



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

**“Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en
células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una
estrategia para explorar su papel en la respuesta celular
al virus de influenza”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

P R E S E N T A:

L. F. MARCOS DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSE LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MOR.

2023





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 17 de mayo de 2023
Folio: FF/M/SI/CIP/MF/086/2023

L.F MARCOS DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ
ALUMNO DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 17 de mayo de 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora de tesis y jurado para la tesis titulada “**Silenciamiento de la proteína Smad7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza**”.

Sinodal

Presidente Dra. Leticia González Maya^{NA}
Secretario Dra. Judith González Christen^{NA}
Vocal 1 Dr. Tomas David López Díaz
Suplente 1 Dr. Ramón Antonio González García Conde
Suplente 2 Dr. José Luis Montiel Hernández^{NA}

NA = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Adscripción

Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
IBT UNAM
CIDC-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Por una humanidad culta
una Universidad de Excelencia”

e-firma UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

ccp: archivo.

Dra. Leticia González Maya; Dra. Judith González Christen; Dr. Tomas David López Diaz; Dr. Ramón Antonio González García Conde; Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-05-18 09:46:31 | Firmante

MBWHect5Zsb/zEyYMqa+OIOVZqBlxxnEPdD000G2Nbegl8zIYm+5f5XyKM8ukR93LWb0ykrO3B/+f1jfl9LNhoZQpBefxzSDuxfnYIrchSx3N5igTCIwlpBLrcW7w1/aSGDKk1mNxVi3MNA4pbBX3nt44R+C7nSG8boY9GhAR22Miz13azTFznAdSjlwSskQjSUNOpvp45h7B+W5HI9mHhnLFbYYhGeHZHPkMRUi6knsXaTwcPw0EJKXEIt4thm1sLulEsx0xfuZnmD8jvRI06WuEtxvuyiutwSHzaWqQuNrh2N4qdEPdY+GK5iu7gZbuHmHEmUqjnh4xw+tCwUv0A==

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



QP64e2x31

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b2EJAiqNNpG2F3R2f44J7AZdpZwscvr1>



“Don't only practice your art, but force your way into its secrets, for it and knowledge can raise men to the divine.”

-Ludwig van Beethoven

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada con Núm. de CVU 1099773

A la Facultad de Farmacia de la universidad Autónoma del Estado de Morelos que me forjo durante la licenciatura y la maestría, y ser un profesional competente.

Al Dr. José Luis Montiel, por haberme aceptado en su laboratorio desde la licenciatura y por haberme permitido concluir mi tesis en la maestría. Le agradezco su paciencia conmigo, reconociendo que no soy ni seré el más inteligente, pero mi deseo constante por aprender a veces me lleva a desafiar obstáculos y a ser un tanto insistente y rebelde. No obstante, bajo su tutela, he adquirido un conocimiento invaluable. Me ha enseñado a ser más crítico y objetivo, a cultivar la paciencia y ha impulsado mi carrera profesional.

A la Dra. Judith, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo que me ha brindado desde que ingresé al laboratorio. He aprendido mucho a su lado, especialmente a no temer cometer errores y a encontrar soluciones para los desafíos que se me presentan. Agradezco que me haya permitido ser autónomo y enérgico dentro del laboratorio, ya que esto me ha permitido crecer en mi carrera profesional y aprender de mis errores sin temor, sino más bien buscando soluciones.

A La Dra. Leticia Gonzalez, por tomarse de su tiempo a enseñarme y compartir de su conocimiento a lo largo de estos años. Se que la he llegado a desesperar, pero he aprendido mucho de usted, y le agradezco que haya formado como parte de mi comité tutorial, por brindarme sus críticas y valioso asesoramiento.

Al Dr. Mario Cruz, agradezco su generosidad al permitirnos utilizar su laboratorio y equipo para llevar a cabo la primera parte de mi proyecto, así como por donRNAs el vector PX458.

A la Dra. Angelica Meneses, que me permitió utilizar su ultracentrífuga y agitador.

A la Dra. María Antonieta del IBT-UNAM, le agradezco su apoyo en el uso del cuarto frío y en la disponibilidad de los agitadores de su laboratorio.

Dra. Elizabeth Lorraine del IBT-UNAM, le agradezco por permitirme utilizar su termociclador, sus agitadores y el cuarto frío de su laboratorio.

Al Dr. Dr. Lourival Possani del IBT-UNAM por permitirme utilizar su equipo chemidpc para el revelado de western blot.

A la MenC. Erika Melchy Pérez DEL IBT-UNAM por brindarme de su apoyo en el citómetro de flujo.

DEDICATORIAS

A mi madre, Isabel, por apoyarme incondicionalmente y por hacer realidad mis sueños y caprichos. No podría haberlo logrado sin ti. Todo lo que tengo te lo debo a ti. Gracias por enseñarme sobre la vida, por estar a mi lado incondicionalmente y sin pedirme nada a cambio. A mi padre, Arturo, por su apoyo. A mi hermano, Mario, por estar a mi lado y brindarme su apoyo.

A mis amigos de toda la vida, Dina, Armando, Omar, Arlette, Mariana, Chema, Martín, Uriel y Andrés, quienes me han brindado su amistad incondicional y han estado a mi lado en los buenos y malos momentos. Su apoyo me ha permitido seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio, Ale Peña, Dr. Ivan, Dianita, Alma, Samantha, Adriana, Anita, Gonzalo, Dafne y Emmanuel, a quienes agradezco por su apoyo y amistad. Hicieron que mi tiempo en el laboratorio fuera divertido, lleno de risas y más agradable, convirtiéndolo en una especie de segunda casa para mí

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	15
SUMMARY	17
INTRODUCCION	19
Epidemiología.....	21
Ciclo viral del virus de Influenza	25
Señalización del TGF- β	33
Muerte celular programada: Apoptosis	35
CRISPR-Cas9: una técnica de precisión para la modificación genética.....	40
ANTECEDENTES	45
JUSTIFICACIÓN	50
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	52
Objetivo General.....	52
Objetivo Específicos	52
MATERIALES Y METODOS	53
Cultivo celular	53
Diseño y síntesis de sgRNA	53
Clonación de las sgRNA en el vector PX458.....	54
Extracción de DNA plasmídico	58
Ensayos de transfección.....	59
Evaluación de la transfección por citometría de flujo.....	61
Evaluación del apagamiento selectiva de Smad7 en células A549	61
Análisis estadístico	63
RESULTADOS.....	65
Guías para silenciamiento	65
Ensayos de transfección de las sgRNA.....	70
Evaluación del silenciamiento de Smad 7	76

DISCUSIÓN	81
Eficiencia de la transfección de las sgRNA.....	81
Evaluación del silenciamiento de Smad7	83
Limitaciones del estudio	85
CONCLUSIONES.....	87
PERSPECTIVAS.....	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	99
Anexo 1. Secuencias de los exones de Smad 7.....	99
Anexo 2. Vectores y simulación en Snap Gen.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de los Virus de influenza A (VIA)	20
Figura 2. Rutas de endocitosis	25
Figura 3. La entrada del virus de Influenza en la célula hospedadora	27
Figura 4. Cambio Conformacional de HA1 y HA2.	28
Figura 5. Transcripción, replicación y exportación de vRNPs.	30
Figura 6. Transcripción y Replicación del genoma viral.	31
Figura 7. Señalización de TGF- β	34
Figura 8. Activación de caspasas durante apoptosis.	36
Figura 9. El sistema de CRISP- Cas 9	42
Figura 10. Evolución del Sistema CRISPR-Cas9	43
Figura 11. La reparación de roturas de doble cadena promueve la edición de genes. 44	
Figura 12. Respuesta inmune innata tras la infección del virus de influenza en la célula hospedadora	46
Figura 13. Pretratamiento con TGF-β1 regula negativamente la expresión de las proteínas pro-apoptóticas inducida por la infección	47
Figura 14. El pretratamiento con TGF-β1 inhibe la replicación del virus de influenza 48	
Figura 15. El pretratamiento con TGF-β1 favorece la fosforilación de Smad2/Smad3 y reprime a Smad7	49
Figura 16. Simulación del emparejamiento de la sgRNA con el vector en SnapGen	67
Figura 17. Vector PX458	68
Figura 18. Perfil de digestión del vector PX458	69
Figura 19. Secuenciación de sgRNAs	70
Figura 20. Foto representativa de la transfección	71
Figura 21. Análisis de transfección por citometría	73
Figura 22. Sorting de células transfectadas	76
Figura 23. Análisis de la abundancia relativa de Smad 7 mediante Western blot	78
Figura 24. Análisis densitométrico de los tres ensayos	79
Figura 25. Análisis estadístico del efecto de la PX458-sgRNA3 sobre el silenciamiento de Smad 7	80
Figura 26. Vector pEGFP-N1	101
Figura 27. Simulación del perfil de digestión con BbsI y XbaI del PX458 \emptyset y del vector con sgRNA	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos y defunciones ocasionadas por el virus de influenza en México.	23
Tabla 2. Condiciones de alineamiento y fosforilación.	55
Tabla 3. sgRNA diseñadas para dirigirse a los exones de Smad 7.	65
Tabla 4. Secuencias de sgRNA.	67
Tabla 5. Eficiencia de la transfección.	72
Tabla 6. Análisis de varianza por DBCA.	75
Tabla 7. Comparaciones por parejas de Tukey.	75

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
A549	Línea celular derivada de epitelio pulmonar obtenidas de un sarcoma
AKT	Es un tipo de proteína serina- treonina cinasa que participan en varios procesos relacionados con el crecimiento y la supervivencia celular.
Apaf1	Proteína que participa en la inducción de apoptosis a través de la vía intrínseca, formando parte del apoptosoma
apo2D/Trail	Es un ligando de Apo2 ó ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral y ligando inductor de apoptosis relacionada con el FNT.
ATP	Adenosín trifosfato, nucleósido fundamental en la obtención de energía celular.
Bak	Proteína pro-apoptótica que interactúa con la proteína P53, supresora de tumores, y promueve la apoptosis.
Bax	Miembro de la familia de proteínas Bcl-2. Regula la liberación de citocromo C y del factor inductor de apoptosis
Bcl_XL	Miembro de la familia de proteínas Bcl-2, regulador de la apoptosis, actuando como proteína anti-apoptotica en la vía intrínseca
Bcl2	Familia de proteínas que regulan los procesos de permeabilización de la mitocondria y apoptosis.
BH1-BH3	Dominios proteicos que presentan los miembros de la familia Bcl-2.
Bid	Miembro de la familia de proteínas Bcl-2 que actúa como proteína pro-apoptótica.
BSA	Albúmina de suero bovino
Cas	proteínas que actúan como tijeras moleculares

CDC	Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de USA
CIAP	fosfatasa alcalina intestinal bovina, es una fosfomonoesterasa que elimina los fosfatos 3' y 5' del ADN y el ARN
CMR1	Proteína nuclear que facilita el transporte de RNA y proteínas a través de la membrana hacia el citosol.
CO₂	Dióxido de carbono
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Inter espaciadas
crRNA	Secuencia de RNA CRISPR que contiene una secuencia complementaria a las secuencias repetidas del sistema CRISPR-Cas y una porción complementaria al genoma viral invasor.
DBCA	Análisis estadístico por ANOVA de Diseño Experimental de Bloques al Azar.
DISC	Complejos de iniciación de señalización de muerte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM Advanced	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium
F12	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético. Agente quelante de metales
EGFP	Proteina verde fluorescente
EGTA	Ácido aminopolicarboxílico. Agente quelante
FasL	Ligando del receptor Fas que induce la muerte por apoptosis por la vía extrínseca.
GTP	Guanosín trifosfato, también conocido como guanosina-5'-trifosfato
HA	Hemaglutinina. Proteína Estructural del virus de influenza que forma parte de la envoltura del virus

HA1	Subunidad estructural de la proteína viral hemaglutinina que tiene la función de reconocer residuos de ácido siálico.
HA2	Subunidad estructural de la proteína viral hemaglutinina que tiene la función de llevar a cabo la fusión de la membrana endosomal y viral.
HDR	Recombinación homóloga dirigida es un tipo de reparación de doble rotura del DNA.
HSP	Proteína de choque térmico.
IAV	Virus de influenza tipo A.
IDT	Integrated DNA Technologies, proveedor de ácidos nucleicos.
IFNAR	Receptor para IFN alfa y beta.
IFN-α/β	Interferones de tipo uno que ayudan en la respuesta inmunológica.
IMPα	Importinas cuya función es el transporte de proteínas a través de la membrana nuclear desde el citosol al núcleo de la célula.
IMPβ1	Importinas cuya función es el transporte de proteínas a través de la membrana nuclear desde el citosol al núcleo de la célula.
LB	Caldo Luria (Luria Bertani). Medio de cultivo para el cultivo de bacterias
M1	Proteína Estructural del virus de influenza que forma parte de la cápside del virus.
M2	Proteína Estructural del virus de influenza que forma parte de la envoltura del virus
MAPK	Familia de proteínas cinasas que participan en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares.
mRNA	ARN mensajero, el cual contiene la información genética para sintetizar proteínas.

MTOC	Centro organizador de microtúbulos es una estructura de la que surgen los microtúbulos que se encuentra en las células eucariotas
NA	Neuraminidasa. Proteína Estructural del virus de influenza que forma parte de la envoltura del virus.
NHEJ	La unión de extremos no homólogos es un proceso de reparación de doble rotura del DNA.
NLR	Receptores tipo NOD, encargados de la detección de patrones moleculares específicos presentes únicamente en los agentes patógenos y de generar una respuesta inmunológica.
NP	Nucleoproteína es una proteína estructural de los vRNP que encapsula el ARN viral de polaridad negativa
NS1	Proteína viral no estructural del virus de influenza.
NS2	Proteína viral no estructural del virus de influenza.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Es una endonucleasa que forma parte del complejo polimerasa del virus de influenza.
PAM	"Motivo adyacente al protoespaciador" es una secuencia de tres nucleótidos que debe estar presente en el ADN para que la proteína Cas9 se una y corte el ADN
PB1	Subunidad que forma parte de del complejo de polimerasa del virus de influenza
PB2	Subunidad que forma parte de del complejo de polimerasa del virus de influenza
PI3K	Fosfoinositol es un compuesto que transmite señales intracelulares dentro de la célula.
RanGTP	Es una proteína que media la exportación de péptidos y proteínas a través de la membrana nuclear entre el núcleo y el citoplasma.

RIG-I	Es un tipo de receptor que reconoce patrones específicos para la detección de patógenos y genera una respuesta inmunológica.
RIPA	Es un buffer utilizado en la lisis de células y en la solubilización de sus proteínas
RNA	Ácido ribonucleico
RNAc	RNA de polaridad positiva complementario a los vRNA que se utiliza para la replicación del genoma del virus de influenza.
R-Smad	Proteínas que pertenecen a la familia de SMAD y son reguladas por un receptor. Estas proteínas funcionan como factores de transcripción del ADN.
Ser/Thr	Aminoácidos serina y treonina presente en las proteínas.
SFB	Suero fetal bovino utilizado como suplemento en el crecimiento de células de mamíferos
sgRNA	Single guide RNA, o RNA guía, sirve para dirigir a la proteína Cas9 a unirse y escindir una secuencia de DNA particular.
siRNA	RNA de interferencia o RNA de silenciamiento es una molécula que inhibe la expresión de un gen específico.
SISVEFLU	Sistema epidemiológico especial de influenza en México
T4 PNK	La polinucleótido cinasa T4 cataliza la transferencia de un grupo fosfato a la posición 5' del DNA o RNA.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta que tiene varias funciones pleiotrópicas en las células.
TLR	Receptores tipo Toll, proteínas transmembranales que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos.
TNF	Factor de necrosis tumoral, citocinas que participan en la respuesta inmunitaria y apoptosis.

tracrRNA	Trans-activación ARN CRISPR, es un fragmento de ARN que interactúa con el crRNA para formar un complejo que permite guiar a la proteína Cas9.
TβRI	Receptor transmembranal que participa en la señalización de TGF-β mediante la activación de los R-Smad.
TβRII	Receptor transmembranal que participa en la señalización de TGF-β y reconoce a TGF-β como ligando.
UTR	Regiones no traducidas de un gen.
VIA	Virus de influenza tipo A
vRNA	Segmento de RNA de polaridad negativa del virus de influenza.
vRNP	ribonucleoproteína viral

RESUMEN

El virus de la influenza es un virus de RNA de polaridad negativa que pertenece a la familia Orthomyxoviridae y es responsable de causar la enfermedad conocida como gripe. El virus de la influenza tipo A tiene una gran capacidad mutagénica que puede dar lugar a epidemias y pandemias que afectan a millones de seres humanos. Esta alta capacidad de mutación es la razón por la cual es necesario actualizar las vacunas de manera regular para mantener una inmunidad efectiva.

En un intento de combatir al virus, las células hospedadoras inician un proceso para neutralizarlo, generando un ambiente rico de factores proinflamatorios que activa los sistemas antivirales y proapoptóticos. Por su parte, en el corto plazo, el virus de influenza tiene estrategias para evadir la respuesta antiviral de la célula y, a largo plazo, regular positivamente la expresión génica de las proteínas que median la muerte por apoptosis, que favorece su propagación. En un estudio realizado previamente en nuestro grupo, se observó que la activación de la vía del TGF- β previo a la infección ocasionó la drástica inhibición de la expresión de varias proteínas pro-apoptóticas inducidas por el virus de influenza. Asimismo, este efecto coincidió con una disminución de la expresión de las proteínas M1 y NS1 virales y la producción de virus infectivos en el mismo modelo celular. Adicionalmente, estos efectos parecen coincidir con el incremento de Smad7 y disminución de la activación Smad 2/3. En base a esto se sugirió que Smad7 podría ser una molécula clave en el proceso de infección del virus de influenza.

En base a esto, en este estudio, se propuso llevar a cabo el silenciamiento de la proteína Smad 7 en células A549 utilizando la técnica CRISPR-Cas9. Para esto, se empleó el vector PX458, el cual contiene los elementos necesarios para la expresión del sistema CRISPR-Cas9, así como la proteína verde fluorescente (EGFP) como gen reportero. Esto permitirá posteriormente evaluar el efecto que tiene el silenciamiento de Smad 7 sobre la replicación del virus de influenza y la inducción de apoptosis en células A549.

Se diseñaron tres RNA guía (sgRNA) específicos para silenciar el gen Smad 7, uno para cada uno de los tres exones seleccionados de su secuencia codificante, y se insertaron en el vector PX458 de manera separada. Luego, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* para clonar cada uno de los sgRNA (PX458-sgRNA1, PX458-sgRNA2, PX458-sgRNA3) y obtener su DNA plasmídico correspondiente. Para evaluar la eficiencia de transfección en células A549, se emplearon tres cantidades diferentes de DNA plasmídico (2.5, 5.0 y 10 µg) y se evaluó la eficiencia mediante la cuantificación de la proteína EGFP mediante citometría de flujo. Se observó que la PX458-sgRNA3 tenía una eficiencia del 30%, por lo que se eligió para el proceso de transfección junto con el PX458 Ø, que no contenía sgRNA, utilizando una concentración de 10 µg de DNA plasmídico.

