>Sobrenadante viral de 48h que contiene partículas virales de chikungunya</b>											
Exp 1	16,81	25,47	<b>2,66</b>	24,66	<b>2,42</b>	13,83	10,83	40,00	<b>7,14</b>	21,11	18,89
Exp 1 (Env)	16,28	25,85	<b>2,94</b>	22,34	<b>1,87</b>	14,48	7,86	37,62	<b>6,57</b>	16,05	21,57
Exp 2	16,44	25,64	<b>2,83</b>	24,82	<b>2,58</b>	14,39	10,43	38,44	<b>6,77</b>	17,46	20,98
Exp 2 (Env)	15,79	25,78	<b>3,08</b>	23,25	<b>2,30</b>	14,96	8,29	31,92	<b>4,97</b>	17,61	14,31
Exp 3	17,76	26,20	<b>2,60</b>	25,34	<b>2,33</b>	14,87	10,47	35,95	<b>5,60</b>	16,90	19,06
Exp 3 (Env)	17,31	26,77	<b>2,91</b>	24,10	<b>2,09</b>	15,21	8,89	36,86	<b>6,02</b>	17,22	19,64
Exp 4	16,84	25,35	<b>2,62</b>	24,55	<b>2,37</b>	14,18	10,37	28,85	<b>3,70</b>	16,24	12,61
Exp 5	17,55	25,20	<b>2,35</b>	23,79	<b>1,92</b>	14,04	9,75	32,84	<b>4,70</b>	14,69	18,15
	16,84	25,78	<b>2,75</b>	24,11	<b>2,23</b>	14,50	9,61	35,31	<b>5,68</b>	17,16	18,15
<b>Sobrenadante viral de 72h que contiene partículas virales de chikungunya</b>											
Exp 2	15,77	26,26	<b>3,23</b>	23,03	<b>2,23</b>	16,42	6,61	38,46	<b>6,98</b>	18,65	19,81
Exp 2 (Env)	14,35	24,90	<b>3,25</b>	21,15	<b>2,09</b>	16,83	4,33	35,23	<b>6,43</b>	19,11	16,12
Exp 3	16,37	25,69	<b>2,87</b>	23,35	<b>2,15</b>	16,49	6,86	35,91	<b>6,01</b>	18,21	17,70
Exp 3 (Env)	15,90	25,56	<b>2,97</b>	22,39	<b>2,00</b>	16,82	5,57	40,27	<b>7,50</b>	18,87	21,41
Exp 4	16,02	24,72	<b>2,68</b>	22,97	<b>2,14</b>	15,47	7,51	31,61	<b>4,80</b>	17,16	14,45
Exp 5	16,10	25,65	<b>2,94</b>	23,24	<b>2,20</b>	15,54	7,70	34,24	<b>5,58</b>	16,34	17,90
	15,75	25,46	<b>2,99</b>	22,69	<b>2,13</b>	16,26	6,43	35,95	<b>6,22</b>	18,05	17,90

**3)** La digestión con DNasa es muy similar, aunque ligeramente más eficiente, en los sobrenadantes virales que contienen partículas virales de chikungunya y fueron recogidos a las 72h desde la transfección, respecto a los sobrenadantes virales que fueron recogidos a las 48h. Los sobrenadantes virales de 48h muestran una reducción de DNA de  $2,75 \log_{10}$ , mientras que los sobrenadantes virales de 72h muestran una reducción de DNA de  $2,99 \log_{10}$ . El valor de  $C_q$  medio previo al tratamiento con DNasa es de  $C_{q(0)}-RT = 16,84$  y  $C_{q(0)}-RT = 15,75$ , respectivamente. Esta ligera diferencia en la eficiencia en la digestión con DNasa podría estar asociada al valor del  $C_q$  de partida, como se ha comentado en el punto 2, o también podría estar asociada al hecho de que los sobrenadantes virales de 72h presentaron un título viral ligeramente inferior ( $2,42E+06$  copias/ $\mu$ l) respecto a los sobrenadantes virales de 48h ( $8,28E+06$  copias/ $\mu$ l). Los valores de concentración de RNA mencionados anteriormente, los cuales no se recogen en la **Tabla 16**, fueron calculados a partir de los valores mostrados de  $C_{q(2)}-RT$  y  $C_{q(2)}+RT$ , tal y como se describe en el apartado III.5.

**4)** Tras aplicar el tratamiento 2 sobre los diferentes tipos de muestra, se observan unos valores de reducción del DNA inferiores a los valores observados tras aplicar el tratamiento 1. En la **Tabla 16** se muestran los valores de  $C_q$  rectificados teniendo en cuenta el factor de concentración de 0,5 que sufre la muestra durante la digestión con DNasa y el factor de concentración de 2,8 que sufre la muestra durante la extracción de ácidos nucleicos (equivalente a un desplazamiento de 1  $C_q$  y 1,49  $C_{qs}$ , respectivamente, aplicando la ecuación 2). Debido a que se muestran los valores corregidos, los valores de  $C_{q(1)}-RT$  y  $C_{q(2)}-RT$  deberían ser coincidentes, sin embargo, el valor de  $C_{q(2)}-RT$  observado es inferior, lo que indica que una fracción del DNA presente en el sobrenadante viral se encuentra “oculta” y únicamente se visualiza por qPCR si ha tenido lugar previamente una extracción de ácidos nucleicos.

Esta observación podría ser justificada por la presencia de DNA en el interior de la partícula viral, pero no es exclusiva de los sobrenadantes que contienen partículas virales, sino que también se observa en sobrenadantes celulares, aunque en estos últimos en menor medida. Podría también este DNA plasmídico estar contenido en exosomas, estructuras similares a los lentivirus, los cuales comparten la misma ruta de síntesis en el interior celular y son continuamente liberados por las células.

**5)** Tras aplicar el tratamiento 3 sobre los diferentes tipos de muestra, la señal de DNA ( $C_{q(3)}-RT$ ) llega a negativizarse casi por completo, ya que se observan valores de  $C_q$  muy elevados. En sobrenadantes celulares de 48h y 72h la reducción de DNA es de  $6,62 \log_{10}$  y  $5,15 \log_{10}$ , respectivamente. En sobrenadantes virales de 48h y 72h la reducción de DNA es de  $5,68 \log_{10}$  y  $6,22 \log_{10}$ , respectivamente. Estos valores difieren de los valores obtenidos tras aplicar el tratamiento 2, donde se observa una digestión con DNasa notablemente menos eficiente, lo que sugiere que una fracción del DNA presente en el sobrenadante viral no se encuentra accesible para la DNasa y, únicamente cuando se realiza una extracción de ácidos nucleicos, queda disponible para su digestión. En este caso, se asumiría que el DNA no accesible para la DNasa, sí que está siendo accesible para la *Taq* DNA polimerasa, ya que se está visualizando por qPCR.

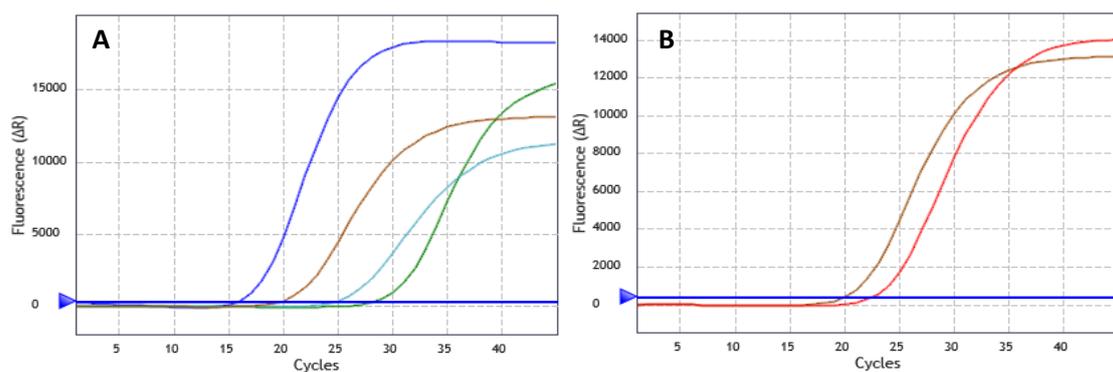
La aplicación del tratamiento 3 en el producto final no es viable ya que el control positivo desarrollado debe consistir en una partícula viral íntegra (no extraída), pero este tratamiento, debido a su elevada eficacia en la eliminación del DNA, fue aplicado en la cuantificación del RNA viral por fluorescencia (apartado III.7.2) y en la cuantificación del RNA viral por PCR digital.

### V.1.3.1.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DIGESTIÓN CON DNASA

Durante los experimentos de tratamiento con nucleasas (apartado V.1.3.1) se describe una digestión con DNasa menos eficiente sobre un DNA plasmídico contenido en un sobrenadante celular, donde no hubo formación de partículas virales, frente a este mismo plásmido en solución acuosa. Se encuentra descrito en la bibliografía que son varios factores (pH, fuerza iónica del medio, concentración de DNA y concentración de iones divalentes) los que condicionan la actividad de la DNasa, estando todos ellos interconectados [221].

En primer lugar, con el objetivo de analizar si la eficiencia en la digestión con DNasa disminuía conforme aumentaba el tiempo de contacto del medio con las células 293T, se diluyó el plásmido B-CHI1 en 3 medios diferentes: una solución acuosa, un sobrenadante celular donde no hubo formación de partículas virales y que estuvo en contacto con células 293T durante 72h y un sobrenadante celular donde no hubo formación de partículas virales y que estuvo en contacto con células 293T durante 7 días. El plásmido contenido en estos 3 medios fue digerido con DNasa (NEB) a concentración 10 U/ml a 37°C durante 3h y posteriormente fue analizado por qPCR.

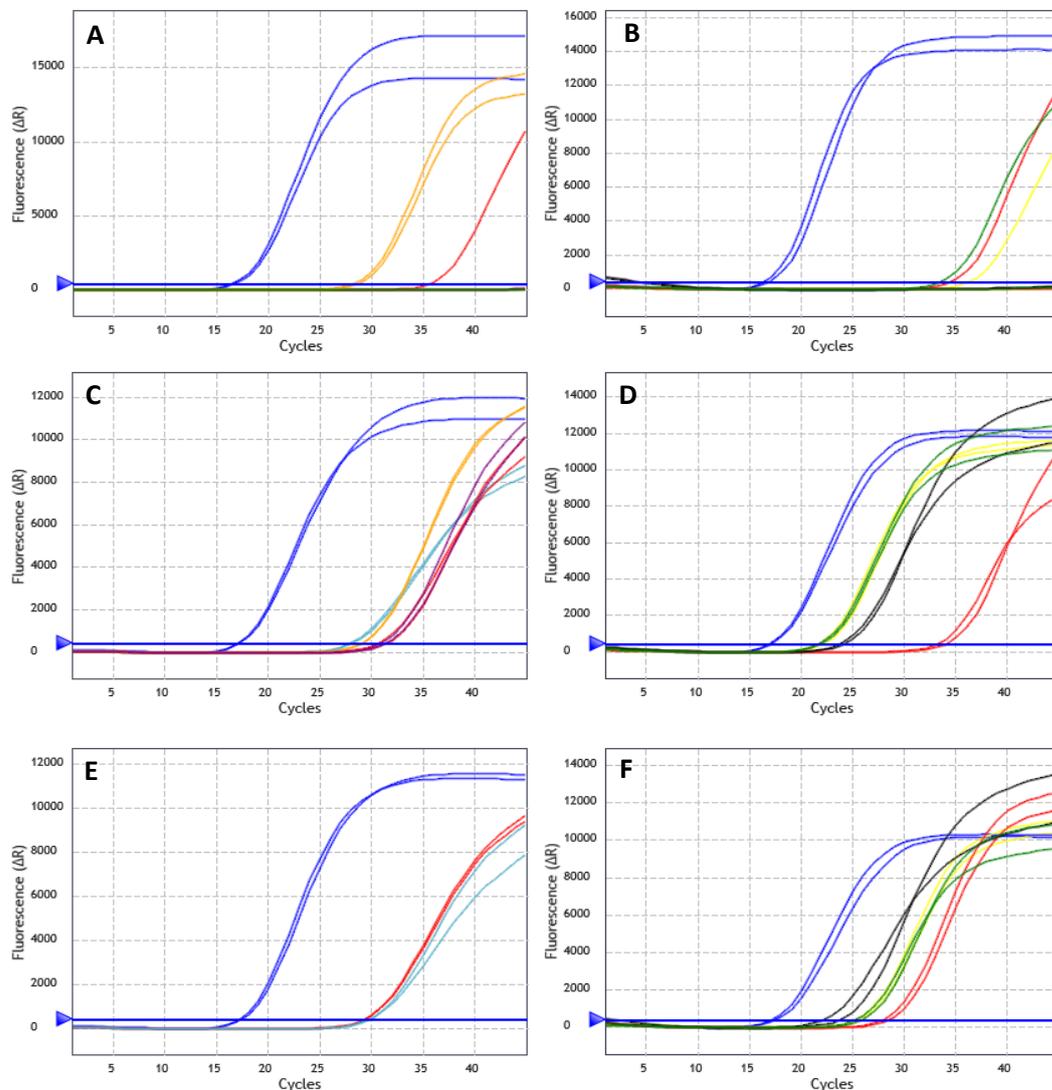
Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 26A**, donde se observa que la digestión con DNasa es notablemente más desfavorable en el sobrenadante celular de 7 días, seguido del sobrenadante de 72h, en comparación con la digestión del plásmido en solución acuosa. Los resultados anteriores podrían ser explicados por la presencia en el sobrenadante viral de restos celulares, por lo que se evaluó si la incorporación de un paso previo, a la digestión con DNasa, consistente en centrifugar a 500 g y filtrar por 0,45  $\mu\text{m}$  el sobrenadante celular de 7 días, contribuía a una mejoría en la digestión con DNasa. Los resultados obtenidos en el análisis por qPCR se muestran en la **Figura 26B**, donde se observa una digestión con DNasa más eficiente cuando se implementan los pasos de centrifugación y filtración previos al tratamiento con DNasa. Todo ello sugiere la presencia de algún compuesto derivado del cultivo con células 293T que afecta negativamente a la reacción de digestión con DNasa, aunque este no sería el único factor condicionante de la actividad DNasa.



**Figura 26.A.** Curvas de amplificación obtenidas mediante análisis por qPCR de tres muestras tratadas con DNasa: plásmido B-CHI1 diluido en solución acuosa (verde); este mismo plásmido diluido en un sobrenadante celular de 72h (azul claro) y este plásmido diluido en un sobrenadante celular de 7 días (marrón). El control del experimento fue el plásmido B-CHI1 diluido en solución acuosa y no tratado con DNasa (azul oscuro). **B.** Curvas de amplificación obtenidas mediante análisis por qPCR de dos muestras tratadas con DNasa: plásmido B-CHI1 diluido en un sobrenadante celular de 7 días (marrón) y esta misma muestra centrifugada a 500 g y filtrada por 0,45  $\mu\text{m}$  (rojo). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

Se continuaron los experimentos con el objetivo de averiguar cómo el medio condicionaba la actividad de la DNasa, considerando la dependencia que presenta esta enzima por los iones divalentes. Se postuló que la eficiencia de la digestión con DNasa podría estar condicionada por la disponibilidad de estos iones, los cuales se encontrarían inaccesibles para la DNasa si el medio en el que se encuentra el DNA que interesa digerir contuviese un agente quelante. Por otra parte, se encuentra descrito en la bibliografía que el tipo de corte de la DNasa varía en función del ion utilizado, por lo que se analizó la digestión con DNasa de un DNA plasmídico diluido en diferentes medios y en presencia de diferentes iones divalentes, tal y como se detalla en el apartado III.5.1.3.

La eficiencia de la digestión con DNasa del plásmido B-CHI1, contenido en diferentes medios, ante la presencia de diferentes iones divalentes se evaluó por qPCR en términos de desplazamiento de  $C_q$ . Las curvas de amplificación derivadas de estos ensayos se muestran en la **Figura 27**.



**Figura 27.** Curvas de amplificación obtenidas mediante análisis por qPCR en diferentes muestras tratadas con DNasa en ausencia de iones divalentes (naranja), en presencia del tampón NEB 1X (rojo), NEB 2X (morado), NEB 4X (azul claro), Mn 1X (negro), Mn 0,1X (verde) o Mn-Ca 1X (amarillo). Como control se incluyó la muestra correspondiente sin digerir con DNasa (azul oscuro). Las muestras digeridas fueron el plásmido B-CHI1 contenido en solución acuosa (**A y B**), este mismo plásmido en medio DMEM (**C y D**) y este plásmido en un sobrenadante celular de 48h (**E y F**). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

Por una parte, se observa la digestión completa del plásmido B-CHI1 en solución acuosa al incrementar la concentración de iones  $Mg^{+2}$  y en presencia de iones  $Mn^{+2}$  a concentración 10 mM, ya que se negativiza la señal de qPCR en presencia de las soluciones NEB 2X, NEB 4X y Mn 1X (**Figura 27A** y **Figura 27B**). Por otra parte, se observa un desplazamiento de la señal de DNA tras digerir con DNasa el plásmido B-CHI1 en solución acuosa en ausencia de iones divalentes (**Figura 27A**), lo que indica que la DNasa puede ejercer parte de su actividad en ausencia de estos iones. Este desplazamiento de la señal de DNA tras la digestión con DNasa en ausencia de iones divalentes aún es más notable en la digestión del plásmido B-CHI1 contenido en medio DMEM (**Figura 27C**); posiblemente se deba a que el medio DMEM presenta en su composición  $MgSO_4$  (a concentración 0,098 g/L) y, por tanto, hay iones  $Mg^{+2}$  disponibles para la actuación de la DNasa.

El plásmido B-CHI1 contenido en medio DMEM exhibe el comportamiento inverso a las observaciones realizadas en la digestión con DNasa de este mismo plásmido en solución acuosa, ya que, el aumento de la concentración de iones  $Mg^{+2}$ , resulta contraproducente para la eliminación del DNA plasmídico (**Figura 27C**). Es probable que esto se deba a que el medio DMEM ya contiene iones  $Mg^{+2}$  en su composición y, por tanto, la concentración total de iones  $Mg^{+2}$  se ve incrementada, la cual, por encima de un determinado límite, puede ejercer un efecto inhibitorio [222]. A su vez, la presencia de iones  $Mn^{+2}$  a las concentraciones analizadas resulta muy desfavorable en la digestión con DNasa del plásmido B-CHI1 contenido en medio DMEM (**Figura 27D**). Esto podría ser consecuencia de la interacción entre los iones  $Mn^{+2}$  y algún componente del medio DMEM, ya que no se repite esta observación en la digestión con DNasa del plásmido B-CHI1 en solución acuosa.

Por último, los resultados obtenidos tras la digestión con DNasa del plásmido B-CHI1 contenido en un sobrenadante celular de 48h, difieren de los resultados reportados tras la digestión de este plásmido en solución acuosa y medio DMEM. Las condiciones de digestión con DNasa en ausencia de iones divalentes y con el tampón NEB 2X no fueron ensayadas en esta muestra, pero sí en experimentos previos donde se demostró una digestión similar sin tampón de digestión (ausencia de iones divalentes) y con tampón NEB 1X, lo que podría ser explicado, como se ha comentado anteriormente, por la presencia de medio DMEM en el sobrenadante celular. Por otra parte, en el sobrenadante celular de 48h, la concentración de iones  $Mg^{+2}$  no parece ser un factor limitante en la digestión con DNasa puesto que las condiciones NEB 1X y NEB 4X muestran resultados idénticos (**Figura 27E**). También se observa que la presencia de iones  $Mn^{+2}$  no conduce a una mejoría en la reacción de digestión del plásmido B-CHI1 contenido en un sobrenadante celular de 48h. De hecho, cuanto menor es la concentración de iones  $Mn^{+2}$ , más se aproximan los resultados a la condición estándar NEB 1X (**Figura 27F**).

Los resultados expuestos anteriormente revelan un comportamiento diferencial en la digestión con DNasa, en función del medio en el que se encuentre contenido el DNA plasmídico que interesa digerir y en función del tipo de ion divalente disponible para la DNasa. Debido a ello, queda patente la necesidad de optimizar el tampón utilizado en la digestión con DNasa en el mismo medio o un medio análogo sobre el cual se va a aplicar posteriormente el protocolo de digestión optimizado, ya que el efecto que provoca cada ion sobre la actividad de la enzima es dependiente de la composición del medio en el que se encuentra el DNA a digerir. Por tanto, en este experimento se consideran los resultados obtenidos en la digestión con DNasa del plásmido B-CHI1 contenido en un sobrenadante celular de 48h, ya que este medio es análogo al sobrenadante viral que contiene partículas virales, cuya purificación mediante tratamiento con nucleasas constituye uno de los objetivos de este proyecto. Los experimentos realizados

sugieren que las condiciones de digestión con DNasa del plásmido B-CHI1, contenido en un sobrenadante celular de 48h, en presencia del tampón NEB 1X (proporcionado por el fabricante) son óptimas. Por este motivo, se descarta la utilización de los tampones alternativos analizados en este estudio, ya que el mayor desplazamiento de la señal de DNA tras la digestión con DNasa se observa en la condición NEB 1X (**Figura 27F**).

### **V.1.3.2 TRANSFECCIÓN CON UN PLÁSMIDO DE EMPAQUETAMIENTO DEFECTIVO PARA LA RETROTRANSCRIPTASA**

Durante los experimentos de tratamiento con nucleasas del sobrenadante viral (apartado V.1.3.1) se describe una digestión con DNasa muy eficiente al aplicar el tratamiento 3 (Extracción + DNasa), frente a una digestión menos eficiente cuando se aplica el tratamiento 2 (DNasa + Extracción). Estos resultados sugieren que una fracción del DNA presente en el sobrenadante viral no se encuentra accesible para la DNasa y, únicamente cuando se realiza una extracción de ácidos nucleicos, queda disponible para su digestión con DNasa. Esta observación apoya la hipótesis de Scherr et al. (2001) [218] y Mattiuzzo et al. (2015) [130], quienes postulan la presencia de cDNA en el interior de las partículas virales y lo asocian a una retrotranscripción prematura del RNA viral a cDNA, que tendría lugar en el interior de la partícula viral durante el proceso de empaquetamiento o justo momentos después en su salida al exterior celular, tal y como se describe en el apartado II.3.2.2.2.

En el supuesto de que exista cDNA contenido en la partícula viral, Kutner et al. (2009) [225] proponen trabajar con un plásmido de empaquetamiento RT defectivo para impedir la retrotranscripción y, por tanto, la presencia de cDNA en el interior de la partícula viral. En este proyecto se siguió la estrategia comentada anteriormente, con el objetivo de analizar si se observaba alguna variación en la cantidad de DNA remanente, tras la digestión con DNasa y posterior extracción de ácidos nucleicos de un sobrenadante viral que contenía partículas virales RT defectivas. Estas fueron generadas mediante transfección con un plásmido de empaquetamiento defectivo para la retrotranscriptasa (plásmido de empaquetamiento C mutado).

Se realizaron dos transfecciones independientes, por una parte, con el plásmido de transferencia B-CHI2 y el plásmido de empaquetamiento C (condición control) y, por otra parte, con el plásmido de transferencia B-CHI2 y el plásmido de empaquetamiento C mutado (condición RT defectiva). Los sobrenadantes virales de 48h y 72h se sometieron a los tratamientos 1 y 2 (ver apartado III.5.1.2) y fueron analizados por qPCR y RT-qPCR. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 17**. Los diferentes cálculos realizados se contemplan en detalle en el apartado III.5.

**Tabla 17.** Resultados obtenidos por qPCR y RT-qPCR tras aplicar los tratamientos 1 y 2 en sobrenadantes virales recogidos a las 48h y 72h, que contienen partículas virales de chikungunya salvajes (control) o defectivas para la retrotranscripción (RT defectiva), obtenidas por transfección con los plásmidos C y C mutado, respectivamente. Condiciones específicas de ensayo: extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( $V_0 = 140 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviaturas: Sobr.: sobrenadante; Sin trat.: sin tratamiento;  $c/\mu\text{l}$ : copias/ $\mu\text{l}$ .

	Sin trat.	Tratamiento 1 DNasa		Tratamiento 2 DNasa + Extracción				
	$C_{q(0)}$ -RT	$C_{q(1)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ +RT	$\Delta C_{q(2)}$	Concentración RNA ( $c/\mu\text{l}$ )
Sobr.viral 48h	19,16	24,68	<b>1,70</b>	27,62	<b>2,60</b>	15,06	12,56	5,28E+06
Sobr.viral RT defectiva 48h	19,66	29,54	<b>3,04</b>	29,27	<b>2,96</b>	16,53	12,74	1,87E+06
Sobr.viral 72h	17,08	25,43	<b>2,57</b>	23,15	<b>1,87</b>	15,36	7,79	4,26E+06
Sobr.viral RT defectiva 72h	17,40	27,52	<b>3,11</b>	25,29	<b>2,43</b>	16,56	8,73	1,82E+06

En la **Tabla 17** se observa, tras aplicar el tratamiento 1, una reducción de DNA superior en los sobrenadantes virales que contienen partículas virales defectivas para la retrotranscriptasa (3,04  $\log_{10}$  en sobrenadante viral de 48h y 3,11  $\log_{10}$  en sobrenadante viral de 72h), respecto al control (1,70  $\log_{10}$  en sobrenadante viral de 48h y 2,57  $\log_{10}$  en sobrenadante viral de 72h). Esta reducción de DNA no se asocia a la posible presencia en la condición control de cDNA en el interior de la partícula viral, puesto que este cDNA únicamente se visualiza tras el tratamiento 2. Por tanto, estos resultados podrían estar relacionados con el título viral ligeramente inferior alcanzado en la condición RT defectiva (1,87E+06 copias/ $\mu\text{l}$  en sobrenadante viral de 48h y 1,82E+06 copias/ $\mu\text{l}$  en sobrenadante viral de 72h), respecto al control (5,28E+06 copias/ $\mu\text{l}$  en sobrenadante viral de 48h y 4,26E+06 copias/ $\mu\text{l}$  en sobrenadante viral de 72h). De confirmarse esta observación, la eficiencia en la digestión con DNasa sería inversamente proporcional a la concentración de partículas virales del medio sobre el cual se aplica el tratamiento con DNasa.

En la **Tabla 17** se observa, tras aplicar el tratamiento 2, un incremento significativo en la cantidad de DNA, tanto en la condición control de 72h (paso de  $C_{q(1)}$ -RT = 25,43 a  $C_{q(2)}$ -RT = 23,15) como en la condición RT defectiva de 72h (paso de  $C_{q(1)}$ -RT = 27,52 a  $C_{q(2)}$ -RT = 25,29). Sin embargo, no se repite la misma observación en los sobrenadantes virales de 48h, sin encontrar explicación aparente, especialmente en la condición control donde la señal de DNA se retrasa entre los tratamientos 1 y 2, lo que indica una pérdida de DNA tras la extracción de ácidos nucleicos. Considerando los resultados obtenidos a las 72h, o bien el incremento en la cantidad de DNA, tras la extracción de ácidos nucleicos, no se debe a la presencia de cDNA en el interior de la partícula viral o la mutagénesis dirigida, realizada sobre el plásmido de empaquetamiento C, no ha conducido a la anulación completa de la actividad RT. Para confirmar este último supuesto podría analizarse la actividad RT mediante infección de un cultivo de células 293T con partículas virales infectivas (con proteína de envuelta) y teóricamente defectivas para la retrotranscriptasa. De este modo, si las partículas virales analizadas presentan una anulación completa de la actividad RT, no convertirán el RNA viral en cDNA en el interior de la célula infectada y, por tanto, no tendrá lugar la integración del cDNA en el genoma celular, por lo que no le conferirán la resistencia a puromicina a las células infectadas. Por tanto, únicamente si la partícula viral analizada presenta actividad RT, las células infectadas crecerán en un medio suplementado con puromicina.

### V.1.3.3 PURIFICACIÓN POR ULTRACENTRIFUGACIÓN DEL SOBRENADANTE VIRAL

#### V.1.3.3.1 ULTRACENTRIFUGACIÓN EN UNA SOLUCIÓN DE SACAROSA

Se aplicó la ultracentrifugación en una solución de sacarosa, siguiendo los protocolos A y B (detallados en el apartado III.5.2.1), con el objetivo de eliminar del sobrenadante viral ciertas sustancias inhibitorias, que podrían estar condicionando la actividad de la DNasa, o diferentes complejos en los que podría estar presente el DNA plasmídico inaccesible para la DNasa.

El objetivo perseguido en la ultracentrifugación de los sobrenadantes virales es lograr una separación completa del DNA respecto a las partículas virales, quedando el DNA en el sobrenadante y las partículas virales en el *pellet* obtenido tras la ultracentrifugación, o bien lograr una separación de ciertas sustancias que puedan estar afectando a la actividad de la DNasa. De este modo, en el supuesto de encontrar DNA en el precipitado, este sería digerido con facilidad.

Las muestras centrifugadas mediante el protocolo A consistieron en, por una parte, el plásmido de transferencia A contenido en un sobrenadante celular que estuvo en contacto con células 293T durante 48h, pero donde no hubo formación de partículas virales; y, por otra parte, un sobrenadante viral recogido a las 48h que contenía partículas virales de EGFP. La muestra ultracentrifugada mediante el protocolo B consistió en ese mismo sobrenadante viral de 48h que contenía partículas virales de EGFP. Los resultados obtenidos tras su análisis por qPCR y RT-qPCR se muestran en la **Tabla 18** y los diferentes cálculos realizados se contemplan en detalle en el apartado III.5. En la **Tabla 18** se presentan los valores de  $C_q$  rectificados teniendo en cuenta el factor de concentración de 20 y 13,5 que sufrieron las muestras tras aplicar el protocolo A de centrifugación y el protocolo B de ultracentrifugación (ver **Tabla 6**), respectivamente. Además de considerar el factor de concentración asociado a los tratamientos 1 y 2, tal y como se indica en el apartado III.5. Los factores de concentración 20 y 13,5 equivalen (aplicando la ecuación 2) a una diferencia de  $C_q$  entre la muestra ultracentrifugada frente a esta misma muestra sin ultracentrifugar de  $4,34 C_{qs}$  y  $3,77 C_{qs}$ , respectivamente.

**Tabla 18.** Resultados obtenidos por qPCR y RT-qPCR tras aplicar los tratamientos 1 y 2 sobre diferentes tipos de muestra no ultracentrifugadas o ultracentrifugadas siguiendo los protocolos A o B. Condiciones específicas de ensayo: extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( $V_o = 140 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviaturas: Sobr.: sobrenadante; Sin trat.: sin tratamiento;  $c/\mu\text{l}$ : copias/ $\mu\text{l}$ .

	Protocolo ultracentrifugación	Sin trat.	Tratamiento 1 DNasa		Tratamiento 2 DNasa + Extracción				
		$C_{q(0)}$ -RT	$C_{q(1)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ +RT	$\Delta C_{q(2)}$	Concentración RNA ( $c/\mu\text{l}$ )
Sobrenadante celular de 48h que contiene el plásmido A	No centrifugado	22,37	33,44	<b>3,31</b>	32,30	<b>2,97</b>	32,10	0,20	3,31E+01
	A	29,23	36,20	<b>2,08</b>	36,00	<b>2,02</b>	35,73	0,27	3,60E+00
Sobr. viral de 48h que contiene partículas virales de EGFP	No centrifugado	19,76	25,88	<b>1,83</b>	25,08	<b>1,59</b>	16,22	8,86	1,43E+07
	A	22,16	25,55	<b>1,01</b>	26,43	<b>1,28</b>	17,44	8,99	6,17E+06
Sobr. viral de 48h que contiene partículas virales de EGFP	No centrifugado	21,05	26,61	<b>1,66</b>	26,06	<b>1,50</b>	16,67	9,39	1,05E+07
	B	24,56	27,78	<b>0,96</b>	31,25	<b>2,00</b>	26,16	5,09	1,49E+04

Se puede observar en los resultados recogidos en la **Tabla 18** que, tanto la centrifugación mediante el protocolo A, como la ultracentrifugación mediante el protocolo B conducen a la eliminación de una fracción del DNA plasmídico presente en el sobrenadante celular o viral. Se observa una disminución en la señal de DNA de  $C_{q(0)}-RT = 22,37$  a  $29,23$ , tras centrifugar un sobrenadante celular siguiendo el protocolo A; una disminución de  $C_{q(0)}-RT = 19,76$  a  $22,16$ , tras centrifugar un sobrenadante viral siguiendo el protocolo A; y una disminución de  $C_{q(0)}-RT = 21,05$  a  $24,56$ , tras ultracentrifugar un sobrenadante viral siguiendo el protocolo B. La fracción de DNA que se visualiza por qPCR es aquella que precipita junto con las partículas virales, por lo que los resultados anteriores muestran que la aplicación de los protocolos A y B no conduce a la eliminación completa del DNA.

Además, estos protocolos tampoco conducen a una digestión con DNasa más eficiente de la fracción de DNA que ha precipitado, ya que la reducción de DNA ( $\log_{10}$ ) observada en los tratamientos 1 y 2 es inferior en las condiciones con (ultra)centrifugación, respecto al control. Estos resultados podrían ser explicados por la diferencia en el  $C_q$  de partida (ver apartado V.1.3.1), ya que en la condición control el valor de  $C_{q(0)}-RT$  es notablemente inferior que el valor de  $C_{q(0)}-RT$  de las condiciones con (ultra)centrifugación. Según esta suposición en la condición control habría una mayor cantidad de DNA libre, aunque la misma cantidad de DNA inaccesible para la DNasa, respecto a las condiciones con (ultra)centrifugación, ya que en estas últimas la fracción de DNA eliminada durante la ultracentrifugación seguramente corresponda con DNA libre. También podría ocurrir que la digestión con DNasa sea menos eficiente en las condiciones con (ultra)centrifugación debido a la presencia de algún compuesto que afecte negativamente a la actividad de la DNasa y co-precipite con las partículas virales. De este modo, su concentración sería mayor en los sobrenadantes (ultra)centrifugados, conduciendo a una disminución de la eficiencia en la digestión con DNasa.

Por otra parte, se monitorizó la señal de RNA con el objetivo de analizar si la totalidad de las partículas virales habían precipitado tras la (ultra)centrifugación. En primer lugar, se confirmó la ausencia de RNA viral y, por tanto, de partículas virales en el sobrenadante celular, ya que se observaron unos valores de  $\Delta C_{q(2)}$  y concentración de RNA próximos a cero. En segundo lugar, se analizó la presencia de RNA en los sobrenadantes virales, observándose una concentración de RNA ligeramente inferior tras aplicar el protocolo A de centrifugación ( $6,17E+06$  copias/ $\mu$ l), respecto al control ( $1,43E+07$  copias/ $\mu$ l), y una concentración de RNA muy inferior tras aplicar el protocolo B de ultracentrifugación ( $1,49E+04$  copias/ $\mu$ l), respecto al control ( $1,05E+07$  copias/ $\mu$ l). Esta disminución de 3 órdenes de magnitud en la concentración de RNA, tras la ultracentrifugación mediante el protocolo B, sugiere que una fracción significativa de RNA viral no está precipitando. El RNA viral no precipitado podría ser consecuencia de que un porcentaje de las partículas virales se hubiese lisado durante el proceso de ultracentrifugación y, de este modo, se habría liberado al exterior el RNA viral. Este RNA libre, no contenido en la partícula viral, presentaría una densidad diferente y no precipitaría tras la ultracentrifugación en una solución de sacarosa.

La posibilidad de que ocurra la lisis de las partículas virales durante el proceso de ultracentrifugación ha sido reportada en la bibliografía, donde además se atribuye una resistencia a la lisis por ultracentrifugación diferente en función de la proteína de envuelta que presente la partícula viral. Es el caso de las partículas virales pseudotipadas con la proteína de envuelta VSV-G, las cuales muestran una mayor estabilidad durante su purificación [191, 198, 199]. En este proyecto se prescindió de la proteína de envuelta VSV-G para garantizar la no infectividad de las partículas virales. Las observaciones anteriores concuerdan con el hecho de

no observar pérdida significativa del RNA viral tras la centrifugación mediante el protocolo A, lo que podría ser explicado porque este protocolo es mucho menos agresivo, ya que la velocidad de centrifugación es muy inferior (10.000 g), respecto al protocolo B (82.700 g). Aunque la pérdida de RNA viral durante el proceso de ultracentrifugación fuese mínima, los protocolos de (ultra)centrifugación A y B no parecen ser una opción factible para lograr la separación total del DNA y las partículas virales, así como tampoco parecen contribuir a una digestión con DNasa más eficiente del DNA remanente.

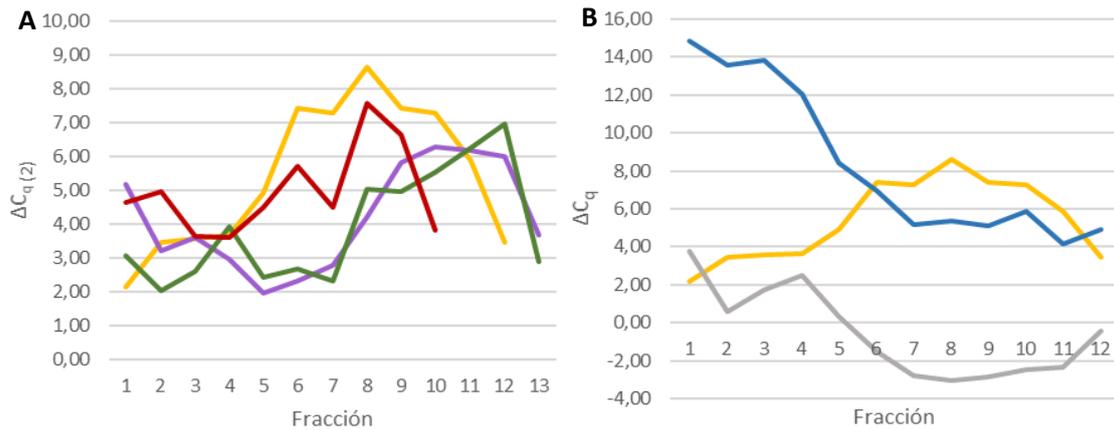
### V.1.3.3.2 ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE VELOCIDAD

Teniendo en cuenta los resultados poco favorables obtenidos durante la purificación de partículas virales mediante ultracentrifugación del sobrenadante viral en una solución de sacarosa (apartado V.1.3.3.1), se consideró la posibilidad de que el DNA inaccesible para la DNasa estuviese contenido en exosomas. Estas estructuras únicamente pueden ser separadas de las partículas virales de forma eficaz mediante ultracentrifugación en gradiente de velocidad, y no en gradiente de densidad, tal y como se describe en el apartado III.5.2.2. Debido a ello, se analizó la ultracentrifugación en gradiente de velocidad mediante el reactivo Optiprep™ (compuesto por 60% de iodixanol), de un sobrenadante viral de 72h que contenía partículas virales de EGFP, siguiendo los protocolos C y D (detallados en el apartado III.5.2.2).

Tras la ultracentrifugación se recogieron diferentes fracciones y, previamente a su análisis por qPCR y RT-qPCR, se sometieron a digestión con DNasa, seguida de extracción de ácidos nucleicos. El número esperado de fracciones sería 11 (atendiendo a los protocolos descritos en el apartado III.5.2.2). Sin embargo, en algunos casos no fue posible asegurar la recogida de 11 fracciones y este número varió en el rango de 10-13 fracciones recogidas, con pequeñas variaciones de volumen entre ellas. Según el fabricante de Optiprep™ las partículas virales deberían situarse en la tercera fracción inferior del gradiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 28A**, donde se representa la cantidad de RNA viral ( $\Delta C_{q(2)}$ , valor calculado siguiendo la ecuación 10) en cada una de las fracciones resultantes de la ultracentrifugación del sobrenadante viral (siguiendo los protocolos C1, C2, D1 o D2). Cuando la gráfica alcanza su máximo es indicativo de una elevada concentración de RNA viral en esa fracción y, por consiguiente, sería esperable que de una elevada concentración de partículas virales. Los resultados mostrados en la **Figura 28A** indican que tras aplicar la ultracentrifugación en rotor oscilante (protocolos D1 y D2, líneas naranja y roja) las partículas virales se localizan en fracciones intermedias, mientras que tras aplicar la ultracentrifugación en rotor fijo (protocolos C1 y C2, líneas verde y morada) las partículas virales se concentran en las fracciones finales.

La gráfica asociada al protocolo D1 (línea naranja) destaca frente al resto, ya que tras aplicar este protocolo de ultracentrifugación se observa que la gran mayoría del RNA viral se encuentra localizado en unas fracciones concretas y, además, el máximo de  $\Delta C_{q(2)}$  se localiza en la fracción 8 de este gradiente, lo que indica un mayor contenido de RNA viral. Debido a ello en la **Figura 28B** se representan únicamente los resultados tras la ultracentrifugación siguiendo el protocolo D1. Se muestra para cada fracción el contenido de RNA ( $\Delta C_{q(2)}$ , línea naranja), el desplazamiento de  $C_q$  de la señal de DNA tras digerir con DNasa cada fracción ( $C_{q(1)} - C_{q(0)}$ , línea azul) y la diferencia en el valor de  $C_q$  observado entre los tratamientos DNasa y DNasa + Extracción ( $C_{q(1)} - C_{q(2)}$ , línea gris). Este último valor refleja la cantidad de DNA que se encuentra “oculta” y solo se visualiza una vez realizada la extracción de ácidos nucleicos.



**Figura 28. A.** Señal de RNA ( $\Delta C_{q(2)}$ ) en cada una de las fracciones recogidas tras la ultracentrifugación de un sobrenadante viral de 72h que contenía partículas virales de EGFP, siguiendo los protocolos de ultracentrifugación C1 (verde), C2 (morado), D1 (naranja) o D2 (rojo). Previo al análisis por qPCR y RT-qPCR las fracciones fueron digeridas con DNasa y extraídas. **B.** Resultados derivados del análisis por qPCR y RT-qPCR de un sobrenadante viral de 72h, que contenía partículas virales de EGFP y fue ultracentrifugado siguiendo el protocolo D1. Las fracciones recogidas fueron digeridas con DNasa y extraídas. Se muestra la señal de RNA ( $\Delta C_{q(2)}$ , naranja), la eficiencia en la digestión con DNasa ( $C_{q(1)} - C_{q(2)}$ , azul) y el DNA "oculto" liberado tras la extracción de ácidos nucleicos ( $C_{q(1)} - C_{q(2)}$ , gris), para cada una de las fracciones recogidas. Condiciones específicas de ensayo: digestión con DNasa (NEB) a concentración 50 U/ml a 37°C durante 1h y extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

Se observa claramente como la digestión con DNasa es más eficaz en las primeras fracciones, donde no hay apenas partículas virales y, a medida que aumenta el contenido de RNA viral (línea naranja en **Figura 28B**), disminuye el rendimiento de la digestión con DNasa (línea azul en **Figura 28B**). Por otra parte, las líneas azul y gris (**Figura 28B**) muestran un comportamiento muy similar. En las primeras fracciones donde se observa un mayor desplazamiento de  $C_q$  tras la digestión con DNasa (línea azul), son también las fracciones donde se encuentra más DNA "oculto" (línea gris). Esta última asociación refleja la necesidad de analizar siempre la cantidad de DNA "oculto", puesto que un mayor desplazamiento de  $C_q$  tras la digestión con DNasa no siempre es indicativo de un mayor rendimiento en la digestión, puede estar asociado a DNA "oculto" o a inhibición parcial de la reacción qPCR.

Los resultados mostrados en la **Figura 28B** se recogen a su vez en la **Tabla 19**, en la cual se establece una comparativa respecto a los resultados obtenidos en el mismo sobrenadante viral sin ultracentrifugar. Los diferentes cálculos realizados se contemplan en detalle en el apartado III.5. Se debe tener en cuenta en la comparativa que el sobrenadante viral no se concentró ni diluyó durante el proceso de ultracentrifugación puesto que se partió de un volumen inicial de 1 ml de sobrenadante viral y se recogieron fracciones de este mismo volumen.

Se puede observar en la **Tabla 19** que tras la ultracentrifugación del sobrenadante viral, siguiendo el protocolo D1, el DNA no se localiza en una única o varias fracciones, sino que se encuentra repartido a lo largo de todo el gradiente. Este DNA muestra un comportamiento diferencial, tras aplicar los tratamientos 1 y 2, en función de la fracción en la que se encuentre. En las 5 primeras fracciones la reducción del DNA tras el tratamiento 1 es superior al resto de fracciones, pero también se observa una mayor cantidad de "DNA oculto" ( $C_{q(1)} - C_{q(2)}$ ), que conduce a un valor de reducción de DNA ( $\log_{10}$ ) inferior en el tratamiento 2, respecto al tratamiento 1. Sin embargo, en las 7 últimas fracciones el valor de reducción de DNA es superior

en el tratamiento 2, respecto al tratamiento 1, ya que no hay “DNA oculto”, es decir, DNA que únicamente se visualice tras la extracción de estas fracciones.

**Tabla 19.** Resultados obtenidos por qPCR y RT-qPCR tras aplicar los tratamientos 1 y 2 en un sobrenadante viral recogido a las 72h, que contiene partículas virales de EGFP y no fue ultracentrifugado; y en este mismo sobrenadante viral ultracentrifugado siguiendo el protocolo D1. Condiciones específicas de ensayo para el sobrenadante viral no ultracentrifugado: digestión con DNasa (NEB) a concentración 50 U/ml a 37°C durante 3h y extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( $V_0 = 140 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 50 \mu\text{l}$ ). Condiciones específicas de ensayo para el sobrenadante viral ultracentrifugado: digestión con DNasa (NEB) a concentración 50 U/ml a 37°C durante 1h y extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviaturas: Sin trat.: sin tratamiento; c/ $\mu\text{l}$ : copias/ $\mu\text{l}$ .

Protocolo ultracentrifugación	Sin trat.	Tratamiento 1 DNasa		Tratamiento 2 DNasa + Extracción				
	$C_{q(0)}$ -RT	$C_{q(1)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ +RT	$\Delta C_{q(2)}$	Concentración RNA (c/ $\mu\text{l}$ )
No ultracentrifugado	19,10	27,20	<b>2,42</b>	24,29	<b>1,55</b>	17,79	6,50	4,80E+06
D1; Fracción 1	22,93	36,79	<b>4,14</b>	33,00	<b>3,01</b>	30,85	2,15	4,70E+02
D1; Fracción 2	19,91	32,50	<b>3,76</b>	31,90	<b>3,58</b>	28,44	3,46	2,90E+03
D1; Fracción 3	20,70	33,53	<b>3,83</b>	31,78	<b>3,31</b>	28,21	3,57	3,42E+03
D1; Fracción 4	22,42	33,46	<b>3,30</b>	30,93	<b>2,54</b>	27,26	3,67	6,62E+03
D1; Fracción 5	24,26	31,69	<b>2,22</b>	31,34	<b>2,12</b>	26,41	4,93	1,25E+04
D1; Fracción 6	24,40	30,33	<b>1,77</b>	31,86	<b>2,23</b>	24,43	7,43	5,01E+04
D1; Fracción 7	24,13	28,32	<b>1,25</b>	31,11	<b>2,09</b>	23,81	7,30	7,68E+04
D1; Fracción 8	22,99	27,37	<b>1,31</b>	30,38	<b>2,21</b>	21,74	8,64	3,20E+05
D1; Fracción 9	22,83	26,91	<b>1,22</b>	29,73	<b>2,06</b>	22,30	7,43	2,17E+05
D1; Fracción 10	23,64	28,51	<b>1,46</b>	31,00	<b>2,20</b>	23,70	7,30	8,28E+04
D1; Fracción 11	24,33	27,46	<b>0,94</b>	29,82	<b>1,64</b>	23,93	5,89	6,99E+04
D1; Fracción 12	23,65	27,57	<b>1,17</b>	28,00	<b>1,30</b>	24,52	3,48	4,31E+04

La presencia de partículas virales se encuentra principalmente localizada en las fracciones 8 y 9, donde se observa una concentración de 3,20E+05 copias/ $\mu\text{l}$  y 2,17E+05 copias/ $\mu\text{l}$ , respectivamente. Estos valores son notablemente inferiores a la concentración de 4,80E+06 copias/ $\mu\text{l}$ , obtenida en el sobrenadante viral no ultracentrifugado. Sin embargo, se observan tras aplicar el tratamiento 2 en las fracciones 8 y 9 unos valores de reducción del DNA de 2,21  $\log_{10}$  y 2,06  $\log_{10}$ , los cuales son superiores al valor de reducción de DNA de 1,55  $\log_{10}$  observado en el sobrenadante viral no ultracentrifugado. Según la hipótesis planteada, tras la ultracentrifugación en gradiente de velocidad, los exosomas se encontrarían principalmente en las primeras fracciones y las partículas virales en las fracciones intermedias-finales, lo que explicaría la diferencia en el comportamiento de las 5 primeras fracciones. Debe, por tanto, analizarse la presencia de exosomas en cada una de las fracciones, para averiguar, en primer lugar, si estos están presentes en el sobrenadante viral y, en segundo lugar, si se ha logrado una correcta separación de exosomas y partículas virales mediante ultracentrifugación en gradiente de velocidad. De cualquier modo, se deben seguir analizando diferentes estrategias de purificación de las partículas virales, ya que en ningún caso se ha logrado la eliminación completa del DNA presente en el sobrenadante viral.

### V.1.3.3.2.1 IDENTIFICACIÓN DE EXOSOMAS EN EL SOBRENADANTE VIRAL

En este proyecto se analizó la presencia de exosomas en diferentes medios mediante la detección de la enzima AChE aplicando la reacción de Ellman [232], siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.5.2.3. La presencia de exosomas en un cultivo celular tiene dos orígenes principales: el suero fetal bovino, en el cual la presencia de exosomas está ampliamente descrita [253-255], y las células, las cuales secretan exosomas en un número que varía en función del tipo celular [226, 256]. Debido a ello se analizó la presencia de AChE en los siguientes medios:

-Suero fetal bovino

-Medio DMEM completo: utilizado de forma rutinaria durante el mantenimiento de las células 293T y compuesto por DMEM + SFB 5% + Ab 1x. Una descripción más detallada se muestra en el apartado III.4.1.

-Medio DMEM completo en el cual se reemplazó el SFB por otros reactivos análogos: CB05 o CDM-HD, cuya composición se detalla en el apartado III.4.1.

-Sobrenadante celular que estuvo en contacto con las células 293T durante 16h, 48h y 72h, pero donde no hubo formación de partículas virales, ya que no se transfectaron las células 293T.

-Sobrenadante viral recogido a las 16h, 48h y 72h después de la transfección con el plásmido de transferencia A y el plásmido de empaquetamiento C en células 293T cultivadas en los siguientes medios: DMEM + SFB 5% + Ab 1x, DMEM + CB05 5% + Ab 1x, DMEM + CDM-HD 5% + Ab 1x y OptiMEM. En estos medios se produjo la formación de partículas virales de EGFP.

Los resultados obtenidos tras aplicar la reacción de Ellman en diferentes medios y posteriormente realizar la lectura de absorbancia a 405 nm se muestran en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.** Resultados de absorbancia leída a 405 nm tras aplicar la reacción de Ellman en diferentes medios, algunos de los cuales estuvieron 16h, 48h y 72h en contacto con las células 293T.

	Tiempo de contacto del medio con las células 293T		
	16h	48h	72h
Suero Fetal Bovino (SFB)	2,2		
Medio DMEM completo: DMEM + SFB 5% + Ab 1x	3,3		
DMEM + CB05 5% + Ab 1x	0,1		
DMEM + CDM-HD 5% + Ab 1x	0,1		
Sobrenadante celular	3,3	3,2	3,2
Sobrenadante viral en DMEM + SFB 5% + Ab 1x	3,3	3,3	2,9
Sobrenadante viral en DMEM + CB05 5% + Ab 1x	0,2	0,1	0,1
Sobrenadante viral en DMEM + CDM-HD 5% + Ab 1x	0,2	0,1	0,1
Sobrenadante viral en OptiMEM	0,1	0,0	0,0

Se observa que la principal fuente de AChE y, probablemente de exosomas, procede del suero fetal bovino, ya que la absorbancia de este medio es de 2,2, mientras que la absorbancia de medios carentes de SFB, como CB05 o CDM-HD, se sitúa próxima a cero. Por otra parte, las células 293T no parecen contribuir a la cantidad final de exosomas, ya que ninguno de los medios que estuvieron en contacto con las células 293T, independientemente de si estas fueron transfectadas o no, muestran valores de absorbancia superiores al medio DMEM completo, que contiene SFB y no ha estado en contacto con las células 293T.

De acuerdo con la bibliografía sería esperable que el valor de absorbancia fuese aumentando conforme aumenta la cantidad de células y el tiempo de contacto del medio con las células, pero el valor de absorbancia observado no difiere significativamente entre los tiempos de 16h, 48h y 72h de contacto con las células 293T. Los resultados obtenidos podrían indicar que la cantidad de exosomas secretada por las células 293T es mucho menor que la cantidad de exosomas presentes en el SFB o que los exosomas secretados por las células 293T carecen del marcador AChE. Para confirmar esta última hipótesis debería analizarse la presencia de exosomas mediante un marcador específico diferente de AChE, como podría ser el marcador CD63.

En el caso de que el marcador AChE pudiese ser considerado como un marcador específico y, por tanto, se confirmase que las células 293T no están secretando exosomas al medio, los exosomas y las partículas virales no estarían compartiendo ruta de síntesis en el interior celular y, por tanto, sería improbable que los exosomas incorporasen DNA plasmídico o RNA viral en su interior. En este supuesto, la vía más probable de incorporación del DNA en el interior de exosomas tendría lugar en el exterior celular.

Por este motivo, se analizaron diferentes modificaciones del proceso de transfección orientadas a eliminar los exosomas presentes en el suero fetal bovino o cualquier sustancia que pudiera estar interfiriendo en la eliminación del DNA plasmídico. Los resultados de estos experimentos se muestran en el siguiente apartado V.1.3.4.

### **V.1.3.4 MODIFICACIÓN DEL PROCESO DE TRANSFECCIÓN**

#### **V.1.3.4.1 TRANSFECCIÓN EN MEDIO LIBRE DE SUERO FETAL BOVINO**

La formación de partículas virales en ausencia de suero fetal bovino se ha descrito en la bibliografía, especialmente en ensayos de terapia génica donde el objetivo es reducir la respuesta inmunológica en el paciente. Reiser (2000) [257] y Kuroda et al. (2009) [258] utilizan el medio de cultivo UltraCulture, Geraerts et al. (2005) [259] emplean OptiMEM suplementado con Glutamax y Ausubel et al. (2012) [193] utilizan medio DMEM. Todos ellos reportan títulos virales similares entre las transfecciones realizadas en presencia y ausencia de SFB.

Tras tener indicios de la presencia de exosomas en el SFB, debido a la presencia de AChE reportada en el apartado V.1.3.3.2.1, se planteó en este estudio la generación de partículas virales en diferentes medios libres de SFB. De este modo, fue posible analizar si la ausencia de SFB contribuía a una eliminación más eficiente del DNA plasmídico.

Se realizaron 4 transfecciones independientes con el plásmido de transferencia A y el plásmido de empaquetamiento C:

- Transfección control: medio de cultivo DMEM completo (ver apartado III.4.1)
- 3 transfecciones en medios libres de SFB (OptiMEM; DMEM + CB05 5% + antibiótico 1x y DMEM + CDM-HD 5% + antibiótico 1x). La composición de los medios CB05 y CDM-HD se contempla en el apartado III.4.1.

Los sobrenadantes virales de los diferentes experimentos de transfección, que fueron recogidos a las 48h y 72h, se sometieron a los tratamientos 1 y 2, descritos en el apartado III.5.1.2, y fueron analizados por qPCR y RT-qPCR. Los resultados de este análisis se muestran en la **Tabla 21** y los diferentes cálculos realizados se contemplan en detalle en el apartado III.5.

**Tabla 21.** Resultados obtenidos por qPCR y RT-qPCR tras aplicar los tratamientos 1 y 2 en sobrenadantes virales recogidos a las 48h y 72h, que contienen partículas virales de EGFP obtenidas por transfección en diferentes medios.

Condiciones específicas de ensayo: extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 200 \mu\text{l}$ ). Resultados obtenidos en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviaturas: Sobr.: sobrenadante; Sin trat.: sin tratamiento; c/ $\mu\text{l}$ : copias/ $\mu\text{l}$ .

	Sin trat.	Tratamiento 1 DNasa		Tratamiento 2 DNasa + Extracción				
	$C_{q(0)}$ -RT	$C_{q(1)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ -RT	$\log_{10}$	$C_{q(2)}$ +RT	$\Delta C_{q(2)}$	Concentración RNA (c/ $\mu\text{l}$ )
Sobr. viral 48h DMEM completo	20,66	23,70	<b>0,91</b>	25,48	<b>1,44</b>	15,56	9,92	<b>2,25E+07</b>
Sobr. viral 48h OptiMEM	18,02	22,00	<b>1,19</b>	25,14	<b>2,13</b>	15,72	9,42	<b>2,02E+07</b>
Sobr. viral 48h CB05	14,44	32,15	<b>5,29</b>	31,60	<b>5,13</b>	26,33	5,27	<b>1,33E+04</b>
Sobr. viral 48h CDM-HD	14,06	33,68	<b>5,86</b>	32,09	<b>5,39</b>	27,93	4,16	<b>4,28E+03</b>
Sobr. viral 72h DMEM completo	20,05	25,24	<b>1,55</b>	23,99	<b>1,18</b>	17,14	6,85	<b>7,56E+06</b>
Sobr. viral 72h OptiMEM	17,81	24,18	<b>1,90</b>	25,29	<b>2,23</b>	16,73	8,56	<b>1,01E+07</b>
Sobr. viral 72h CB05	18,14	32,39	<b>4,26</b>	31,55	<b>4,01</b>	23,82	7,73	<b>7,64E+04</b>
Sobr. viral 72h CDM-HD	17,65	30,75	<b>3,91</b>	28,96	<b>3,38</b>	25,47	3,50	<b>2,25E+04</b>

Se observa una reducción del DNA plasmídico mucho más eficiente en los medios que contienen CB05 (5,29  $\log_{10}$  en sobrenadante de 48h y 4,26  $\log_{10}$  en sobrenadante de 72h) y CDM-HD (5,86  $\log_{10}$  en sobrenadante de 48h y 3,91  $\log_{10}$  en sobrenadante de 72h), frente a OptiMEM (1,19  $\log_{10}$  en sobrenadante de 48h y 1,90  $\log_{10}$  en sobrenadante de 72h) y DMEM completo (0,91  $\log_{10}$  en sobrenadante de 48h y 1,55  $\log_{10}$  en sobrenadante de 72h). La similitud en los resultados de transfección en medio OptiMEM (ausencia de SFB) y en medio DMEM completo (contiene SFB a concentración final 5%) sugieren que la presencia de SFB no está condicionando la actividad de la DNasa. El factor condicionante de la actividad DNasa podría ser la concentración de partículas virales (ver apartado V.1.3.2), ya que el título viral de los sobrenadantes de 48h en DMEM completo (2,25E+07 copias/ $\mu\text{l}$ ) y OptiMEM (2,02E+07 copias/ $\mu\text{l}$ ) es de 3-4 órdenes de magnitud superior al título viral obtenido en los medios CB05 (1,33E+04 copias/ $\mu\text{l}$ ) y CDM-HD (4,28E+03 copias/ $\mu\text{l}$ ). En los sobrenadantes de 72h se repite esta observación con una diferencia de 2-3 órdenes de magnitud. El título viral inferior observado en los medios que contenían CB05 y CDM-HD podría ser debido a que se observó que las células 293T crecían con dificultad en estos medios, a pesar de haber realizado sucesivos pases a diferentes concentraciones de estos reactivos para la adaptación de las células 293T al nuevo medio.