Luego del proceso de transfección, se cultivaron células A549 no transfectadas, así como células transfectadas con vector vacío (PX458 Ø) y PX458-sgRNA3. Para evaluar la pérdida de expresión de Smad 7, se empleó la técnica de western blot, utilizando la proteína actina como control interno. Los resultados del análisis densitométrico mostraron una reducción significativa, de alrededor del 80%, en los niveles de Smad 7 en las células A549 transfectadas con PX458-sgRNA3 en comparación con las células no transfectadas y las transfectadas con PX458 Ø.

Consideramos que esta estrategia permitirá una evaluación precisa del papel que desempeña la proteína Smad 7 en la replicación del virus de influenza y la inducción de apoptosis en células A549, lo que ayudará a identificar los participantes moleculares clave responsables de estas funciones celulares.

SUMMARY

The influenza virus is an RNA virus of negative polarity, belonging to the Orthomyxoviridae family, which causes the disease known as the flu. The type A influenza virus has a high mutagenic capacity that can lead to epidemics and pandemics affecting millions of humans. This high mutation rate is the reason why it is necessary to regularly update vaccines to maintain effective immunity.

As an attempt to resist the viral infection, the host cells initiate a process characterized by type-I interferon secretion and increase of inflammatory factors which activates antiviral and proapoptotic mechanisms. On the other hand, the influenza virus has developed several strategies to evade the antiviral response of the host cell, in the short term, and to promote cell death by apoptosis, in the long term, which, in some way, benefit their propagation. In a study carried out previously in our group, it was observed that the activation of the TGF- β pathway prior to viral infection caused the drastic inhibition of the expression of several pro-apoptotic proteins induced by the influenza virus. Likewise, this effect coincided with a decrease in the expression of viral M1 and NS1 proteins and the production of infectious virus. Additionally, these effects seem to coincide with an increase in Smad7 and a decrease in Smad 2/3 activation. Based on this, it was suggested that Smad7 could be a key molecule in the influenza virus infection process.

Therefore, in the present study, it was proposed to carry out the silencing of the Smad7 protein in A549 cells using the CRISPR-Cas9 technique. For this, the PX458 vector was used, which contains the necessary elements for the expression of the CRISPR-Cas9 system, as well as the green fluorescent protein (EGFP) as a reporter gene. This will allow us to subsequently evaluate the effect of Smad7 silencing on influenza virus replication and the induction of apoptosis in A549 cells.

Three guide RNAs (sgRNA) specific to silencing Smad7 were designed for each one of the three different exons of the Smad7 coding nucleotide sequence. Each sgRNA was inserted separately into the PX458 vector. Subsequently, electrocompetent *E. coli* cells were transformed to clone each of the sgRNAs (PX458-sgRNA1, PX458-sgRNA2, PX458-sgRNA3) and obtain their plasmid DNA.

To evaluate the efficiency of the transfection process in A549 cells, three different amounts of plasmid DNA (2.5, 5.0 and 10 µg) were used and the efficiency was measured by quantifying the EGFP protein through flow cytometry. It was observed that PX-sgRNA3 had an 30% efficiency level. From these results, the PX458-sgRNA3 was selected for the transfection process together with the empty vector containing no sgRNA, using a concentration of 10 µg plasmid DNA. After the transfection process, non-transfected A549 cells were cultured, as well as cells transfected with the vector empty (PX458 Ø) and the corresponding PX458-sgRNA3. To assess the efficiency of Smad7 silencing, the Western blot technique was used to measure the relative levels of expression of this protein, using β-actin as load protein standard. The results of the densitometric analysis revealed a significant reduction of approximately 80% in the levels of Smad7 in A549 cells transfected with the sgRNA compared to non-transfected cells and those transfected with the empty vector.

This approach will allow for a precise assessment of the role that the Smad7 protein plays in influenza virus replication and induction of apoptosis in A549 cells, helping to identify the key molecular participants responsible for these cellular functions.

INTRODUCCION

El virus de influenza es un virus de RNA de polaridad negativa que pertenece a la familia Orthomyxoviridae y se clasifica en virus de influenza tipo A, B, C ó D ^{1,2}. Las diferencias entre los tipos de virus radican principalmente en las variantes de las glicoproteínas de superficie del virus, que son la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA). Entre ellos, los tipos A y B son los que generalmente infectan a los humanos, por lo cual son clínicamente relevantes. Sin embargo son los virus de influenza tipo A quienes presentan mayor relevancia clínica y epidemiológica, ya que pueden infectar también a otras especies de mamíferos, posibilitando la generación de un alto nivel de variación antigénica, razón por la cual se han causado pandemias a lo largo del siglo XX y lo que llevamos de este siglo ¹⁻⁵.

Los virus de influenza A (VIA) contienen 8 segmentos de RNA de polaridad negativa (**Figura 1A**), a partir de los cuales se sintetizan 10 RNA mensajeros de polaridad positiva, que son necesarios para sintetizar las 11 proteínas del virus (**Figura 1B**). Los VIAs tienen una envoltura donde se hallan inmersas las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) y, en menor proporción, la proteína de matriz 2 (M2); siendo mayoritaria la primera (**Figura 1C**) ^{1,4}. Debajo de la envoltura se encuentra la proteína de matriz 1 (M1), que se asocia consigo misma para formar una capa proteica que encierra en su interior los 8 segmentos de RNA. Cada segmento de RNA está asociado a la polimerasa viral (complejo de proteínas PB1, PB2 y PA) y a un número de monómeros de la nucleoproteína (NP); a esta asociación se le conoce como complejo individual de ribonucleoproteína viral (vRNP) ⁶.

El virus de influenza ocasiona la enfermedad infecciosa llamada “gripe” que afecta las vías respiratorias en el humano y que se caracteriza por tener síntomas parecidos a los del catarro común o resfriado, tales como: fiebre, dolor de garganta, escurrimiento nasal, tos, dolor de cabeza, dolor muscular y fatiga ^{2,7,8}. Sin embargo, no debemos confundirlo con el catarro común, primero porque los virus causantes son diferentes: mientras que el virus de influenza causa la gripe, el catarro común es causado por múltiples virus respiratorios (principalmente *Rhinovirus*)^{3,7}.

Asimismo, los síntomas presentados por la gripe suelen manifestarse abruptamente y suelen ser más severos que el catarro común, provocando que un porcentaje de los pacientes requieran hospitalización. El cuadro clínico de la influenza es muy variable, pudiendo ir desde un cuadro febril agudo leve hasta una infección pulmonar y, en ocasiones, asociarse a complicaciones graves pudiendo llegar a la muerte ^{3,7,9}.

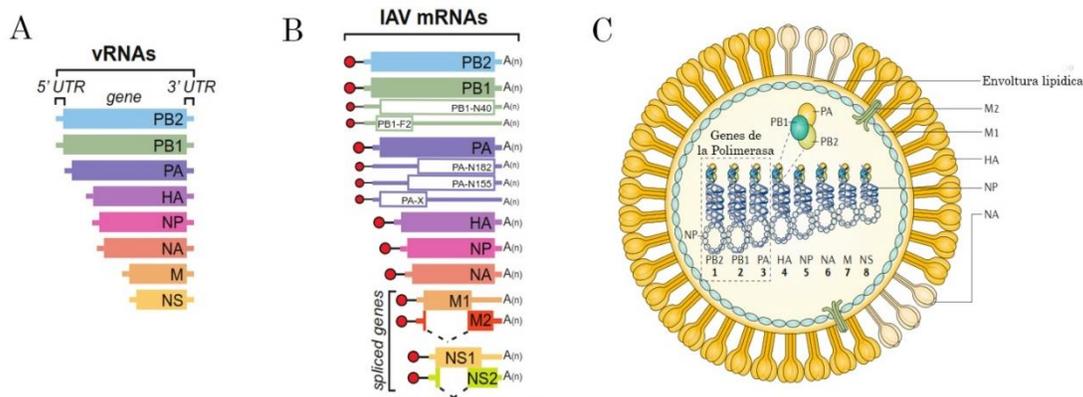


Figura 1. Componentes de los Virus de influenza A (VIA). **(A)** Representación esquemática de los 8 segmentos de RNA, de polaridad negativa (vRNA), que contiene como genoma el virus de influenza A. Las regiones no traducidas (UTRs, las cuales contienen los promotores virales), son representado con una línea, y las regiones codificantes de cada vRNA son representadas dentro de una caja coloreada **(B)** Diagrama de los RNA mensajeros sintetizados a partir de los vRNAs. Cada caja coloreada representa el producto codificado por cada mRNA. Las proteínas M1 y M2, así como NS1 y NS2, son generadas mediante splicing alternativo. El Circulo rojo representa la cap-5'. A(n) corresponde a la cola de poli-A. las cajas vacías son productos codificantes no esenciales que son encontradas en muchas cepas de virus de influenza. **(C)** Diagrama de la estructura de las partículas virales de influenza. Tomada de Dou et al. (2018) y Krammer et al. (2018) ^{1,2}.

Epidemiología

El virus de influenza se transmite de persona a persona por medio de aerosoles derivados del tracto respiratorio, creadas al toser o estornudar. El virus de influenza es capaz de propagarse con rapidez gracias a que sus síntomas son muy parecidos a los del catarro común, ocasionando que las personas infectadas le resten importancia a los síntomas presentados y favoreciendo así su diseminación. Además de esto, factores como la globalización, las condiciones precarias de sanidad, el hacinamiento, los conflictos sociales y el cambio climático, van favorecer la generación de pandemias y epidemias. A modo de ejemplo, sólo en el último siglo cuatro pandemias globales han sido provocadas por el VIA, lo cual ha resultado en numerosas muertes^{10,11}.

La pandemia más mortífera provocada por el virus de influenza (H1N1) que se tiene registro, ocurrió a finales de la primera guerra mundial durante los años de 1918 y 1919, conocida como gripe española, y a la cual se le adjudica millones de muertos. Aunque la cifra exacta no se conoce, las estimaciones van desde los 20 hasta los 200 millones de muertes, una cifra mucho mayor de pérdidas humanas que la ocasionada por las acciones bélicas de la primera guerra mundial⁵. A pesar de que las siguientes pandemias no se comparan con las muertes ocasionadas por la gripe española, en su conjunto estas han ocasionado millones de muertes. Tan sólo las pandemias ocasionadas en los años de 1957 (Gripe asiática) y 1968 (gripe de Hong Kong) se estima que ocasionaron alrededor de 2 millones y 1 millón de muertes, respectivamente ^{5,12}. La pandemia más reciente provocada por este virus fue en el año 2009 (H1N1), se asume que se originó en México y que posteriormente se propagó, primero, a los Estados Unidos y, posteriormente, al mundo entero. La organización mundial de la salud (OMS) reportó a los tres meses posterior al inicio de la pandemia 94,512 casos confirmados en 110 países, con al menos 429 muertes registradas. Al final de la pandemia, la OMS reportó 18,500 muertes confirmadas, aunque algunos autores sugieren que estos números están subestimados y que los números de muertes oscila entre los 151,700 y 575,400 ¹³.

De acuerdo con los centros de control y prevención (CDC, <https://www.cdc.gov/>) de los Estados Unidos, en el hemisferio norte, actualmente circulan los virus de influenza tipo A H1N1 y H3N2, los cuales son considerados virus estacionales que causan epidemias cada año en los periodos invernales. Asimismo, la CDC estimó entre los años 2010 y 2017 que sólo en Estado Unidos, que las infecciones estacionales por virus de influenza provocaron entre 9.2 y 35.6 millones de enfermos de los cuales alrededor de 140,000 a 710,000 necesitaron ser hospitalizados. Asimismo, a nivel mundial se ha estimado que el virus provoca entre 3 a 5 millones de casos graves cada año². De acuerdo a un estudio realizado recientemente, se estimó que las muertes respiratorias asociadas a virus de influenza estacionales oscilan entre 291,243 a 645 832 anualmente¹⁴.

Durante esta epidemia, en el año 2009, se hicieron evidentes las fallas que presentaba el sistema epidemiológico de nuestro país para dar respuesta a la crisis sanitaria. Entre los factores que dificultan la aplicación de los planes de respuesta se puede destacar: la fragmentación del sistema de salud, la descentralización de los servicios estatales, la heterogeneidad de los servicios de salud, la baja adherencia de los estados a la notificación al sistema de vigilancia de influenza (SISVEFLU), la carencia de los protocolos de estudio de patógenos emergentes, la falta de infraestructura especializada, la falta de recursos para poder adquirirlos y el manejo de técnicas desactualizadas^{11,15}.

Por otro lado, de acuerdo con el informe semanal #20 para la vigilancia epidemiológica 2021 presentada por la secretaría de Salud en México, desde el año 2009 al 2016 se puede identificar un comportamiento bianual de las epidemias por VIA. Durante los períodos en 2010-2011, 2012-13 y 2014-2015 la variante predominante fue H3N2, mientras en los años 2009-2010, 2011-2012, 2013-2014 y 2015-2016 la variante predominante fue H1N1. Sin embargo después del 2016, el comportamiento bianual cesó: en el 2016-17, 2018-2019, 2019-2020 la variante predominante fue H1N1 y en el 2017-2018 la variante predominante fue H3N2^{16,17}. Los casos presentados, así como la tasa de letalidad del virus de influenza en México presentan fluctuaciones (Tabla 1), pero los mayores casos de infección y

tasas de letalidad se presentan cuando la variante H1N1 está en circulación como variante predominante.

Tabla 1. Casos y defunciones ocasionadas por el virus de influenza en México. El sombreado gris presenta los años en los cuales la variante predominante fue H1N1. Datos tomados de la Secretaría de Salud, 2021 ¹⁶.

Temporada de influenza	Variante dominante	Casos	Defunciones	tasa de letalidad
2011-2012	H1N1	7317	345	4.72
2012-2013	H3N2	2945	60	2.04
2013-2014	H1N1	9131	1112	12.18
2014-2015	H3N2	2836	85	3.0
2015-2016	H1N1	9641	703	7.29
2016-2017	H1N1	6371	528	8.29
2017-2018	H3N2	3692	160	4.33
2018-2019	H1N1	7467	848	11.36
2019-2020	H1N1	6205	412	6.64

Por otro lado, se sabe que las comorbilidades aumentan el riesgo de gravedad en la infección por el virus de influenza. Además, el embarazo y la edad son factores de riesgo reconocidos, siendo los menores de 1 año y las personas mayores de 65 años los grupos más vulnerables. La enfermedad grave y/o mortalidad en pacientes con infección por el virus de influenza generalmente se deben a una neumonía inducida por el virus de influenza o a una superinfección bacteriana secundaria. La neumonía viral primaria se caracteriza por altos niveles de replicación viral en el tracto respiratorio acompañados de fuertes respuestas proinflamatorias, también conocidas como 'tormenta de citocinas' ².

A pesar de la existencia de fármacos antivirales y vacunas contra el virus de la influenza, sigue siendo un problema de salud a nivel mundial. Esto se debe a que

el virus de la influenza es capaz de evadir la inmunidad mediada por anticuerpos inducida previamente durante infecciones o vacunaciones, así como de presentar resistencia parcial a los antivirales¹⁸. Esta capacidad de evasión o de resistencia a antivirales resulta de los dos mecanismos de variación genética. Por un lado, el virus de la influenza tiene la capacidad de experimentar variaciones antigénicas, también conocidas como "deriva antigénica ('drift antigénico')". Estas variaciones resultan en mutaciones puntuales de los nucleótidos que afectan a las glicoproteínas de superficie del virus de la influenza, en particular la región globular de la HA. Las mutaciones en las regiones antigénicas ocasionará la pérdida parcial del reconocimiento por los anticuerpos específicos generados durante infecciones o inmunizaciones previas. De manera similar, se ha podido monitorear que este mismo mecanismo ocasionó la resistencia de la proteína M2 al medicamento amantadina. En resumen, este mecanismo parece ser el principal factor que da lugar a las epidemias anuales^{19,20}.

El virus de la influenza A es el que experimenta cambios antigénicos de manera continua y causa todos los casos de epidemias de gripe cada año, en contraste con otros tipos de influenza que muestran cambios menores. Por ejemplo, el tipo B, aunque puede sufrir cambios antigénicos, generalmente provoca epidemias esporádicas, mientras que el tipo C presenta estabilidad antigénica y no genera epidemias²¹. Por esta razón, cada año se requiere la actualización de las vacunas para incluir las variantes emergentes de los virus de la influenza que están circulando en el mundo.

Ciclo de replicación del virus de Influenza

Una vez que el virus ha alcanzado las vías respiratorias de un humano, las proteínas HA presentes en alta proporción en la membrana del virus, se unirán a glicoproteínas en la superficie de las células epiteliales del hospedero. Se reconoce que dependiendo del tipo de HA presente en el virus, tendrá más o menos afinidad por residuos de ácido siálico en configuración α -2,6 en las glicoproteínas de membrana^{8,22,23}. La unión de la HA con el receptor sializado va a llevar a dos eventos: 1) las partículas virales se concentrarán en regiones discretas de la membrana celular y 2) una vez aglomeradas, estas serán conducidas al interior de la célula por un mecanismo conocido como endocitosis mediada por receptor. Existen diversas rutas de endocitosis a través de las cuales el virus puede ingresar al citoplasma de la célula, donde las más conocidas son aquellas que dependen de la proteína clatrina²⁴. Sin embargo, también se han descrito otros tipos de endocitosis por los cuales el virus puede ingresar, tales como la macropinocitosis y la endocitosis independiente de clatrina y caveolina (**Figura 2**)²⁵⁻²⁸.