Se concluyen en este punto las diferentes estrategias abordadas para la purificación de las partículas virales, cuyo desarrollo reveló la complejidad en la eliminación completa del DNA presente en el sobrenadante viral. Se logró alcanzar una reducción del DNA superior al 98,6%, mediante la digestión con DNasa del sobrenadante viral. Los resultados obtenidos durante la purificación de las partículas virales sugieren que la digestión incompleta del DNA podría estar condicionada por múltiples factores: el medio en el que se encuentra el DNA (apartado V.1.3.1.1), la presencia de exosomas (apartado V.1.3.3) o la concentración de partículas virales presentes en el medio (apartados V.1.3.2 y V.1.3.4.1).

Como consecuencia de la aparición del virus SARS-CoV-2 y la crisis sanitaria que se desencadenó a nivel mundial, se priorizó la elaboración de un control positivo de SARS-CoV-2, para la monitorización completa de ensayos de RT-qPCR, frente a dar continuidad a los experimentos

de purificación de partículas virales. Debido a ello, con el objetivo de eliminar el DNA remanente, se aplicó una dilución del sobrenadante viral en la cual la cantidad de DNA se encontrase por debajo del límite de detección de la técnica de RT-qPCR. Para la elaboración del control positivo de SARS-CoV-2, y de otros virus causantes de patología en humanos, se empleó el sistema de generación de partículas virales que había sido previamente desarrollado y optimizado en este proyecto para la elaboración de un control positivo del virus chikungunya. Los resultados relativos a la elaboración de una colección de partículas virales recombinantes de RNA se describen en el siguiente apartado V.2.

## V.2 ELABORACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA Y VALIDACIÓN PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO DE ENSAYOS RT-QPCR

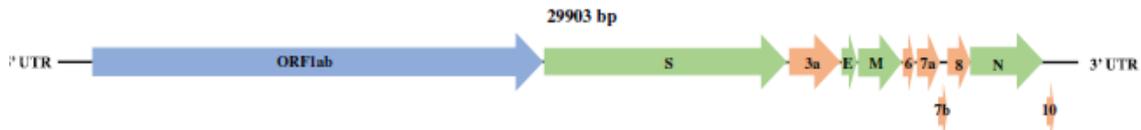
En este apartado se exponen los resultados derivados de implementar un sistema optimizado de generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de RNA, cuyo desarrollo queda detallado en el apartado V.1, para la elaboración de una colección de controles positivos de ensayos de RT-qPCR.

### V.2.1 SELECCIÓN DE LOS VIRUS SOBRE LOS QUE IMPLEMENTAR UN SISTEMA DE GENERACIÓN *IN VITRO* DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

La selección de los virus a incluir en la colección de controles positivos, para la monitorización completa del proceso de RT-qPCR, se realizó de acuerdo con las necesidades del mercado y atendiendo a los siguientes criterios: escasa disponibilidad de muestras clínicas si se trata de patógenos emergentes, exóticos y/o endémicos, dificultad técnica de su cultivo o necesidad de instalaciones de alto nivel de bioseguridad para su manipulación. Teniendo en cuenta lo anterior, los virus seleccionados para el desarrollo de un control positivo fueron el virus SARS-CoV-2, debido a su reciente aparición y a la crisis sanitaria desencadenada a nivel mundial; y otros virus causantes de afección respiratoria: virus respiratorio sincitial, virus de influenza A y virus de influenza B, debido a las necesidades del mercado, por su elevada prevalencia [260]. Por los motivos anteriormente comentados, se priorizó el desarrollo de estos diseños frente al diseño del virus chikungunya, con el cual se realizaron los experimentos de desarrollo y optimización del sistema. A continuación, se resumen brevemente las características del genoma de cada uno de los virus considerados en este proyecto.

#### V.2.1.1 VIRUS SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 es un virus envuelto perteneciente al género *Betacoronavirus*, dentro de la familia *Coronaviridae*. A este mismo género pertenecen los virus SARS-CoV y MERS-CoV, respecto a los cuales SARS-CoV-2 presenta una homología del 80% y 50%, respectivamente [261]. El genoma de SARS-CoV-2 es un RNA de cadena sencilla de sentido positivo y de tamaño aproximado 30 kb, el cual se compone de dos marcos abiertos de lectura: ORF1a y ORF1b. La traducción se inicia en ORF1a, dando lugar al polipéptido 1a. Una vez el ribosoma se encuentra al final de ORF1a, retrocede un nucleótido para continuar la traducción de ORF1b en un marco de lectura diferente, dando lugar al polipéptido 1ab. Ambos polipéptidos son posteriormente escindidos originando diferentes proteínas no estructurales [261, 262]. A su vez, a partir del RNA viral se generan diferentes RNAs subgenómicos, que codifican para las proteínas estructurales S (espícula), E (envuelta), M (matriz) y N (nucleocápside) y para las proteínas accesorias 3a, 6, 7a, 7b, 8 y 10 [261, 263]. Un esquema del genoma viral de SARS-CoV-2 se muestra en la **Figura 29**.



**Figura 29.** Esquema del genoma viral de SARS-CoV-2. Se representa el marco abierto de lectura ORF1ab (azul), genes que codifican para proteínas estructurales (verde) y genes que codifican para proteínas accesorias (naranja). Fuente: [262].

El virus SARS-CoV-2 fue detectado por primera vez en diciembre de 2019 en Wuhan (China), donde algunas personas comenzaron a manifestar una neumonía de causa desconocida. El análisis de secuenciación masiva de las muestras de pacientes afectados reveló la presencia de un nuevo coronavirus, causante de la enfermedad que hoy en día se conoce como COVID-19. En marzo de 2020, la OMS declaró el brote de COVID-19 como una pandemia. Desde entonces diferentes variantes del virus han ido apareciendo, entre otras, las denominadas Alpha (también conocida como variante UK o B.1.1.7), Beta (variante Sudáfrica o B.1.351), Gamma (variante Brasil o P.1) y Delta (variante India o B.1.617.2) [264].

### V.2.1.2 VIRUS RESPIRATORIO SINCIAL

El virus respiratorio sincial es un virus envuelto perteneciente al género *Orthopneumovirus*, dentro de la familia *Pneumoviridae*. Su genoma es un RNA de cadena sencilla de sentido negativo y de tamaño aproximado 15 kb, el cual se compone de 10 genes: *NS1*, *NS2*, *N*, *P*, *M*, *SH*, *G*, *F*, *M2* y *L*, que codifican al menos para 10 proteínas (**Figura 30**). Entre ellas se distinguen dos proteínas no estructurales (codificadas en los genes *NS1* y *NS2*), una nucleoproteína (gen *N*), una proteína de matriz (gen *M*), tres proteínas de membrana (genes *SH*, *G* y *F*), un factor regulador de la transcripción (gen *M2*), una polimerasa (gen *L*) y un cofactor (gen *P*). Estos dos últimos conforman el complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA [265].



**Figura 30.** Esquema del genoma viral de RSV constituido por 10 genes: *NS1*, *NS2*, *N*, *P*, *M*, *SH*, *G*, *F*, *M2* y *L*. Fuente: [266]

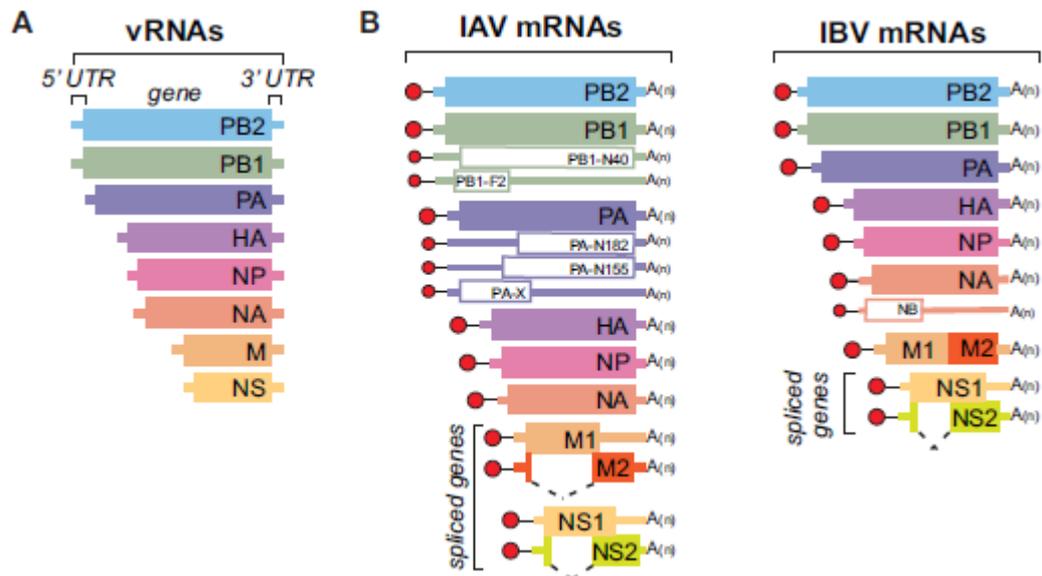
Existen dos subgrupos antigénicos de RSV denominados A y B, siendo el gen *G* el que acumula la mayor variabilidad genética entre ellos, por este motivo el gen *G* no suele considerarse como diana en la gran mayoría de ensayos de RT-qPCR. Estudios epidemiológicos indican que el subtipo A es el predominante en la mayoría de las epidemias [267, 268], mientras que otros autores reportan epidemias alternas de tipo A y B [269].

### V.2.1.3 VIRUS DE INFLUENZA A E INFLUENZA B

Los virus de influenza A e influenza B son virus envueltos pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae*, en concreto a los géneros *Alphainfluenzavirus* y *Betainfluenzavirus*, respectivamente. Su genoma se compone de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de sentido negativo, los cuales se nombran ordenados de mayor a menor longitud (**Figura 31A**).

Tanto en el virus de influenza A como en el virus de influenza B los segmentos 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden a los genes *PA* (subunidad de la RNA polimerasa), *HA* (hemaglutinina), *NP* (nucleoproteína), *NA* (neuraminidasa), *M* (matriz) y *NS* (proteína no estructural), respectivamente. El segmento 1 del virus de influenza A corresponde al gen *PB2* y el segmento

2 al gen *PB1*. Sin embargo, en el virus de influenza B ocurre a la inversa, el segmento 1 corresponde al gen *PB1* y el segmento 2 al gen *PB2*, pero en ambos casos los genes *PB1* y *PB2* codifican para diferentes subunidades de la RNA polimerasa [270, 271]. Se observa, en algunos casos, que un mismo segmento codifica para varias proteínas [272, 273], como se muestra en la **Figura 31B**.



**Figura 31. A.** Esquema de los 8 segmentos de RNA que constituyen el genoma de los virus de influenza A e influenza B. **B.** Esquema de los RNAs mensajeros (mRNAs) de los virus de influenza A (izquierda) e influenza B (derecha) resultantes de la transcripción del genoma viral. Fuente: [271].

El virus de influenza A se divide en diferentes subtipos, en función de los subtipos de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) que presente. Hasta el momento se han identificado dieciocho subtipos de HA y once subtipos de NA [274], pero no todas las combinaciones posibles de HA y NA se presentan en la naturaleza. Los subtipos H1N1, H2N2 y H3N2 causan patología en humanos, en concreto, el subtipo H1N1 fue el responsable de la denominada gripe española, una pandemia que fue notificada por primera vez en 1918 [272, 273] y causó entre 50 y 100 millones de fallecidos en el mundo. Por otra parte, los subtipos H5N1 y H7N9, causantes de la gripe aviar, también causan patología en humanos, pero presentan una baja transmisibilidad [275, 276].

Por otra parte, el virus de influenza B se clasifica en 2 linajes (B/Victoria y B/Yamagata). Ambos se encuentran en circulación por todo el mundo originando una proporción similar de casos, siendo más frecuente B/Victoria en los trópicos y B/Yamagata en países con climas templados [277, 278].

## V.2.2 DISEÑO DE LOS DIFERENTES PLÁSMIDOS DE TRANSFERENCIA QUE CONTIENEN EL GENOMA DE LOS VIRUS DE INTERÉS

El diseño de los diferentes plásmidos de transferencia, para la elaboración de una colección de partículas virales recombinantes de RNA, se realizó de acuerdo con las consideraciones detalladas en el apartado III.2. El diseño del genoma de las partículas virales de SARS-CoV-2 y RSV se centró en incluir aquellas secuencias del genoma del virus salvaje cuyo uso como dianas de los ensayos de RT-qPCR es más frecuente, mientras que el diseño del genoma de las partículas

virales de influenza A e influenza B se centró en incluir el genoma completo de ambos virus. Los detalles específicos de cada diseño y la elección de la cepa de referencia que se tomó como modelo en cada caso se exponen a continuación.

#### Virus de SARS-CoV-2

En el diseño del genoma de las partículas virales de SARS-CoV-2 se consideraron las dianas de los ensayos de RT-qPCR recomendados por la OMS para la identificación del virus SARS-CoV-2 [279]. Por tanto, se incluyeron en el inserto de SARS-CoV-2 (denominado NCO) diferentes fragmentos de los genes *ORF1ab*, *S*, *E* y *N*, constituyendo un inserto de tamaño 2.848 pb. Esto implica que el genoma de la partícula viral desarrollada presenta una longitud de 6.576 pb, consecuencia de sumar el tamaño de las regiones común y específica de patógeno, tal y como se detalla en el apartado II.2.

La cepa de referencia seleccionada en este proyecto para el diseño de las partículas virales de SARS-CoV-2 fue la cepa origen Wuhan-Hu-1, cuyo número de acceso en GenBank es **MN908947.3**. Esta cepa fue a su vez seleccionada como genoma de referencia por GenBank y su correspondiente número de acceso en RefSeq es **NC\_045512.2**.

#### Virus respiratorio sincitial

En el diseño del genoma de las partículas virales de RSV se incluyeron los genes *N*, *M* y *F* completos y 2 fragmentos del gen *L* de este virus, ya que se observó un consenso muy claro en el uso de estas dianas, tanto en la bibliografía [280-284] como en los fabricantes de ensayos de RT-qPCR. Un ejemplo de ello es la siguiente recopilación de diferentes kits comerciales de RT-qPCR dirigidos frente a las dianas anteriormente comentadas:

**-Gen N:** VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.), Xpert® Xpress Flu/RSV (Cepheid) y Savvygen™ Flu A, Flu B & RSV test (Savyon Diagnostics Ltd.).

**-Gen M:** Panther Fusion® FluA/B/RSV assay (Hologic), Cobas® Influenza A/B & RSV (Roche Diagnostics), Alinity m Resp-4-Plex assay (Abbott Molecular), Simplexa™ Flu A/B & RSV (Focus Diagnostics), PKamp™ Respiratory SARS-CoV-2 RT-PCR Panel Assay (Perkin Elmer) y GeneProof Flu Multiplex PCR Kit (GeneProof).

**-Gen F:** RIDA®GENE Flu & RSV (r-biopharm).

**-Gen L:** SARS-CoV-2/FLU/RSV REALTIME PCR KIT (Vircell) y Respiratory Viral ELITE MGB® Panel (ELITechGroup).

Este inserto, denominado RSV, presenta una longitud total de 4.374 pb, lo que implica que el genoma de la partícula viral desarrollada presenta una longitud de 8.102 pb. La cepa de referencia seleccionada para el diseño de las partículas virales de RSV fue la cepa establecida por GenBank como genoma de referencia para este patógeno (número de acceso **NC\_001803.1**). Esta cepa corresponde al subtipo A de RSV, en concreto se trata de la cepa S2 ts1C, una cepa resultante de un proceso de atenuación mediante tres ciclos de mutagénesis y posterior selección de los mutantes sensibles a temperatura [285].

Los fragmentos concretos del genoma de los virus SARS-CoV-2 y RSV incluidos en el genoma de las partículas virales se recogen en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Descripción de los fragmentos de los genes incluidos en los insertos NCO y RSV diseñados para constituir el genoma de las partículas virales de SARS-CoV-2 y RSV, respectivamente. Se especifica la localización de cada uno de los fragmentos indicando el nucleótido (nt) de inicio y fin de fragmento, respecto a las cepas del virus SARS-CoV-2 y del virus RSV consideradas de referencia (números de acceso en GenBank: MN908947.3 y NC\_001803.1, respectivamente).

Inserto NCO (2.848 pb)- SARS-CoV-2		Inserto RSV (4.374 pb)- RSV	
Gen	Localización (nt)	Gen	Localización (nt)
ORF1ab	474...906	N	1125...2329
	13332...13470		
	15421...15540	M	3224...4180
	18768...18919		
S	21565...21783	F	5619...7521
	24344...24910		
E	26259...26391	L	12440...12610
N	28277...29292		13810...13920
Longitud genoma	6.576 pb	Longitud genoma	8.102 pb

#### Virus de influenza A e influenza B

La estrategia de diseño se modificó para el desarrollo de los controles positivos de los virus de influenza A e influenza B, con el objetivo de incluir el genoma completo del virus salvaje e incrementar, de este modo, la universalidad de los controles positivos desarrollados. Para ello, se agruparon los 8 segmentos que constituyen el genoma del virus salvaje de influenza A y los 8 segmentos que constituyen el genoma del virus salvaje de influenza B en 4 construcciones, diferentes para cada virus: YIA1, YIA2, YIA3 y YIA4 y YIB1, YIB2, YIB3 y YIB4, respectivamente, tal y como se detalla en la **Tabla 23**. La agrupación en 4 construcciones de los 8 fragmentos se realizó de acuerdo con su tamaño, con el objetivo de obtener construcciones de tamaño similar para alcanzar rendimientos comparables durante el proceso de transfección. Por tanto, en este caso los controles positivos desarrollados de los virus de influenza A e influenza B son controles de tipo multiplex, ya que se componen de una mezcla de diferentes partículas virales que en su conjunto representan el genoma completo de estos virus. La estrategia de control positivo multiplex únicamente se consideró en los últimos controles positivos desarrollados, ya que su aplicación fue posible una vez validado el proceso en diseños monoplex.

**Tabla 23.** Descripción de los segmentos contenidos en el genoma viral de las diferentes partículas virales de influenza A e influenza B desarrolladas en este proyecto. Se detalla también la longitud del inserto (región del genoma viral específica de patógeno) y la longitud del genoma viral (suma de tamaños de regiones común y específica de patógeno) de cada una de las partículas virales.

Partícula viral	Genoma viral	Longitud inserto	Longitud genoma viral
YIA1	Segmentos 4 (HA) + 6 (NA) + 7 (M)	4.214 pb	7.942 pb
YIA2	Segmento 1 (PB2)	2.325 pb	6.053 pb
YIA3	Segmentos 2 (PB1) + 8 (NS)	3.199 pb	6.744 pb
YIA4	Segmentos 3 (PA) + 5 (NP)	3.766 pb	7.494 pb
YIB1	Segmentos 4 (HA) + 7 (M) + 8 (NS)	4.105 pb	7.872 pb
YIB2	Segmentos 3 (PA) + 5 (NP)	4.109 pb	7.837 pb
YIB3	Segmentos 1 (PB1) + 6 (NA)	3.897 pb	7.625 pb
YIB4	Segmento 2 (PB2)	2.376 pb	5.960 pb

La cepa de referencia seleccionada en este proyecto para el diseño de las partículas virales de influenza A fue el subtipo H1N1 pdm09, en concreto la cepa **A/Arkansas/08/2020**, ya que se trata de la secuencia más reciente depositada en GenBank por la OMS. Los números de acceso de GenBank correspondientes a los 8 segmentos que constituyen su genoma son: MW130270, MW130271, MW130272, MW130273, MW130274, MW130275, MW130276 y MW130277. Se seleccionó el subtipo H1N1 pdm09 ya que actualmente los subtipos de influenza A que se encuentran en circulación están relacionados con esta cepa, que causó una pandemia en el año 2009 [286-288]. En el caso del virus de influenza B, la cepa de referencia seleccionada fue el linaje B/Yamagata, en concreto la cepa **B/Arizona/12/2020**, ya que se trata de una secuencia depositada recientemente en GenBank por la OMS. Los números de acceso de GenBank correspondientes a los 8 segmentos que constituyen su genoma son: MT499475, MT499476, MT499477, MT499478, MT499479, MT499480, MT499481 y MT499482.

### **V.2.3 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL RNA CONTENIDO EN LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES GENERADAS *IN VITRO* MEDIANTE EL SISTEMA LENTIVIRAL**

Se generaron partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B mediante transfección en células 293T con diferentes plásmidos de transferencia (cuyo diseño se detalla en el apartado V.2.2), junto con el plásmido de empaquetamiento C. En todos los casos se verificó la generación de partículas virales de RNA mediante análisis por RT-qPCR, utilizando un ensayo específico para cada una de las partículas virales, los cuales se recogen en la **Tabla 10**.

El RNA viral contenido en las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B se cuantificó con el objetivo de ofrecer al usuario final un control positivo de concentración conocida, aportando de este modo valor añadido al producto. Se seleccionó la técnica de PCR digital para la cuantificación del RNA viral, ya que esta técnica permite la cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos sin necesidad de disponer de un estándar de referencia. La cuantificación por PCR digital se realizó utilizando el sistema QuantStudio® 3D Digital PCR (Thermo Fisher Scientific).

Se cuantificaron dos réplicas (R1 y R2) de los sobrenadantes virales que contenían partículas virales de SARS-CoV-2 (NCO), RSV (RSV), influenza A (YIA1, YIA2, YIA3 y YIA4) e influenza B (YIB1, YIB2, YIB3 y YIB4). Los resultados obtenidos tras la cuantificación por PCR digital se recogen en la **Tabla 24** y los gráficos de dispersión de los cuales derivan los datos mostrados se recogen en la **Figura S1** y la **Figura S2**.

**Tabla 24.** Resultados obtenidos tras la cuantificación de diferentes sobrenadantes virales por PCR digital mediante el sistema QuantStudio® 3D Digital PCR. Los sobrenadantes virales fueron extraídos por QIAamp® Viral RNA Mini Kit; posteriormente los ácidos nucleicos extraídos se digirieron con DNAsa y el RNA viral resultante fue sometido a una etapa previa de retrotranscripción para la obtención del cDNA viral, el cual fue diluido y amplificado por PCR digital. Abreviaturas: k: número de particiones positivas; n: número total de particiones con reacción; R1: réplica 1; R2: réplica 2. c/μl: copias/μl.

	Longitud (pb)	k	n	k/n	λ	Concentración RNA (c/μl)	Concentración media (c/μl)	CV (%)
NCO R1	6.576	12.125	16.122	0,75	1,39	6,03E+06	5,83E+06	4,73
NCO R2		12.294	16.874	0,73	1,30	5,64E+06		
RSV R1	8.102	8.597	14.598	0,59	0,89	2,26E+06	2,14E+06	8,26
RSV R2		8.060	14.741	0,55	0,79	2,01E+06		
YIA1 R1	7.942	8.616	16.477	0,52	0,74	2,26E+06	2,20E+06	3,83
YIA1 R2		8.904	15.666	0,57	0,84	2,14E+06		
YIA2 R1	6.053	7.756	15.894	0,49	0,67	2,04E+06	2,26E+06	13,77
YIA2 R2		9.816	15.774	0,62	0,97	2,48E+06		
YIA3 R1	6.744	7.509	14.716	0,51	0,71	1,82E+06	1,82E+06	0,39
YIA3 R2		9.562	16.138	0,59	0,90	1,83E+06		
YIA4 R1	7.494	9.020	15.670	0,58	0,86	1,74E+06	1,96E+06	15,51
YIA4 R2		10.028	15.304	0,66	1,06	2,17E+06		
YIB1 R1	7.872	12.188	17.225	0,71	1,23	1,13E+06	1,25E+06	14,14
YIB1 R2		9.185	17.008	0,54	0,78	1,38E+06		
YIB2 R1	7.837	12.617	17.369	0,73	1,30	1,19E+06	1,55E+06	33,30
YIB2 R2		11.700	17.736	0,66	1,08	1,92E+06		
YIB3 R1	7.625	12.504	17.703	0,71	1,23	1,12E+06	1,30E+06	19,58
YIB3 R2		8.817	15.604	0,57	0,83	1,48E+06		
YIB4 R1	5.960	9.612	17.277	0,56	0,81	3,51E+06	3,49E+06	1,01
YIB4 R2		9.908	15.940	0,62	0,97	3,46E+06		
CN R1	NA	3	16.513	0,00	0,00	1,16E+00	1,12E+06	5,05
CN R2	NA	3	17.582	0,00	0,00	1,08E+00		

Los resultados recogidos en la **Tabla 24** conducen a las siguientes valoraciones:

- 1) El título viral (en copias/μl) de los sobrenadantes virales cuantificados por PCR digital se encuentra en el mismo orden de magnitud, a pesar de contener partículas virales que difieren tanto en la secuencia de su genoma como en el tamaño de este. Estos resultados sugieren que el tamaño del RNA viral en ningún caso superó el tamaño máximo a partir del cual es frecuente observar una disminución en la eficiencia del proceso de transfección [132], por lo que queda demostrado que una longitud de genoma de hasta 8.000 pb no conduce a una disminución de la eficiencia durante la generación de las partículas virales siguiendo el protocolo optimizado en este proyecto.
- 2) La similitud en los valores de concentración indica que el protocolo de transfección utilizado es robusto y reproducible, ya que todos los sobrenadantes virales derivan de transfecciones independientes donde, en algunos casos, se utilizaron diferentes lotes de reactivos.
- 3) La concentración media de los 10 sobrenadantes virales es de 2,38E+06 copias/μl (equivalente a 2,38E+09 copias/ml), valor que concuerda con lo expuesto en la bibliografía, donde se reportan títulos virales del orden de 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> copias/ml [130, 218].

4) La variabilidad observada entre réplicas, reflejada en el valor del coeficiente de variación (calculado aplicando la ecuación 17), se encuentra dentro del rango esperado [43, 44, 289]. Este valor se ve afectado, entre otros, por el tipo de sistema de PCR digital utilizado, el número total de particiones, el valor de  $\lambda$  [55, 289] o la inclusión de un paso previo de retrotranscripción [51, 290]. El valor del coeficiente de variación reportado en diferentes estudios es variable, pero todos ellos coinciden en una mayor precisión en la cuantificación por PCR digital, frente a la cuantificación por PCR en Tiempo Real [43, 44, 289].

#### V.2.4 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO DE ENSAYOS DE RT-QPCR

Previamente a la evaluación de la funcionalidad y estabilidad de las partículas virales de RNA desarrolladas en este proyecto, las partículas virales fueron liofilizadas a una concentración concreta (especificada en la **Tabla 25**). De este modo, la evaluación de la funcionalidad y estabilidad se realizó sobre el formato definitivo para su potencial comercialización.

**Tabla 25.** Descripción del contenido de los viales de control positivo evaluados en este proyecto, así como la concentración a la que se encuentran las partículas virales en los lotes de control positivo utilizados durante los experimentos de evaluación de la funcionalidad y estabilidad.

Tipo de control positivo	Contenido por vial de control positivo	Concentración por vial de control positivo
1	Partículas virales cuyo genoma contiene diferentes fragmentos del genoma del virus SARS-CoV-2	88.000 copias/vial
2	Partículas virales cuyo genoma contiene diferentes fragmentos del genoma de RSV	11.000 copias/vial
3	Mezcla de cuatro tipos diferentes de partículas virales (YIA1, YIA2, YIA3 y YIA4) que en su conjunto contienen el genoma completo del virus de influenza A	22.000 copias/vial
4	Mezcla de cuatro tipos diferentes de partículas virales (YIB1, YIB2, YIB3 y YIB4) que en su conjunto contienen el genoma completo del virus de influenza B	88.000 copias/vial

Los diferentes ensayos de RT-qPCR que fueron utilizados durante la evaluación de la funcionalidad y estabilidad de las partículas virales, se recogen en la **Tabla 10**. Durante los ensayos de funcionalidad y estabilidad se monitorizaron un total de diez partículas virales diferentes, por lo que se requirió la detección por RT-qPCR de diez dianas distintas. Para ello, se utilizaron tanto ensayos comerciales (VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit y VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit) como ensayos *in-house*. Se recurrió al desarrollo de estos últimos cuando la diana que interesaba monitorizar no se encontraba contemplada en ningún ensayo comercial.