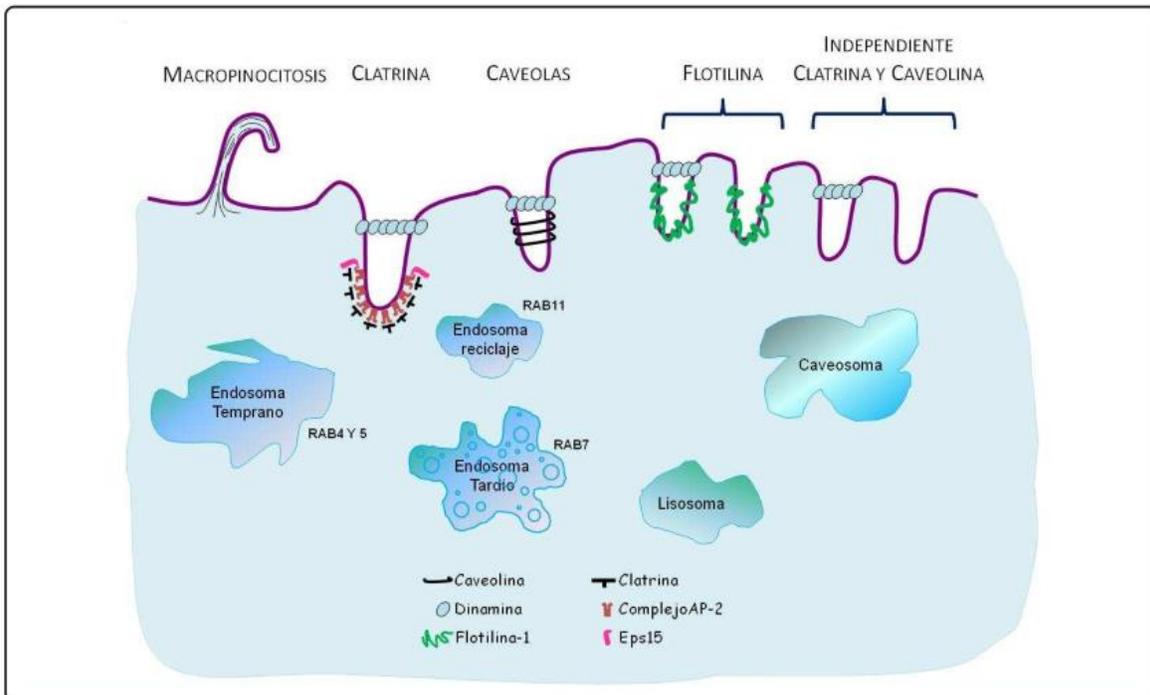


Figura 2. Rutas de endocitosis. El virus de influenza puede ser internalizado dentro de la célula por medio de la endocitosis mediada por clatrina, macropinocitosis y la vía independiente de clatrina y caveolina. Tomada de McMahon & Boucrot (2011) ²⁷.

La clatrina es un complejo proteico formado por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas que constituyen una unidad llamada el "triesqueleto" de clatrina. Este complejo es reclutado en la membrana plasmática por proteínas adaptadoras²⁹. Tras la unión del receptor sialidado con la HA viral, probablemente desencadena una cascada de señalización que activa la proteína adaptadora epsin 1, lo que conduce al reclutamiento y polimerización de la clatrina para formar la vesícula endocítica^{27,29,30}. Se ha observado que la unión del virus a receptores sialidados no necesariamente conducen a su internalización en la célula³¹, lo que podría limitar la capacidad infectiva del virus. Aunque múltiples estudios han mostrado que juega un papel crítico para la propagación de la infección¹, se ha reportado que incluso células que carecen de receptores sialidados tienen la capacidad de interacción con VIA, lo cual sugeriría que el ácido siálico podría no ser el único requisito para la internalización de VIA²⁵.

Después de la invaginación de las partículas virales junto con la formación de los endosomas, su recubrimiento de clatrina se desvanecerá y se formará lo que se conoce como el endosoma primario. A su vez, este comenzará a fusionarse gradualmente con otras vesículas cercanas a la superficie celular³². Esta fusión de vesículas continuará hasta que se forme lo que se conoce como el endosoma tardío, el cual se ubicará cerca del núcleo de la célula hospedadora.

Durante el proceso de transporte del endosoma hacia el espacio perinuclear, se produce una acidificación en el interior del endosoma, lo que activa los canales iónicos de los virus de influenza (M2), permitiendo la entrada de iones hidronio (H⁺)³³⁻³⁶. Esta acidificación conlleva a un cambio conformacional en las proteínas HA de las partículas virales, lo que a su vez permite la exposición del péptido de fusión. Este péptido de fusión facilita la fusión de la envoltura lipídica viral con la membrana del endosoma, lo que finalmente conduce a la liberación de los vRNPs hacia el citosol de la célula³⁷⁻³⁹ **(Figura 3)**.

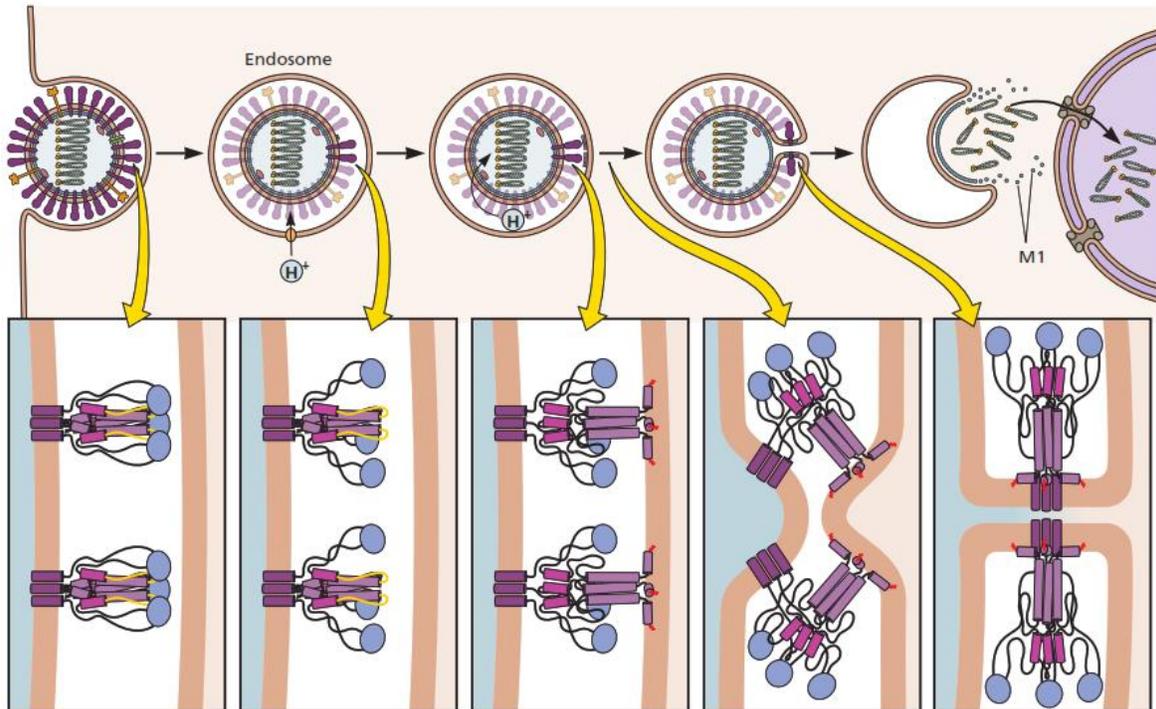


Figura 3. La entrada del virus de Influenza en la célula hospedadora. La cabeza globular de HA1 reconoce receptores sializados, lo que permite su endocitosis. Una vez en el citosol, el endosoma se acidificará gradualmente, activando los canales iónicos de M2 en las partículas virales. Esto conduce a la acidificación del interior de la partícula y provoca un cambio conformacional en la estructura de HA, permitiendo que HA2 exponga el péptido fusión (representado por las colitas rojas) y facilite la fusión de las membranas. Como resultado de esta fusión, los vRNPs son liberados al citosol, desde donde son transportados al núcleo de la célula hospedadora, donde se llevarán a cabo los procesos necesarios para formar nuevas partículas virales. Imagen tomada de Flint *et al.* (2015) ³².

Es importante destacar que las proteínas HA están compuestas por dos subunidades: HA1 y HA2. HA1 tiene la capacidad de reconocer residuos de ácido siálico, mientras que HA2 es responsable de la actividad fusogénica. La acidificación de las partículas virales permite el cambio conformacional de las proteínas HA, exponiendo la subunidad HA2 que dirige la fusión de las membranas (**Figura 4**).

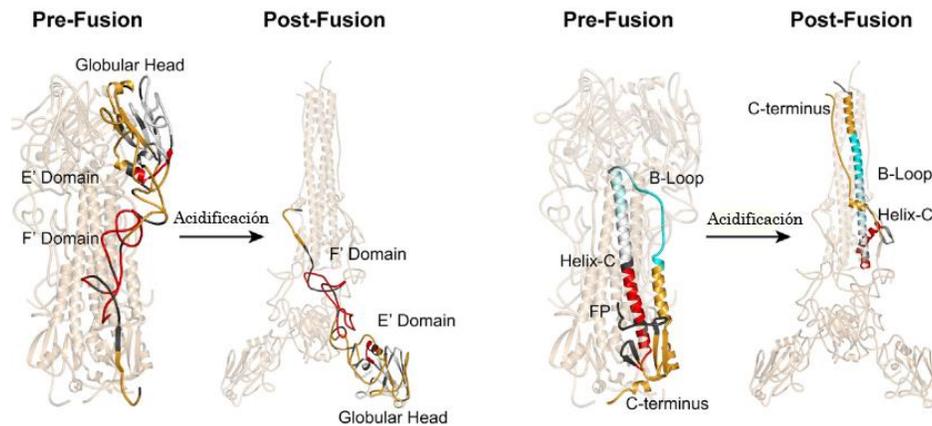


Figura 4. Cambio Conformacional de HA1 y HA2. A la derecha se muestra el cambio conformacional de la subunidad globular, HA1; mientras que a la izquierda se presenta el cambio conformacional de la subunidad HA2, exponiendo el péptido fusión. Imagen tomada de Garcia *et al.*, (2015) ³⁹.

Por su parte, los vRNPs liberados en el citoplasma son transportados hacia el núcleo de la célula hospedadora mediante las importinas α y $\beta 1$, donde tendrá lugar los procesos de transcripción y replicación viral. Las importinas α (IMP α) se unen a las nucleoproteínas (NP) del virus mediante secuencias conservadas llamadas "señales de localización nuclear" (NLS, por sus siglas en inglés). Una vez que IMP α se une a NP, son reconocidas por el receptor del transportador "importina $\beta 1$ " (IMP $\beta 1$). Después de atravesar el complejo del poro nuclear (NPC), las proteínas IMP $\beta 1$ se disocian de IMP α debido a la activación de la Ran GTPasa, lo que libera los vRNPs-IMP α en el nucleoplasma^{6,32,40,41}. Aún no está claro si las proteínas IMP α se disocian de los vRNPs. En cualquier caso, se sugiere que estas proteínas promueven los procesos de transcripción y/o replicación del genoma del virus de la influenza⁶. Asimismo, se plantea la posibilidad de que, tras su internalización en el núcleo, los vRNPs sean separados individualmente.

Una vez dentro del núcleo, los vRNPs iniciarán el proceso de transcripción y replicación de su genoma viral (**Figura 5**). Dado que las células humanas no poseen RNA polimerasas dependientes de RNA, el virus de influenza utiliza su complejo de polimerasa para sintetizar RNAs de polaridad positiva a partir de vRNAs, los cuales se utilizan como moldes para llevar a cabo los procesos de transcripción y

replicación. La transcripción viral se refiere a la síntesis de RNAm, cuyo propósito es servir como molde para la traducción de las proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales del virus⁴². La transcripción viral depende de cebadores o "primers" para su iniciación, por lo que la polimerasa viral proporciona estos "primers" mediante un proceso conocido como "robo de Cap" o "Cap snatching". El "robo de Cap" implica, en primer lugar, el reconocimiento del "5' cap" de los pre-RNAm sintetizados por la célula hospedadora, a través de la proteína PB2 del complejo de la polimerasa viral. Luego, se produce la escisión de los Caps, catalizada por la actividad endonucleasa de PA, para que PB1 los utilice como cebadores y así iniciar el proceso de transcripción (**Figura 6A**)⁴³.

Durante el proceso de infección, la síntesis de RNAm ocurre antes de la replicación de su genoma, ya que la transcripción es más eficiente debido a la dependencia de los "primers" para su iniciación. Los RNAm sintetizados se exportan fuera del núcleo en dos direcciones para la síntesis de las proteínas virales: hacia los ribosomas ubicados en el citosol (PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 y M) y hacia los ribosomas cercanos al retículo endoplasmático (HA, NA y M2)¹.

La replicación del genoma del virus de influenza consiste en dos etapas: la transcripción de RNA complementario de polaridad positiva (RNAc) a partir de los vRNAs, seguida de la transcripción de nuevas copias de vRNAs utilizando los RNAc como cadena molde (**Figura 5**). La transcripción del RNAc y la síntesis de las nuevas copias de vRNAs son procesos independientes de "primers", lo que hace que el proceso sea menos eficiente en comparación con la transcripción viral, que requiere "primers" para su inicio. Por lo tanto, la transcripción de vRNAs y RNAc requiere ATP y GTP para ser ensamblados de manera simultánea y correcta en la posición 3' del vRNA (**Figura 6B**)^{1,42}. Bajo este mecanismo de ensamblaje, ambos procesos de transcripción de la replicación viral se llevan a cabo. Los RNAc y vRNAs sintetizados se asocian con una cantidad de NP y un complejo de polimerasa viral para dar lugar a la formación de vRNPs que contienen cadenas de RNA de polaridad positiva (RNAc) y cadenas de polaridad negativa (vRNAs).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la exportación de los vRNPs fuera del núcleo no queda del todo claro. Por un lado, parece ser que la proteína NP viral puede mediar la exportación nuclear en complejo con la exportina 1 (también conocida como CRM1)⁴⁴. Por otro lado, es el complejo M-NS2/NEP-CRM1 quien media la exportación de RanGTP, donde la proteína M se ha identificado que participa como una proteína adaptadora para reclutar NS2, formando un complejo con CRM1 y RanGTP para exportar los vRNPs (**Figura 5**)^{6,45,46}. Por su parte, la proteína viral M1 bloquea las NLS de las NP virales previniendo la reimportación de los vRNPs hacia el núcleo, de tal manera asegura que los vRNPs replicados en el núcleo formen partes de las nuevas partículas virales⁶.

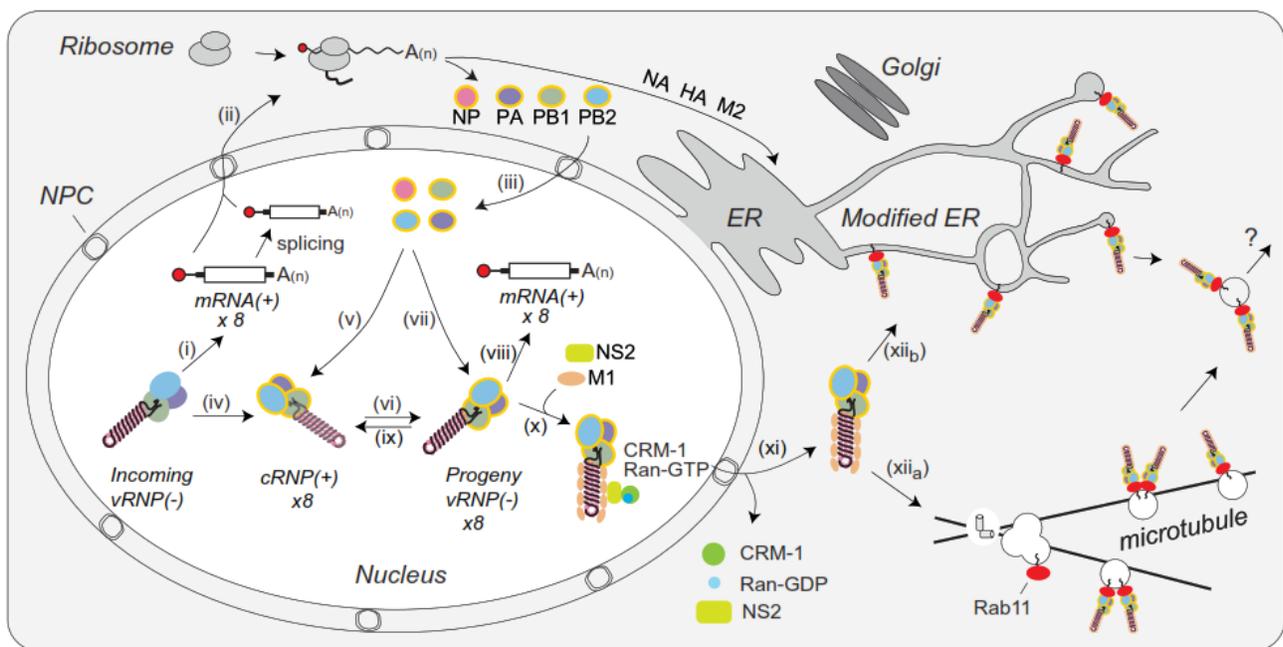


Figura 5. Transcripción, replicación y exportación de vRNPs. Una vez dentro del núcleo, se inicia la transcripción de los RNAm, los cuales se transportarán hacia los ribosomas citosólicos y del retículo endoplasmático para la síntesis de las proteínas virales. Los componentes de la polimerasa viral regresan al núcleo, donde contribuyen a la formación de los RNAc a partir de los vRNA. Estos RNAc actúan como cadenas molde para la generación de vRNAs. Los vRNPs se exportan del núcleo mediante el complejo M-NS2-CRM1-RanGTP, que luego se transporta hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC) para ser dirigido a la periferia celular a través de las vías de reciclaje endosomal y secretoria. Tomada de Dou et al. (2018)¹.