En los próximos apartados se recogen los resultados obtenidos en los diferentes ensayos dirigidos a evaluar la funcionalidad de las partículas virales.

### V.2.4.1 ANÁLISIS DE COMPATIBILIDAD CON DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En este apartado se recogen los resultados obtenidos tras evaluar la funcionalidad de las partículas virales al ser procesadas mediante diferentes sistemas de extracción comerciales, recogidos en la **Tabla 11**. Se establecieron unos criterios, basados en la desviación típica ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación (CV) de los valores de  $C_q$ , para considerar si un determinado sistema de extracción resultaba compatible con las partículas virales sometidas a evaluación, tal y como se describe en el apartado III.9.1. La variabilidad en la comparativa intra-extractor debe cumplir el criterio  $\sigma \leq 1$  y  $CV \leq 5\%$ , mientras que la variabilidad en la comparativa inter-extractor debe cumplir el criterio  $\sigma \leq 2$  y  $CV \leq 10\%$ . Los resultados obtenidos (valor de  $C_q$  medio, desviación típica y coeficiente de variación) tras someter las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B a diferentes sistemas de extracción se recogen en la **Tabla 26**, **Tabla 27** y **Tabla 28**.

**Tabla 26.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de compatibilidad de las partículas virales de SARS-CoV-2 y RSV con diferentes sistemas de extracción ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ). El análisis por RT-qPCR se realizó con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit y VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, respectivamente, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

Sistema de extracción	Tipo de comparativa	SARS-CoV-2			RSV		
		Gen <i>ORF1ab</i> (FAM)			Gen <i>N</i> (Cy5)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
1	Intra-extractor	25,71	0,48	1,86	27,16	0,15	0,56
2	Intra-extractor	27,07	0,44	1,63	27,59	0,19	0,69
3	Intra-extractor	25,37	0,27	1,08	27,70	0,75	2,70
4	Intra-extractor	25,61	0,34	1,34	26,67	0,18	0,67
5	Intra-extractor	25,70	0,26	1,00	28,35	0,40	1,42
6	Intra-extractor	26,99	0,71	2,65	27,20	0,21	0,76
7	Intra-extractor	27,24	0,28	1,02	28,86	0,43	1,48
1-7	Inter-extractor	26,17	0,85	3,25	27,65	0,79	2,85

**Tabla 27.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de compatibilidad de las partículas virales de influenza A con diferentes sistemas de extracción ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ). El análisis por RT-qPCR se realizó con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviaturas: extr: extracción.

Sistema de extr.	Tipo de comparativa	Gen M (FAM)			Gen PB2 (FAM)			Gen NS (FAM)			Gen PA (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
1	Intra-extractor	26,97	0,22	0,83	26,38	0,10	0,37	26,61	0,09	0,35	25,02	0,19	0,76
2	Intra-extractor	27,89	0,18	0,64	28,00	0,29	1,05	28,78	0,17	0,59	26,91	0,09	0,34
3	Intra-extractor	27,28	0,16	0,58	25,95	0,44	1,69	26,62	0,11	0,40	24,86	0,14	0,58
4	Intra-extractor	27,08	0,16	0,60	26,22	0,05	0,17	26,54	0,07	0,26	25,22	0,09	0,34
5	Intra-extractor	28,99	0,68	2,36	29,03	0,90	3,10	29,59	0,87	2,94	27,67	0,86	3,11
6	Intra-extractor	28,06	0,12	0,43	27,43	0,18	0,64	27,47	0,38	1,37	25,70	0,22	0,86
7	Intra-extractor	28,84	0,24	0,84	28,42	0,19	0,67	28,80	0,41	1,41	27,25	0,29	1,05
1-7	Inter-extractor	27,77	0,76	2,74	27,36	1,11	4,05	27,82	1,18	4,23	26,07	1,07	4,10

**Tabla 28.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de compatibilidad de las partículas virales de influenza B con diferentes sistemas de extracción ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ). El análisis por RT-qPCR se realizó con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Extr: extracción.

Sistema de extr.	Tipo de comparativa	Gen M (ROX)			Gen NP (FAM)			Gen NA (FAM)			Gen PB2 (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
1	Intra-extractor	24,36	0,21	0,86	26,42	0,51	1,91	25,17	0,14	0,57	24,70	0,25	1,02
2	Intra-extractor	25,17	0,27	1,08	26,47	0,34	1,28	27,05	0,48	1,78	27,11	0,49	1,79
3	Intra-extractor	24,65	0,09	0,38	24,86	0,09	0,37	25,99	0,13	0,49	25,88	0,37	1,41
4	Intra-extractor	24,44	0,13	0,52	26,10	0,18	0,68	25,29	0,36	1,44	24,98	0,16	0,64
5	Intra-extractor	25,88	0,23	0,90	27,43	0,34	1,25	27,12	0,27	0,99	27,78	0,24	0,85
6	Intra-extractor	25,54	0,52	2,03	27,66	0,35	1,26	27,28	0,81	2,96	26,83	0,52	1,93
7	Intra-extractor	26,18	0,31	1,17	29,22	0,49	1,69	27,54	0,48	1,75	27,16	0,24	0,88
1-7	Inter-extractor	25,17	0,72	2,88	26,88	1,34	4,97	26,49	1,01	3,82	26,35	1,15	4,36

Se puede observar, en los resultados mostrados en las tablas anteriores, que en todos los casos la variabilidad intra-extractor fue mínima. La variabilidad de los valores de  $C_q$ , obtenidos tras procesar una determinada partícula viral por un determinado sistema de extracción, se encontró dentro de los parámetros aceptables de  $\sigma \leq 1$  y  $CV \leq 5\%$ . Por otra parte, se puede observar que la variabilidad inter-extractor también se encontró dentro de los parámetros aceptables de  $\sigma \leq 2$  y  $CV \leq 10\%$ , lo que indica que las partículas virales desarrolladas en este proyecto se extraen con un rendimiento similar mediante todos los sistemas de extracción analizados. Las

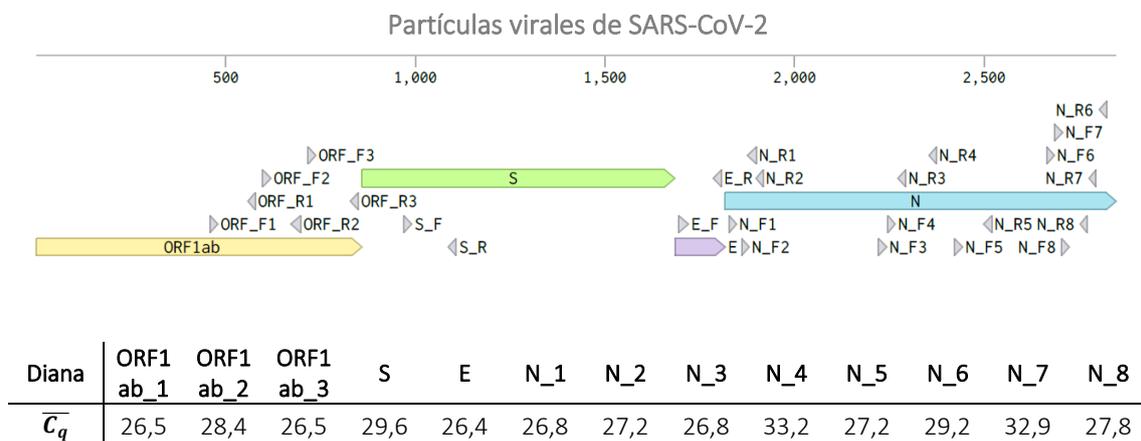
diferencias observadas en el valor de  $C_q$  medio, entre los diferentes tipos de partícula viral, se debe a la diferencia de concentración a la que se liofilizó cada partícula viral (indicada en la **Tabla 25** del apartado V.2.4) y al ensayo de RT-qPCR utilizado para su detección. Esto es debido a que el valor de  $C_q$  es dependiente de la concentración del RNA viral y de la eficiencia de amplificación propia de cada ensayo de RT-qPCR, respectivamente.

La mínima variabilidad observada en los resultados, tras extraer las partículas virales evaluadas por diferentes sistemas de extracción comerciales, confirma la validez de las partículas virales como control del proceso de extracción.

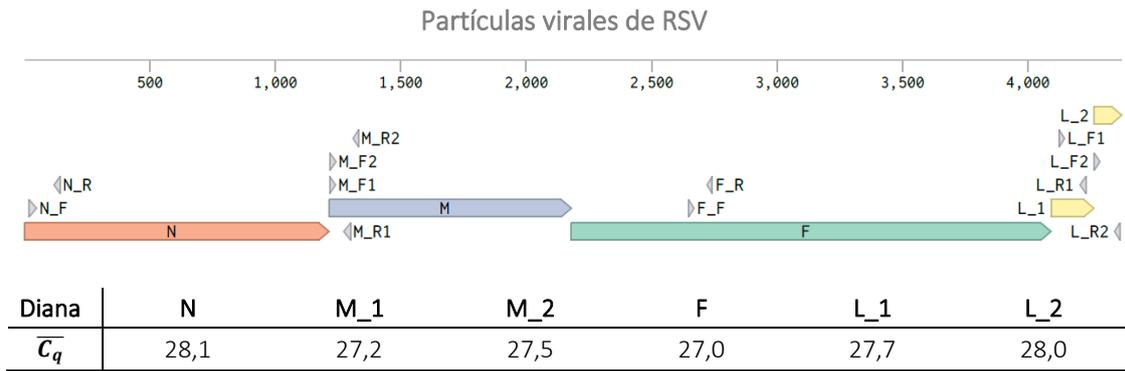
### V.2.4.2 ANÁLISIS DE COMPATIBILIDAD CON DIFERENTES ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL

A lo largo de este apartado se recogen los resultados obtenidos tras evaluar la funcionalidad de las partículas virales, siguiendo el protocolo III.9.2, mediante diferentes conjuntos de cebadores y sonda. Las partículas virales de influenza A e influenza B, al contener el genoma completo de ambos patógenos, presumiblemente serían compatibles con cualquier ensayo de RT-qPCR dirigido a la detección de estos virus. Sin embargo, las partículas virales de SARS-CoV-2 y RSV, al contener diferentes fragmentos del genoma de ambos patógenos, serían compatibles con aquellos ensayos de RT-qPCR cuya diana estuviese incluida en el genoma de las partículas virales desarrolladas (ver **Tabla 22**).

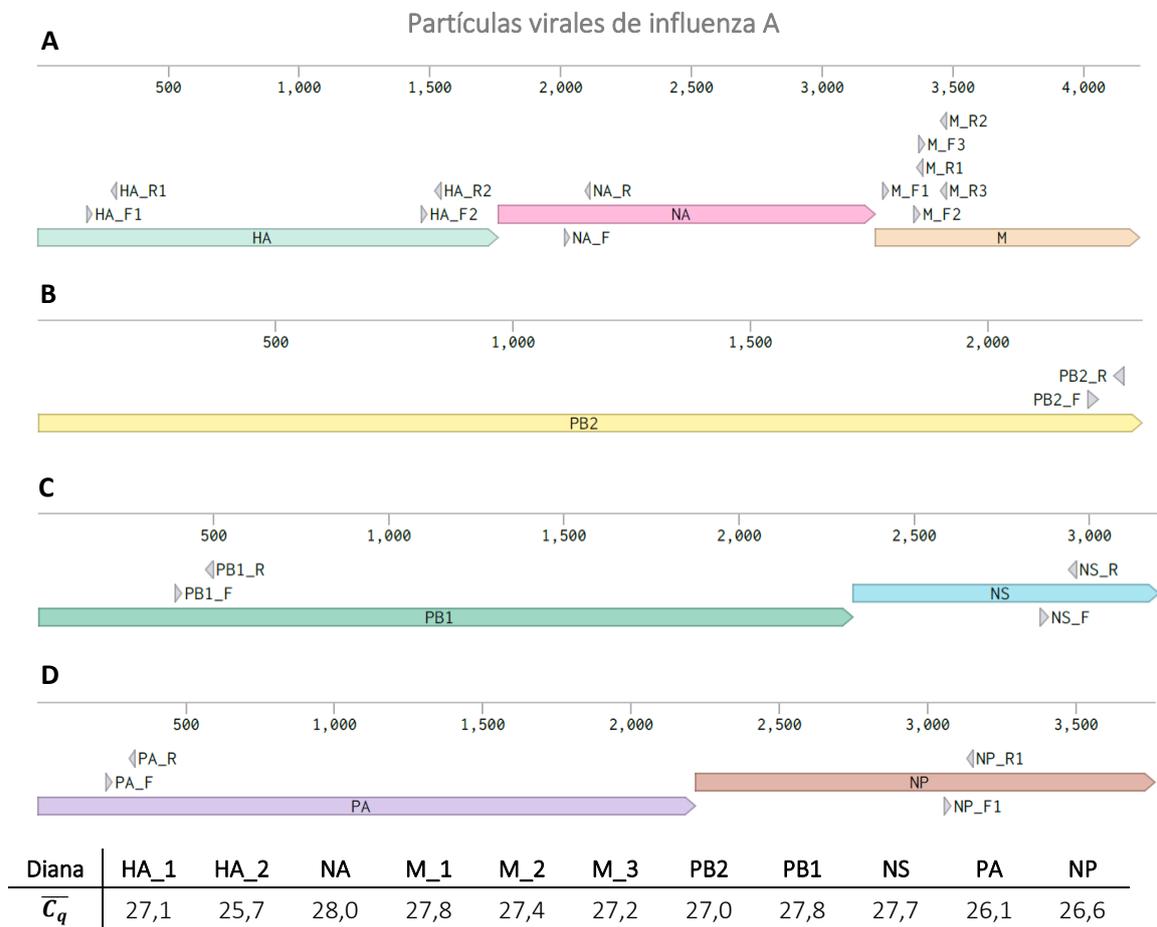
Las zonas de hibridación de los distintos conjuntos de cebadores y sonda con el genoma de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, así como los valores de  $C_q$  obtenidos en cada ensayo de RT-qPCR, se muestran en la **Figura 32**, **Figura 33**, **Figura 34** y **Figura 35**, respectivamente.



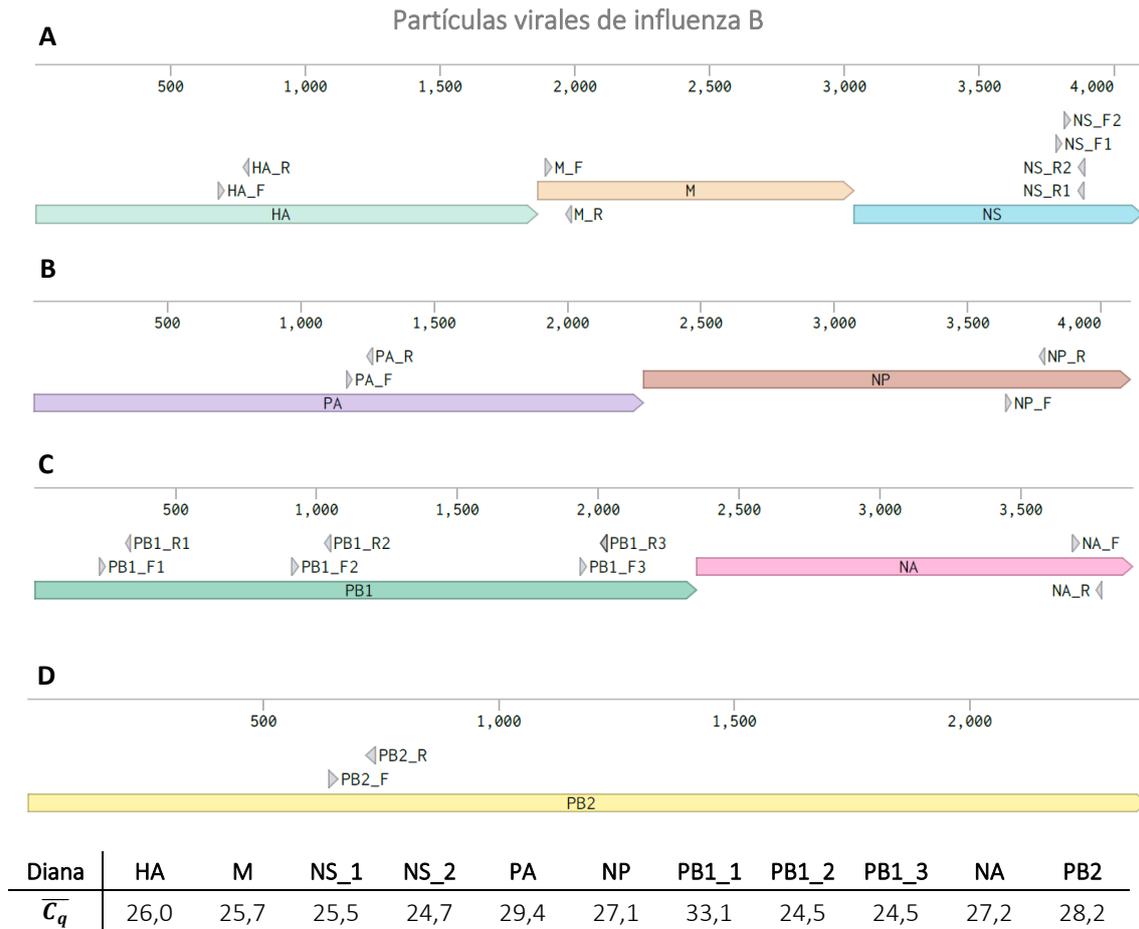
**Figura 32.** Esquema de hibridación y valores de  $C_q$  obtenidos tras analizar por RT-qPCR las partículas virales de SARS-CoV-2 (previamente extraídas) con diferentes conjuntos de cebadores y sonda.



**Figura 33.** Esquema de hibridación y valores de  $C_q$  obtenidos tras analizar por RT-qPCR las partículas virales de RSV (previamente extraídas) con diferentes conjuntos de cebadores y sonda.



**Figura 34.** Esquema de hibridación y valores de  $C_q$  obtenidos tras analizar por RT-qPCR las partículas virales de influenza A (previamente extraídas) con diferentes conjuntos de cebadores y sonda.



**Figura 35.** Esquema de hibridación y valores de  $C_q$  obtenidos tras analizar por RT-qPCR las partículas virales de influenza B (previamente extraídas) con diferentes conjuntos de cebadores y sonda.

Se puede observar que todos los conjuntos de cebadores y sonda evaluados dieron una señal positiva en RT-qPCR, indicando la presencia, en el genoma de la partícula viral, del fragmento o gen diana analizado. Un análisis exhaustivo de la secuencia de cada genoma viral se contempla en el apartado V.2.7.

Por otra parte, las partículas virales desarrolladas en este proyecto se evaluaron por todos aquellos productos VIASURE Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec S.L.) destinados a la identificación por RT-qPCR de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B; y por otros kits comerciales de RT-qPCR. Tras este análisis, se observó en todos los casos amplificación por RT-qPCR de las partículas virales evaluadas y, por tanto, se confirmó su compatibilidad con todos los kits VIASURE Real Time PCR Detection Kit y, a su vez, se demostró la compatibilidad de las partículas virales de SARS-CoV-2 con el ensayo comercial Xpert® Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid) y la compatibilidad de las partículas virales de RSV, influenza A e influenza B con los ensayos comerciales Genesig® Real Time PCR SARS-CoV-2 Winterplex (Genesig) y SARS-CoV-2/FLU/RSV REALTIME PCR KIT (Vircell).

### V.2.4.3 ANÁLISIS DE LA REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA.

Se evaluó la variabilidad que sufría el valor de  $C_q$ , obtenido mediante análisis por RT-qPCR, tras procesar las partículas virales en diferentes condiciones de ensayo, siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.9.3, con el objetivo de analizar la reproducibilidad y repetibilidad de las partículas virales desarrolladas en este proyecto.

Se consideró que las partículas virales mostraban unos elevados valores de reproducibilidad y repetibilidad cuando los resultados obtenidos cumplían el criterio  $\sigma \leq 1$  y  $CV \leq 5\%$ , excepto en el ensayo de inter-equipamiento. En este último se asumió una mayor variabilidad, consecuencia de la utilización de diferentes equipos de extracción y diferentes termocicladores y, por tanto, se amplió el criterio a los valores de  $\sigma \leq 2$  y  $CV \leq 10\%$ , tal y como se detalla en el apartado III.9.3. Los valores de media, desviación típica y coeficiente de variación obtenidos en los diferentes ensayos de precisión, realizados para la evaluación de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, se muestran en la **Tabla 29**, **Tabla 30** y **Tabla 31**.

**Tabla 29.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la reproducibilidad y repetibilidad de las partículas virales de SARS-CoV-2 y RSV. Extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit y VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, respectivamente, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. En el ensayo de inter-equipamiento también se incluye la extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit y MagDEA DxSV Kit y la utilización de los termocicladores V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform y CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System.

		SARS-CoV-2	RSV
Tipo de ensayo	Parámetro	Gen <i>ORF1ab</i> (FAM)	Gen N (Cy5)
Intra-ensayo	$\bar{x}$	25,59	27,36
	$\sigma$	0,68	0,21
	CV (%)	2,67	0,78
Inter-ensayo	$\bar{x}$	26,14	27,61
	$\sigma$	1,07	0,43
	CV (%)	4,08	1,57
Inter-operador	$\bar{x}$	25,72	27,61
	$\sigma$	1,21	0,22
	CV (%)	4,69	0,81
Inter-lote	$\bar{x}$	25,62	27,15
	$\sigma$	0,57	0,19
	CV (%)	2,22	0,70
Inter-equipamiento	$\bar{x}$	26,09	28,66
	$\sigma$	0,70	0,78
	CV (%)	2,68	2,71

**Tabla 30.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la reproducibilidad y repetibilidad de las partículas virales de influenza A. Extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. En el ensayo de inter-equipamiento también se incluye la extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit y MagDEA DxSV Kit y la utilización de los termocicladores V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform y CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System.

Tipo de ensayo	Parámetro	Gen M (FAM)	Gen PB2 (FAM)	Gen NS (FAM)	Gen PA (FAM)
Intra-ensayo	$\bar{x}$	27,11	26,47	26,15	25,21
	$\sigma$	0,14	0,11	0,10	0,10
	CV (%)	0,53	0,43	0,38	0,42
Inter-ensayo	$\bar{x}$	27,29	26,46	26,43	25,22
	$\sigma$	0,24	0,08	0,26	0,12
	CV (%)	0,89	0,30	0,98	0,49
Inter-operador	$\bar{x}$	27,26	26,46	26,26	25,10
	$\sigma$	0,25	0,27	0,22	0,12
	CV (%)	0,92	1,02	0,85	0,46
Inter-lote	$\bar{x}$	26,97	26,38	26,61	25,11
	$\sigma$	0,22	0,12	0,14	0,09
	CV (%)	0,81	0,44	0,53	0,35
Inter-equipamiento	$\bar{x}$	28,36	27,14	27,20	26,01
	$\sigma$	0,75	0,53	0,60	0,58
	CV (%)	2,66	1,94	2,22	2,21

**Tabla 31.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la reproducibilidad y repetibilidad de las partículas virales de influenza B. Extracción de ácidos nucleicos con QIAamp® Viral RNA Mini Kit y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house, en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. En el ensayo de inter-equipamiento también se incluye la extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit y MagDEA DxSV Kit y la utilización de los termocicladores V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform y CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System.

Tipo de ensayo	Parámetro	Gen M (ROX)	Gen NP (FAM)	Gen NA (FAM)	Gen PB2 (FAM)
Intra-ensayo	$\bar{x}$	24,33	26,46	25,12	24,52
	$\sigma$	0,39	0,23	0,36	0,18
	CV (%)	1,61	0,87	1,43	0,72
Inter-ensayo	$\bar{x}$	24,31	26,04	25,74	24,84
	$\sigma$	0,55	0,55	0,53	0,36
	CV (%)	2,27	2,12	2,05	1,43
Inter-operador	$\bar{x}$	23,77	25,63	25,31	25,28
	$\sigma$	0,17	0,13	0,13	0,11
	CV (%)	0,69	0,52	0,52	0,44
Inter-lote	$\bar{x}$	24,31	26,38	25,20	24,70
	$\sigma$	0,26	0,48	0,30	0,29
	CV (%)	1,06	1,84	1,20	1,16
Inter-equipamiento	$\bar{x}$	25,26	27,29	27,09	26,67
	$\sigma$	1,47	1,48	1,70	1,93
	CV (%)	5,83	5,42	6,27	7,25

Tras analizar los resultados mostrados en la **Tabla 29**, **Tabla 30** y **Tabla 31**, se observa en todos los casos unos valores de desviación típica y coeficiente de variación dentro del rango establecido, lo que indica que las partículas virales evaluadas presentan una elevada reproducibilidad y repetibilidad, a pesar de ser procesadas en diferentes escenarios: diferentes lotes de partículas virales, diferentes días de análisis, por distintos operadores y con modificaciones en el flujo de trabajo respecto a los equipos de extracción y termocicladores utilizados.

En este punto concluyeron los diferentes experimentos realizados con el objetivo de validar la funcionalidad de las partículas virales desarrolladas. Estas se procesaron siempre junto con un vial de control negativo, el cual mostró un resultado negativo tras ser extraído por los diferentes sistemas de extracción contemplados en este estudio y, posteriormente, amplificado por todos los ensayos de RT-qPCR analizados. De este modo, por una parte, se verificó que el control negativo cumplía con su intención de uso y, por otra parte, se validaron los resultados obtenidos en los diferentes análisis de funcionalidad de las partículas virales.

## **V.2.5 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA**

A lo largo de este apartado se detallan los resultados derivados de los diferentes experimentos de estabilidad que se llevaron a cabo con el objetivo de determinar la vida útil de las partículas virales, así como su estabilidad durante el transporte. También fue necesario evaluar la estabilidad de las partículas virales en una serie de condiciones que pueden ocurrir cuando son manipuladas por el usuario final, por lo que se estudió a su vez la estabilidad de las partículas virales una vez reconstituido el líofilo y la estabilidad del ácido nucleico una vez extraídas las partículas virales.

Los ensayos de RT-qPCR que fueron utilizados para evaluar la estabilidad de las partículas virales se recogen en la **Tabla 10**. Durante los ensayos de estabilidad se realizaron dos tipos de análisis (partícula viral extraída y partícula viral no extraída), detallados en el apartado III.10, con el objetivo de valorar la estabilidad del RNA viral y la integridad de la partícula viral. En función del resultado obtenido en ambos análisis, se asignó una determinada calificación, de acuerdo con los criterios recogidos en la **Tabla 14**. La calificación puede oscilar entre los valores 0, 1, 2 y 3, siendo 0 indicativo de un fallo durante el proceso de RT-qPCR, que requiere la repetición del ensayo; la calificación 1 implica que la partícula viral no es estable en las condiciones analizadas; y las calificaciones 2 y 3 son indicativas de una elevada estabilidad (mayor en el caso de obtener una calificación 3) de la partícula viral en las condiciones analizadas.

### **V.2.5.1 DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LAS PARTÍCULAS VIRALES MEDIANTE ENVEJECIMIENTO ACELERADO**

Los experimentos de envejecimiento acelerado permiten determinar la vida útil de un producto en un corto periodo de tiempo, exponiendo al producto a una temperatura superior a la temperatura de almacenamiento. Los fundamentos del método de envejecimiento acelerado que fue aplicado y las condiciones específicas a las que fueron sometidas las partículas virales se detallan en el apartado III.10.1. El experimento de envejecimiento acelerado (realizado a temperatura de 50°C), se llevó a cabo de forma paralela con un experimento de envejecimiento

real (realizado a temperaturas de 25°C y 4°C) y, por este motivo, en los resultados mostrados se consideran estas tres temperaturas.

Los resultados obtenidos tras extraer y analizar por RT-qPCR, a diferentes tiempos, las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, las cuales fueron incubadas a las temperaturas de 4°C, 25°C y 50°C, se recogen en la **Tabla S1**, **Tabla S2**, y **Tabla S4**, respectivamente. La calificación obtenida tras considerar los resultados anteriores, donde se analizan las partículas virales extraídas, junto con los resultados derivados del análisis de las partículas virales no extraídas, se recoge en la **Tabla 32** (SARS-CoV-2) y **Tabla 33** (RSV, influenza A e influenza B).

**Tabla 32.** Calificaciones obtenidas durante el experimento de envejecimiento acelerado, de las partículas virales de SARS-CoV-2, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer.

Días	Temperatura	Gen <i>ORF1ab</i> (FAM)
0	25°C	3
7	25°C	2
	4°C	2
	50°C	2
17	25°C	2
	4°C	2
	50°C	2
30	25°C	2
	4°C	2
	50°C	3
51	25°C	2
	4°C	2
	50°C	2
70	25°C	2
	4°C	3
	50°C	2
114	25°C	2
	4°C	3
	50°C	2
150	25°C	2
	4°C	2
	50°C	3

**Tabla 33.** Calificaciones obtenidas durante los experimentos de envejecimiento acelerado, de las partículas virales de influenza A, influenza B y RSV, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer.