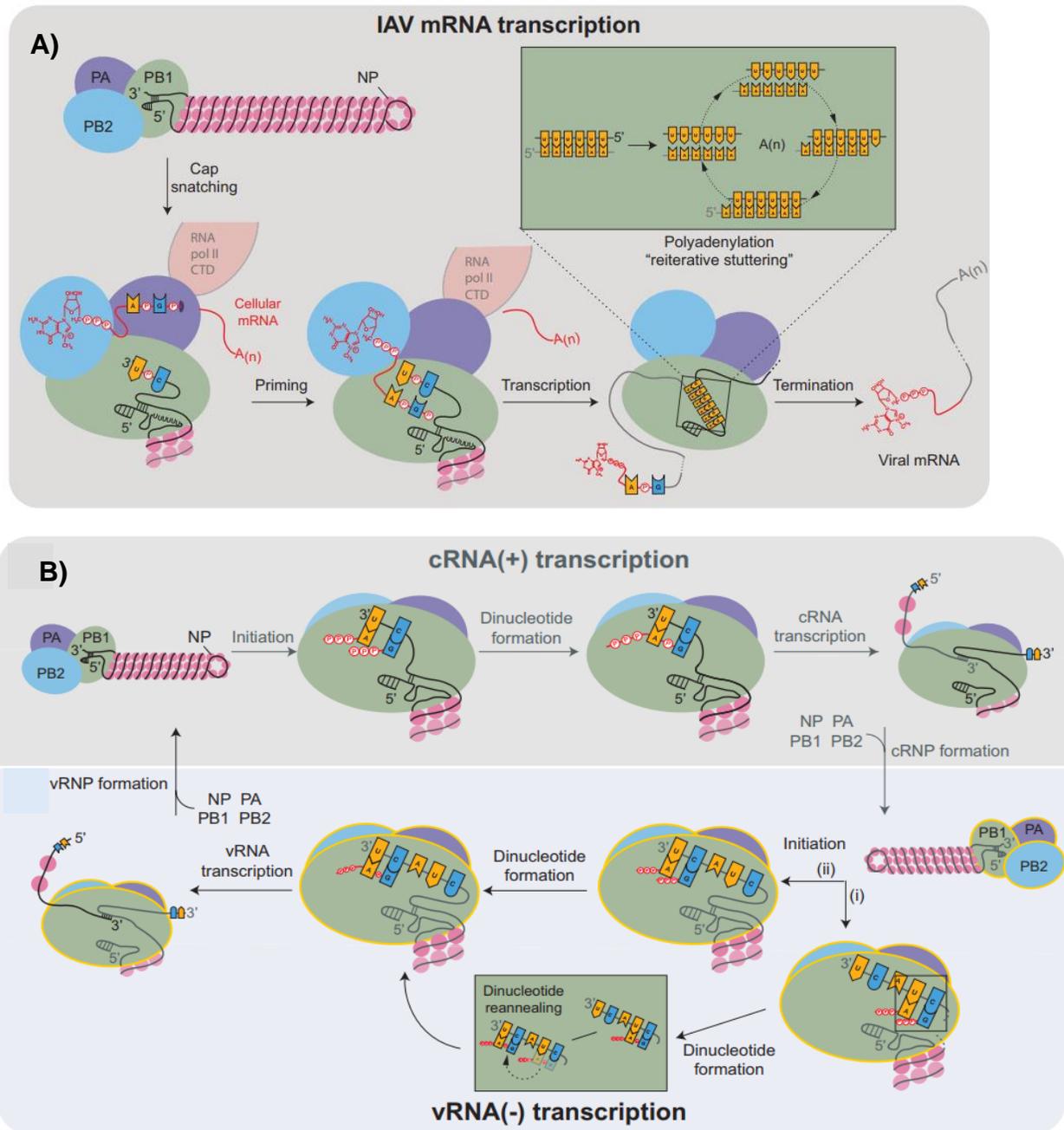


Figura 6. Transcripción y replicación del genoma viral. (A) La transcripción viral implica la generación de RNAm a partir de los vRNPs, un proceso que requiere el uso de cebadores o "primers". Para llevarlo a cabo, es necesario robar el "Cap" de los RNAm celulares y utilizarlos como cebadores en la transcripción de los vRNPs, lo que da lugar a la formación de los RNAm virales. (B) La replicación del genoma viral consta de dos etapas: la generación de vRNPs de polaridad positiva (cRNA+) y su posterior transcripción para producir vRNPs de polaridad negativa (vRNA-), que se emplearán en la formación de nuevas partículas virales. Tomada de *Dou et al. (2018)*¹.

Una vez exportados los vRNPs, estos son transportados hacia los centros organizadores de microtúbulos o "MTOC", donde se acumulan antes de dirigirse hacia la membrana plasmática^{47,48}. El virus de influenza utiliza los componentes de las vías de reciclaje endosomal y secretoria para este proceso^{1,47}. Un estudio reciente demostró que Rab11 es un elemento importante en las vesículas endosomales que facilita la interacción de los segmentos de los vRNPs, funcionando como centros de reclutamiento, promoviendo un ensamblaje correcto de cada uno de los vRNPs y, en la ausencia de este, resultaba en la producción de partículas defectuosas con genomas mal ensamblado conteniendo segmentos virales repetidos o perdidos⁴⁸. En resumen, Rab11 permite la formación de partículas con 8 vRNPs en una configuración "1 + 7".

Las proteínas de membrana sintetizadas por el retículo endoplasmático (HA, NA y M2) son traslocadas a la membrana de la célula hospedadora a través de la vía secretoria, con HA y NA experimentando modificaciones post-traduccionales de glicosilación, tanto de tipo N como de tipo O. En el caso de HA, esta proteína se expresa inicialmente como un precursor en el retículo endoplasmático rugoso, donde se oligomeriza para formar trímeros durante su maduración. Sin embargo, debe someterse a una activación proteolítica para obtener dos subunidades, HA1 y HA2, que son responsables del reconocimiento del receptor sialidado y la fusión de la membrana viral. Sin esta escisión proteolítica, el virus no puede llevar a cabo la infección⁴⁹⁻⁵¹. Una vez en la periferia celular, estas proteínas esperan ser ensambladas con los 8 segmentos de vRNP, dando como resultado la formación de partículas virales. Finalmente, la proteína NA, mediante hidrólisis, rompe las interacciones moleculares entre los receptores sialidados y la HA, al eliminar el residuo de ácido siálico del receptor, lo que permite la liberación de las partículas virales y su propagación¹.

Señalización del TGF- β

El TGF- β es un factor de crecimiento que pertenece a la superfamilia de proteínas del mismo nombre, y desempeña un papel fundamental en diversos procesos celulares, como la proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, respuesta inmunitaria y reparación celular. Se han reportado cinco isoformas de TGF- β , pero en el ser humano, se reconocen sólo tres de ellas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. La isoforma TGF- β 1 ha sido la más estudiada, especialmente por sus efectos en la inflamación y la regulación de la respuesta inmunológica. Interesantemente, las isoformas 2 y 3 parecen tener efectos más significativos en el desarrollo, la morfogénesis y los procesos de reparación tisular. El TGF- β tiene la capacidad de unirse a diversas proteínas de membrana, lo que da lugar a al menos dos tipos de cascadas de señalización: la vía principal, también conocida como canónica, y la vía alternativa (**Figura 7**).

La ruta clásica comienza cuando el TGF- β se une al receptor T β RII, el cual recluta y activa por fosforilación al receptor TGF- β 1; ahora, T β RI es capaz de reclutar y activar por fosforilación a las proteínas citoplasmáticas Smad 2 y Smad 3 (R-Smads). Aunque algunos estudios han mostrado que los efectos transcripcionales de Smad 2 y Smad 3 pueden variar y, por lo tanto, tener efectos distintos en las células, en muchos otros estudios parece que su papel puede intercambiarse. Por eso, en este estudio se considerarán equivalentes, salvo cuando se mencione lo contrario. Una vez fosforiladas las proteínas Smads, estas actuarán como factores transcripcionales o co-transcripcionales, ya sea de manera represora o inductora. Después de la fosforilación de Smad 2 o Smad 3, estas se unen a la proteína Smad4 (Co-Smad) para formar un complejo dimérico activo que será translocado al núcleo celular y permitirá la inducción o represión selectiva de genes.

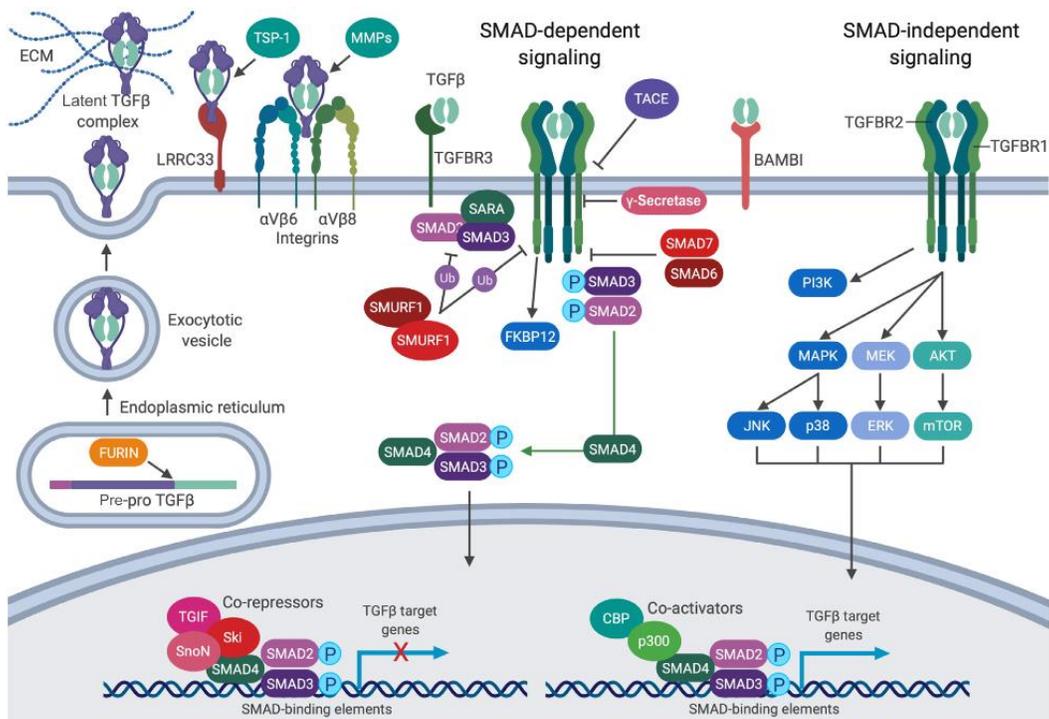


Figura 7. Señalización de TGF- β . La ruta principal es dependiente de las proteínas Smad, que actúan como segundos mensajeros. Una vez que TGF- β se une al receptor T β RII, este último recluta a T β RI para que active por fosforilación a Smad2/Smad3, los cuales forman un complejo con Smad4 para ser traslocados al núcleo y regulen la expresión génica. Smad7 regula la señalización de TGF- β , el cual se une al receptor T β RI y previene la fosforilación de Smad2/Smad3. La ruta alternativa es independiente de las proteínas Smad y puede llevar a la activación de la ruta de señalización MAPK y PI3K/AKT. Tomada de Spittau *et al.* *2020) 52.

Por su parte, la ruta de señalización del TGF- β se autorregula negativamente mediante la inducción de Smad inhibitorias (I-Smad) que bloquean ya sea la activación de T β RI o la fosforilación de los Smad 2/3. En este último evento, las proteínas Smad 6 y Smad 7 son proteínas inducidas por la propia cascada de señalización del TGF- β y que se unen al T β RI, compitiendo con los R-Smads por el sitio catalítico del receptor. Debido a que estas I-Smads carecen del dominio de fosforilación de Ser/Thr, la unión de las I-Smad al T β RI impide la fosforilación de las proteínas Smad 2/3 y, por lo tanto, inhibe la cascada de señalización de TGF- β .

Muerte celular programada: Apoptosis

La muerte celular programada por apoptosis es un proceso biológico normal que consiste en eliminar células para mantener un control homeostático de los tejidos ⁵³. Este fenómeno no se lleva a cabo de manera aleatoria, sino que es un proceso activo y está bien definido genéticamente. La apoptosis también juega un papel fundamental en el desarrollo de los procesos embrionarios para la formación de organismos pluricelulares. La apoptosis también juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario para la formación de organismos pluricelulares. Además, la apoptosis es un mecanismo que emplean las células cuando ocurren daños lo suficientemente graves que no pueden ser reparados o como una estrategia de defensa contra infecciones, como las provocadas por los virus ^{32,53}.

Las células que mueren por apoptosis sufren cambios morfológicos característicos. Algunos cambios son: reducción de tamaño; el "ruffling" de la membrana; la condensación de la células; el colapso del citoesqueleto; la desaparición de la envoltura nuclear y la fragmentación de la cromatina; la formación de burbujas en la membrana ("beebbling") y; finalmente, la separación de los componentes celulares en el interior de los llamados "cuerpos apoptóticos"^{53,54}. De este modo las células programan su muerte sin generar salida de productos al espacio extracelular y, finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células profesionales, evitando la generación de respuestas inflamatorias.

Por su parte, las caspasas son enzimas cisteína-proteasas que desempeñan un papel muy importante en la traducción y ejecución de las señales apoptóticas. Estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos que necesitan ser escindidas para activarse e iniciar su actividad proteolítica ⁵⁵. Las caspasas pueden clasificarse en tres grupos: caspasas iniciadoras, caspasas ejecutoras y caspasas procesadoras de citocinas ⁵⁶.

Las caspasas iniciadoras (caspasa 8, 9, 10), como su nombre indica, inician los procesos de apoptosis. Normalmente se encuentran en forma monomérica inactiva, pero cuando se produce una señal apoptótica, ensamblan grandes complejos proteicos que reclutan múltiples caspasas iniciadoras **(Figura 8)**. Dentro

de estos complejos, las caspasas iniciadoras son activadas de forma dimérica y su objetivo es activar por escisión a las caspasas ejecutoras (Caspasa 3, 6 y 7) para desencadenar la muerte celular por apoptosis^{53,57}. Las caspasas ejecutoras son responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas, mediante la acción sobre diversas proteínas, que incluyen proteínas de señalización, de reparación, estructurales y factores de transcripción, entre otras. Por otro lado, las caspasas procesadoras de citocinas (por ejemplo, la Caspasa 1) tienen funciones distintas a la apoptosis y no se incluirán en este escrito.

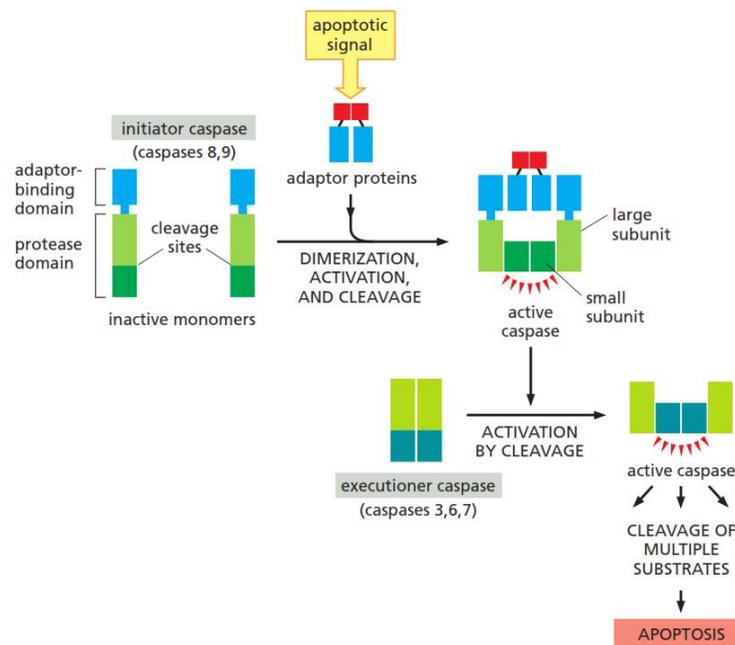


Figura 8. Activación de caspasas durante apoptosis. Después de recibir una señal apoptótica, se reclutarán a las caspasas iniciadoras para que sean activadas por autoproteólisis. Una vez activadas, procesan proteolíticamente las caspasas ejecutoras, lo que permitirá que estas últimas inicien los procesos de apoptosis actuando sobre múltiples proteínas con el fin de llevar a cabo la apoptosis. Tomada de Alberts (2015) ⁵³.

Existen dos vías principales de inducción de la apoptosis. La primera de ellas se denomina vía extrínseca, que está mediada por ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte anclados a la membrana. La unión de moléculas extracelulares desencadenará la formación de complejos de iniciación de señalización de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) a través del dominio intracelular de los receptores. De esta manera, los DISC permite el reclutamiento de las pro-caspasas 8 para ser activadas por autoproteólisis y así, iniciar la escisión de las caspasas 3, 6 y 7, desencadenando el proceso de apoptosis (**Figura 9**)³². Los receptores de muerte, así como sus ligandos, pertenecen a la familia del TNF, que incluye al propio TNF. Los receptores de muerte son TNFr, Fas/Apo1 y DR4/5, que tienen como ligandos a TNF, FasL y Apo2L/Trail, respectivamente ⁵³.

La segunda vía que puede desencadenar la apoptosis se conoce como vía intrínseca, donde la mitocondria y la familia de proteínas Bcl2 desempeñan un papel clave. Bajo diversos estímulos, como el estrés, el daño en el DNA o las infecciones virales, entre otros, se produce la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, lo que resulta en la liberación del citocromo c desde el espacio intermembranal hacia el citosol. Una vez que el citocromo c se encuentra en el citoplasma, se asocia con Apaf1 para formar un complejo llamado apoptosoma, que facilita el reclutamiento y activación de la caspasa 9, desencadenando así la apoptosis mediante la escisión de las caspasas efectoras (**Figura 9**)^{53,56}. Además, la vía extrínseca puede activar la vía intrínseca a través de la caspasa 8, promoviendo la activación de un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 llamado Bid y amplificando los procesos apoptóticos.⁵⁶.

Por otro lado, las proteínas de la familia Bcl2 regulan los procesos de permeabilización de la membrana mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis. Otras de sus funciones son la dimerización, actividad de formación del poro y creación de enlaces a otras proteínas⁵⁸. La familia Bcl2 se clasifica en dos grupos: proteínas anti-apopticas y pro-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-XL y Mcl-1) presentan los dominios BH1-BH4; mientras que las proteínas pro-apoptóticas se dividen en dos clases: aquellas proteínas pro-apoptóticas efectoras (Bax y Bak) que presentan los dominios conservados BH1-BH3 y aquellas proteínas

pro-apoptica iniciadoras (Bim, Puma, Bad, Noxa, entre otras) que presentan un único dominio conservado, BH3^{53,59,60}. Las proteínas anti-apoptica y pro-apoptica se pueden unir entre sí en varias combinaciones y formar heterodímeros en los cuales se inhiben mutuamente. El balance entre estas proteínas determinará si se activa o no la vía intrínseca de apoptosis⁵³.

Las proteínas anti-apoptóticas contrarrestarán la actividad de las proteínas pro-apoptóticas, tanto de las efectoras como de las iniciadoras. Cuando se produce un estímulo de muerte celular, se produce un desequilibrio en el balance de las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, lo que permite que un número mayor de moléculas pro-apoptóticas desplace a las moléculas anti-apoptóticas de la membrana de la mitocondria. Esto permite que Bak y Bax se activen y dimericen para formar poros que facilitan la liberación de proteínas intermembranales de la mitocondria, incluyendo el citocromo c, que induce la formación del apoptosoma y activa la caspasa 9.