Días	Temperatura	Influenza A				Influenza B				RSV
		M (FAM)	PB2 (FAM)	NS (FAM)	PA (FAM)	M (ROX)	NP (FAM)	NA (FAM)	PB2 (FAM)	N (Cy5)
0	25°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
30	25°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	50°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
90	25°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	50°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
150	25°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	3	3	2	2
	50°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Se puede observar que, en todas las temperaturas y puntos de tiempo analizados, para las diferentes partículas virales evaluadas, se obtuvieron calificaciones de 2 y 3. Si en el sistema de calificación únicamente se considerasen los resultados del análisis de las partículas virales extraídas, en la gran mayoría de condiciones se obtendría una calificación 3, pero el análisis de las partículas virales no extraídas disminuye la calificación a un valor de 2. Ambos valores indican una buena estabilidad tanto del RNA viral como de la estructura externa del virus. Considerando los resultados favorables obtenidos en el envejecimiento acelerado de las diferentes partículas virales, durante 150 días a temperatura de 50°C, se determinó una vida útil de las partículas virales analizadas de mínimo 2 años, cuando estas son almacenadas a temperatura ambiente. La equivalencia entre los tiempos acelerado y real se detalla en el apartado III.10.1.

### V.2.5.2 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD EN USO DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

Los experimentos de estabilidad en uso contemplados en este proyecto se orientaron a determinar la estabilidad de las partículas virales una vez reconstituido el liófilo. Los viales de control positivo, que contienen las partículas virales liofilizadas, fueron diseñados para ser de un único uso y, por tanto, se prevé su procesamiento inmediato tras la rehidratación del liófilo. A pesar de ello, se plantearon diferentes escenarios (detallados en el apartado III.10.2) en los que se evaluó la estabilidad de las partículas virales reconstituidas. El objetivo es ofrecer al usuario final una serie de pautas a seguir, sin comprometer la estabilidad del producto, en el caso en el que se haya reconstituido el vial de control positivo, pero este no pueda ser procesado de inmediato.

Los resultados obtenidos tras extraer y analizar por RT-qPCR, en diferentes puntos de tiempo, las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B reconstituidas e incubadas a las temperaturas de 4°C y 25°C, se recogen en la **Tabla S5**, **Tabla S6**, **Tabla S7** y **Tabla S8**, respectivamente. La calificación obtenida tras considerar los resultados anteriores, donde se analizan las partículas virales extraídas, junto con los resultados derivados del análisis de las partículas virales no extraídas, se recoge en la **Tabla 34** (SARS-CoV-2) y **Tabla 35** (RSV, influenza A e influenza B).

**Tabla 34.** Calificaciones obtenidas durante el análisis de la estabilidad en uso, de las partículas virales de SARS-CoV-2, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer.

Tiempo	Temperatura	Gen <i>ORF1ab</i> (FAM)
0h	25°C	3
5h	25°C	2
	4°C	3
1 día	25°C	2
	4°C	2
2 días	25°C	2
	4°C	2
3 días	25°C	2
	4°C	2
8 días	25°C	3
	4°C	3

**Tabla 35.** Calificaciones obtenidas durante el análisis de la estabilidad en uso, de las partículas virales de influenza A, influenza B y RSV, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer.

Días	Temperatura	Influenza A				Influenza B				RSV
		M (FAM)	PB2 (FAM)	NS (FAM)	PA (FAM)	M (ROX)	NP (FAM)	NA (FAM)	PB2 (FAM)	N (Cy5)
0	25°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1	25°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	25°C	2	2	2	2	2	3	2	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	3	2	2	2
7	25°C	2	2	3	2	2	2	3	2	2
	4°C	2	2	3	2	2	2	2	2	2
14	25°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4°C	2	2	2	2	2	2	3	2	2

Se puede observar que en todas las temperaturas y puntos de tiempo analizados, para las diferentes partículas virales evaluadas, se obtuvieron calificaciones de 2 y 3. Los resultados anteriores indican que es posible almacenar, a las temperaturas de 25°C y 4°C, los viales de control positivo reconstituidos de SARS-CoV-2 durante mínimo 8 días (pendiente de evaluar un periodo de tiempo mayor). En el caso de las partículas virales de RSV, influenza A e influenza B, durante un tiempo mínimo de 14 días, lo que permite al usuario final disponer de un amplio margen de tiempo para procesar las partículas virales rehidratadas. Además, los resultados obtenidos sugieren que este tiempo podría ser aún más prolongado, ya que las partículas virales mostraron una elevada estabilidad en las condiciones ensayadas.

Por otra parte, los resultados obtenidos tras extraer y analizar por RT-qPCR las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B reconstituidas y sometidas a un ciclo de congelación y descongelación a las temperaturas de -20°C y -80°C, se recogen en la **Tabla S5**, **Tabla S6**, **Tabla S7** y **Tabla S8**, respectivamente. La calificación obtenida tras considerar los resultados anteriores, donde se analizan las partículas virales extraídas, junto con los resultados derivados del análisis de las partículas virales no extraídas, se recoge en la **Tabla 36**.

**Tabla 36.** Calificaciones obtenidas durante el análisis de la estabilidad en uso, de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer. Abreviaturas: T: temperatura.

Días	T	SARS-CoV-2	Influenza A				Influenza B				RSV
		ORF1ab (FAM)	M (FAM)	PB2 (FAM)	NS (FAM)	PA (FAM)	M (ROX)	NP (FAM)	NA (FAM)	PB2 (FAM)	N (Cy5)
0	25°C	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
30	-20°C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	-80°C	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2

Los resultados mostrados en la **Tabla 36** indican que someter a los viales de control positivo reconstituidos a un ciclo de congelación y descongelación, a las temperaturas de -20°C y -80°C, no compromete la estabilidad de las partículas virales. Se valora ampliar este estudio evaluando la resistencia a la congelación y descongelación ante un número mayor de ciclos, con el objetivo de localizar el punto crítico en el cual se produce una pérdida significativa de la estabilidad de las partículas virales.

Por último, el ácido nucleico extraído de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B se sometió a 10 ciclos de congelación y descongelación y los resultados obtenidos se encontraron dentro del rango de valores aceptado, por lo que se confirmó la estabilidad del RNA extraído durante al menos 10 ciclos de congelación y descongelación.

### V.2.5.3 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD EN EL TRANSPORTE DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

Se prevé la exportación a diferentes países de los productos desarrollados en este proyecto. Debido a ello, durante su transporte se pueden ver sujetos a diferentes cambios de temperatura, presión o humedad. La liofilización de las partículas virales no solo incrementa su estabilidad, sino que además permite su transporte y almacenamiento a temperatura ambiente.

Las partículas virales contenidas en los kits transportados fueron analizadas por RT-qPCR, junto a las partículas virales contenidas en los kits homólogos no transportados (control), tal y como se detalla en el apartado III.10.3. Los resultados derivados de este análisis en las partículas virales de SARS-CoV-2, influenza A e influenza B se recogen en la **Tabla S9**, **Tabla S10** y **Tabla S11**, respectivamente. La calificación obtenida tras considerar los resultados anteriores, donde se analizan las partículas virales extraídas, junto con los resultados derivados del análisis de las partículas virales no extraídas, se recoge en la **Tabla 37**.

**Tabla 37.** Calificaciones obtenidas en el análisis de la estabilidad en el transporte, de las partículas virales de SARS-CoV-2, influenza A e influenza B, tras considerar los análisis de la partícula viral extraída y sin extraer.

Condición	SARS-CoV-2	Influenza A				Influenza B			
	ORF1ab (FAM)	M (FAM)	PB2 (FAM)	NS (FAM)	PA (FAM)	M (ROX)	NP (FAM)	NA (FAM)	PB2 (FAM)
Control	2	2	2	2	2	2	2	3	2
Transportado	3	2	2	2	2	2	3	3	2

Los resultados mostrados en la **Tabla 37**, donde se observan calificaciones de 2 y 3, confirman la estabilidad de las partículas virales, a pesar de las diferentes temperaturas y presiones a las que estuvieron sometidas durante su transporte.

## V.2.6 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES DE RNA

Durante el desarrollo de las partículas virales recombinantes de RNA se implementaron las medidas de bioseguridad descritas en el apartado III.4.5, con el objetivo de generar partículas virales no infecciosas. En este apartado se muestran los resultados derivados del análisis de la capacidad infectiva de las partículas virales, evaluada sobre un cultivo de células 293T mediante selección con puromicina. Previamente a este análisis se seleccionó, siguiendo el protocolo III.4.5.1, la concentración de puromicina a la que las células 293T no infectadas son sensibles y, por tanto, a esta concentración de antibiótico su crecimiento se ve afectado. Los valores de confluencia observados en el cultivo de 293T en un medio a diferentes concentraciones de puromicina, durante el transcurso de 8 días que duró el experimento, se muestran en la **Tabla 38**.

**Tabla 38.** Resultados de los valores de confluencia observados en células 293T cultivadas durante 8 días en medio DMEM en presencia de SFB al 5% y diferentes concentraciones de puromicina. La puromicina se comienza a incorporar al medio de cultivo a partir del día 3.

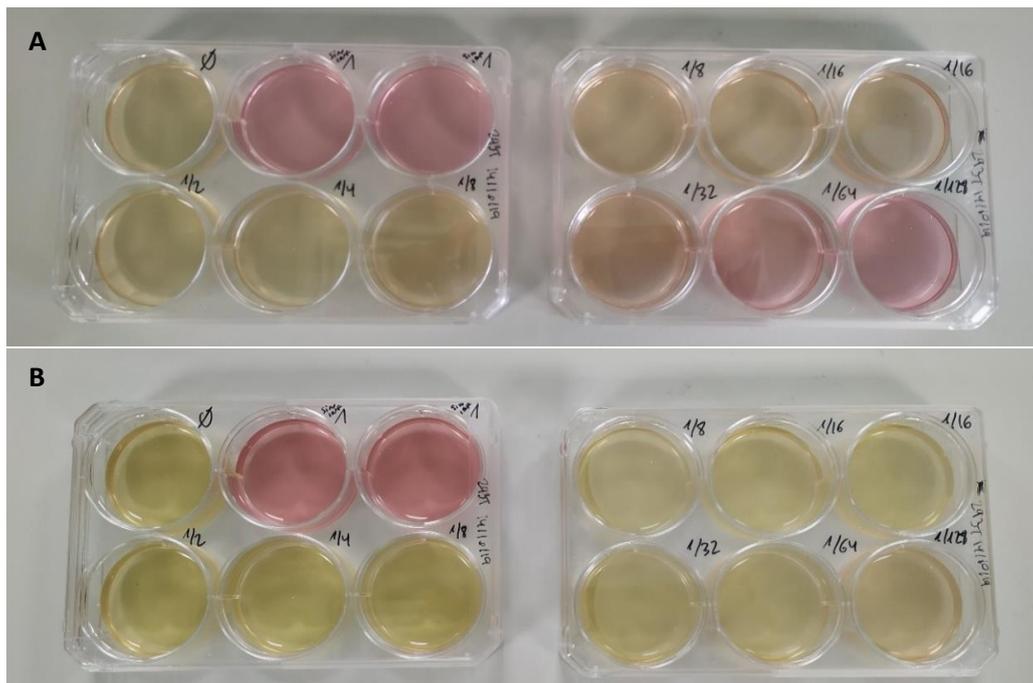
	Concentración de puromicina						
	0 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	6 µg/ml
DÍA 2	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%
DÍA 3	70%	60%	50%	20%	0%	0%	0%
DÍA 4	100%	85%	50%	10%	0%	0%	0%
DÍA 7	100%	100%	10%	0%	0%	0%	0%
DÍA 8	85%	100%	5%	0%	0%	0%	0%

Los resultados mostrados en la **Tabla 38** indican que las células 293T son resistentes a una concentración de puromicina de 0,25 µg/ml y comienzan a ser sensibles a partir de una concentración de puromicina de 0,5 µg/ml. La muerte celular observada el día 8 en la condición control (0 µg/ml de puromicina) se debe a un exceso de confluencia, debido al cual las células pierden la capacidad de adherirse a la placa de cultivo. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó para continuar con los experimentos de infección la concentración de puromicina de 1 µg/ml, ya que esta condición permite concluir el experimento de infección en un periodo de 7 días, durante el cual se puede observar la muerte celular progresiva que ocurre en el cultivo de células 293T cuando este no ha sido infectado.

Se determinó la multiplicidad de infección de las partículas virales de chikungunya que poseían proteína de envuelta, las cuales, presumiblemente, son infecciosas, sobre un cultivo de células 293T en presencia de puromicina a concentración 1 µg/ml, siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.4.5.2. El aspecto de las placas de cultivo pasados cinco y ocho días tras la infección de las células 293T con las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 del sobrenadante viral que contenía las partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta se muestra en la **Figura 36A** y **Figura 36B** respectivamente. Por otra parte, el aspecto de las placas de cultivo pasados ocho días tras la infección de las células 293T con las diluciones 1/10<sup>1</sup>, 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>,

$1/10^4$ ,  $1/10^5$ ,  $1/10^6$  y  $10^7$  del mismo sobrenadante viral mencionado anteriormente se muestra en la **Figura 37A**, junto con la imagen de una colonia aislada de células 293T resistentes a puromicina (**Figura 37B**).

Debe considerarse que el color del medio DMEM, en el cual se cultivan las células 293T, es un indicativo indirecto de la confluencia celular, debido a la presencia de rojo de fenol en su composición. En valores de pH superiores a 8 el cultivo adquiere una tonalidad violeta, en valores de pH comprendidos entre 6,8-8 la tonalidad es rojiza-naranja y en valores de pH inferiores a 6,8 el color se torna amarillo. Cuando el cultivo alcanza la confluencia, es decir, hay un 100% de ocupación de la placa de cultivo por las células 293T, los nutrientes del medio DMEM se han consumido y el medio se ha acidificado, lo que conduce a un color amarillo del mismo.

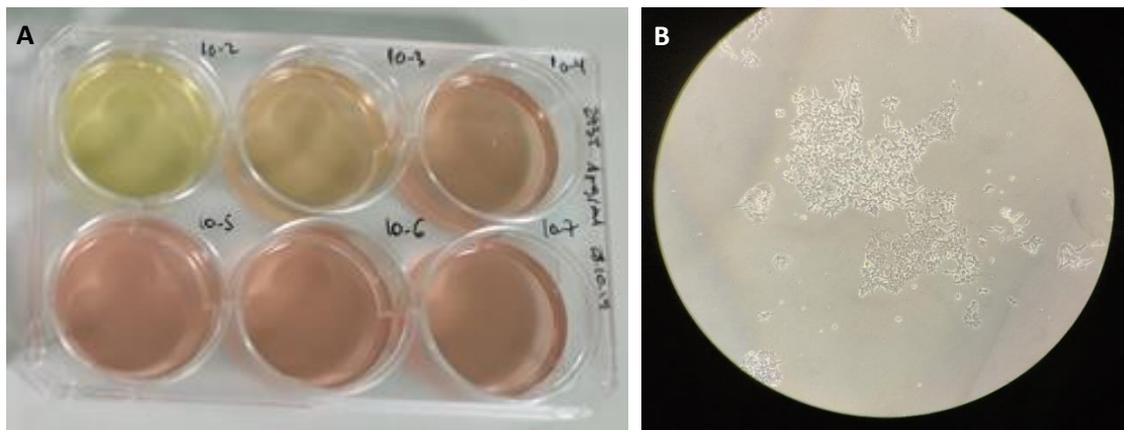


**Figura 36.** Apariencia de las placas de cultivo pasados cinco (A) y ocho (B) días tras la infección de las células 293T con diferentes diluciones de un sobrenadante viral, que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta, y posterior selección con puromicina a concentración  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . De izquierda a derecha y de arriba abajo: control I (células 293T no infectadas y crecidas en ausencia de puromicina); control II (células 293T no infectadas y crecidas en presencia de puromicina); dilución  $1/2$  del sobrenadante viral; dilución  $1/4$ ; dilución  $1/8$  (2 pocillos); dilución  $1/16$  (2 pocillos), dilución  $1/32$ , dilución  $1/64$  y dilución  $1/128$ .

En la **Figura 36A** se puede observar que el color del medio pasados 5 días desde la infección es más amarillo conforme más concentrado se encontraba el sobrenadante viral con el que se infectaron las células 293T, lo que sugiere que a mayor concentración del sobrenadante viral, un mayor número de células 293T crecieron en la placa y, por tanto, adquirieron la resistencia a puromicina. Esta observación se confirmó mediante visualización al microscopio, donde se observó un 90% de confluencia en los pocillos correspondientes a la infección con las diluciones  $1/64$  y  $1/128$  del sobrenadante viral, un 95% en los pocillos correspondientes a las diluciones  $1/32$  y  $1/16$  y un 100% de confluencia en los pocillos de las diluciones  $1/2$ ,  $1/4$  y  $1/8$ . En la **Figura 36B** se observa que pasados 8 días desde la infección, todos los pocillos donde hubo infección con el sobrenadante viral presentaron un color amarillo similar, lo que se confirmó mediante visualización al microscopio donde se observó una confluencia del 100% en todos los casos. Por otra parte, se observó la misma confluencia del 100% en la condición control I (células 293T no infectadas y crecidas en ausencia de puromicina) y una confluencia diferente en la condición

control II (células 293T no infectadas y crecidas en presencia de puromicina a concentración 1  $\mu\text{g/ml}$ ). En el control II se observó, según lo esperado, una muerte progresiva de las células 293T, siendo el día 8 la confluencia del 0%.

Los resultados anteriores confirmaron la infectividad de las partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta, ya que las células 293T infectadas crecieron con normalidad en presencia de puromicina a concentración 1  $\mu\text{g/ml}$ , a diferencia de las células 293T no infectadas que no sobrevivieron en estas condiciones de cultivo. A su vez, los resultados anteriores mostraron la necesidad de aplicar una dilución mayor del sobrenadante viral, si el objetivo perseguido era la observación de colonias aisladas de células 293T resistentes a puromicina, para poder de este modo calcular la multiplicidad de infección.



**Figura 37. A.** Apariencia de las placas de cultivo pasados ocho días tras la infección de las células 293T con diferentes diluciones de un sobrenadante viral, que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta, y posterior selección con puromicina a concentración 1  $\mu\text{g/ml}$ . De izquierda a derecha y de arriba abajo: dilución 1/10<sup>2</sup> del sobrenadante viral, dilución 1/10<sup>3</sup>, dilución 1/10<sup>4</sup>, dilución 1/10<sup>5</sup>, dilución 1/10<sup>6</sup> y dilución 1/10<sup>7</sup>. **B.** Colonia aislada de células 293T resistentes a puromicina visualizada en microscopio.

En la **Figura 37A** se repitieron las observaciones anteriores, ya que el color del medio pasados 8 días desde la infección fue dependiente de la concentración del sobrenadante viral con el que fueron infectadas las células 293T. Esta observación se verificó bajo visualización al microscopio, donde se comprobó que las confluencias alcanzadas el día 8 del experimento de infección variaron en función de la dilución aplicada del sobrenadante viral: dilución 1/10<sup>2</sup> (confluencia del 100%), 1/10<sup>3</sup> (90%), 1/10<sup>4</sup> (50%), 1/10<sup>5</sup> (se observaron 50-60 colonias aisladas), 1/10<sup>6</sup> (se observaron 5 colonias aisladas) y 1/10<sup>7</sup> (confluencia del 0%, no se observó ninguna colonia aislada). Los resultados obtenidos indican que las diluciones del sobrenadante viral óptimas para infectar células 293T y poder visualizar colonias aisladas de células resistentes a puromicina son las diluciones 1/10<sup>5</sup> y 1/10<sup>6</sup>. El conteo de las colonias resistentes, obtenidas tras infectar un cultivo celular con las diluciones 1/10<sup>5</sup> y 1/10<sup>6</sup> del sobrenadante viral, permitió determinar su MOI, aplicando la ecuación 9 descrita en el apartado III.4.5.2. La MOI se determinó tanto en las partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta como en las partículas virales de chikungunya sin proteína de envuelta, con el objetivo de evaluar la capacidad infectiva de ambos tipos de partícula. Los resultados obtenidos tras aplicar el protocolo descrito en el apartado III.4.5.2 se muestran en la **Tabla 39**.

**Tabla 39.** Resultados obtenidos tras la infección de células 293T con diferentes tipos de partículas virales y posterior selección con puromicina a concentración 1 µg/ml. Tras la selección con puromicina se cuenta el número de colonias de células 293T resistentes a puromicina y se determina el número de partículas virales infectivas por ml de sobrenadante viral, asumiendo que cada colonia resistente procede de la infección por una única partícula viral. Abreviaturas: Dil: dilución; sobr: sobrenadante; No: número; R1; réplica 1; R2: réplica 2;  $\bar{X}$ : media del número de colonias resistentes obtenidas en ambas réplicas; MOI: multiplicidad de infección. \*Contaje realizado el día 2 del experimento de infección.

Tipo de partícula viral	Dil sobr. viral	No. Células 293T*	No. de colonias (R1; R2; $\bar{X}$ )	No. Partículas virales infectivas	No. medio de partículas virales infectivas	MOI
Con proteína de envuelta	1/10 <sup>5</sup>	1E+06 células	65; 87; 76	7,6E+06 partículas virales infectivas	1,0E+07 partículas virales infectivas	10
	1/10 <sup>6</sup>	1E+06 células	7; 18; 12,5	12,5E+06 partículas virales infectivas		
Sin proteína de envuelta	No diluido	1E+06 células	10	5,0E+00 partículas virales infectivas/ml	1,0E+00 partículas virales infectivas	10 <sup>-5</sup>

Los resultados mostrados en la **Tabla 39** indican que las partículas virales carentes de proteína de envuelta son seis ordenes de magnitud menos infectivas que las partículas virales con proteína de envuelta, ya que se obtiene una MOI de 10<sup>-5</sup> y 10, respectivamente. Por tanto, queda confirmada la eficacia de prescindir del plásmido de envuelta durante la generación *in vitro* de partículas virales como método para disminuir su capacidad infectiva. Únicamente se observan 10 colonias de células 293T resistentes a puromicina cuando se infectan estas células con el sobrenadante viral que contiene partículas virales de chikungunya sin proteína de envuelta. Quizás esto pueda deberse al hecho de añadir polibreno en el momento de infección, ya que ha sido demostrado que este reactivo potencia la entrada de las partículas virales al interior celular mediante un mecanismo independiente de la presencia de la proteína de envuelta viral y del receptor celular. Este mecanismo se basa en la adsorción de la partícula viral a la membrana celular, lo que es posible gracias a la carga positiva que aporta el polibreno frente a la carga negativa propia de la membrana celular [291].

El polibreno se incorporó en un inicio con el objetivo de reproducir los protocolos de infección descritos en la bibliografía [217], pero posteriormente se consideró el interés en este proyecto de simular las condiciones reales de infección y no potenciar mecanismos alternativos de entrada de las partículas virales al interior celular. Debido a ello, en experimentos posteriores se prescindió del polibreno y la evaluación de la capacidad infectiva de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, todas ellas generadas sin proteína de envuelta, se evaluó siguiendo el protocolo de infección detallado en el apartado III.4.5.3. En esta evaluación no solo se analizó la capacidad de las partículas virales de acceder al interior celular (ensayo A) sino que también se evaluó si las partículas virales analizadas provocaban una alteración en el crecimiento celular o en la morfología de las células (ensayo B). Por último, se evaluó si un paso previo de incubación del sobrenadante viral a 75°C durante 10 min conducía a la inactivación de las partículas virales. En los ensayos comentados anteriormente se incluyó como control positivo de infección un sobrenadante viral que contenía partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta. Los resultados obtenidos en los ensayos A y B para cada una de las partículas virales analizadas se muestran en la **Tabla 40**.

**Tabla 40.** Resultados obtenidos tras la infección de células 293T con diferentes tipos de partículas virales. En el ensayo A se realiza tras la infección una selección con puromicina a concentración 1 µg/ml y se cuenta el número de colonias resistentes a puromicina pasados ocho días tras la infección. En el ensayo B se mantienen las células en medio DMEM completo (sin selección con puromicina) y pasados cinco días tras la infección se realiza, por cada condición ensayada, un recuento celular y se determina la viabilidad celular. Abreviaturas: Sobr: sobrenadante; No: número.

Tipo de partícula viral	Tratamiento	Dilución sobr. viral	Volumen sobrenadante viral	ENSAYO A	ENSAYO B	
				No. Colonias	No. Células	Viabilidad celular
Células 293T sin infectar	N/A	N/A	N/A	N/A	1,09E+07	97,7%
SARS-CoV-2	N/A	No diluido	182 µl	Ninguna	1,13E+07	97,9%
	75°C 10 min	No diluido	182 µl	Ninguna	0,92E+07	96,4%
RSV	N/A	No diluido	182 µl	Ninguna	1,30E+07	98,9%
	75°C 10 min	No diluido	182 µl	Ninguna	1,34E+07	96,8%
Influenza A	N/A	No diluido	182 µl (45,5 µl YIA1+45,5 µl YIA2+45,5 µl YIA3+45,5 µl YIA4)	Ninguna	1,04E+07	97,1%
	75°C 10 min	No diluido	182 µl (45,5 µl YIA1+45,5 µl YIA2+45,5 µl YIA3+45,5 µl YIA4)	Ninguna	1,48E+07	98,8%
Influenza B	N/A	No diluido	182 µl (45,5 µl YIB1+45,5 µl YIB2+45,5 µl YIB3+45,5 µl YIB4)	Ninguna	1,31E+07	98,6%
	75°C 10 min	No diluido	182 µl (45,5 µl YIB1+45,5 µl YIB2+45,5 µl YIB3+45,5 µl YIB4)	Ninguna	1,16E+07	96,5%
Chikungunya con proteína de envuelta	N/A	1/10 <sup>5</sup>	182 µl	Colonias aisladas	0,60E+07	96,2%
	75°C 10 min	1/10 <sup>5</sup>	182 µl	Ninguna	1,23E+07	97,6%

Los resultados mostrados en la **Tabla 40** confirman la no infectividad de las partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, ya que, por una parte, tras la infección de las células 293T con los diferentes tipos de partículas virales no se observan colonias aisladas resistentes a puromicina y, por otra parte, no se observan diferencias significativas respecto al control (células 293T sin infectar) ni en la viabilidad celular, ni en su morfología, ni en el número de células 293T presentes en el cultivo, pasados 3 días tras la infección con los diferentes sobrenadantes virales. Estos resultados también sugieren que las 10 colonias aisladas (**Tabla 39**) que fueron observadas al infectar las células 293T con las partículas virales de chikungunya sin proteína de envuelta fueron consecuencia de la adición de polibreno, que potencia la infección, ya que en el resto de las partículas virales, cuya infección se realizó en ausencia de polibreno, no se observan colonias aisladas.

Por otra parte, se observa que el paso de incubación a 75°C 10 min sería suficiente como método de inactivación de las partículas virales desarrolladas, como demuestra el hecho de no observar colonias aisladas resistentes a puromicina cuando se infectan las células con partículas virales de chikungunya con proteína de envuelta y que han sido sometidas a un tratamiento previo de 75°C 10 min (**Tabla 40**).

A pesar de ello, en este proyecto se deciden implementar ambas estrategias: la generación de partículas virales carentes de proteína de envuelta y el paso de incubación a 75°C 10 min para reforzar la bioseguridad de las partículas virales desarrolladas. Queda, por tanto, demostrada la no infectividad de las partículas virales desarrolladas en este proyecto, las cuales pueden ser

manipuladas en nivel de bioseguridad tipo 2 [292], independientemente del patógeno al que corresponda el RNA viral.

## V.2.7 SECUENCIACIÓN MASIVA DEL RNA CONTENIDO EN LAS PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES

La secuenciación masiva del RNA contenido en las partículas virales desarrolladas en este proyecto se realizó con el objetivo de verificar que durante su generación *in vitro*, mediante el sistema lentiviral, no se produjeron modificaciones en la secuencia del RNA viral. Estas modificaciones podrían tratarse de mutaciones puntuales o modificaciones más notables como inserciones o deleciones, las cuales podrían ocurrir si tiene lugar un proceso de recombinación entre las dos hebras del RNA viral que se empaquetan de forma conjunta en el mismo virión [157, 158]. Por otra parte, la importancia de validar mediante secuenciación los controles positivos basados en virus queda reflejada en el estudio de Bateman et al. (2017) [61], donde encontraron la existencia de subpoblaciones en el estándar internacional de la OMS del virus BK, las cuales presentaban deleciones en la región del antígeno T, como se detalla en el apartado II.2.2.1.

Se determinó la concentración de RNA de cada muestra previamente a su secuenciación, tal y como se indica en el apartado III.11. Los resultados fueron favorables, alcanzándose la concentración mínima de 1 ng/μl requerida para la técnica de secuenciación. La secuenciación masiva fue realizada por el CIBIR, tal y como se indica en el apartado III.11. Los resultados proporcionados por este centro, en concreto el número de lecturas obtenido y el porcentaje de lecturas perdidas en cada paso del procesamiento bioinformático de las lecturas crudas, se muestra en la **Tabla 41**.

**Tabla 41.** Número (No.) de lecturas obtenido y porcentaje de lecturas perdidas tras la eliminación de las lecturas correspondientes a los adaptadores y las regiones de baja calidad (paso 1); la eliminación del RNA ribosómico (paso 2); y la eliminación de las secuencias de origen humano (paso 3).

Muestra (RNA viral)	No. Lecturas crudas	Eliminación de adaptadores y regiones de baja calidad		Eliminación del RNA ribosómico		Eliminación de las secuencias de origen humano	
		No. Lecturas_1	% pérdida_1	No. Lecturas_2	% pérdida_2	No. Lecturas_3	% pérdida_3
Influenza A (YIA1)	3.329.262	3.280.757	1,46	3.276.899	0,12	2.835.084	13,48
Influenza A (YIA2)	3.489.017	3.446.162	1,23	3.440.695	0,16	3.056.374	11,17
Influenza A (YIA3)	3.047.225	3.009.009	1,25	3.001.039	0,26	2.494.543	16,88
Influenza A (YIA4)	2.745.562	2.723.735	0,79	2.718.408	0,20	2.173.674	20,04
SARS-CoV-2 (NCO)	1.672.072	1.658.276	0,83	1.651.977	0,38	840.715	49,11
Influenza B (YIB1)	3.085.843	3.062.616	0,75	3.057.722	0,16	2.362.559	22,73
Influenza B (YIB2)	3.287.641	3.260.858	0,81	3.254.264	0,20	2.624.339	19,36
Influenza B (YIB3)	1.982.061	1.968.792	0,67	1.965.891	0,15	1.531.011	22,12
Influenza B (YIB4)	2.544.870	2.519.168	1,01	2.514.576	0,18	2.196.648	12,64
Virus respiratorio sincitial (RSV)	3.064.898	3.042.869	0,72	3.038.246	0,15	2.407.043	20,78

Se observa que el mayor porcentaje de pérdida de lecturas ocurre cuando se eliminan las lecturas de origen humano, lo que podría ser indicativo de cierta presencia en el sobrenadante viral de DNA o RNA derivado del genoma de las células 293T, utilizadas durante la generación *in vitro* de las partículas virales. A pesar de ello, el número de lecturas resultantes, tras el procesamiento bioinformático de las lecturas crudas, sigue siendo muy elevado. Los resultados proporcionados por el CIBIR, relativos al mapeo de las lecturas con la secuencia de referencia correspondiente, se muestran en la **Tabla 42**.

**Tabla 42.** Porcentaje de lecturas mapeadas y número de lecturas no mapeadas respecto a la secuencia de referencia, la cual es diferente para cada una de las muestras.

Muestra	No. Lecturas_3	% Lecturas mapeadas (Cobertura)	No. Lecturas no mapeadas
Influenza A (YIA1)	2.835.084	97,20	95.530
Influenza A (YIA2)	3.056.374	97,11	103.344
Influenza A (YIA3)	2.494.543	95,53	127.497
Influenza A (YIA4)	2.173.674	94,96	123.147
SARS-CoV-2 (NCO)	840.715	84,26	141.656
Influenza B (YIB1)	2.362.559	94,86	137.210
Influenza B (YIB2)	2.624.339	95,05	145.777
Influenza B (YIB3)	1.531.011	95,06	85.849
Influenza B (YIB4)	2.196.648	96,43	92.440
Virus respiratorio sincitial (RSV)	2.407.043	96,31	106.501

Por último, el esquema de mapeo, obtenido mediante el *software* Integrative Genomics Viewer, para cada una de las 10 muestras secuenciadas se recoge en la **Figura S3**. La visualización de las lecturas en IGV, junto con los valores de porcentaje de lecturas mapeadas respecto a la secuencia de referencia, mostrados en la **Tabla 42**, revelan una cobertura muy elevada en la secuenciación. Esto implica que las lecturas obtenidas durante la secuenciación cubrieron la totalidad del genoma viral, en cada una de las 10 muestras analizadas. A su vez, se observó que la profundidad de cobertura, parámetro que muestra cuantas veces fue secuenciado un fragmento del genoma en particular, fue relativamente constante a lo largo del genoma secuenciado, para cada una de las 10 muestras analizadas.

Desde el CIBIR extrajeron las modificaciones significativas presentes en el RNA viral de cada muestra respecto a su correspondiente secuencia de referencia. Este análisis reveló que no existía ninguna mutación en la región específica de patógeno del RNA viral secuenciado, respecto a su correspondiente secuencia de referencia. Tampoco se observó ninguna inserción ni delección. Únicamente se observaron mutaciones, en las diez muestras analizadas, en los últimos siete nucleótidos del gen de resistencia a puromicina (mutaciones mostradas como una línea roja en la **Figura S3**), probablemente debido a una anotación incorrecta de la secuencia de este gen.

La ausencia, confirmada mediante secuenciación masiva, de mutaciones, inserciones y delecciones en el RNA viral de diez partículas virales distintas, permitió validar el procedimiento

utilizado en este proyecto para la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de RNA, durante el cual no hay indicios de que se produzca la recombinación entre las dos hebras de RNA empaquetadas conjuntamente en el mismo virión.

Los experimentos desarrollados en este proyecto permitieron disponer de una colección de partículas virales recombinantes de RNA conformada por los virus de chikungunya, SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B. El desarrollo del control positivo de SARS-CoV-2, basado en partículas virales recombinantes del virus SARS-CoV-2, permitió dar respuesta a la necesidad existente a nivel mundial de disponer de un control positivo fiable y no infeccioso que asegure la monitorización completa del proceso de RT-qPCR.

## VI. DISCUSIÓN

---



### *Relevancia de los controles de proceso de RT-qPCR y necesidad identificada en el mercado*

La técnica de PCR en tiempo real ha trascendido al ámbito del diagnóstico clínico por su rapidez, sensibilidad y especificidad, reemplazando o reforzando el diagnóstico mediante técnicas convencionales como el cultivo, la microscopía o ensayos inmunológicos basados en la detección de antígenos o anticuerpos. La elevada sensibilidad de la PCR en tiempo real, capaz de detectar una copia de la secuencia diana por reacción, es una de las fortalezas de esta técnica, pero a su vez la convierte en una técnica sensible ante la presencia de ácidos nucleicos contaminantes, los cuales si son reconocidos por los cebadores y sondas incluidos en la mezcla de RT-qPCR conducen a la aparición de falsos positivos [293]. En las reacciones de RT-qPCR, como en todas las técnicas diagnósticas, también se da la aparición de falsos negativos, cuyo origen suele ser un problema en la extracción de ácidos nucleicos o en su amplificación por RT-qPCR.

La aparición de resultados falsos positivos o negativos en el contexto del diagnóstico clínico puede tener un grave impacto en la salud del paciente [294], por lo que resulta imprescindible incluir en el procedimiento diagnóstico un control positivo y un control negativo, que imiten con fidelidad a las muestras clínicas y sean procesados de forma simultánea junto a ellas. De este modo, cualquier incidente durante el procedimiento se verá reflejado en el resultado de los controles positivo y negativo, invalidando los resultados de las muestras clínicas y siendo precisa la repetición del ensayo desde la etapa inicial. La aplicación de los controles positivo y negativo se extiende más allá del ámbito clínico, ya que estos controles de proceso pueden actuar como material de referencia que permita validar procedimientos de PCR en tiempo real o de extracción de ácidos nucleicos, obtener resultados comparables entre distintos ensayos o verificar el correcto funcionamiento de termocicladores o equipos de extracción automática.

La disponibilidad de controles que permitan la monitorización completa del proceso de RT-qPCR es limitada, especialmente en el caso de virus de reciente aparición, virus endémicos o aquellos virus cuyo cultivo es complejo o requiere de instalaciones de alto nivel de bioseguridad. La mayoría de los controles existentes en el mercado que permiten la monitorización completa, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta su posterior amplificación y detección por RT-qPCR, consisten en una cepa del virus salvaje, que con frecuencia es aislada de pacientes que presentan infección. La manipulación de este tipo de controles suele requerir de personal experimentado y en algunos casos de medidas de contención propias de un nivel de bioseguridad tipo 3 o superior.

### *La solución propuesta en este proyecto*

La solución propuesta en este proyecto de investigación se basa en la generación *in vitro* de partículas virales recombinantes de RNA, que permitan la monitorización completa de los ensayos de RT-qPCR. La manipulación de estas partículas requiere un nivel de bioseguridad tipo 2, independientemente del tipo de partícula viral desarrollada, garantizando de este modo su acceso a la gran mayoría de laboratorios. Se seleccionó el sistema lentiviral, frente a otros, debido a que los lentivirus poseen un genoma de RNA, son capaces de albergar insertos de gran tamaño, presentan una elevada especificidad en el empaquetamiento (discriminando el RNA viral del RNA celular) y su estructura se asemeja con fidelidad a aquellos virus causantes de patología en humanos, los cuales son el centro de interés de este proyecto.

### *El camino recorrido*

Durante este proyecto de investigación se desarrolló y optimizó el proceso de generación de partículas virales recombinantes de RNA, tomando como modelo partículas virales cuyo RNA

incluía el gen *EGFP* y partículas virales cuyo RNA contenía diferentes fragmentos del genoma del virus chikungunya. Una vez optimizado el proceso, este se validó en diferentes diseños que incluyeron la generación de partículas virales de SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B.

En primer lugar, se llevó a cabo el diseño del inserto, donde se consideraron las dianas más frecuentes en la identificación por RT-qPCR del virus de interés y se introdujeron en la secuencia codones de parada de la traducción, como medida adicional de bioseguridad.

En segundo lugar, se logró la generación eficiente de partículas virales mediante transfección de los plásmidos lentivirales en células HEK 293T. El mismo protocolo fue aplicado en los diferentes diseños de RNA viral considerados en este proyecto, cuyo tamaño se encontraba en el rango de 5-8 kb. En todos ellos se alcanzó un título viral equivalente, siendo el título viral medio de  $2,38E+09$  copias de RNA viral por ml. Este valor es similar a la concentración reportada en estudios análogos de generación de partículas virales de RNA mediante el sistema lentiviral [130, 218].

En tercer lugar, se realizaron diferentes experimentos de purificación dirigidos a eliminar el DNA plasmídico, presente en el sobrenadante viral e incorporado durante la transfección, o el posible cDNA generado por retrotranscripción, este último se encontraría en el interior de las partículas virales. El DNA presente en el sobrenadante viral debe ser eliminado, ya que su presencia condiciona la aplicación de las partículas virales como control positivo de ensayos de RT-qPCR, puesto que en estos ensayos ocurre la detección conjunta de DNA y RNA y, por tanto, la presencia de DNA conduciría a una interpretación errónea de la cantidad de RNA presente en el control positivo. Para la eliminación del DNA plasmídico se recurrió a la digestión con DNasa del sobrenadante viral. Los resultados obtenidos fueron comparables e incluso más favorables que los resultados de ensayos análogos reportados en la bibliografía. Un ejemplo de ello es el estudio de Scherr et al. (2001) [218], donde observaron un desplazamiento de  $1 C_q$  en la señal de DNA entre los sobrenadantes virales tratado y sin tratar con DNasa. Este valor es notablemente inferior a los valores de desplazamiento de la señal de DNA obtenidos en este proyecto de investigación, ya que tras la digestión con DNasa en sobrenadantes virales de 48h y 72h se observó un desplazamiento de  $8,94 C_{qs}$  (equivalente a  $2,75 \log_{10}$ ) y  $9,71 C_{qs}$  (equivalente a  $2,99 \log_{10}$ ), respectivamente.

Por otra parte, Sastry et al. (2002) [219] trataron un sobrenadante viral con DNasa, posteriormente realizaron una extracción de ácidos nucleicos y analizaron los ácidos nucleicos extraídos por qPCR y RT-qPCR. Tras el análisis observaron que el número de moléculas de DNA + RNA era aproximadamente 1.000 veces superior al número de moléculas de DNA. Esto implica una diferencia de  $9,9 C_{qs}$  (aplicando la ecuación 2) entre la señal de DNA y la señal de DNA + RNA. Este valor es muy próximo al valor de  $\Delta C_{q(2)} = 9,61$ , observado en este proyecto tras someter a los sobrenadantes virales de 48h a digestión con DNasa y posterior extracción de ácidos nucleicos.

Por último, en el estudio reportado por Merten et al. (2011) [192] observaron una reducción del DNA plasmídico del 85%, tras digerir un sobrenadante viral con benzonasa. Este valor es inferior a los valores de reducción de DNA reportados en este proyecto, donde se demostró una reducción del DNA superior al 98,6% (equivalente a un valor superior a  $1,86 \log_{10}$ ), en todos los sobrenadantes virales que fueron digeridos con DNasa.

En este proyecto se logró, por tanto, alcanzar una eliminación superior al 98,6% del DNA presente en el sobrenadante viral, mediante digestión con DNasa. Con el objetivo de eliminar el

DNA remanente se valoraron diferentes estrategias de purificación, las cuales consistieron en la optimización de la reacción de digestión, la transfección con un plásmido de empaquetamiento defectivo para la retrotranscriptasa, la purificación del sobrenadante viral por ultracentrifugación y la implementación de diferentes modificaciones sobre el proceso de transfección.

La eliminación del DNA fue prácticamente del 100% cuando la digestión con DNasa fue aplicada sobre las partículas virales extraídas, obteniéndose unos valores de reducción de DNA de 5,68  $\log_{10}$  y 6,22  $\log_{10}$ , tras el tratamiento Extracción + DNasa en sobrenadantes virales de 48h y 72h, respectivamente. Estos valores fueron muy superiores a la reducción de DNA observada tras el tratamiento DNasa + Extracción en sobrenadantes virales de 48h y 72h, donde se obtuvieron valores de 2,23  $\log_{10}$  y 2,13  $\log_{10}$ , respectivamente. Esta observación coincide con los resultados reportados por Mattiuzzo et al. (2015) [130], Trono (1992) [160] y Lori et al. (1992) [161], quienes justificaron este fenómeno como consecuencia de una retrotranscripción prematura del RNA viral a cDNA, la cual estaría teniendo lugar en el interior de las partículas virales. Por tanto, habría cDNA contenido en las partículas virales y, únicamente este se liberaría una vez realizada la extracción de ácidos nucleicos, quedando disponible para la digestión con DNasa. Para analizar esta hipótesis se abordó la estrategia propuesta por Kutner et al. (2009) [225], consistente en generar partículas virales defectivas para la retrotranscriptasa, mediante transfección con un plásmido de empaquetamiento RT defectivo. Los resultados obtenidos no fueron favorables, por lo que o bien la presencia de DNA en el sobrenadante viral no se debía a la hipótesis inicialmente planteada o la mutagénesis dirigida realizada para inactivar la retrotranscriptasa no fue completamente efectiva.

Por otra parte, Scherr et al. (2001) [218] reportaron que la señal de DNA desaparecía por completo cuando la digestión se realizaba sobre un DNA plasmídico presente en un sobrenadante celular. En este sobrenadante, que había estado en contacto con las células, no hubo formación de partículas virales. Los resultados obtenidos en este proyecto difieren de la observación anterior, ya que la digestión con DNasa no fue 100% eficaz en sobrenadantes celulares de 48h y 72h, observándose unos valores de reducción de DNA de 2,95  $\log_{10}$  y 2,35  $\log_{10}$ , respectivamente. Se obtuvieron valores similares de reducción de DNA (2,75  $\log_{10}$  y 2,99  $\log_{10}$ ) cuando la digestión se aplicó en sobrenadantes virales de 48h y 72h, respectivamente.

Los resultados anteriores sugerían que la ineficiencia en la digestión con DNasa no estaba asociada a la presencia de partículas virales, ya que la digestión con DNasa fue equivalente en sobrenadantes celulares (no hay formación de partículas virales) y en sobrenadantes virales (hay formación de partículas virales). Debido a ello se planteó la posibilidad de que el DNA inaccesible para la digestión con DNasa estuviese contenido en exosomas. Los exosomas son estructuras similares a las partículas virales que podrían haber internalizado el DNA en el interior celular (comparten la misma ruta de síntesis que las partículas virales) o en el exterior celular. Se plantearon diferentes estrategias basadas, por una parte, en la separación de exosomas y partículas virales mediante ultracentrifugación en gradiente de velocidad [226, 227, 229] y, por otra parte, en la realización de diferentes modificaciones del proceso de transfección. Estas modificaciones se realizaron con el objetivo de generar partículas virales en un medio libre de suero fetal bovino, ya que este es una fuente de exosomas [253-255].

Los resultados obtenidos a lo largo del proyecto de investigación sugieren que la eliminación completa del DNA se trata de un problema multifactorial, donde serían varios los factores condicionantes. Ninguna de las estrategias abordadas durante la purificación de las partículas virales fue más favorable que el tratamiento del sobrenadante viral con DNasa. Sin embargo,

debido a la reducción de más del 98,6% del DNA (obtenida durante la digestión con DNasa) fue posible la obtención de un control positivo concentrado. Su concentración se encontró en el rango de 50-500 copias/ $\mu$ l, en el cual el DNA está presente en una cantidad ínfima, por lo que no es detectado tras su análisis por qPCR.

Las partículas virales fueron cuantificadas por PCR digital y estabilizadas por liofilización, con el objetivo de aportar valor añadido al producto. En ambos procesos se logró la optimización de un protocolo universal, independientemente de la secuencia del RNA viral.

La versatilidad del sistema lentiviral permitió ampliar la colección de partículas virales en un periodo de tiempo reducido. Su aplicación fue crucial en el desarrollo de un control positivo para el virus SARS-CoV-2, ya que fue posible el desarrollo de un control positivo de estas características en un momento todavía incipiente, donde las características de este virus comenzaban a estudiarse. De este modo, se dio respuesta a la necesidad existente a nivel mundial de un control positivo fiable y no infeccioso que permitiese validar los diferentes ensayos de RT-qPCR. El desarrollo de estos ensayos de RT-qPCR se fue sucediendo desde el inicio de la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2, siendo la principal herramienta para la identificación del virus y la contención de la enfermedad, contribuyendo a frenar los contagios y a su control epidemiológico.

#### *Validación de las partículas virales desarrolladas para su uso como control positivo de ensayos de RT-qPCR*

Las partículas virales liofilizadas se sometieron a una exhaustiva evaluación con el objetivo de validar su aplicación como control positivo de ensayos de RT-qPCR. Para ello, se evaluó su funcionalidad tras ser procesadas por algunos de los sistemas de extracción cuyo uso está ampliamente extendido, verificando su compatibilidad.

Por otra parte, se analizó la universalidad de uso con diferentes ensayos de RT-qPCR, confirmando que las dianas, incluidas durante el diseño del inserto, se encontraban presentes en la partícula viral de RNA y conducían a la amplificación por RT-qPCR. Además, se analizó la secuencia del RNA viral mediante secuenciación masiva, confirmando que este no había sufrido ninguna mutación puntual, inserción o delección.

También se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad de las partículas virales, analizando la variabilidad en el valor de  $C_q$  obtenido tras su extracción y análisis por un mismo ensayo de RT-qPCR (intraensayo), en ensayos realizados en días diferentes (inter-ensayo), por distintos operadores (inter-operador), entre diferentes lotes de partículas virales (inter-lote) y tras su procesamiento por diferentes sistemas de extracción y termocicladores (inter-equipamiento). Los resultados de desviación típica y coeficiente de variación, calculados a partir de los valores de  $C_q$  obtenidos en los diferentes tipos de análisis, se encontraron dentro del rango de aceptación establecido, indicando que las partículas virales desarrolladas presentan una elevada reproducibilidad y repetibilidad.

Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos con el objetivo de demostrar que las partículas virales producidas no eran infectivas, con el fin de garantizar la seguridad en la manipulación por parte del usuario. Estas pruebas consistieron en la infección de células con sobrenadantes virales y posterior selección con puromicina. La estrategia abordada para lograr la no infectividad consistió en prescindir del plásmido de envuelta durante el proceso de transfección, con el objetivo de generar partículas virales sin proteína de envuelta, impidiendo así su unión con el receptor celular y, por tanto, la entrada del virus en la célula. También se incorporó un

paso de incubación a 75°C durante 10 min previo a la liofilización de la partícula viral, con el doble objetivo de inactivar la DNasa e inactivar la partícula viral [214-216], tras verificar que este paso no comprometía la estabilidad de la partícula viral.

Por último, se realizaron diferentes experimentos de envejecimiento acelerado, estabilidad en uso y estabilidad en el transporte. Estos experimentos se realizaron con el objetivo de determinar la vida útil de las partículas virales (cuando estas son almacenadas a temperatura ambiente); evaluar su estabilidad, una vez reconstituido el liófilo, durante su almacenamiento a las temperaturas de 25°C, 4°C, -20°C y -80°C; y evaluar su estabilidad durante su transporte, respectivamente. En los experimentos anteriores se determinó una vida útil de 2 años y se confirmó la estabilidad del liófilo reconstituido y almacenado a las temperaturas de 25°C y 4°C durante 8 días, en el caso de las partículas virales de SARS-CoV-2, y 14 días para las partículas virales de RSV, influenza A e influenza B. Por otra parte, no se observó una pérdida de estabilidad, en ninguna de las partículas virales analizadas, cuando el liófilo reconstituido fue sometido a un ciclo de congelación y descongelación a las temperaturas de -20°C y -80°C. Tampoco se observó una pérdida de estabilidad durante su transporte, en el cual las condiciones de humedad y presión fueron variables y la temperatura osciló en el rango de valores entre 6,8°C y 29,2°C.

#### *Desarrollo de productos potencialmente comerciales y características diferenciales frente a los competidores*

Las partículas virales desarrolladas en este proyecto comparten la misma finalidad que los controles positivos comerciales incluidos en la gama de productos Accuplex™ de Seracare (basados en partículas virales recombinantes generadas mediante alphavirus), Armored RNA Quant® de Asuragen (basados en partículas virales recombinantes generadas a partir del bacteriófago MS2), AmpliRun® Total de Vircell y NATtrol™ Molecular Controls de Zeptomatrix (ambos basados en el cultivo del virus salvaje y posterior inactivación mediante métodos físico-químicos) y AcroMetrix™ de Thermo Fisher Scientific (basados en el cultivo del virus salvaje y posterior inactivación o en partículas virales recombinantes generadas a partir del virus de la diarrea bovina).

Una comparativa de las características de los controles positivos mencionados anteriormente se recoge en la **Tabla 43**, donde los productos desarrollados en este proyecto destacan frente al resto de controles en términos de formato, temperatura de almacenamiento y concentración. El formato liofilizado permite su almacenamiento y transporte a temperatura ambiente, sin ser necesario mantener la cadena de frío, por lo que son accesibles a cualquier laboratorio sin depender de su infraestructura.

**Tabla 43.** Comparativa de las características de diferentes controles positivos comerciales para la monitorización completa de ensayos RT-qPCR. Abreviatura: T: temperatura. <sup>(1)</sup> Una vez reconstituido el liofilo, este puede permanecer varios días a temperatura ambiente o en nevera, o ser congelado para su almacenamiento a largo plazo; <sup>(2)</sup> Una vez reconstituido el liofilo requiere su procesamiento en las próximas 24h; <sup>(3)</sup> Excepto los paneles que contienen 3 controles positivos a las concentraciones de 1, 10 y 100 copias/ $\mu$ l; <sup>(4)</sup> Armored RNA Quant<sup>®</sup> SARS-CoV-2, se suministra a 1E+08 copias/ $\mu$ l; <sup>(5)</sup> NATtrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 External Run Control se suministra a 50 copias/ $\mu$ l.

Nombre comercial	Vida útil	Formato	T almacenamiento	Concentración
<b>Partículas virales desarrolladas en este proyecto</b>	24 meses	Liofilizado <sup>(1)</sup>	Temperatura ambiente	50-500 copias/ $\mu$ l
<b>Accuplex<sup>™</sup></b>	24 meses	Líquido	2-8°C	5 copias/ $\mu$ l <sup>(3)</sup>
<b>Armored RNA Quant<sup>®</sup></b>	No se especifica	Líquido	-15 a -30°C	Variable <sup>(4)</sup>
<b>AmpliRun<sup>®</sup>Total</b>	30 meses	Liofilizado <sup>(2)</sup>	2-8°C	20-50 copias/ $\mu$ l
<b>NATtrol<sup>™</sup> Molecular Controls</b>	12-24 meses	Líquido	2-8°C	Variable <sup>(5)</sup>
<b>AcroMetrix<sup>™</sup></b>	No se especifica	Líquido	-20°C	Cualitativo

#### Próximos diseños y nuevos sistemas de generación de partículas virales

La urgencia en el desarrollo del control positivo de SARS-CoV-2 condicionó el diseño de su genoma, en el cual se incluyeron en una única partícula viral las dianas de los ensayos de RT-qPCR recomendados por la OMS para la identificación del virus SARS-CoV-2 [279]. Esta misma estrategia de control positivo basado en una única partícula viral (control positivo monoplex) se siguió en el resto de los controles positivos desarrollados en este proyecto, excepto en los virus de influenza A e influenza B. En el diseño de estos últimos controles se consideró una estrategia diferente, consistente en la segmentación del genoma del virus salvaje en varias partículas virales, las cuales en su conjunto representan el genoma completo del virus (control positivo multiplex). La generación de un control positivo multiplex implica la aplicación de un mismo protocolo de cuantificación por PCR digital y un mismo protocolo de liofilización, sobre las diferentes partículas virales que conforman el control positivo multiplex. Debido a ello, el planteamiento de este tipo de controles únicamente es viable una vez el procedimiento de generación de partículas virales ha sido validado en diferentes diseños. En este proyecto se desarrollaron en orden cronológico las partículas virales de EGFP, chikungunya, SARS-CoV-2, RSV, influenza A e influenza B, motivo por el cual se implementó en los últimos diseños el desarrollo de un control positivo multiplex. La evaluación de la funcionalidad y estabilidad de este control positivo contó con la complejidad añadida de requerir el diseño y desarrollo de diferentes ensayos de RT-qPCR, los cuales incluyesen los cebadores y sonda específicos para la detección y, por tanto, monitorización de cada una de las partículas virales que constituyen el control positivo multiplex.

La puesta a punto de un proceso de generación de controles positivos multiplex ha permitido iniciar el desarrollo, en el cual se está trabajando actualmente, de diferentes controles positivos que contengan el genoma completo de las variantes alfa, beta y gamma del virus SARS-CoV-2. Próximamente se valorará el desarrollo de la variante delta del virus SARS-CoV-2 y de las nuevas variantes que se vayan sucediendo, debido a su relevancia en el avance de la pandemia. Las

variantes del virus SARS-CoV-2 presentan diferencias en su genoma que condicionan su transmisibilidad, la sintomatología asociada o virulencia y la eficacia de las vacunas administradas, por lo que su identificación es vital para un buen control epidemiológico. El tamaño del genoma del virus SARS-CoV-2 es aproximadamente el doble respecto al genoma del virus de influenza A o influenza B, por lo que para la generación del control positivo planteado de SARS-CoV-2, la segmentación de su genoma debe realizarse en un número mayor de partículas virales, lo que incrementa la complejidad del proceso.

El desarrollo de este proyecto de investigación ha permitido instaurar un sistema de generación *in vitro* de partículas virales de RNA, el cual ha implicado el mantenimiento de una línea celular; la optimización de diferentes procesos, tales como la transfección de células eucariotas, la purificación de partículas virales, su cuantificación por PCR digital o su estabilización por liofilización; y la implementación de un sistema que permita validar las partículas virales desarrolladas. Considerando el conocimiento y dominio adquirido en estas técnicas durante el proyecto de investigación, se espera dar continuidad al mismo con la evaluación de sistemas alternativos al sistema lentiviral. Los próximos diseños que se espera abordar en un futuro, correspondientes tanto a virus de genoma RNA como virus de genoma DNA, todos ellos causantes de patología en humanos, se recogen en la **Tabla 44**.

**Tabla 44.** Próximos diseños propuestos de partículas virales de genoma RNA o DNA, clasificados en función del tipo de enfermedad.

<b>VIRUS RNA</b>	<b>PANEL RESPIRATORIO</b>	<b>VIRUS DNA</b>	<b>PANEL RESPIRATORIO</b>
	SARS-CoV-2 (nuevas variantes)		Bocavirus
	Metapneumovirus humano		<b>PANEL GASTROINTESTINAL</b>
	Virus parainfluenza		Adenovirus
	<b>PANEL DE ENFERMEDADES TROPICALES</b>		<b>PANEL INMUNOSUPRIMIDOS</b>
	Virus chikungunya		Virus BK
	Virus del dengue		Virus John Cunningham (JC)
	Virus de Zika		Virus de la varicela-zóster
	Virus del Nilo Occidental		<b>PANEL ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL</b>
	Virus de la fiebre amarilla		Virus del herpes simple
	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo		Virus del papiloma humano
	Virus Mayaro		
	Virus de la encefalitis japonesa		
	<b>PANEL GASTROINTESTINAL</b>		
	Norovirus		
	Rotavirus		
Astrovirus			
Sapovirus			



## VII. CONCLUSIONES

---



Los controles positivos desarrollados en este proyecto cumplen las siguientes características:

- Son controles de tipo monoplex (en el caso de los virus chikungunya, SARS-CoV-2 y RSV) o controles de tipo multiplex (en el caso de los virus de influenza A e influenza B). Los controles monoplex están constituidos por un único tipo de partícula viral, que incluye en su genoma las dianas de RT-qPCR más frecuentes para la identificación del virus de interés. Los controles multiplex están constituidos por varios tipos de partícula viral, que en su conjunto representan el genoma completo del virus salvaje.
- Presentación en formato liofilizado a una concentración, determinada por PCR digital, dentro del rango de 11.000-110.000 copias/vial, equivalente a 50-500 copias/ $\mu$ l.
- Son un control fiable del proceso completo de RT-qPCR. Se demostró su compatibilidad con diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos, cuyo uso está ampliamente extendido en la extracción del material genético de virus, y con diferentes ensayos de RT-qPCR, dirigidos frente a alguno de los fragmentos incluidos en el genoma de la partícula viral.
- Las partículas virales desarrolladas presentan una elevada reproducibilidad y repetibilidad.
- Se determinó una vida útil de las partículas virales de 2 años, cuando estas son almacenadas a temperatura ambiente, en formato liofilizado y protegidas de la humedad. A su vez, se validó su transporte en estas mismas condiciones.
- Una vez reconstituido el control positivo liofilizado, se demostró su estabilidad durante varios días a temperatura ambiente o en nevera a 4°C y tras un ciclo de congelación-descongelación a -20°C o -80°C. Además, se demostró que el ácido nucleico extraído admite un mínimo de 10 ciclos de congelación-descongelación a 20°C o -80°C, sin verse comprometida su estabilidad.
- Las partículas virales desarrolladas son defectivas para la replicación y no infecciosas. Carecen de proteína de envuelta y fueron sometidas a incubación a 75°C durante 10 min, lo que condujo a la inactivación total de la partícula viral. Su manipulación precisa de medidas propias de un nivel de bioseguridad tipo 2, independientemente del control positivo desarrollado, por lo que son accesibles a la gran mayoría de laboratorios.
- La secuencia del RNA viral se confirmó por secuenciación masiva, no encontrándose ninguna mutación puntual, inserción o delección.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---



1. Weaver, W., *Molecular Biology: Origin of the Term*. Science, 1970. **170**(3958): p. 581-582.
2. Moberg, C., *Schrödinger's*

*What is Life?*

—*The 75th Anniversary of a Book that Inspired Biology*. Angewandte Chemie International Edition, 2020. **59**(7): p. 2550-2553.

3. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-738.
4. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. **12**: p. 138-63.
5. Szymanski, M. and J. Barciszewski, *The path to the genetic code*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2017. **1861**(11): p. 2674-2679.
6. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
7. Green, M.R. and J. Sambrook, *Polymerase Chain Reaction*. Cold Spring Harb Protoc, 2019. **2019**(6).
8. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
9. Kawasaki, E.S., et al., *Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5698-702.
10. Wang, A.M., M.V. Doyle, and D.F. Mark, *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 9717-21.
11. Myers, T.W. and D.H. Gelfand, *Reverse transcription and DNA amplification by a Thermus thermophilus DNA polymerase*. Biochemistry, 1991. **30**(31): p. 7661-6.
12. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
13. *Polymerase chain reaction*. [cited 2021 September 02]; Available from: [https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Polymerase\\_chain\\_reaction-en.svg&oldid=512201078](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Polymerase_chain_reaction-en.svg&oldid=512201078).
14. Zhu, H., et al., *PCR past, present and future*. Biotechniques, 2020. **69**(4): p. 317-325.
15. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-7.
16. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
17. Becker, A., et al., *A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain*. Anal Biochem, 1996. **237**(2): p. 204-7.
18. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
19. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-62.
20. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
21. Navarro, E., et al., *Real-time PCR detection chemistry*. Clin Chim Acta, 2015. **439**: p. 231-50.
22. Cao, Y., et al., *Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation*. Molecules, 2020. **25**(3).

23. *Fluorescence SpectraViewer*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/>.
24. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005. **5**(2): p. 209-19.
25. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.
26. Kralik, P. and M. Ricchi, *A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 108.
27. Johnson, G., T. Nolan, and S.A. Bustin, *Real-Time Quantitative PCR, Pathogen Detection and MIQE*, in *PCR Detection of Microbial Pathogens*. 2013. p. 1-16.
28. Stephenson, F.H., *Real-Time PCR*, in *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. 2016. p. 215-320.
29. Speers, D.J., *Clinical applications of molecular biology for infectious diseases*. *Clin Biochem Rev*, 2006. **27**(1): p. 39-51.
30. Fernandez, J.M. and J.B. Gomez, [*Norovirus infections*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2010. **28 Suppl 1**: p. 51-5.
31. Rathore, A.P.S. and A.L. St. John, *Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses*. *Frontiers in Immunology*, 2020. **11**.
32. Valones, M.A., et al., *Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review*. *Braz J Microbiol*, 2009. **40**(1): p. 1-11.
33. Tan, K.S.W., et al., *Clinical and microscopic predictors of Entamoeba histolytica intestinal infection in travelers and migrants diagnosed with Entamoeba histolytica/dysplasia infection*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018. **12**(10).
34. Whitley, R.J., *Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System*. *Continuum (Minneapolis)*, 2015. **21**(6 Neuroinfectious Disease): p. 1704-13.
35. Tanimura, K. and H. Yamada, *Potential Biomarkers for Predicting Congenital Cytomegalovirus Infection*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(12).
36. Stahl, J.P., *Update on HSV and VZV infections of the brain*. *Rev Neurol (Paris)*, 2019. **175**(7-8): p. 442-444.
37. Younes, N., et al., *Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2*. *Viruses*, 2020. **12**(6).
38. Morling, N., *PCR in forensic genetics*. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 2): p. 438-40.
39. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. *BioTechniques*, 2008. **44**(5): p. 619-626.
40. Umesha, S. and H.M. Manukumar, *Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018. **58**(1): p. 84-104.
41. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Digital PCR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9236-41.
42. Quan, P.L., M. Sauzade, and E. Brouzes, *dPCR: A Technology Review*. *Sensors (Basel)*, 2018. **18**(4).
43. Racki, N., et al., *One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses*. *Anal Bioanal Chem*, 2014. **406**(3): p. 661-7.
44. Monteiro, S. and R. Santos, *Nanofluidic digital PCR for the quantification of Norovirus for water quality assessment*. *PLoS One*, 2017. **12**(7): p. e0179985.
45. Cao, L., et al., *Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017. **90**: p. 459-474.
46. Whale, A.S., et al., *Assessment of Digital PCR as a Primary Reference Measurement Procedure to Support Advances in Precision Medicine*. *Clin Chem*, 2018. **64**(9): p. 1296-1307.

47. Qi, Z., et al., *Digital analysis of the expression levels of multiple colorectal cancer-related genes by multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array*. *Analyst*, 2011. **136**(11): p. 2252-9.
48. Arrabito, G., et al., *Luminometric sub-nanoliter droplet-to-droplet array (LUMDA) and its application to drug screening by phase I metabolism enzymes*. *Lab Chip*, 2013. **13**(1): p. 68-72.
49. Dong, L., et al., *Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 13174.
50. Pavsic, J., et al., *Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA*. *Anal Bioanal Chem*, 2017. **409**(10): p. 2601-2614.
51. Huggett, J.F., et al., *The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020*. *Clinical Chemistry*, 2020. **66**(8): p. 1012-1029.
52. Corbisier, P., et al., *DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(7): p. 1831-40.
53. Jacobs, B.K., E. Goetghebeur, and L. Clement, *Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR*. *BMC Bioinformatics*, 2014. **15**: p. 283.
54. Vynck, M., et al., *The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology*. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2016. **20**(5): p. 437-447.
55. Bhat, S., et al., *Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number*. *Anal Bioanal Chem*, 2009. **394**(2): p. 457-67.
56. Huggett, J.F., S. Cowen, and C.A. Foy, *Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool*. *Clin Chem*, 2015. **61**(1): p. 79-88.
57. Majumdar, N., T. Wessel, and J. Marks, *Digital PCR modeling for maximal sensitivity, dynamic range and measurement precision*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0118833.
58. Kreutz, J.E., et al., *Theoretical design and analysis of multivolume digital assays with wide dynamic range validated experimentally with microfluidic digital PCR*. *Anal Chem*, 2011. **83**(21): p. 8158-68.
59. Bhat, S. and K.R. Emslie, *Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials*. *Biomol Detect Quantif*, 2016. **10**: p. 47-49.
60. Pavsic, J., et al., *Standardization of Nucleic Acid Tests for Clinical Measurements of Bacteria and Viruses*. *J Clin Microbiol*, 2015. **53**(7): p. 2008-14.
61. Bateman, A.C., et al., *Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard*. *Clin Chem*, 2017. **63**(3): p. 761-769.
62. White, H., et al., *A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR*. *Leukemia*, 2015. **29**(2): p. 369-76.
63. Page, M., et al., *Developing biological standards for vaccine evaluation*. *Future Virology*, 2017. **12**(8): p. 431-437.
64. Hartley, P., *Diphtheria Antigens-Their Preparation, Properties, Laboratory Testing and Statutory Control*. *Proc R Soc Med*, 1945. **38**(9): p. 473-6.
65. Hartley, P., *International Biological Standards: Prospect and Retrospect*. *Proc R Soc Med*, 1945. **39**(1): p. 45-58.
66. Silverstein, A.M., *Paul Ehrlich's passion: the origins of his receptor immunology*. *Cell Immunol*, 1999. **194**(2): p. 213-21.
67. Kaufmann, S.H., *Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(7): p. 705-12.

68. O'Connor, D.J., et al., *Commonly setting biological standards in rare diseases*. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2019. **7**(7-8): p. 305-314.
69. Madej, R.M., et al., *International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing*. J Mol Diagn, 2010. **12**(2): p. 133-43.
70. Mattiuzzo, G., E.M. Bentley, and M. Page, *The Role of Reference Materials in the Research and Development of Diagnostic Tools and Treatments for Haemorrhagic Fever Viruses*. Viruses, 2019. **11**(9).
71. WHO, *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards*. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series, no.932. WHO, Geneva, Switzerland., 2006.
72. Caasi, D.R., et al., *A multi-target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays*. J Microbiol Methods, 2013. **95**(2): p. 229-34.
73. Wang, B., et al., *Synthetic long oligonucleotides to generate artificial templates for use as positive controls in molecular assays: drug resistance mutations in influenza virus as an example*. Virol J, 2011. **8**: p. 405.
74. Kosuri, S. and G.M. Church, *Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications*. Nat Methods, 2014. **11**(5): p. 499-507.
75. Merryman, C. and D.G. Gibson, *Methods and applications for assembling large DNA constructs*. Metab Eng, 2012. **14**(3): p. 196-204.
76. David, M.M., et al., *A novel and rapid method for synthesizing positive controls and standards for quantitative PCR*. J Microbiol Methods, 2008. **73**(1): p. 73-7.
77. Dillon, P.J. and C.A. Rosen, *A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction*. Biotechniques, 1990. **9**(3): p. 298, 300.
78. Stemmer, W.P.C., et al., *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides*. Gene, 1995. **164**(1): p. 49-53.
79. Whiley, D.M., et al., *A simple approach for preparing real-time PCR positive reaction controls for rare or emerging viruses*. J Clin Virol, 2010. **48**(3): p. 193-7.
80. Cho, H., et al., *Positive control synthesis method for COVID-19 diagnosis by one-step real-time RT-PCR*. Clin Chim Acta, 2020. **511**: p. 149-153.
81. Smith, H.O., et al., *Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15440-5.
82. Carrera, M. and J.L. Sagripanti, *Non-infectious plasmid engineered to simulate multiple viral threat agents*. J Virol Methods, 2009. **159**(1): p. 29-33.
83. Schembri, J., et al., *Multi-target plasmid controls for conventional and real-time PCR-based serotyping of Streptococcus pneumoniae*. Plasmid, 2018. **98**: p. 45-51.
84. Dehghan Esmatabadi, M.J., et al., *Design and Production of a Chimeric Construct as a Genetically Positive Control for the Detection of Burkholderia and Yellow Fever Virus Using the Real-Time PCR*. Journal of Human Genetics and Genomics, 2020. **3**(1).
85. Charrel, R.N., B. La Scola, and D. Raoult, *Multi-pathogens sequence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 21.
86. Kodumal, S.J., et al., *Total synthesis of long DNA sequences: synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15573-8.
87. Sakai, F., et al., *Development and characterization of a synthetic DNA, NUversa, to be used as a standard in quantitative polymerase chain reactions for molecular pneumococcal serotyping*. FEMS Microbiol Lett, 2017. **364**(17).
88. Gibson, D.G., *Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments*. Methods Enzymol, 2011. **498**: p. 349-61.

89. Gibson, D.G., et al., *Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome*. Nat Methods, 2010. **7**(11): p. 901-3.
90. Chen, J., F.F. Kadlubar, and J.Z. Chen, *DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(4): p. 1377-88.
91. Hou, Y., et al., *Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9545.
92. Dhanasekaran, S., et al., *Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification*. J Immunol Methods, 2010. **354**(1-2): p. 34-9.
93. Kavlick, M.F., et al., *Quantification of human mitochondrial DNA using synthesized DNA standards*. J Forensic Sci, 2011. **56**(6): p. 1457-63.
94. Conte, J., M.J. Potoczniak, and S.S. Tobe, *Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR*. BioTechniques, 2018. **64**(4): p. 177-179.
95. Viljoen, C.D., G.G. Thompson, and S. Sreenivasan, *Stability of ultramer as copy number standards in real-time PCR*. Gene, 2013. **516**(1): p. 143-5.
96. Madala, B.S., et al., *Chimeric synthetic reference standards enable cross-validation of positive and negative controls in SARS-CoV-2 molecular tests*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 2636.
97. Cello, J., *Chemical Synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template*. Science, 2002. **297**(5583): p. 1016-1018.
98. Martínez-Martínez, M., et al., *Design and Application of Nucleic Acid Standards for Quantitative Detection of Enteric Viruses by Real-Time PCR*. Food and Environmental Virology, 2011. **3**(2): p. 92-98.
99. Kodani, M. and J.M. Winchell, *Engineered Combined-Positive-Control Template for Real-Time Reverse Transcription-PCR in Multiple-Pathogen-Detection Assays*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **50**(3): p. 1057-1060.
100. Bermúdez de León, M., et al., *In vitro transcribed RNA molecules for the diagnosis of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 2013. **193**(2): p. 487-491.
101. Dimaculangan, M., et al., *A simple and rapid approach to prepare Sindbis and West Nile viral RNA controls for differentiation between positive samples and laboratory contamination*. Journal of Virological Methods, 2020. **278**.
102. Pickett, G.G. and D.S. Peabody, *Encapsidation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(19): p. 4621-6.
103. DuBois, D.B., M.M. Winkler, and B.L. Pasloske, *Ribonuclease resistant viral RNA standards*. 1997.
104. Pasloske, B.L., et al., *Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(12): p. 3590-4.
105. Yu, X.F., et al., *Preparation of armored RNA as a control for multiplex real-time reverse transcription-PCR detection of influenza virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(3): p. 837-41.
106. Sun, Y., et al., *External quality assessment for Avian Influenza A (H7N9) Virus detection using armored RNA*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(12): p. 4055-9.
107. Zhang, D., et al., *External Quality Assessment for the Detection of Measles Virus by Reverse Transcription-PCR Using Armored RNA*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0134681.
108. Zhang, L., et al., *External quality assessment for the molecular detection of MERS-CoV in China*. J Clin Virol, 2016. **75**: p. 5-9.
109. Mikel, P., et al., *Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1911.

110. Zhan, S., et al., *Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(8): p. 2571-6.
111. Zhang, L., et al., *A novel method to produce armored double-stranded DNA by encapsulation of MS2 viral capsids*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015. **99**(17): p. 7047-57.
112. Lin, G., et al., *Fast preparation of a long chimeric armored RNA as controls for external quality assessment for molecular detection of Zika virus*. Clin Chim Acta, 2017. **466**: p. 138-144.
113. Goncharova, E.A., et al., *One-step quantitative RT-PCR assay with armored RNA controls for detection of SARS-CoV-2*. J Med Virol, 2021. **93**(3): p. 1694-1701.
114. Yao, L., et al., *Development and Evaluation of a Novel Armored RNA Technology Using Bacteriophage Qbeta*. Food Environ Virol, 2019. **11**(4): p. 383-392.
115. Chan, S.K., et al., *Biomimetic Virus-Like Particles as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Diagnostic Tools*. ACS Nano, 2021. **15**(1): p. 1259-1272.
116. Ashcroft, A.E., et al., *Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds*. J Nanosci Nanotechnol, 2005. **5**(12): p. 2034-41.
117. Bundy, B.C. and J.R. Swartz, *Efficient disulfide bond formation in virus-like particles*. J Biotechnol, 2011. **154**(4): p. 230-9.
118. Hamer, D.H., et al., *SV40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences*. Cell, 1979. **17**(3): p. 725-35.
119. Mulligan, R.C. and P. Berg, *Expression of a bacterial gene in mammalian cells*. Science, 1980. **209**(4463): p. 1422-7.
120. Wei, C.M., et al., *Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1981. **39**(3): p. 935-44.
121. Shimotohno, K. and H.M. Temin, *Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus*. Cell, 1981. **26**(1 Pt 1): p. 67-77.
122. Rosenberg, S.A., et al., *Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction*. N Engl J Med, 1990. **323**(9): p. 570-8.
123. Rosenberg, S.A., *Gene therapy for cancer*. JAMA, 1992. **268**(17): p. 2416-9.
124. Rosenberg, S.A., et al., *The development of gene therapy for the treatment of cancer*. Ann Surg, 1993. **218**(4): p. 455-63; discussion 463-4.
125. Wirth, T., N. Parker, and S. Yla-Herttuala, *History of gene therapy*. Gene, 2013. **525**(2): p. 162-9.
126. Maier, P., C. von Kalle, and S. Laufs, *Retroviral vectors for gene therapy*. Future Microbiol, 2010. **5**(10): p. 1507-23.
127. L, Q., et al., *Viral Vectors for Vaccine Development, in Novel Gene Therapy Approaches*. 2013.
128. Parr-Brownlie, L.C., et al., *Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2015. **8**.
129. Chen, M. and X.-E. Zhang, *Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review*. International Journal of Biological Sciences, 2021. **17**(6): p. 1574-1580.
130. Mattiuzzo, G., et al., *Development of Lentivirus-Based Reference Materials for Ebola Virus Nucleic Acid Amplification Technology-Based Assays*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142751.
131. Pluta, K. and M.M. Kacprzak, *Use of HIV as a gene transfer vector*. Acta Biochim Pol, 2009. **56**(4): p. 531-95.
132. Kumar, M., et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.

133. Kishishita, N., et al., *Development of a pseudotyped-lentiviral-vector-based neutralization assay for chikungunya virus infection*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1389-95.
134. Zhou, D. and J. Luo, *Construction of Lentivirus-Based Reference Material for RT-PCR Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Its Application in External Quality Assessment*. Advances in Microbiology, 2018. **08**(07): p. 506-518.
135. Almasaud, A., N.K. Alharbi, and A.M. Hashem, *Generation of MERS-CoV Pseudotyped Viral Particles for the Evaluation of Neutralizing Antibodies in Mammalian Sera*, in *MERS Coronavirus*. 2020. p. 117-126.
136. Mantis, N.J., et al., *Establishment of a well-characterized SARS-CoV-2 lentiviral pseudovirus neutralization assay using 293T cells with stable expression of ACE2 and TMPRSS2*. Plos One, 2021. **16**(3).
137. Yan, Y., et al., *Comparison of Seven Commercial Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Nucleic Acid Detection Reagents with Pseudovirus as Quality Control Material*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2021. **23**(3): p. 300-309.
138. Lam, P., et al., *Bioengineering of Tobacco Mosaic Virus to Create a Non-Infectious Positive Control for Ebola Diagnostic Assays*. Scientific Reports, 2016. **6**(1).
139. Lomonosoff, G.P. and C. Wege, *TMV Particles: The Journey From Fundamental Studies to Bionanotechnology Applications*. 2018. p. 149-176.
140. Madi, M., et al., *Development of a non-infectious encapsidated positive control RNA for molecular assays to detect foot-and-mouth disease virus*. J Virol Methods, 2015. **220**: p. 27-34.
141. King, D.P., et al., *Development of a novel recombinant encapsidated RNA particle: Evaluation as an internal control for diagnostic RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 2007. **146**(1-2): p. 218-225.
142. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.
143. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
144. Ferguson, M.R., et al., *HIV-1 replication cycle*. Clin Lab Med, 2002. **22**(3): p. 611-35.
145. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
146. Srinivasakumar, N., *HIV-1 vector systems*. Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 51-81.
147. Faust, T.B., et al., *Making Sense of Multifunctional Proteins: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Accessory and Regulatory Proteins and Connections to Transcription*. Annu Rev Virol, 2017. **4**(1): p. 241-260.
148. Lamb, R.A. and L.H. Pinto, *Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles?* Virology, 1997. **229**(1): p. 1-11.
149. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 97-107.
150. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-767.
151. Wyatt, R. and J. Sodroski, *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1884-8.
152. Chen, B., *Molecular Mechanism of HIV-1 Entry*. Trends in Microbiology, 2019. **27**(10): p. 878-891.
153. Mougél, M., L. Houzet, and J.L. Darlix, *When is it time for reverse transcription to start and go?* Retrovirology, 2009. **6**: p. 24.
154. Huang, Y., et al., *Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 7676-83.

155. Simonova, A., et al., *LC/MS analysis and deep sequencing reveal the accurate RNA composition in the HIV-1 virion*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 8697.
156. Krupkin, M., et al., *Advances in understanding the initiation of HIV-1 reverse transcription*. *Curr Opin Struct Biol*, 2020. **65**: p. 175-183.
157. Hu, W.S. and H.M. Temin, *Retroviral recombination and reverse transcription*. *Science*, 1990. **250**(4985): p. 1227-33.
158. Rhodes, T., H. Wargo, and W.S. Hu, *High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication*. *J Virol*, 2003. **77**(20): p. 11193-200.
159. Sakuragi, J., S. Sakuragi, and T. Shioda, *Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication*. *J Virol*, 2007. **81**(15): p. 7985-92.
160. Trono, D., *Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses*. *J Virol*, 1992. **66**(8): p. 4893-900.
161. Lori, F., et al., *Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions*. *J Virol*, 1992. **66**(8): p. 5067-74.
162. Zhang, H., et al., *Amphipathic domains in the C terminus of the transmembrane protein (gp41) permeabilize HIV-1 virions: a molecular mechanism underlying natural endogenous reverse transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22): p. 12519-24.
163. Houzet, L., et al., *Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(7): p. 2311-9.
164. Suzuki, Y. and R. Craigie, *The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(3): p. 187-96.
165. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(7): p. a006890.
166. Lusic, M. and R.F. Siliciano, *Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration*. *Nat Rev Microbiol*, 2017. **15**(2): p. 69-82.
167. Mukherjee, S., et al., *Imaging Viral Infection by Fluorescence Microscopy: Focus on HIV-1 Early Stage*. *Viruses*, 2021. **13**(2).
168. Berkhout, B., R.H. Silverman, and K.T. Jeang, *Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target*. *Cell*, 1989. **59**(2): p. 273-82.
169. Feinberg, M.B., D. Baltimore, and A.D. Frankel, *The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(9): p. 4045-9.
170. Bigalke, J.M., et al., *Formation of Tat-TAR containing ribonucleoprotein complexes for biochemical and structural analyses*. *Methods*, 2011. **53**(1): p. 78-84.
171. Karn, J. and C.M. Stoltzfus, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(2): p. a006916.
172. Cassan, M., et al., *Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells*. *J Virol*, 1994. **68**(3): p. 1501-8.
173. Buxton, P., G. Tachedjian, and J. Mak, *Analysis of the contribution of reverse transcriptase and integrase proteins to retroviral RNA dimer conformation*. *J Virol*, 2005. **79**(10): p. 6338-48.
174. Jacks, T., et al., *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression*. *Nature*, 1988. **331**(6153): p. 280-3.
175. Hill, C.P., et al., *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(7): p. 3099-104.
176. Jouvenet, N., P.D. Bieniasz, and S.M. Simon, *Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells*. *Nature*, 2008. **454**(7201): p. 236-40.

177. Ivanchenko, S., et al., *Dynamics of HIV-1 assembly and release*. PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000652.
178. Kuzembayeva, M., et al., *Life of psi: how full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles*. Virology, 2014. **454-455**: p. 362-70.
179. Chen, J., et al., *High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13535-40.
180. Moore, M.D., et al., *Probing the HIV-1 genomic RNA trafficking pathway and dimerization by genetic recombination and single virion analyses*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000627.
181. Sakuragi, J., T. Shioda, and A.T. Panganiban, *Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of human immunodeficiency virus type 1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2557-65.
182. Sakuragi, J., et al., *Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 4060-9.
183. Abbink, T.E. and B. Berkhout, *A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11601-11.
184. Lu, K., et al., *NMR detection of structures in the HIV-1 5'-leader RNA that regulate genome packaging*. Science, 2011. **334**(6053): p. 242-5.
185. Aldovini, A. and R.A. Young, *Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 1920-6.
186. Rein, A., *RNA Packaging in HIV*. Trends Microbiol, 2019. **27**(8): p. 715-723.
187. Kondo, E. and H.G. Gottlinger, *A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 159-64.
188. Feng, Y.X., et al., *HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7577-81.
189. von Schwedler, U.K., et al., *Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly*. EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1555-68.
190. Trono, D., *Lentiviral Vectors*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2002.
191. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
192. Merten, O.W., et al., *Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application*. Hum Gene Ther, 2011. **22**(3): p. 343-56.
193. Ausubel, L.J., et al., *Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors*. Bioprocess Int, 2012. **10**(2): p. 32-43.
194. *Overview of Recombinant Lentivirus Particles and Infection of Target Cell*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.mirusbio.com/applications/high-titer-virus-production/lentivirus-production#figure1303>.
195. Bulcha, J.T., et al., *Viral vector platforms within the gene therapy landscape*. Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 53.
196. Naldini, L., et al., *In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-267.
197. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11382-8.
198. Carmo, M., et al., *Thermosensitivity of the reverse transcription process as an inactivation mechanism of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(10): p. 1168-76.

199. Tolmachov, O., T. Tolmachova, and F. A., *Designing Lentiviral Gene Vectors*, in *Viral Gene Therapy*. 2011.
200. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(9): p. 871-5.
201. Kim, V.N., et al., *Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 811-6.
202. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
203. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
204. Pauwels, K., et al., *State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations*. *Curr Gene Ther*, 2009. **9**(6): p. 459-74.
205. Kotsopoulou, E., et al., *A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene*. *J Virol*, 2000. **74**(10): p. 4839-52.
206. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 521-9.
207. Banasik, M.B. and P.B. McCray, Jr., *Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications*. *Gene Ther*, 2010. **17**(2): p. 150-7.
208. Park, F. and M.A. Kay, *Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo*. *Mol Ther*, 2001. **4**(3): p. 164-73.
209. Barry, S.C., et al., *Lentivirus vectors encoding both central polypurine tract and posttranscriptional regulatory element provide enhanced transduction and transgene expression*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(9): p. 1103-8.
210. Zufferey, R., et al., *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(4): p. 2886-2892.
211. Segura, M.M., et al., *Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification*. *Biotechnol Bioeng*, 2007. **98**(4): p. 789-99.
212. Strang, B.L., et al., *Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells*. *Gene Ther*, 2004. **11**(7): p. 591-8.
213. Chan, W.T., et al., *A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli*. *Biosci Rep*, 2013. **33**(6).
214. Kriesel, F., et al., *Efficient inactivation of pseudotyped HIV-based lentiviral vectors and infectious HIV*. *J Virol Methods*, 2020. **276**: p. 113768.
215. Zou, S., et al., *Inactivation of the novel avian influenza A (H7N9) virus under physical conditions or chemical agents treatment*. *Virol J*, 2013. **10**: p. 289.
216. Leifels, M., et al., *Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications - A systematic review*. *Water Res X*, 2021. **11**: p. 100080.
217. Zhang, B., et al., *The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events*. *Genet Vaccines Ther*, 2004. **2**(1): p. 6.
218. Scherr, M., et al., *Quantitative Determination of Lentiviral Vector Particle Numbers by Real-Time PCR*. *BioTechniques*, 2001. **31**(3): p. 520-526.
219. Sastry, L., et al., *Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods*. *Gene Ther*, 2002. **9**(17): p. 1155-62.
220. Bauer, P., et al., *Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion*. *Biotechniques*, 1997. **22**(6): p. 1128-32.