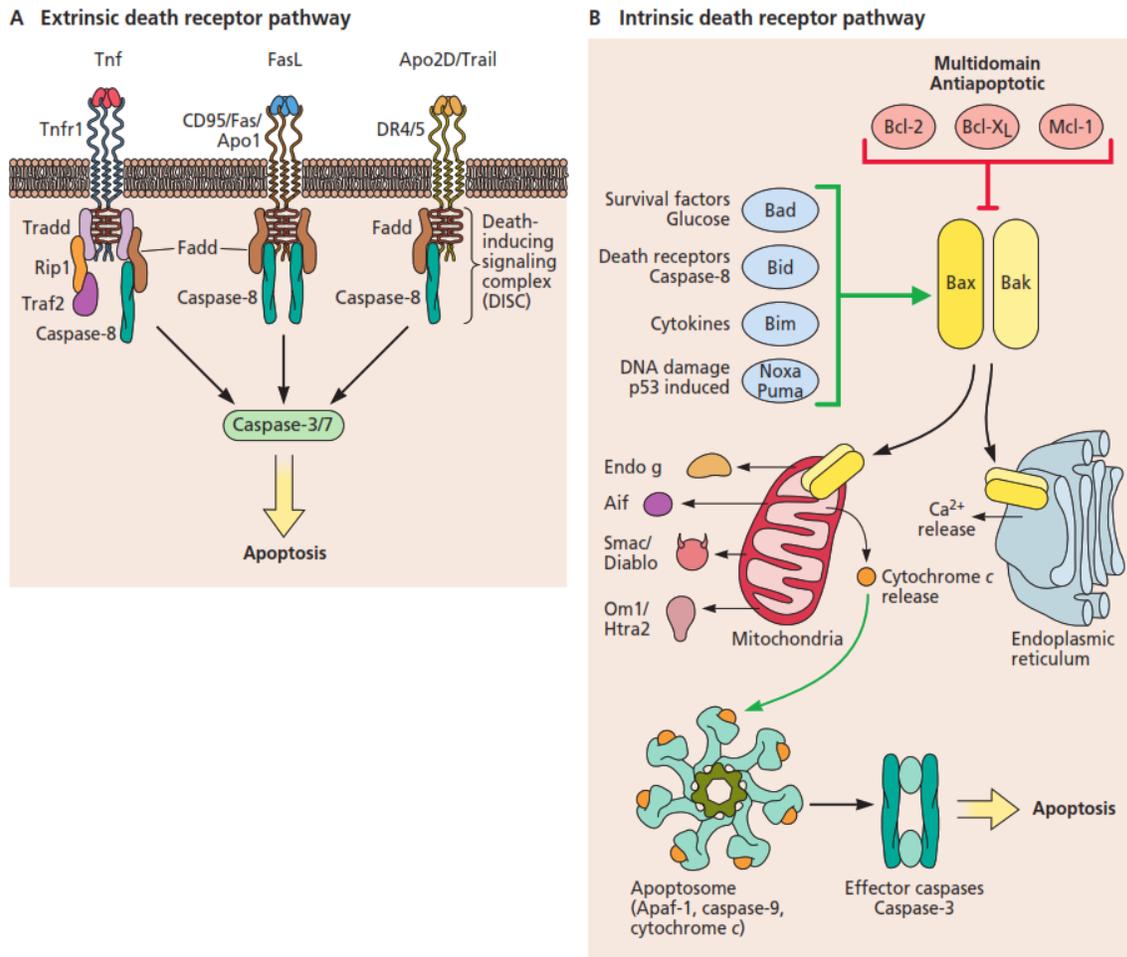


Figura 8. Las vías de apoptosis. (A) | La vía extrínseca está mediada por ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte, lo que activa el receptor y envía una señal a su dominio intracelular para formar un complejo de inicio de señalización llamado DISC. Este complejo recluta a la caspasa 8 y la activa, desencadenando la apoptosis mediante la escisión de las caspasas efectoras. **(B)** La vía intrínseca, en respuesta a un estímulo apoptótico, implica la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas en la superficie de la membrana mitocondrial. Esto permite que las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl2, como Bax y Bak, se activen y oligomerizen en la membrana mitocondrial externa, lo que promueve la liberación del citocromo c. La liberación de citocromo c conduce a la formación del complejo apoptosoma, que a su vez recluta a la caspasa 9 y activa la apoptosis. Tomada de Alberts (2015)³².

CRISPR-Cas9: una técnica de precisión para la modificación genética

La tecnología CRISPR-Cas9 ha sido uno de los mayores avances en la investigación de la biología molecular y genética en los últimos años. Esta técnica ha revolucionado la forma en que los científicos pueden manipular los genes, lo que ha permitido importantes avances en la medicina, la agricultura y la biotecnología⁶¹⁻⁶³. El acrónimo CRISPR significa “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas”, y se refiere a un sistema de defensa que las bacterias utilizan para defenderse contra los virus y otros agentes patógenos.

La investigación sobre el sistema CRISPR comenzó en la década de 1980, cuando se descubrieron secuencias repetitivas de DNA en el genoma de bacterias por un grupo de investigación japonés que estudiaba *Escherichia coli*, y por el español Francisco Mojica, quien trabajaba con *Haloferax mediterranei*, un microorganismo del reino Arquea^{64,65}. A pesar de que estas secuencias de DNA se habían identificado, su función no estaba clara en ese momento.

No fue hasta la década de 2000 cuando los científicos comenzaron a comprender cómo funciona el sistema CRISPR como un mecanismo de defensa contra los virus. Se descubrió que el sistema utiliza las secuencias de DNA repetitivas como una especie de memoria, para identificar y destruir las secuencias de DNA de virus y otros elementos patógenos que hayan invadido a la célula^{63,66,67}. El mecanismo es análogo al silenciamiento con RNA interferente (siRNA) en eucariontes, el cual identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógeno⁶⁸.

El sistema CRISPR-Cas se compone de dos elementos esenciales: el RNA guía complementario (crRNA) y el RNA trans-activador (tracrRNA). El crRNA se encarga de identificar la secuencia nucleotídica específica del DNA objetivo mediante el apareamiento de bases, mientras que el tracrRNA se une al crRNA para guiar al complejo de la proteína Cas9 al sitio activo del DNA objetivo^{63,65,67}. PAM (motivo adyacente al protoespaciador) es una secuencia corta de DNA de 3 nucleótidos que no forma parte estructural del sistema CRISPR-Cas, sino que se encuentra inmediatamente adyacente al extremo 3' del sitio objetivo en el DNA del patógeno de la cadena complementaria del reconocimiento de crRNA⁶³. Si falta esta

breve secuencia denominada PAM, incluso una secuencia completamente complementaria a la sgRNA no puede ser reconocida por la endonucleasa Cas9⁶⁹. Esto se debe a que la presencia de la secuencia PAM es un requisito crítico para la actividad de la endonucleasa Cas9 en el DNA diana⁶². La secuencia PAM es esencial para la separación de las hebras del DNA y la formación del heterodúplex RNA-guía/DNA-diana, lo que permite a la endonucleasa Cas9 realizar cortes precisos en el DNA diana⁷⁰. Esto permite que la endonucleasa Cas9 actúe como unas tijeras moleculares y escinda la cadena de DNA, generando una rotura de doble cadena, que es perjudicial para el plásmido o virus invasor, lo que resulta en su degradación.

Cuando una célula bacteriana es infectada por un patógeno invasor, pequeños fragmentos de su DNA se insertan en el genoma de la bacteria en el sitio denominado CRISPR^{61,67}. Estos fragmentos, llamados espaciadores, se intercalan entre las repeticiones cortas y palindrómicas regulares. Además esta información se hereda para futuras generaciones, lo que significa que cuando esta misma célula o sus descendientes se enfrenten nuevamente a los mismos patógenos⁶⁵, la maquinaria de vigilancia de la bacteria activa la producción de un crRNA. Este crRNA cuenta con una región complementaria a la secuencia repetida del locus CRISPR, que se denomina crRNA transcodificado (tracrRNA)^{68,71}. La proteína Cas se une al tracrRNA y juntos se unen a las secuencias repetidas que son precursoras de los crRNA. Posteriormente, el complejo es procesado por la RNAasa III para producir un tracrRNA:crRNA maduro^{66,71}. Finalmente, este complejo se dirige a la secuencia nucleotídica del patógeno invasor para realizar el rompimiento de la doble cadena de DNA y llevar a cabo su degradación **(Ver Figura 9)**.

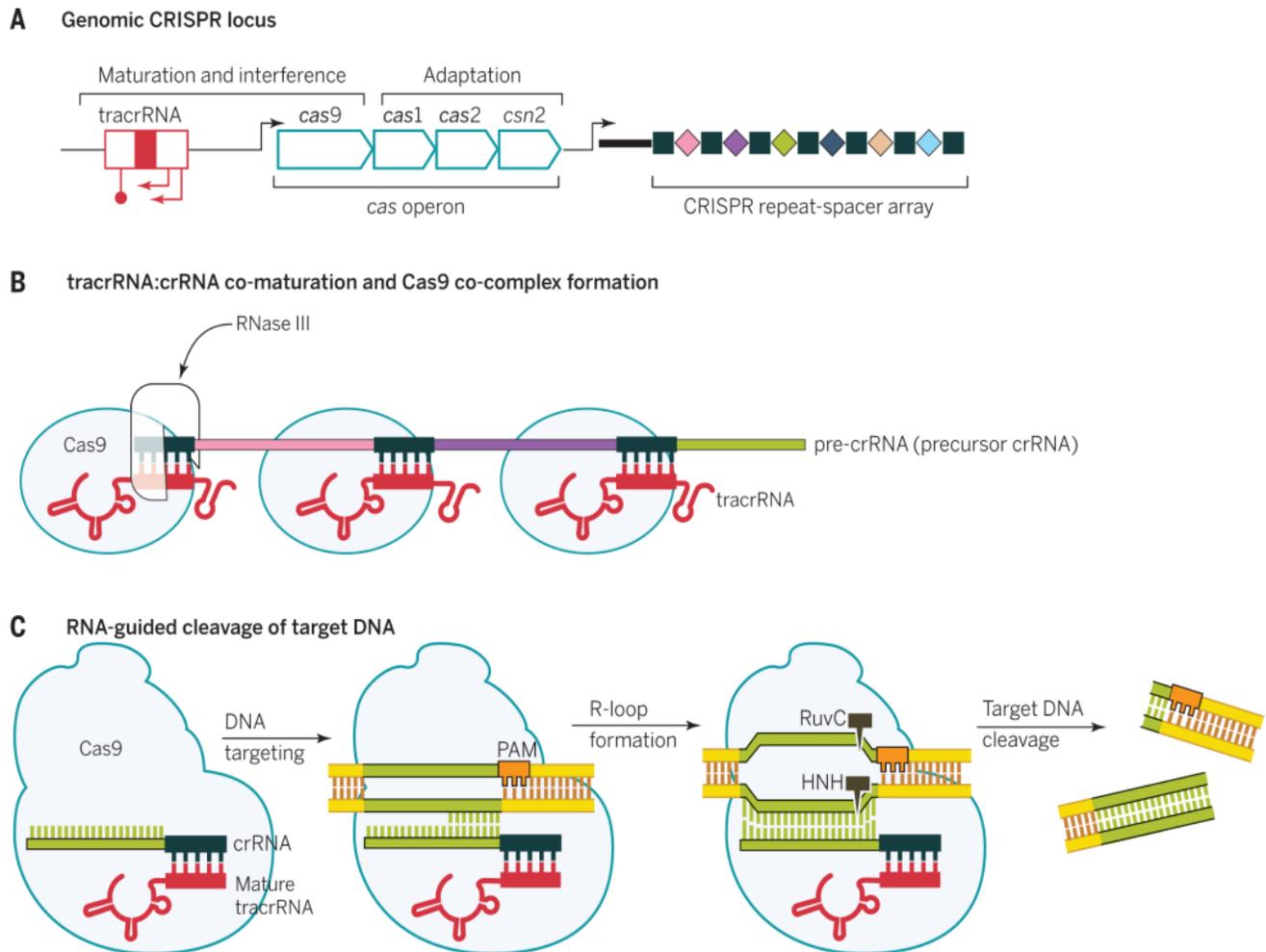


Figura 9. El sistema de CRISP- Cas 9. (A) El operón CAS junto con el tracrRNA se encuentra en el locus CRISPR, donde los rombos de colores corresponden a las secuencias espaciadoras que provienen del DNA del agente patógeno que ha infectado a la bacteria, y los cuadrados negros representan las secuencias palindrómicas repetidas. (B) Cuando un agente patógeno infecta nuevamente a esta célula o a su descendencia, se activa la síntesis de tracrRNA, que se une a la proteína Cas9. El tracrRNA se unirá por complementariedad de bases a las secuencias palindrómicas repetidas, generando un precursor crRNA que será procesado por la RNAasa III. (C) El complejo tracrRNA: crRNA se unirá a la secuencia complementaria del crRNA en el genoma del invasor patógeno, y la proteína Cas9 realizará una doble rotura de la cadena de DNA del patógeno. Tomada de Doudna & Charpentier (2014) ⁷².

Por su parte, los investigadores Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron en la revista Science en 2012 un trabajo que las hizo merecedoras del Premio Nobel de Química en 2020⁷³. En este trabajo, aprovecharon el sistema CRISPR-Cas9 para mejorar sus elementos mediante la generación de una quimera del crRNA y tracrRNA en un único RNA denominado sgRNA, de esta manera evitando el proceso de maduración (Ver Figura 10). Este diseño conservó las propiedades críticas de los elementos nativos del sistema CRISPR, de tal manera que pudieron programar con una secuencia de RNA guía (sgRNA) la edición de genes de manera más precisa y sencilla, en comparación con las técnicas existentes hasta ese momento^{65,72-74}. Desde entonces, este trabajo ha revolucionado el campo de la genética y la biotecnología, ya que proporcionó una herramienta poderosa y accesible para la edición de genes, que va desde su activación, su represión o su silenciamiento^{66,74}.

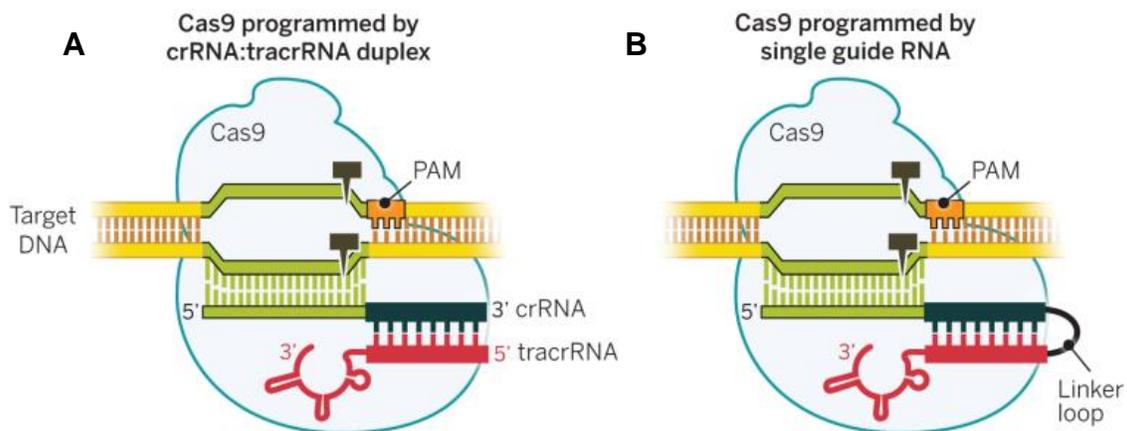


Figura 10. Evolución del Sistema CRISPR-Cas9. (A) El complejo tracrRNA: crRNA nativo del sistema CRISPR-Cas9. (B) La quimera diseñada por Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, donde se diseñó una RNA guía (sgRNA) unida al tracrRNA por un loop. Tomada de Doudna & Charpentier (2014) ⁷².

El sistema CRISPR-Cas se ha convertido en una herramienta clave para la edición del genoma de los eucariotas, de tal manera que después de la introducción de una rotura de doble cadena del DNA de estas células eucariontes, se activa el

sistema de reparación del DNA a través de dos mecanismos principales: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga dirigida (HDR) ^{61,66,75}, (ver Figura 11). El proceso de NHEJ es el más común, pero también es propenso a errores, lo que puede generar mutaciones puntuales, inserciones o deleciones que provoquen la pérdida de la función del DNA objetivo o la degradación de la secuencia objetivo⁶⁸. Estas mutaciones pueden generar cambios puntuales, inserciones o deleciones que afecten la estabilidad y estructura de la proteína. Si no se produce el plegamiento correcto, se pierde la función de la proteína, o si estos cambios genéticos generan un codón de paro, se puede perder parcial o totalmente la estructura primaria de la proteína. Por otro lado, el proceso de HDR es un método más preciso y requiere una plantilla de DNA homólogo para llevar a cabo la reparación⁷⁵.

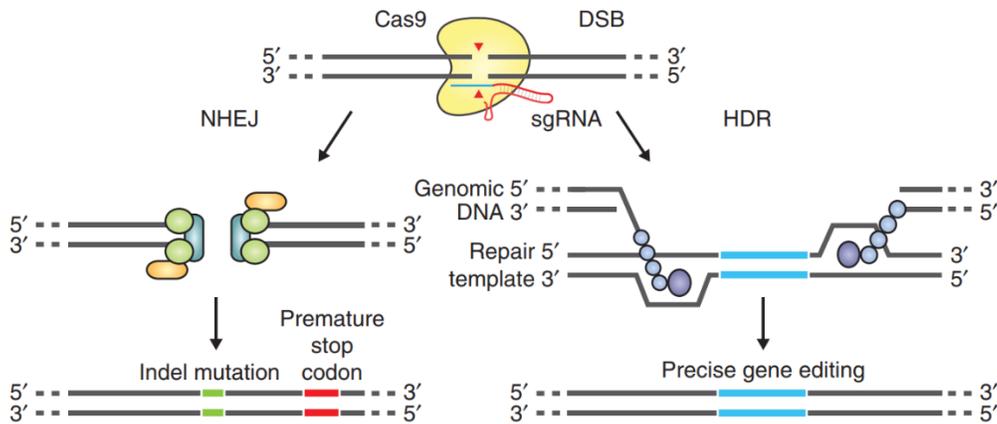


Figura 11. La reparación de roturas de doble cadena promueve la edición de genes.

Cuando el sgRNA se une al objetivo deseado, como un gen, la proteína Cas9 lleva a cabo una doble rotura en la cadena de DNA, lo que activa el sistema de reparación del DNA mediante los mecanismos de NHEJ y HDR. Tomada de Ran et al. (2013) ⁷⁵.

La tecnología CRISPR-Cas9 ha sido utilizada en numerosos campos, desde la investigación básica hasta el desarrollo de nuevas terapias génicas para enfermedades genéticas y el cáncer ^{62,65,76,77}.

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, la muerte celular por apoptosis puede desencadenarse cuando la célula detecta un patógeno intracelular y, como resultado, inactiva sus procesos celulares para evitar que el patógeno utilice su maquinaria celular. De esta manera, la apoptosis puede considerarse un mecanismo de defensa que permite eliminar los patógenos intracelulares. Sin embargo, algunos patógenos virales han desarrollado estrategias para bloquear la apoptosis⁷⁸. Por otro lado, existen patógenos virales para los cuales la apoptosis no es perjudicial, e incluso puede resultar beneficiosa para su replicación, lo que lleva a la inducción de proteínas pro-apoptóticas.⁷⁹⁻⁸¹

Durante las dos últimas décadas, se ha observado que el virus de la influenza es capaz de inducir la apoptosis tanto a través de la vía extrínseca como de la vía intrínseca. Se ha observado que el virus de la influenza puede modular diferencialmente las vías apoptóticas en diferentes etapas de la infección: en las etapas tempranas, el virus puede inhibir la inducción de apoptosis, mientras que en etapas tardías de la infección puede inducirla⁶⁰⁻⁶⁶. Esto sugiere que al prevenir los eventos pro-apoptóticos en las etapas tempranas, el virus tiene tiempo suficiente para llevar a cabo su replicación y la producción de nuevos viriones. Una vez iniciada la apoptosis en las etapas tardías, los viriones son liberados al exterior de la célula, lo que permite la infección de otras células huéspedes cercanas.⁸² Es importante destacar que este tema sigue siendo objeto de controversia, ya que varios estudios no han observado una clara correlación entre la apoptosis y la replicación viral, especialmente debido a las diferencias en los modelos celulares y animales utilizados en las investigaciones, lo que puede llevar a respuestas muy diversas^{80,83-86}.