221. Junowicz, E. and J.H. Spencer, *Studies on bovine pancreatic deoxyribonuclease A. I. General properties and activation with different bivalent metals*. Biochim Biophys Acta, 1973. **312**(1): p. 72-84.
222. Campbell, V.W. and D.A. Jackson, *The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA*. J Biol Chem, 1980. **255**(8): p. 3726-35.
223. Merten, O.W., M. Hebben, and C. Bovolenta, *Production of lentiviral vectors*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16017.
224. Jiang, W., et al., *An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13875.
225. Kutner, R.H., X.Y. Zhang, and J. Reiser, *Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 495-505.
226. Cantin, R., et al., *Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants*. J Immunol Methods, 2008. **338**(1-2): p. 21-30.
227. Liao, Z., et al., *Acetylcholinesterase is not a generic marker of extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1628592.
228. Nolte-t Hoen, E., et al., *Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives?* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(33): p. 9155-9161.
229. Dettenhofer, M. and X.F. Yu, *Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1460-7.
230. *OptiPrep Application Sheet S03*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.optiprep.com/S03.pdf>.
231. *OptiPrep Application Sheet V04*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.axis-shield-density-gradient-media.com/V04.pdf>.
232. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-95.
233. *Laboratory Ultrafiltration*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.sartorius.com/download/449148/5/laboratory-ultrafiltration-faq-2020-1-13-20-pdf-data.pdf>.
234. Zimmermann, K., et al., *Highly efficient concentration of lenti- and retroviral vector preparations by membrane adsorbers and ultrafiltration*. BMC Biotechnol, 2011. **11**: p. 55.
235. *AriaMx Real-time PCR System*. [cited 2021 September 02]; Available from: [https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-\(qpcr\)/real-time-pcr-\(qpcr\)-instruments/ariamx-real-time-pcr-system-software-pc/ariamx-real-time-pcr-system-232711](https://www.agilent.com/en/product/real-time-pcr-(qpcr)/real-time-pcr-(qpcr)-instruments/ariamx-real-time-pcr-system-software-pc/ariamx-real-time-pcr-system-232711).
236. *V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.certest.es/es/viasure/viasure-v-lab96/>.
237. *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System*. [cited 2021 September 02]; Available from: <https://www.bio-rad.com/es-es/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system?ID=LJB1YU15>.
238. *World Health Organization. Establishing stability of in vitro diagnostic medical devices (No. WHO/BS/2017.2304)*. World Health Organization, 2019.
239. Testing, A.S.f. and Materials, *Standard guide for accelerated aging of sterile barrier systems for medical devices*. 2007: ASTM international.
240. Clark, G.S., *Shelf life of medical devices. Food and Drug Administration Guidance Document*. 1991.
241. Artika, I.M. and C.N. Ma'roef, *Laboratory biosafety for handling emerging viruses*. Asian Pac J Trop Biomed, 2017. **7**(5): p. 483-491.
242. Jain, J., et al., *In silico analysis of natural compounds targeting structural and nonstructural proteins of chikungunya virus*. F1000Res, 2017. **6**: p. 1601.

243. Powers, A.M., et al., *Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 2): p. 471-9.
244. Wikan, N., et al., *Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e31102.
245. Sharif, N., et al., *Molecular Epidemiology, Evolution and Reemergence of Chikungunya Virus in South Asia*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 689979.
246. Dash, P.K., et al., *Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **62**(1): p. 52-7.
247. Edwards, C.J., et al., *Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus*. J Clin Virol, 2007. **39**(4): p. 271-5.
248. Ho, P.S., M.M. Ng, and J.J. Chu, *Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection*. Virol J, 2010. **7**: p. 13.
249. Lanciotti, R.S., et al., *Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(5): p. 764-7.
250. Parida, M.M., et al., *Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 351-7.
251. Cecilia, D., et al., *Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 323-7.
252. Waggoner, J.J., et al., *Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(7): p. 1295-7.
253. Shelke, G.V., et al., *Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
254. Jin, Y., et al., *DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 753.
255. Ludwig, N., T.L. Whiteside, and T.E. Reichert, *Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(19).
256. Li, J., et al., *Identification and Characterization of 293T Cell-Derived Exosomes by Profiling the Protein, mRNA and MicroRNA Components*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163043.
257. Reiser, J., *Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors*. Gene Ther, 2000. **7**(11): p. 910-3.
258. Kuroda, H., et al., *Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection*. J Virol Methods, 2009. **157**(2): p. 113-21.
259. Geraerts, M., et al., *Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration*. J Gene Med, 2005. **7**(10): p. 1299-310.
260. Bruyndonckx, R., et al., *Respiratory syncytial virus and influenza virus infection in adult primary care patients: Association of age with prevalence, diagnostic features and illness course*. International Journal of Infectious Diseases, 2020. **95**: p. 384-390.
261. Kim, D., et al., *The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome*. Cell, 2020. **181**(4): p. 914-921 e10.
262. Yan, Y., L. Chang, and L. Wang, *Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures*. Rev Med Virol, 2020. **30**(3): p. e2106.
263. Alexandersen, S., A. Chamings, and T.R. Bhatta, *SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 6059.

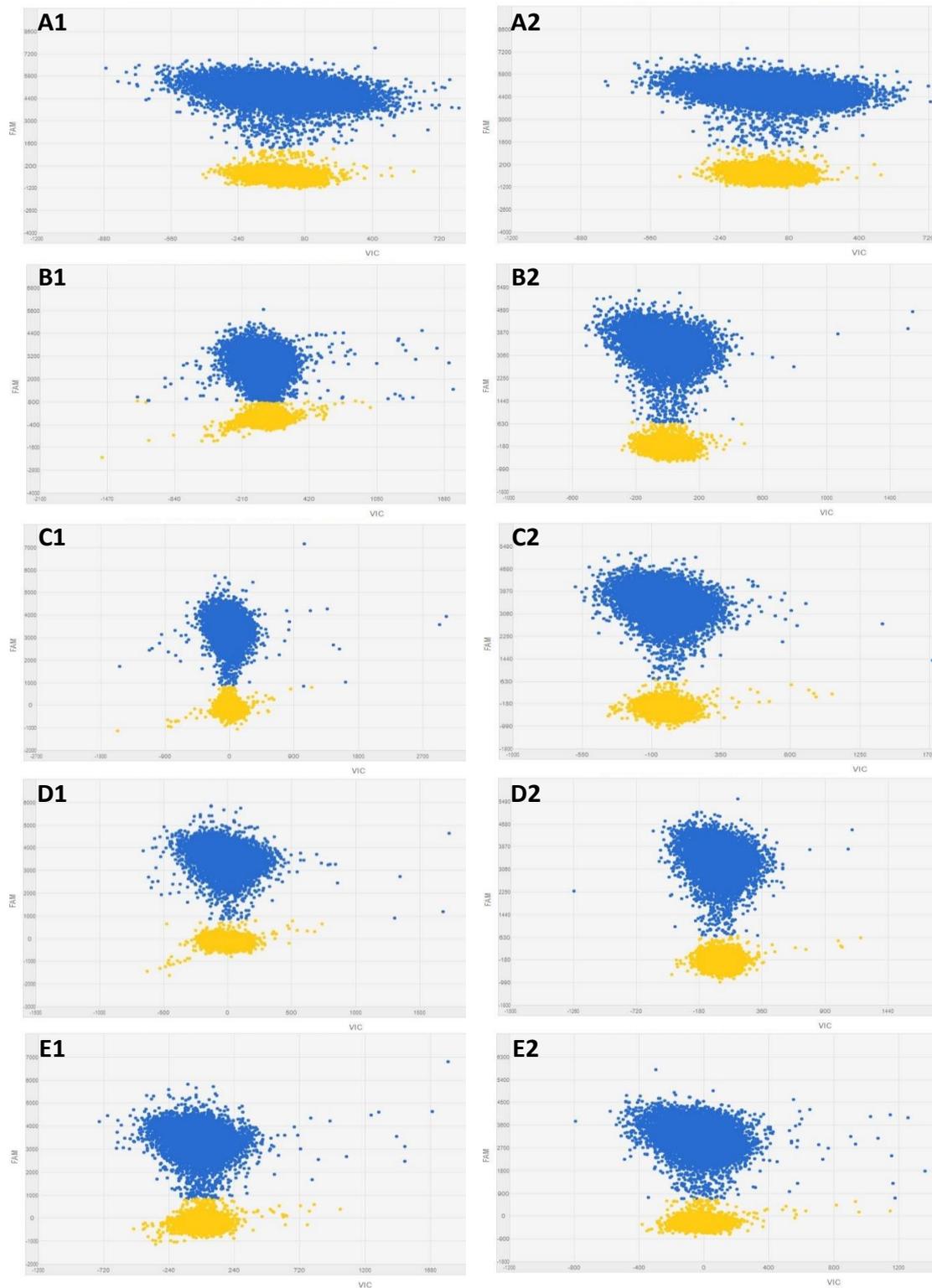
264. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies*. Cell, 2021. **184**(9): p. 2384-2393 e12.
265. Cao, D., Y. Gao, and B. Liang, *Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes*. Viruses, 2021. **13**(5).
266. Cox, R. and R.K. Plemper, *The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 459.
267. Tan, L., et al., *Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51439.
268. Kumaria, R., et al., *Whole genome characterization of non-tissue culture adapted HRSV strains in severely infected children*. Virol J, 2011. **8**: p. 372.
269. Griffiths, C., S.J. Drews, and D.J. Marchant, *Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment*. Clin Microbiol Rev, 2017. **30**(1): p. 277-319.
270. Jackson, D., R.A. Elderfield, and W.S. Barclay, *Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 1): p. 1-17.
271. Dou, D., et al., *Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1581.
272. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
273. Baker, S.F., A. Nogales, and L. Martínez-Sobrido, *Downregulating viral gene expression: codon usage bias manipulation for the generation of novel influenza A virus vaccines*. Future Virol, 2015. **10**(6): p. 715-730.
274. Baker, S.F., A. Nogales, and L. Martínez-Sobrido, *Downregulating viral gene expression: codon usage bias manipulation for the generation of novel influenza A virus vaccines*. Future Virology, 2015. **10**(6): p. 715-730.
275. Neumann, G. and Y. Kawaoka, *Transmission of influenza A viruses*. Virology, 2015. **479-480**: p. 234-246.
276. Fan, J., et al., *Detection of a novel avian influenza A (H7N9) virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay*. BMC Infectious Diseases, 2014. **14**(1).
277. Rota, P.A., et al., *Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983*. Virology, 1990. **175**(1): p. 59-68.
278. Caini, S., et al., *The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0222381.
279. Nayar, G., et al., *Analysis and forecasting of global real time RT-PCR primers and probes for SARS-CoV-2*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 8988.
280. Hu, A., et al., *Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 149-54.
281. Yan, Y., et al., *A multiplex liquid-chip assay based on Luminex xMAP technology for simultaneous detection of six common respiratory viruses*. Oncotarget, 2017. **8**(57): p. 96913-96923.
282. Mentel, R., et al., *Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection*. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 10): p. 893-896.
283. Templeton, K.E., et al., *Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(4): p. 1564-9.
284. Kuypers, J., N. Wright, and R. Morrow, *Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children*. J Clin Virol, 2004. **31**(2): p. 123-9.
285. Tolley, K., *Identification of mutations contributing to the reduced virulence of a modified strain of respiratory syncytial virus*. Vaccine, 1996. **14**(17-18): p. 1637-1646.

286. Segaloff, H., et al., *Co-circulation of influenza A(H1N1)pdm09 and influenza A(H3N2) viruses, World Health Organization (WHO) European Region, October 2018 to February 2019*. *Eurosurveillance*, 2019. **24**(9).
287. Takayama, I., et al., *Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza*. *mSphere*, 2021. **6**(1).
288. Yang, Y., et al., *Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR*. *Journal of Virological Methods*, 2010. **167**(1): p. 37-44.
289. White, R.A., 3rd, S.R. Quake, and K. Curr, *Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus*. *J Virol Methods*, 2012. **179**(1): p. 45-50.
290. Sanders, R., et al., *Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples*. *Anal Bioanal Chem*, 2014. **406**(26): p. 6471-83.
291. Davis, H.E., J.R. Morgan, and M.L. Yarmush, *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. *Biophys Chem*, 2002. **97**(2-3): p. 159-72.
292. *Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors*. [cited 2021 September 02]; Available from: [https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/Lenti\\_Containment\\_Guidance.pdf](https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/Lenti_Containment_Guidance.pdf).
293. Aslanzadeh, J., *Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory*. *Ann Clin Lab Sci*, 2004. **34**(4): p. 389-96.
294. Borst, A., A.T.A. Box, and A.C. Fluit, *False-Positive Results and Contamination in Nucleic Acid Amplification Assays: Suggestions for a Prevent and Destroy Strategy*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2004. **23**(4): p. 289-299.

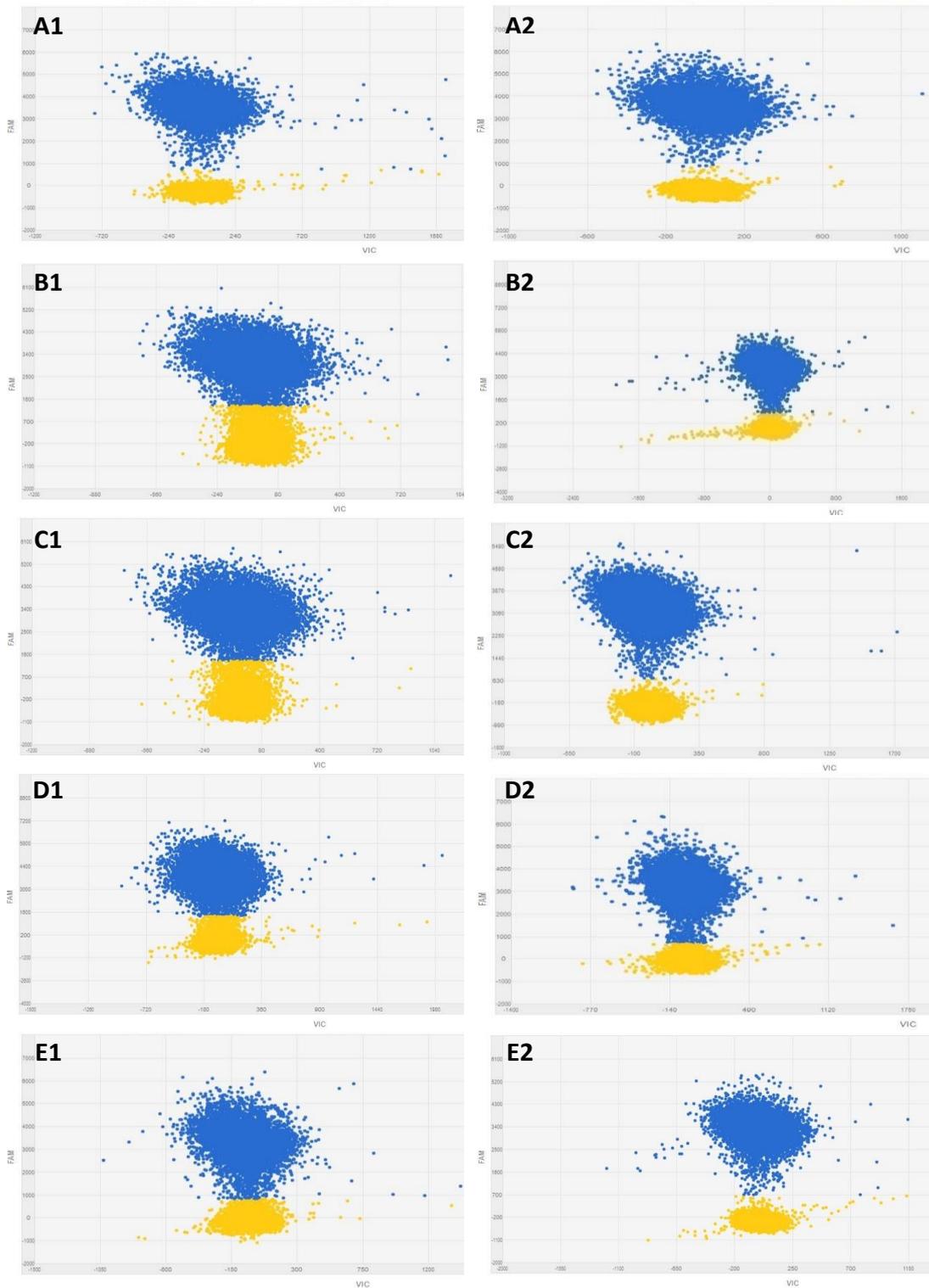
## IX. ANEXOS

---





**Figura S1.** Resultados obtenidos tras la cuantificación por PCR digital, mediante el sistema QuantStudio® 3D Digital PCR, del RNA viral contenido en las partículas virales de SARS-CoV-2 (resultados de dos réplicas en figuras A1 y A2) y en las partículas virales de Influenza A (resultados de YIA1 en B1 y B2; YIA2 en C1 y C2; YIA3 en D1 y D2; YIA4 en E1 y E2). Diagramas de dispersión proporcionados por el software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™. Se muestran los pocillos positivos (fluoróforo FAM, azul), en los cuales ha ocurrido la amplificación del DNA molde, y los pocillos negativos (fluoróforo ROX, amarillo), en los que no ha ocurrido la amplificación del DNA molde. El Threshold (Th) se ha ajustado manualmente en la zona donde se observa una separación clara entre las dos poblaciones: Th = 1.200 (A1 y A2); Th = 800 (B1, C1, D1 y E1); Th = 650 (B2, C2, D2 y E2).



**Figura S2.** Resultados obtenidos tras la cuantificación por PCR digital, mediante el sistema QuantStudio® 3D Digital PCR, del RNA viral contenido en las partículas virales de RSV (resultados de dos réplicas en figuras A1 y A2) y en las partículas virales de Influenza B (resultados de YIB1 en B1 y B2; YIB2 en C1 y C2; YIB3 en D1 y D2; YIB4 en E1 y E2). Diagramas de dispersión proporcionados por el software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™. Se muestran los pocillos positivos (fluoróforo FAM, azul), en los cuales ha ocurrido la amplificación del DNA molde, y los pocillos negativos (fluoróforo ROX, amarillo), en los que no ha ocurrido la amplificación del DNA molde. El Threshold (Th) se ha ajustado manualmente en la zona donde se observa una separación clara entre las dos poblaciones: Th = 650 (A1); Th = 800 (A2); Th = 1.300 (B1, C1, D1 y E1); Th = 800 (B2); Th = 650 (C2, D2 y E2).

**Tabla S1.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el envejecimiento acelerado de las partículas virales de SARS-CoV-2. Extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

		Gen ORF1ab (FAM)		
Días	Temperatura	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	25,85	NA	NA
7	25°C	26,36	0,67	2,54
	4°C	26,14	0,46	1,77
	50°C	26,20	0,49	1,88
17	25°C	26,01	0,24	0,94
	4°C	25,85	0,17	0,64
	50°C	26,05	0,29	1,10
30	25°C	25,77	0,33	1,28
	4°C	25,54	0,41	1,60
	50°C	25,81	0,14	0,55
51	25°C	25,54	0,38	1,47
	4°C	25,46	0,49	1,94
	50°C	25,85	0,19	0,74
70	25°C	25,59	0,35	1,36
	4°C	25,57	0,35	1,36
	50°C	26,10	0,34	1,31
114	25°C	25,59	0,33	1,28
	4°C	25,69	0,26	1,01
	50°C	26,33	0,59	2,24
150	25°C	25,54	0,41	1,61
	4°C	25,43	0,48	1,90
	50°C	26,19	0,47	1,78

**Tabla S2.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el envejecimiento acelerado de las partículas virales de RSV. Extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

		Gen N (Cy5)		
Días	Temperatura	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	26,87	NA	NA
30	25°C	27,08	0,31	1,14
	4°C	27,09	0,35	1,29
	50°C	27,27	0,52	1,92
90	25°C	26,79	0,15	0,56
	4°C	26,89	0,18	0,67
	50°C	27,13	0,32	1,17
150	25°C	26,88	0,13	0,50
	4°C	26,96	0,18	0,66
	50°C	27,29	0,48	1,77

**Tabla S3.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{X}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el envejecimiento acelerado de las partículas virales de influenza A. Extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviatura: Temp: Temperatura.

Días	Temp.	Gen M (FAM)			Gen PB2 (FAM)			Gen NS (FAM)			Gen PA (FAM)		
		$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	27,39	NA	NA	26,44	NA	NA	26,80	NA	NA	25,53	NA	NA
30	25°C	27,76	0,43	1,56	26,67	0,31	1,15	26,95	0,22	0,80	25,45	0,23	0,89
	4°C	27,50	0,20	0,71	26,54	0,17	0,63	26,79	0,18	0,65	25,42	0,25	0,99
	50°C	27,61	0,27	0,98	26,71	0,32	1,22	26,98	0,22	0,83	25,73	0,26	1,01
90	25°C	27,64	0,31	1,14	26,43	0,26	0,98	26,80	0,26	0,96	25,68	0,30	1,16
	4°C	27,66	0,35	1,26	26,45	0,16	0,62	26,80	0,21	0,77	25,64	0,26	1,03
	50°C	27,99	0,68	2,44	26,75	0,39	1,46	27,19	0,47	1,72	26,12	0,68	2,62
150	25°C	27,50	0,21	0,78	26,62	0,29	1,07	26,77	0,22	0,81	25,58	0,26	1,01
	4°C	27,51	0,19	0,68	26,60	0,23	0,86	26,78	0,18	0,67	25,53	0,21	0,83
	50°C	27,80	0,47	1,71	26,94	0,61	2,27	27,27	0,58	2,13	26,14	0,73	2,80

**Tabla S4.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{X}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el envejecimiento acelerado de las partículas virales de influenza B. Extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviatura: Temp: Temperatura.

Días	Temp.	Gen M (ROX)			Gen NP (FAM)			Gen NA (FAM)			Gen PB2 (FAM)		
		$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{X}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	24,85	NA	NA	26,48	NA	NA	26,38	NA	NA	26,33	NA	NA
30	25°C	24,85	0,14	0,55	26,31	0,22	0,85	26,47	0,19	0,71	26,38	0,13	0,49
	4°C	24,87	0,13	0,51	26,36	0,14	0,52	26,39	0,18	0,69	26,40	0,10	0,38
	50°C	24,99	0,26	1,02	26,72	0,41	1,55	26,51	0,26	0,97	26,50	0,20	0,74
90	25°C	24,83	0,15	0,59	26,53	0,11	0,40	26,51	0,27	1,01	26,52	0,25	0,94
	4°C	24,80	0,14	0,54	26,57	0,18	0,66	26,35	0,10	0,37	26,42	0,15	0,58
	50°C	25,22	0,44	1,73	27,00	0,58	2,14	26,80	0,49	1,82	26,87	0,61	2,25
150	25°C	24,74	0,17	0,69	26,28	0,24	0,91	26,58	0,38	1,42	26,34	0,10	0,37
	4°C	24,71	0,21	0,85	26,32	0,18	0,70	26,41	0,09	0,33	26,38	0,09	0,34
	50°C	25,15	0,35	1,38	26,81	0,38	1,41	26,88	0,56	2,08	26,73	0,45	1,69

**Tabla S5.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el análisis de la estabilidad en uso de las partículas virales de SARS-CoV-2. Extracción de ácidos nucleicos con Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit en termocicladores AriaMx Real-Time PCR System y CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System.

		Gen ORF1ab (FAM)		
Tiempo	Temperatura	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0h	25°C	26,00	NA	NA
5h	25°C	26,32	0,29	1,11
	4°C	26,20	0,31	1,18
24h	25°C	26,01	0,23	0,87
	4°C	26,03	0,21	0,80
48h	25°C	26,13	0,16	0,61
	4°C	26,04	0,11	0,43
72h	25°C	26,16	0,30	1,14
	4°C	26,20	0,22	0,86
8 días	25°C	26,23	0,24	0,91
	4°C	26,43	0,33	1,24
0h	25°C	26,91	NA	NA
30 días	-20°C	26,25	0,59	2,25
	-80°C	26,16	0,66	2,54

**Tabla S6.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el análisis de la estabilidad en uso de las partículas virales de RSV. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit en termociclador AriaMx Real-Time PCR System.

		Gen N (Cy5)		
Días	Temperatura	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	26,77	NA	NA
1	25°C	27,13	0,44	1,61
	4°C	26,99	0,26	0,98
3	25°C	27,27	0,54	1,98
	4°C	27,17	0,43	1,60
7	25°C	27,26	0,53	1,94
	4°C	27,12	0,39	1,42
14	25°C	27,21	0,51	1,86
	4°C	27,21	0,49	1,81
0h	25°C	26,85	NA	NA
30	-20°C	26,97	0,15	0,57
	-80°C	26,90	0,13	0,49

**Tabla S7.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el análisis de la estabilidad en uso de las partículas virales de influenza A. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviatura: Temp: Temperatura.

Días	Temp.	Gen M (FAM)			Gen PB2 (FAM)			Gen NS (FAM)			Gen PA (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	26,63	NA	NA	25,46	NA	NA	25,84	NA	NA	24,80	NA	NA
1	25°C	26,77	0,18	0,68	25,52	0,17	0,65	25,87	0,09	0,36	24,90	0,14	0,57
	4°C	26,78	0,19	0,71	25,50	0,13	0,50	25,84	0,07	0,29	24,84	0,07	0,27
3	25°C	26,93	0,36	1,36	25,61	0,21	0,84	26,00	0,20	0,78	25,02	0,26	1,02
	4°C	26,86	0,30	1,11	25,60	0,21	0,82	25,96	0,19	0,75	24,89	0,15	0,58
7	25°C	27,33	0,82	2,99	25,82	0,44	1,69	26,00	0,21	0,79	25,14	0,40	1,60
	4°C	27,11	0,56	2,06	25,73	0,37	1,44	25,92	0,12	0,47	25,08	0,32	1,28
14	25°C	27,19	0,65	2,41	26,12	0,77	2,96	26,36	0,61	2,30	25,27	0,54	2,14
	4°C	27,01	0,46	1,69	25,94	0,57	2,20	26,14	0,35	1,35	25,05	0,31	1,26
30	-20°C	27,03	0,46	1,72	25,71	0,32	1,26	25,89	0,11	0,41	24,86	0,08	0,33
	-80°C	26,92	0,35	1,29	25,63	0,25	0,96	25,81	0,12	0,48	24,73	0,12	0,48

**Tabla S8.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos durante el análisis de la estabilidad en uso de las partículas virales de influenza B. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador AriaMx Real-Time PCR System. Abreviatura: Temp: Temperatura.

Días	Temp.	Gen M (ROX)			Gen NP (FAM)			Gen NA (FAM)			Gen PB2 (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
0	25°C	24,09	NA	NA	24,28	NA	NA	24,39	NA	NA	25,17	NA	NA
1	25°C	24,32	0,29	1,20	24,31	0,07	0,29	24,39	0,08	0,32	24,81	0,42	1,71
	4°C	24,34	0,39	1,61	24,22	0,22	0,93	24,53	0,22	0,90	24,86	0,37	1,49
3	25°C	24,27	0,23	0,96	24,29	0,05	0,22	24,43	0,07	0,27	24,96	0,25	1,01
	4°C	24,26	0,20	0,83	24,44	0,27	1,10	24,48	0,10	0,42	24,87	0,35	1,40
7	25°C	24,42	0,38	1,57	24,84	0,66	2,64	24,62	0,27	1,08	25,03	0,17	0,68
	4°C	24,22	0,16	0,65	24,53	0,29	1,19	24,54	0,18	0,73	24,88	0,34	1,38
14	25°C	24,42	0,40	1,62	24,74	0,56	2,26	24,59	0,25	1,01	24,93	0,28	1,11
	4°C	24,32	0,27	1,11	24,56	0,32	1,32	24,58	0,29	1,16	24,82	0,41	1,66
30	-20°C	24,22	0,16	0,67	24,07	0,24	1,00	24,53	0,18	0,73	25,15	0,06	0,25
	-80°C	24,17	0,12	0,48	24,00	0,33	1,36	24,42	0,05	0,21	25,06	0,13	0,53

**Tabla S9.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la estabilidad en el transporte de las partículas virales de SARS-CoV-2. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit en termociclador V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform.

Condición	Temperatura	Gen ORF1ab (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
Control	25°C	25,62	NA	NA
Transportado	16,9°C	25,66	0,21	0,80

**Tabla S10.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la estabilidad en el transporte de las partículas virales de influenza A. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform. Abreviaturas: Temp: Temperatura; Cond: condición; C: kit control (no transportado); T: kit transportado.

Cond.	Temp.	Gen M (FAM)			Gen PB2 (FAM)			Gen NS (FAM)			Gen PA (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
C	25°C	26,99	NA	NA	26,65	NA	NA	26,69	NA	NA	25,11	NA	NA
T	16,9°C	27,11	0,32	1,17	26,68	0,90	3,37	26,91	0,47	1,76	24,91	0,33	1,31

**Tabla S11.** Media de los valores de  $C_q$  ( $\bar{x}$ ), desviación típica ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en el análisis de la estabilidad en el transporte de las partículas virales de influenza B. Extracción de ácidos nucleicos con MagDEA DxSV Kit ( $V_0 = 200 \mu\text{l}$ ;  $V_f = 100 \mu\text{l}$ ) y posterior análisis por RT-qPCR con VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit y 3 ensayos RT-qPCR in-house en termociclador V-Lab96 VIASURE Real Time PCR platform. Abreviaturas: Temp: Temperatura; Cond: condición; C: kit control (no transportado); T: kit transportado.

Cond.	Temp.	Gen M (ROX)			Gen NP (FAM)			Gen NA (FAM)			Gen PB2 (FAM)		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)	$\bar{x}$	$\sigma$	CV (%)
C	25°C	24,89	NA	NA	25,88	NA	NA	26,43	NA	NA	26,72	NA	NA
T	16,9°C	24,96	0,09	0,35	25,89	0,11	0,43	26,40	0,14	0,51	26,62	0,18	0,67

**Figura S3.** Visualización en el software IGV de las lecturas mapeadas, respecto a la secuencia de referencia, obtenidas tras secuenciación masiva del RNA viral procedente de las partículas YIA1 (A), YIA2 (B), YIA3 (C), YIA4 (D), NCO (E), YIB1 (F), YIB2 (G), YIB3 (H), YIB4 (I) y RSV (J). Se muestran las mutaciones que cursan con un cambio por timina (en rojo), adenina (verde), citosina (azul) y guanina (marrón). El gráfico superior indica el nivel de cobertura alcanzado a lo largo del RNA viral secuenciado. El gráfico inferior permite visualizar la profundidad de cobertura, observándose la cantidad de lecturas que mapean en una determinada región del genoma.