Por otro lado, la célula hospedadora puede inducir la apoptosis mediante una colección de receptores especializados en la detección de patógenos, como las proteínas TLRs, NLR y RIG-I. Esto generalmente lleva a la expresión y síntesis de interferones de tipo 1 (IFN- α o IFN- β), que se unen a los receptores IFN- $\alpha\beta$ (IFNAR) e inducen una serie de respuestas antivirales (**ver Figura 12**). Entre estas respuestas se incluye la inducción de la expresión de ligandos para los receptores

de muerte, como TRAIL y FasL, lo que provoca la muerte de las células infectadas a través de las vías extrínseca e intrínseca por apoptosis.^{87–90}

Sin embargo, algunos virus han superado esta barrera antiviral, lo que les confiere ventajas para su replicación y provoca un daño severo en las células hospedadoras. Un ejemplo de esto es el virus de la influenza, que causa un daño severo en los pulmones y provoca una liberación excesiva de IFNs tipo 1, lo que aumenta la respuesta inmune. Esto propicia el reclutamiento excesivo de células mononucleares, células T, NK y macrófagos en los espacios alveolares, lo que resulta en la expresión y liberación de grandes cantidades de TRAIL y FasL, así como en la expresión de receptores de muerte en células vecinas. Esto da como resultado un daño apoptótico excesivo en células epiteliales alveolares no infectadas cercanas, lo que provoca una lesión pulmonar aguda o síndrome de dificultad respiratoria aguda, caracterizada por una filtración masiva de proteínas alveolares y hipoxemia^{90–95}.

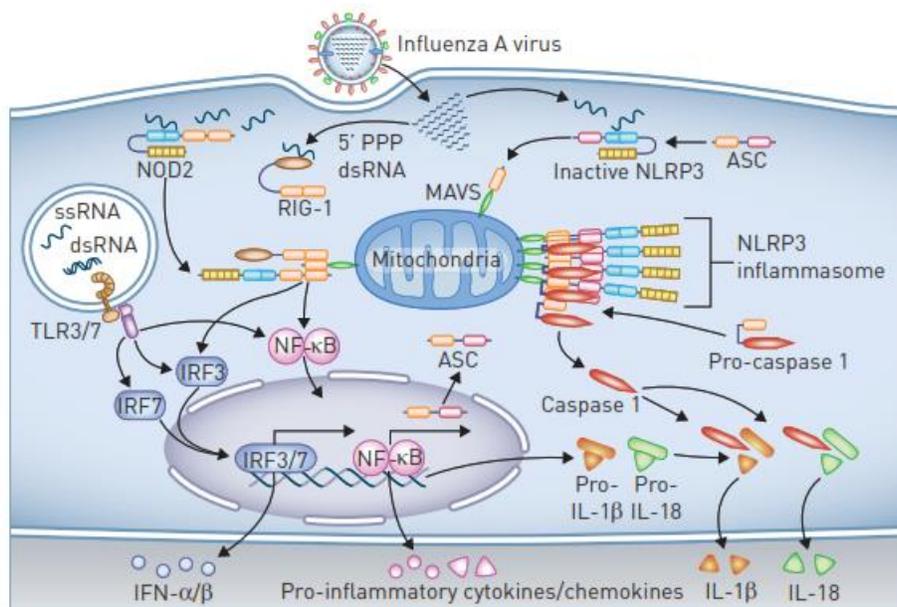


Figura 12. Respuesta inmune innata tras la infección del virus de influenza en la célula hospedadora. La presencia de vRNA activa los receptores tipo Toll (TLRs), principalmente TLR7 y TLR3, lo que da a lugar a la transcripción de interferones tipo 1 (IFN- α/β). La activación de esta vía también puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas mediante la activación del factor nuclear NF- κ B. Tomada de Herold *et al* (2015)

95

Por otra parte, en experimentos realizados por nuestro grupo de investigación⁹⁶, se observó que el pre-tratamiento con TGF- β 1 ocasionó una disminución de la presencia de alrededor de 16 proteínas pro-apoptóticas durante la infección viral, en de células A549 que no fueron tratadas con TGF- β 1 (**Figura 13A**). Como se muestra en la **Figura 13B**, se observó inhibición en la expresión o presencia proteínica de caspasa 3, proteína de choque término (HSP), receptores de muerte (TNFr), p53, Diablo, etc.

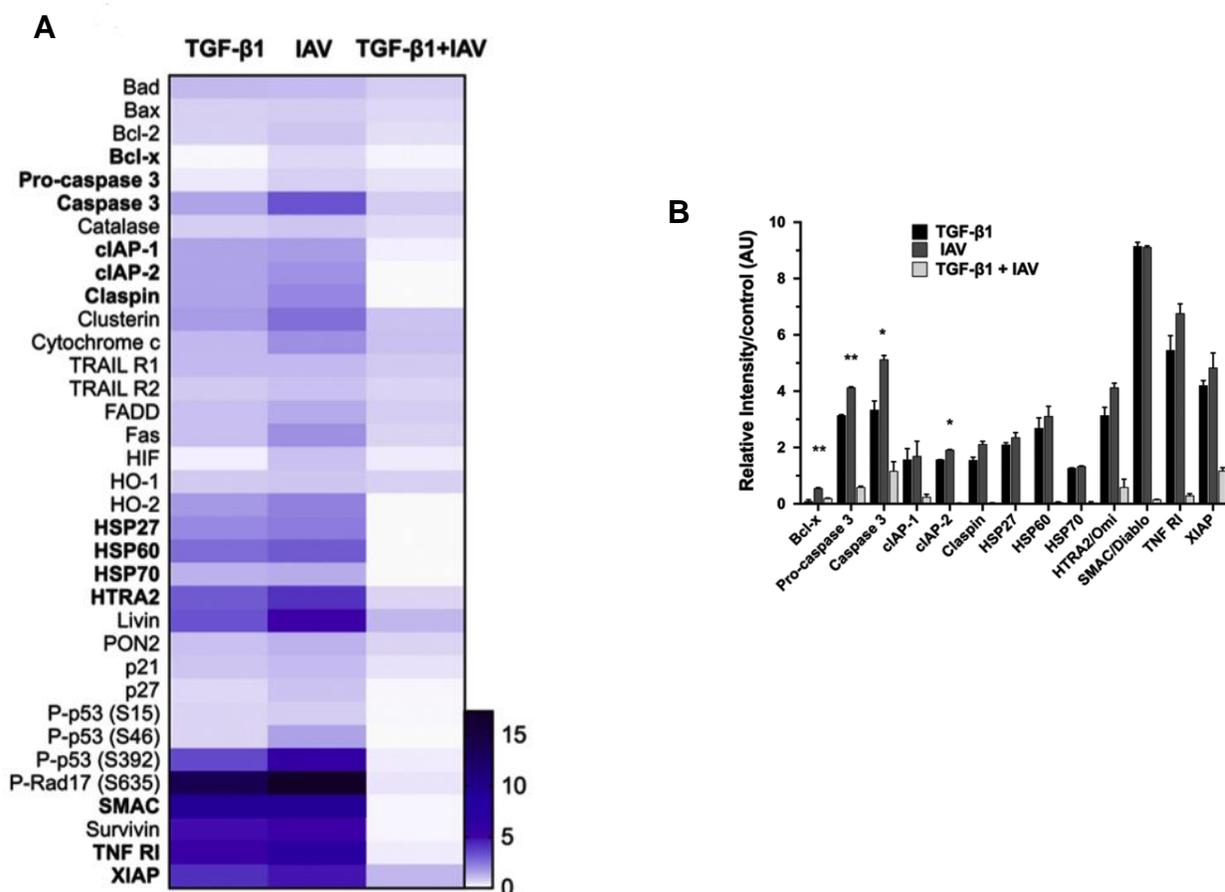


Figura 13. Pretratamiento con TGF- β 1 regula negativamente la expresión de las proteínas pro-apoptóticas inducida por la infección. (A) mapa de calor de la abundancia relativa de las proteínas apoptóticas (microarreglo). **(B)** comparación grafica cuantitativa de las proteínas apoptóticas que fueron reducidas significativamente con el pretratamiento de TGF- β 1. Los asteriscos identifican las diferencias significativas de las proteínas apoptóticas cuando el virus esta solo versus cuando se pretratan con solo TGF- β 1. Tomada de BustosRivera-Bahena *et al.* (2021)⁹⁷.

Por otra parte, esta inhibición de proteínas pro-apoptóticas coincidió con una inhibición significativa de expresión de las proteínas M1 y NS1, así como la generación de partículas virales infectivas (**Figura 14**).

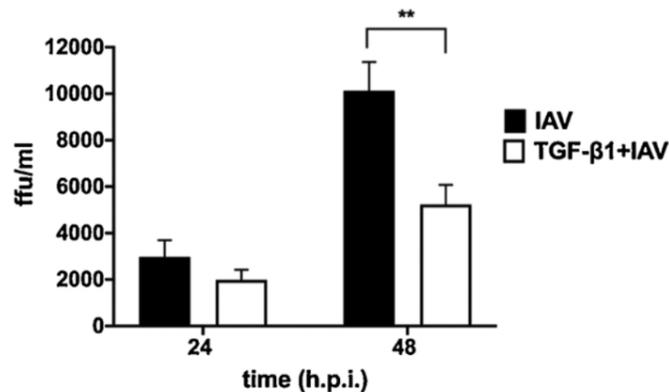


Figura 14. El pretratamiento con TGF-β1 inhibe la replicación del virus de influenza. El efecto que tiene el pretratamiento de TGF-β1 sobre los títulos virales, a las 24 y 48 h post infección. Tomada de BustosRivera-Bahena *et al.* (2021) ⁹⁷.

En este mismo estudio, a través de la evaluación del perfil de expresión de Smad7 y la fosforilación de Smad2/3 mediante la técnica de Western blot, en un intervalo de tiempo que abarcó desde los 30 minutos hasta las 24 horas, se propuso que los efectos pro o anti-apoptóticos dependen de las vías de señalización del TGF-β1. Específicamente, se observó un aumento en la presencia de la proteína Smad7 (**Figura 15A**) en concordancia con la inducción de proteínas pro-apoptóticas y la infección productiva por el virus de la Influenza. Por otro lado, el efecto inhibitorio del TGF-β parece estar relacionado con un aumento en la fosforilación de Smad2/3 (**Figura 15B**), lo que coincide con la inhibición de proteínas pro-apoptóticas y la infección viral productiva. Por lo tanto, la modificación selectiva de Smad7 y Smad2/3, que tienen funciones opuestas en la vía del TGF-β1, podría ser un punto crucial para alterar la replicación del virus de influenza, el programa de apoptosis celular y/o la respuesta antiviral de la célula hospedadora. Para confirmar dichas suposiciones, en el presente estudio se propuso la modificación de la línea celular

A549 mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9 para silenciar la expresión de Smad7.

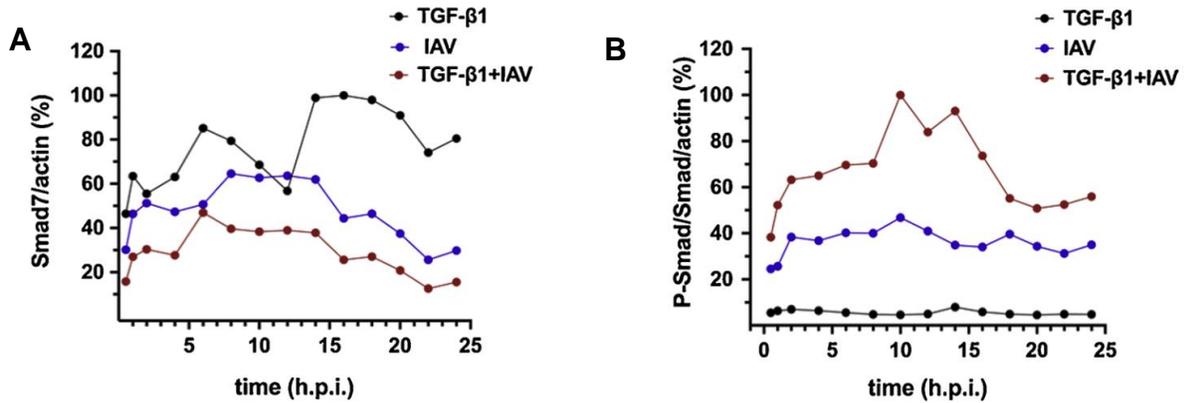


Figura 15. El pretratamiento con TGF-β1 favorece la fosforilación de Smad2/Smad3 y reprime a Smad7. Perfil de expresión de Smad7 y Smad2/3 mediante Western blot. Cada punto representa el cociente de Smad7 o Smad2/3 respecto a la Actina (A). Cuando las células están infectadas solo con el virus de la influenza, se observa una mayor presencia de los niveles de Smad7 en comparación con las células pretratadas con TGF-β, donde se registra una disminución en los niveles de Smad7. (B) En el caso de las células pretratadas con TGF-β, se observa un aumento en la fosforilación de Smad2/Smad3 en comparación con las células infectadas solo con el virus de la influenza. Tomada de BustosRivera-Bahena *et al.* (2021) ⁹⁷.

JUSTIFICACIÓN

El virus de la influenza ha causado y sigue causando millones de muertes en todo el mundo a través de epidemias y pandemias, lo que lo convierte en un grave problema de salud global. A pesar de la existencia de vacunas contra el virus, estas sólo son efectivas contra las cepas específicas que circulan cada año, ya que el virus muta con frecuencia. Esto crea la posibilidad de epidemias con graves consecuencias tanto en términos de salud como económicas y sociales, especialmente cuando las vacunas existentes no son efectivas para todas las variantes.

En la actualidad, existen medicamentos que actúan inhibiendo la actividad de las proteínas M2 o neuraminidasa del virus, lo que inhibe su ciclo replicativo y limita su propagación. Sin embargo, también se ha observado que la efectividad de estos medicamentos antivirales, como la amantadina y el oseltamivir, se ha visto comprometida debido a la variabilidad del virus. De hecho, las nuevas cepas del virus de la influenza son prácticamente resistentes a la amantadina. Por lo tanto, es urgente el desarrollo de nuevos antivirales más efectivos.

Además, el estudio de los mecanismos celulares durante la infección por el virus de la influenza es fundamental para comprender las interacciones entre el virus y las respuestas celulares, como la apoptosis y la respuesta antiviral. Un modelo de infección *in vitro* con el virus de la influenza proporciona información valiosa sobre estas interacciones y puede ayudar a identificar posibles objetivos terapéuticos para combatir el virus.

En este estudio, se busca comprender el papel de la proteína Smad 7 en la señalización relacionada con el TGF- β y la apoptosis durante la infección *in vitro* con el virus de la influenza H1N1. Para lograrlo, se utilizará la técnica CRISPR-Cas9 para silenciar la expresión de Smad 7 en células A549, que son un modelo comúnmente utilizado en estudios de infección por el virus de la influenza. Al silenciar Smad 7, se podrá evaluar su impacto en las vías de señalización del TGF- β y la apoptosis, así como en la capacidad infectiva del virus. Esto podría arrojar luz sobre cómo el virus interactúa con estas vías de señalización.

HIPÓTESIS

Mediante el empleo de la técnica CRISPR-Cas9, la transfección en las células A549 con el vector PX458, que contiene una sgRNA específica para la secuencia del gen de Smad7, resultará en la inhibición de su expresión, en comparación con las células transfectadas con un vector vacío o las células no transfectadas.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Bloquear la expresión de Smad7 mediante la técnica CRISPR-Cas9 en células A549.

Objetivo Específicos

1. Diseñar y sintetizar los RNA guías específicos para Smad7.
2. Clonar los RNA guías en el vector PX458 y confirmar su incorporación.
3. Evaluar la eficiencia del proceso de transfección de los RNA guías mediante la técnica de citometría de flujo.
4. Determinar el grado de inhibición de Smad7 en células A549 mediante la técnica de western blot

MATERIALES Y METODOS

Cultivo celular

La línea celular utilizada fue A549 que deriva de carcinoma alveolar epitelial y fue obtenida del American Type Culture Collection (CCL-185). Las células se mantuvieron en medio de cultivo Dubelcco's Modified Eagle's F-12 (DMEM F-12), complementado con 1% de glutamina, 10% de suero fetal (SFB, Invitrogen) y 1% de antibiótico (Antibiótico-antimicótico, Invitrogen). La línea se mantuvo en cultivo en una incubadora CO₂ Water-Jacketed Incubator, Re TM US Ausflow, NUAIRE a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó el número y la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul tripano. Los pases de continuidad se llevaron a cabo utilizando la solución TrypLE Express (GIBCO 12604), añadiéndola directamente a la caja de cultivo y manteniéndola durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez despegadas las células, se añadieron 7 mL de medio de cultivo suplementado y las células se centrifugaron a 1500 rpm y se contabilizaron para los ensayos correspondientes o se diluyeron para su crecimiento y uso posterior. Las células transfectadas con el vector vacío (PX458 Ø) y el vector PX458 que contenía la sgRNA3 (PX458-sgRNA3) se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

Diseño y síntesis de sgRNA

Para el diseño de sgRNA (single guide RNA), se utilizó el software "Custom Alt-R® CRISPR-Cas9 guide RNA" Integrated DNA Technologies IDT (https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM). Se obtuvo la secuencia codificante de los exones de Smad 7 en ensamblaje (<http://www.ensembl.org/>). Para su análisis, se introdujeron los primeros 1000 pb de cada uno de los tres exones de Smad 7 (Ver Anexos) y se eligieron las secuencias recomendadas por el software, basadas en el menor riesgo de emparejamiento con

secuencias de otros genes y la mayor probabilidad de complementaridad con el gen de interés. Las secuencias de sgRNA se mandaron a sintetizar en el departamento de síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM. Adicionalmente, en las tres secuencias de sgRNA se incluyó los sitios de corte de restricción de BbsI en los extremos 5' y 3'. El diseño de las sgRNA está basado en el protocolo de Ann Ran y colaboradores⁷⁵.

Clonación de las sgRNA en el vector PX458

Para la clonación de cada una de las sgRNA, se utilizó el vector PX458 (Addgene plasmid # 48138), el cual contiene los elementos necesarios para la expresión del sistema de CRISPR-Cas9, así como el gen reportero de proteína verde fluorescente (EGFP), ver Anexo 2. El vector fue donado por el grupo de investigación del Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Para su clonación, primero se cortó el vector PX458 con la enzima de restricción BbsI, permitiendo hacer complementarios los extremos de las sgRNA con los extremos del vector de clonación. Posteriormente, en un tubo eppendorf se agregaron 3 µg (4 µL) del vector PX458, 1 µL de FastDigest BbsI(ER1012, Thermofisher), 5 µL de FastDigest Green Buffer (10X) (BG5, Thermofisher) y 40 µL agua miliQ. Finalmente, se incubó a 37°C por 2 horas

Para verificar si la digestión se realizó correctamente, se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó 1 µL de buffer de carga (10x), 4 µL de agua y 5 µL del vector digerido para cargar en un carril del gel. En otro carril, se cargó 1 µL de buffer de carga y 3 µL de marcador de peso molecular para DNA. También se dispuso de un tercer carril para cargar 2.5 µL del vector PX458 no digerido, 1 µL de buffer de carga y 6.5 µL de agua.

A continuación, se realizó la desfosforilación del vector PX458 digerido añadiendo 5.5 µL de buffer y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego se agregó 1 µL de la enzima CIAP (Invitrogen) y se incubó durante otros 30 minutos. Finalmente, el vector se purificó mediante una columna (FAGCK 001-1, Favorgen).

Cada par de oligos sintetizados para las 3 sgRNAs fue fosforilado en el extremo 5' y alineado con su complementario. En un tubo Eppendorf, se agregaron 1 μ L de enzima T4 PNK (EK0031, Thermofisher), 6 μ L de agua miliQ, 1 μ L de buffer de ligación (10x) (new england) y 1 μ L de oligos (100 μ M). Luego, se introdujo el tubo en un termociclador con las condiciones mostradas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de alineamiento y fosforilación.

T °C	Tiempo (min)
37 °C	30 min
95 °C	5 min
90 °C	1 min
85 °C	1 min
75 °C	1 min
65 °C	1 min
60 °C	1 min
55 °C	1 min
50 °C	1 min
45 °C	1 min
35 °C	1 min
30 °C	1 min
25 °C	1 min
4 °C	1 min

Posteriormente, cada uno de los tres sgRNAs se ligó con el vector PX458. En un tubo Eppendorf, se agregaron 1 μ L de buffer de ligación T4 (10X) de New England BioLabs, 1 μ L del dúplex (diluido 2:400), 1 μ L de T4 ligasa de New England de BioLabs, 2 μ L de vector previamente digerido y defosforilado y 6 μ L de agua MilliQ. La reacción de ligación se llevó a cabo a una temperatura de 16°C, incubándose durante 12 horas. Después del tiempo de incubación, se procedió a tratar la reacción de ligación con plasmid-safe exonucleasa de Lucigen/Epicentre. Esto implicó tomar 11 μ L de la reacción de ligación, a los que se agregaron 1.5 μ L de buffer de plasmid-safe (10x, Lucigen/Epicentre), 1 μ L de solución ATP (25 μ M),

1 μL de agua MilliQ y 0.5 μL de DNAasa plasmid safe, y se dejó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos.

Tras esta reacción, se realizaron las transformaciones utilizando células electrocompetentes de *E. coli* MC4100 para clonar cada una de las sgRNA. Las bacterias se cultivaron en medio LB sólido con ampicilina (1 μL de ampicilina por cada 1 mL de medio) y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Finalmente, las placas se dejaron en incubación durante toda la noche a temperatura ambiente.

Las células de *E. coli* electrocompetentes MC4100 fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Estas células fueron cultivadas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido o líquido, dependiendo del ensayo a realizar.

Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó mediante choque térmico, el cual consistió en incubar durante 15 minutos en hielo células *E. coli* electrocompetentes MC4100 con el producto de ligación. Luego de este tiempo, se añadieron 100 μL de bacterias competentes y 10 μL del producto de ligación en un tubo tipo Falcon de 15 mL y se incubó por 45 minutos en hielo, seguido por 2 minutos a 42°C. Luego, se transfirieron las bacterias a un tubo de tipo Sarstedt de 15 mL que contenía 1 mL de medio de cultivo LB sin antibiótico, y se cultivaron en agitación a 37°C y 150 rpm durante 60 minutos. Después de la incubación, se plaquearon 700 μL de la solución en placas Petri con medio LB sólido y antibiótico, y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Finalmente, las placas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se seleccionaron las colonias aisladas que contenían las sgRNAs clonadas, mediante la resistencia a ampicilina, y se inoculó cada una de ellas en 2 mL de medio de cultivo LB líquido con antibiótico durante 12 horas para posteriormente purificar el plásmido PX458 utilizando el kit Plasmid DNA Extraction Miniprep Kit de Bio Basic Inc (Thermofisher). Luego, se caracterizaron las colonias

positivas por medio del perfil de digestión para las enzimas BbsI y XbaI. Finalmente, se enviaron las colonias positivas a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM para verificar que la secuencia clonada en el vector correspondía a la sgRNA deseada.

El proceso de selección de colonias, purificación de plásmidos y caracterización por enzimas de restricción fue realizado de manera independiente para cada una de las sgRNAs que se ligaron al vector.

Perfil de digestión

El perfil de digestión se realizó agregando 5 μ L de DNA plasmídico extraído del miniprep a una mezcla que contenía 11.5 μ L de agua MilliQ, 2 μ L de buffer Tango (B45, Thermofisher), 1 μ L de la enzima BbsI y 0.5 μ L de la enzima de restricción XbaI (ER0681, Thermofisher). La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C en un baño seco. Luego, se procedió a analizar la digestión de los plásmidos en un gel de agarosa al 1.7%.

Banco Celular

Una vez confirmadas las secuencias de cada uno de los vectores que contenían las sgRNA mediante secuenciación, se estableció un banco celular para cada una de ellas. Las células de *E. coli* transformadas con los vectores PX458 que contenían las sgRNA, y que eran resistentes a la ampicilina, se cultivaron en placas Petri con 2 mL de medio LB líquido y antibiótico, y se incubaron con agitación durante 12 horas a 37°C a 150 rpm. Luego, se tomaron 60 μ L del inóculo y se cultivaron en 12 mL de medio de cultivo LB líquido con antibióticos durante toda la noche a 37°C a 150 rpm, durante 12 horas. Al día siguiente, se tomaron 500 μ L del cultivo y se mezclaron con 500 μ L de glicerol al 50% para ser almacenados en crioviales de 2 mL a -80°C.

Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción del vector PX458 con cada una de las sgRNA clonadas se utilizó el kit midiprep (GeneJET Plasmid midiprep kit, Thermofisher), para esto se tomó una azada de los bancos celulares y se incubó en 2 mL de medio de cultivo LB durante 12 horas a 37°C. Después de este tiempo, se tomaron 75 µL del cultivo para ser transferidos a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de medio de cultivo LB, y se incubó durante 16 horas a 37°C en agitación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo a 5000 x g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió mediante vortex en 2 mL de solución de resuspensión, y luego se añadieron 2 mL de solución de lisis y se mezclaron mediante inversión. A continuación, se añadieron 2 mL de solución de neutralización, se mezclaron mediante inversión y se agregaron 0.5 mL de agente de unión de endotoxina (Endotoxin Binding Reagent), mezclándose inmediatamente, y se dejó incubar durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 3 mL de etanol al 96% y se centrifugó a 4000 rpm durante 40 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de tipo Falcon de 15 mL, al cual se le añadieron 3 mL de etanol al 96%, y se mezcló mediante inversión. La mezcla se transfirió a una columna preensamblada dentro de otro tubo de tipo Falcon de 15 mL, y se centrifugó a 2000 x g durante 3 minutos, eliminando el sobrenadante. La columna preensamblada se lavó con Wash Solution I y Wash Solution II (4 mL cada una por separado), y se centrifugó a 3000 x g durante 2 minutos cada lavado (se lavó dos veces con Wash Solution II), eliminando el sobrenadante entre cada lavado. Después de los lavados, se centrifugó la columna una vez a 3000 x g durante 5 minutos para desechar los residuos de las soluciones de lavado. Finalmente, se añadieron 350 µL de solución de dilución a la columna, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos para diluir el DNA plasmídico.

Ensayos de transfección

Para el proceso de transfección, en primer lugar, se midió la eficiencia de la transfección utilizando un vector que también contenía la expresión de EGFP y cuyo proceso de transfección ya había sido estandarizado previamente, el cual se utilizó como control positivo, este vector fue el pEGFP-N1, proporcionado por la Dra. Yvonne Rosenstein del IBT-UNAM. Para cada vector con cada una de las sgRNA, se emplearon tres cantidades distintas de DNA plasmídico (2.5, 5.0 y 10 µg), mientras que para el vector de control positivo se usó 9.9 µg de DNA plasmídico. Como control negativo, se utilizaron células A549 que no fueron transfectadas con ningún vector. La cuantificación del DNA plasmídico se midió en el equipo de nanodrop (Denovix DS-11fx). Una vez realizada la comparación con el control positivo, solo se tomó una cantidad de 10 µg para el vector que contenía la sgRNA 3 (PX458-sgRNA3) y el vector vacío (PX458 Ø).

Veinte y cuatro horas antes de la transfección, se sembraron 500,000 células A549 en cada uno de los 6 pocillos de una placa, donde se evaluarían cada una de las diferentes cantidades de DNA plasmídico. Pasadas 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 2 ml de medio de cultivo libre de suero fetal bovino. La transfección se llevó a cabo utilizando lipofectamina 3000 (2429245, Invitrogen). Para ello, se añadieron las siguientes cantidades en dos tubos Eppendorf, A y B:

Tubo A

Reactivo	Cantidad
Optimem (31985-062, gibco)	250 µL
Lipofectamina 3000	10 µL

*Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente

Tubo B

Reactivo	Cantidad
Optimem	250 µL
DNA plasmídico	2.5, 5.0 y 10 µg

*Se Incubó por 5 minutos a temperatura ambiente

Posteriormente, se mezclaron los tubos A y B y se dejaron reposar por 20 minutos; después se agregaron 500 μ L de la mezcla a las células y se dejaron incubar por 3 horas. Transcurridas las 3 horas, se completó hasta 4 ml de medio de cultivo DMEM F-12 al 20% de suero fetal bovino sin antibiótico, y se dejaron durante 36 o 48 horas.

Por otra parte, La transfección del vector pEGFP-N1 con lipofectamina se realizó en placas de 24 pozos, en donde 24 horas antes de la transfección se pusieron 200,000 células A549 en un pozo. Transcurrido las 24 horas, se removió el medio de cultivo, y se lavó dos veces con 1 mL de PBS estéril y se colocó 200 μ L de Optimem y se preparó dos tubos Eppendorf, A y B:

Tubo A

Reactivo	Cantidad
Optimem	40 μ L
Lipofectamina 3000	10 μ L

Tubo B

Reactivo	Cantidad
Optimen	17 μ L
DNA pEGFP-N1,	9.9 μ g

Los tubos A y B se mezclaron y se dejaron reposar durante 20 minutos antes de agregar 100 μ L de la mezcla a las células. Luego, se incubaron durante 6 horas. Transcurrido ese tiempo, se agregó 1 mL de medio de cultivo DMEM F-12 suplementado con un 20% de suero fetal bovino sin antibiótico, y se incubó por 24 horas.

Evaluación de la transfección por citometría de flujo

Posterior al ensayo de transfección, se evaluó la eficiencia de transfección mediante la fluorescencia de la proteína EGFP. Una vez concluido el proceso, las células se despegaron del pozo con TrypLE Express y se contaron mediante la técnica de azul de tripano. A continuación, se reservaron 200,000 células A549 transfectadas y 500,000 células A549 no transfectadas, las cuales se almacenaron en 1 mL de paraformaldehído al 1% a 4°C hasta su análisis en el citómetro BD FACSCanto II. El día de la adquisición por citometría, se centrifugaron las muestras a 1500 rpm y se decantó el sobrenadante, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se trasvasaron a tubos de citometría para ser pasadas a través del citómetro de flujo.

Después de este ensayo, se llevó a cabo el proceso de transfección nuevamente con la PX458-sgRNA3 y el PX458 Ø para continuar con el silenciamiento de Smad 7. Con el objetivo de enriquecer el cultivo de células transfectadas, se procedió a realizar el sorting mediante el citómetro BD FACSCanto II. El día del sorting se contaron 1.5×10^6 células. Luego, se filtraron (SPL Cell Strainer 93070) y se sometieron al proceso de sorting mediante citometría de flujo. Las células restantes se cultivaron para su expansión y generación de banco celular guardándose en medio de cultivo con 10% de SFB, 1% de antibiótico y 2% de DMSO. La evaluación en el citómetro se realizó con el apoyo de la M.C. Erika Melchy Pérez (IBT-UNAM).

Evaluación del silenciamiento selectivo de Smad7 en células A549

Para evaluar el bloqueo selectivo de la expresión de la proteína Smad 7 en las células A549, se cultivaron células A549 no transfectadas (A549 N), células transfectadas con la PX458-sgRNA3 (A549 sgRNA 3) y con el PX458 Ø (A549 Ø) tomadas de los bancos celulares y se crecieron para su expansión. Luego, se contaron 500,000 células para cada condición de células (A549 N, A549 Ø, A549 sgRNA 3) y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia superior al 90%.

Luego, cada uno de estos cultivos se lisaron con buffer de lisis RIPA (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% IgePal, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 8.0), complementado con los inhibidores de proteasas Mini-complete e inhibidores de fosfatasa Phospho-stop (Roche). Los sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 rpm y se almacenaron a 4°C hasta su uso para el análisis de inmunodetección por Western blot.

Se cuantificó la cantidad de proteína de los lisados mediante el ensayo de Bradford, utilizando una microplaca de 24 pozos (microplaca para EIA/RIA Corning CLS3591). Para ello, se preparó una curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA, Sigma) con las cantidades 0, 0.5, 1, 2, 4, 10 µg en un volumen final de 8 µL. Además, en pozos diferentes se añadieron 4 µL de cada lisado correspondiente a los diferentes tratamientos de células. Posteriormente, se añadieron 240 µL de la solución de Bradford e incubaron durante 5 minutos. Luego, se determinó la absorbancia en un lector de placas EPOCH (Bio Tek) a 595 nm. La curva estándar y la determinación de la cantidad de proteína de la muestra se realizaron por duplicado, y se determinó la regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y calcular por interpolación la cantidad de proteína presente en los lisados. La regresión lineal e interpolación se llevaron a cabo mediante el software GraphPad Prism v.9.0.

Después de la cuantificación de proteínas por ensayos de Bradford, se utilizó una concentración de 15 µg de proteína de los lisados de los diferentes tratamientos de células para determinar la presencia de la proteína Smad 7 mediante su inmunodetección por la técnica de western blot.

Las cantidades de proteína de los diferentes tratamientos fueron analizadas por SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 12% de 1.5 mm de grosor, empleando una cámara miniProtean 3 Cell (Bio-Rad). Cada una de las muestras, con 15 µg de proteína de cada uno de los tratamientos, fue desnaturalizada en buffer de carga 4x y calentada por 5 minutos a 95°C en un baño seco (BRNAstead/Termolyne). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante aproximadamente 10 segundos en una centrífuga Spectrafuge 24D (Labnet). Las

muestras se corrieron en los geles de poliacrilamida a 40 mA constante mediante una fuente de poder Enduro Power Supplies (Labnet).

Después de correr los geles de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μm (Bio Rad) utilizando una cámara Mini Trans-blot (Bio Rad) durante una hora a 100 V constante y 500 mA, con una fuente de poder Enduro power supplies (Labnet). Posteriormente, se bloqueó la membrana con una solución de 1.5% de BSA en PBS Tween 20 al 0.1% durante toda la noche, con agitación constante en un cuarto frío.

Al día siguiente, se lavó la membrana dos veces con PBS Tween 20 al 0.1%, durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos primarios anti-SMAD-7 (mouse IgG sc-365846, Santa Cruz Biotech, diluido 1:2000) y β -actina (mouse igG sc-47778, Santa Cruz Biotech, diluido 1:1000) en solución de PBS Tween-20 al 0.05% con BSA al 1.5%, durante dos horas. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, se realizó dos lavados con PBS Tween 20 al 0.05% durante 5 minutos cada lavado. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente Anti-ratón (JACKSON, diluido 1:4000) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) durante una hora. Finalmente, se realizaron dos lavados con PBS Tween 20, y se incubó la membrana por un minuto con el reactivo Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y se registró la imagen de quimioluminiscencia en una cámara ChemiDoc XRS (Bio Rad). Dado que el peso molecular de la proteína Smad 7 y la banda de β -actina no coinciden, se cortó la membrana de nitrocelulosa en secciones. La sección de proteínas menores a 41 kDa se incubó con el anticuerpo primario anti β -actina, mientras que la sección por encima de 41 kDa se incubó con el anticuerpo primario anti Smad 7.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva e inferencial para analizar la comparación de los diferentes grupos examinados. Para evaluar la eficiencia de la transfección, que implicaba medir la cuantificación de la fluorescencia de la EGFP, se aplicó un

análisis de ANOVA de diseño experimental de bloques al azar (DBCA). En este análisis, se controlaron las diferentes cantidades de DNA plasmídico en tres niveles distintos (bloques) para evaluar de manera más precisa el efecto de las diferentes sgRNAs.

En lo que respecta a la evaluación del nivel de expresión de la proteína Smad7, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis post hoc de Dunn. Se llevaron a cabo tres ensayos de Western blot independientes, en los cuales se analizaron por densitometría las bandas de inmunodetección de Smad7 de los diferentes tratamientos. Para el análisis densitométrico, se utilizó el software Image Lab v.6.1.0.07 de Bio-Rad Laboratories.

Se consideró como diferencia significativa cuando el valor de p resultó menor al 0.05%. Se emplearon diversas herramientas de software para llevar a cabo el análisis estadístico y la creación de gráficos. El programa Minitab v.21.3 se utilizó para el análisis de varianza de bloques completamente aleatorizados (DBCA). Por otro lado, se utilizó el programa GraphPad Prism v.9.0 para el análisis de la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn.

RESULTADOS

Guías para silenciamiento

En este estudio, se diseñaron tres guías de RNA dirigidas a Smad 7 utilizando el software "Custom Alt-R® CRISPR-Cas9 guide RNA" de Integrated DNA Technologies (IDT). Para ello, se buscó la secuencia de los exones de Smad 7 en la base de datos Ensembl (ENSG00000101665) y se seleccionaron tres de los más largos, los cuales fueron exón 1 (1000 bp), exón 2 (327 bp) y exón 3 (1000 bp) (ver Anexo 1). Las secuencias se introdujeron en el software de IDT y se obtuvieron las sgRNA correspondientes, seleccionando las que presentaban el menor riesgo de emparejamiento con otras secuencias de otros genes y el mejor puntaje de posibilidad de emparejamiento con el gen de interés, como se mencionó en la sección de materiales y métodos. Se seleccionó una sgRNA para cada exón, a las cuales se les denominó sgRNA 1, 2 y 3, de acuerdo con el exón correspondiente. En la Tabla 3 se muestra la secuencia PAM para cada una de las sgRNA que debe reconocer y los puntajes de emparejamiento tanto para el gen de Smad7 en esa secuencia nucleotídica del exón, así como el puntaje de menor riesgo de emparejamiento con otras secuencias de otros genes. La sgRNA del exón 3 presentó un 90% de probabilidad de no pegarse a secuencias de otros genes, mientras que la sgRNA del exón 2 tuvo la mayor probabilidad de hibridarse con Smad7.

Tabla 3. sgRNA diseñadas para dirigirse a los exones de Smad 7. Datos proporcionados por el

Exon	posición	Cadena	Secuencia sgRNA	PAM	On- target Score	Off-Target Score
1	813	-	TCTGAAGGCGCTCACGCACT	CGG	50	86
2	179	-	GCGTGCTTAAAGATGGATCT	TGG	57	78
3	25	-	GGATCGGTCCACTGGTGCG	TGG	53	90

software de IDT.

Cabe destacar que el software ofreció más sugerencias de sgRNA (datos no mostrados) para cada una de las secuencias de los exones, sin embargo, se decidió sólo mandar a sintetizar las tres sgRNA que recomendaba el programa, como primers, junto con su secuencia complementaria de cada una de las sgRNA. Para ello (como se puede visualizar en la Tabla 4), a cada una de las sgRNA, se le añadió una guanina (letra en color verde, G) en la posición 5', esto se debe a que la RNA polimerasa III prefiere una guanina como base inicial al inicio de su transcripción.

sgRNA	Secuencias sintetizadas
1	5' CACC ^G TCTGAAGGCGCTCACGCACT 3' 5' AAACAGTGCGTGAGCGCCTTCAGAC ^G 3'
2	5' CACC ^G GGCGTGCTTAAAGATGGATCT 3' 5' AAACAGATCCATCTTTAAGCACGCC ^G 3'
3	5' CACC ^G GGATCGGTCACTGGTGCG 3' 5' AAACCGCACCCAGTGTGACCGATCC ^G 3'

Tabla 4. Secuencias de sgRNA. Las letras marcadas en rojo corresponden a las secuencias de sgRNA, las letras marcadas en morado corresponden al flanqueo de los sitios de corte de BbsI, y finalmente, la letra en color verde representa la adición de una guanina. Esto se debe a que la RNA polimerasa III prefiere una guanina como base inicial de su transcripto.

También se añadió la secuencia de emparejamiento del flanqueo que realizó el corte de la enzima BbsI (letras en morado, CACC; AAAC) en el vector PX458 rio arriba de la secuencia de la sgRNA. Esto se hizo con el fin de que pudieran emparejarse correctamente dentro del vector y ligarse de manera adecuada, como se muestra en la simulación realizada en el software SnapGene v.6.0. (Figura 16)

Una vez sintetizados los oligos, se procedió a insertarlos en el vector PX458 correspondiente a cada sgRNA. Posteriormente, se realizó la transformación de los vectores con las sgRNAs en *E. coli* MC4100 para su clonación. Las colonias resultantes que mostraron resistencia a la ampicilina fueron seleccionadas y cultivadas para su posterior análisis.

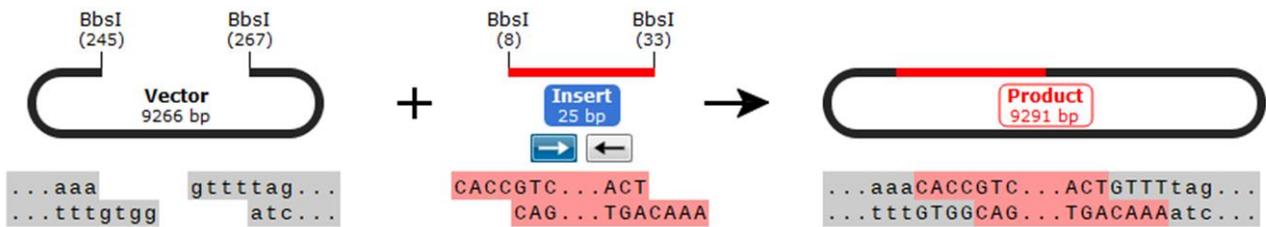


Figura 16. Simulación del emparejamiento de la sgRNA con el vector en SnapGen. El vector es cortado por BbsI, dejando un corte cohesivo, y la sgRNA, junto con su cadena complementaria que contiene el flanqueo de los sitios de corte, puede emparejarse correctamente dentro del vector.

Se confirmó la correcta inserción de las sgRNAs en el vector PX458 mediante un perfil de digestión utilizando las enzimas BbsI y XbaI. Los vectores vacíos fueron cortados por ambas enzimas, generando tres fragmentos de DNA plasmídico con tamaños de 9046 pb, 161 pb y 22 pb, mientras que los vectores que contenían las sgRNAs no fueron reconocidos por BbsI y solo fueron cortados por XbaI, produciendo un fragmento de 9291 pb. Esto se debe a que una vez que el vector PX458 es cortado con la enzima BbsI, pierde los sitios de reconocimiento de la enzima y, por esta razón, cuando se liga el vector PX458 con la sgRNA no hay sitio de corte para la enzima (**Ver Figura 17**). La visualización de los fragmentos generados y la simulación del gel se llevaron a cabo mediante el programa SnapGene v.6.0 (**Ver Anexos 2**). Los vectores digeridos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.7%, pero debido a su pequeño tamaño, el fragmento de 22 pares de bases no fue visible.

El perfil de digestión con BbsI y XbaI (**Figura 18**) muestra que el PX458 Ø presenta dos bandas de fragmentos de DNA, mientras que los vectores que contienen las sgRNA 1, 2 y 3 muestran un solo fragmento (carril 3 de la **Figura 18A** y carriles 3 y 4 de la **Figura 18B**), lo que es consistente con la simulación realizada en el programa SnapGene. Estos resultados son consistentes con la simulación realizada en el programa SnapGene, lo que sugiere que el proceso de ligación de las sgRNA con el vector PX458 se realizó correctamente.

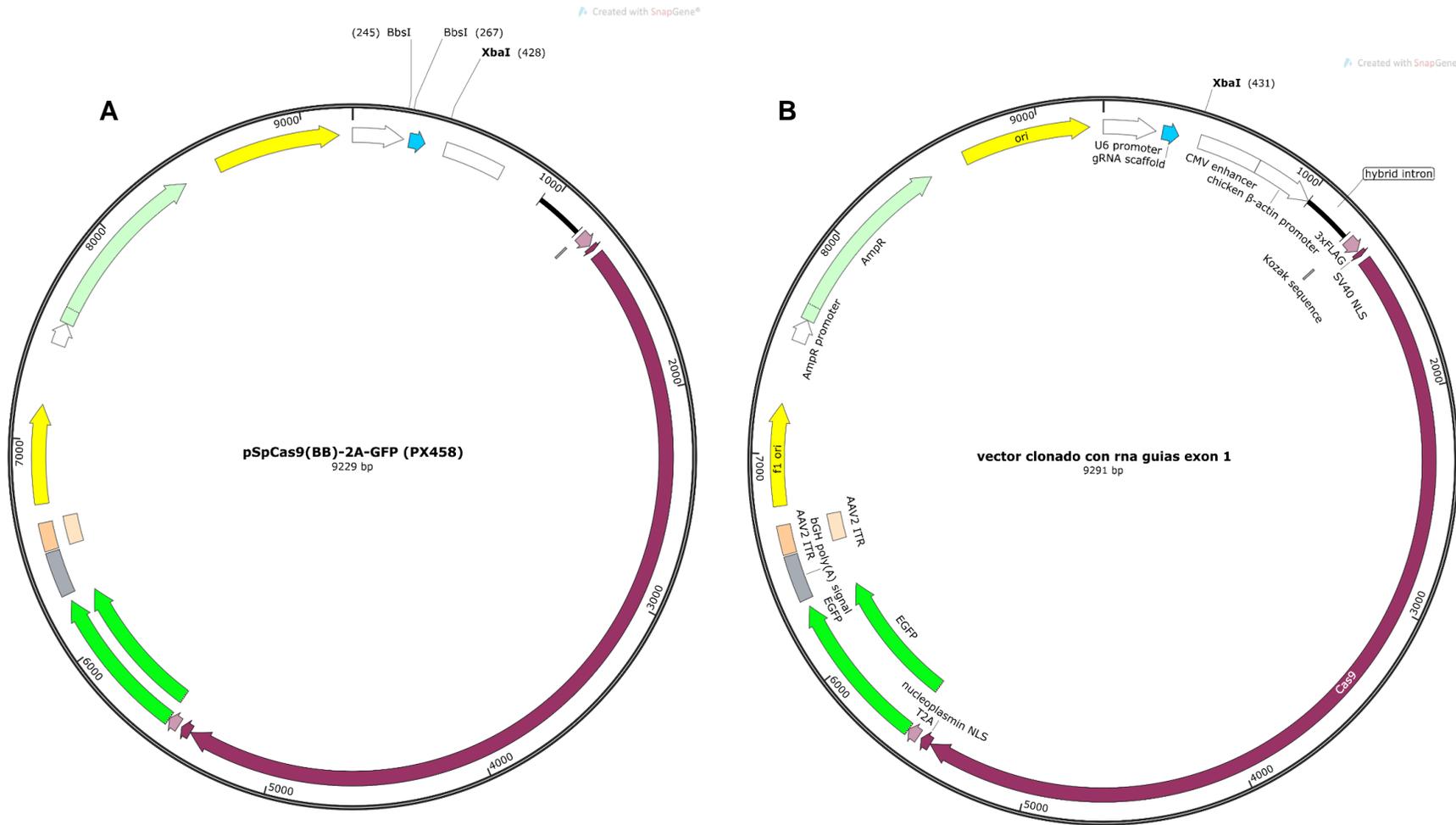


Figura 17. Vector PX458. (A) Vector PX458 vacío que contiene la expresión del sistema de CRISPR/Cas9, además de tener contar la expresión a resistencia ampicilina y la expresión de la EGFP como gen reportero. Se muestra el corte donde la enzima de restricción BbsI y XbaI. (B) vector PX458 donde una vez cortado e insertado la secuencia de la sgRNA se pierde la se secuencia de reconocimiento de BbsI. La simulación del corte de las enzimas se realizó en el programa SnapGene v.6.0.

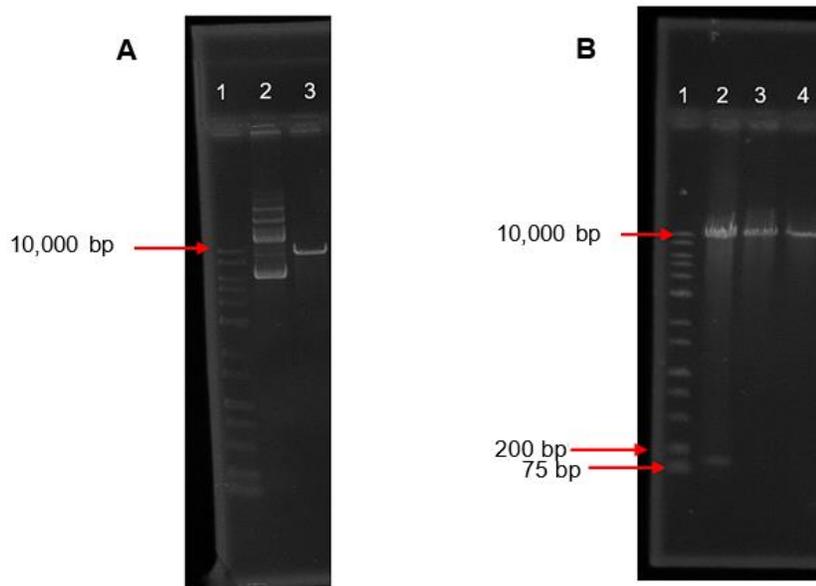


Figura 18. Perfil de digestión del vector PX458: **(A)** muestra el perfil de digestión de la sgRNA 1, en el que se observan tres carriles: **1)** peso molecular, **2)** PX458 Ø sin digerir y **3)** sgRNA 1. **(B)** Muestra el perfil de digestión de las sgRNA 2 y 3, en el que se observan cuatro carriles: **1)** peso molecular, **2)** PX458 Ø digerido, **3)** sgRNA 2 y **4)** PX458-sgRNA3.

Una vez realizado el perfil de digestión con las enzimas de restricción, se procedió a secuenciar los vectores para confirmar que cada uno contenían las sgRNA, así como su orientación de inserción era la correcta (IBT-UNAM). Se realizó el alineamiento de las secuencias teóricas y las obtenidas en los ensayos de secuenciación de la unidad de síntesis del IBT-UNAM utilizando el software SnapGene V.6 (ver [Figura 19](#)). El alineamiento mostró que los vectores clonados con cada una de las sgRNA, de manera independiente, contenían la secuencia correcta de cada una de las sgRNA y confirmó su orientación, integridad y exactitud, lo que permitió avanzar con la transfección de células para llevar a cabo el apagamiento de Smad7.

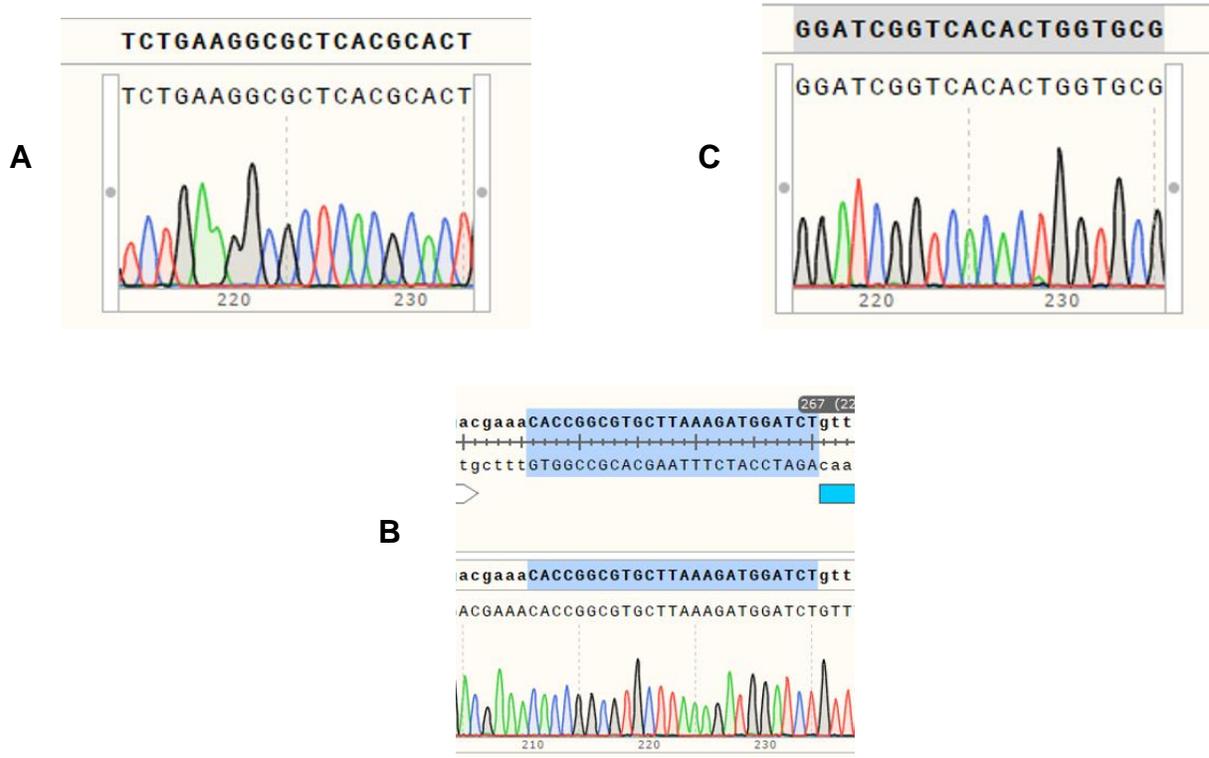


Figura 19. Secuenciación de sgRNAs. Se alineó la secuencia obtenida de la secuenciación proporcionada por el IBT-UNAM con las secuencias teóricas de las sgRNAs diseñadas. (A) sgRNA 1. (B) sgRNA 2. (C) sgRNA 3. Los resultados del alineamiento indican que las secuencias de las sgRNAs clonadas en los vectores PX458 son correctas y están en la orientación adecuada.

Ensayos de transfección de las sgRNA

Una vez confirmada la inserción de las sgRNA en el vector PX458, se crearon bancos celulares de *E. coli* que contenían cada una de ellas y se almacenaron a -70°C . De estos bancos, se descongelaron células que se cultivaron para posteriormente obtener su DNA plasmídico. Este DNA fue cuantificado para utilizarlo en los ensayos de transfección. Se iniciaron los ensayos de transfección con lipofectamina utilizando el vector PX458 que contenía cada una de las sgRNA. Se realizaron tres ensayos con diferentes cantidades de DNA plasmídico para cada una de la sgRNA (2.5 μg , 5.0 μg y 10 μg) en células A549 cultivadas en una placa de 6 pocillos. En este primer ensayo, se dejaron crecer 500,000 células un día antes de la transfección y, después de la transfección, se incubaron durante 48 horas.

Luego, las células fueron desprendidas y se resuspendieron en 1 mL de medio, tomando 10 μ L de cada uno de los tratamientos. Esto se hizo con la intención de cuantificar la eficiencia de la transfección mediante microscopía de fluorescencia, ya que hay que recordar que el vector PX458 codifica para la proteína GFP (ver **Figura 17**). La imagen obtenida (**Figura 20**) de la transfección del vector PX458-sgRNA1 nos permitió confirmar la presencia de células GFP positivas en el primer ensayo de transfección, lo que indicaba que el vector había sido introducido en las células y que la expresión del vector se llevaba a cabo.

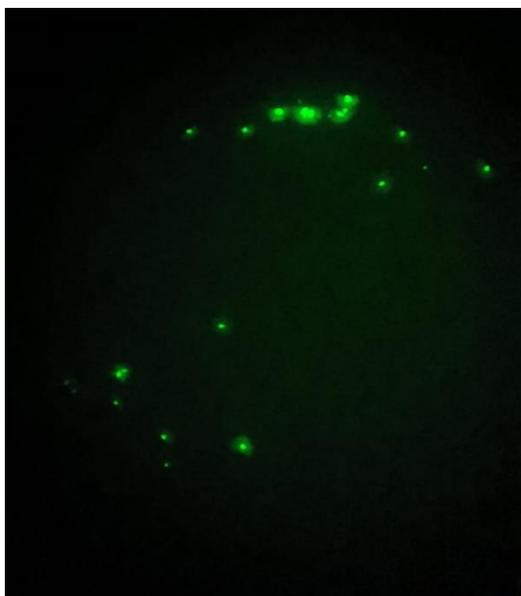


Figura 20. Foto representativa de la transfección. Imagen representativa de los 9 ensayos realizados, donde la transfección del vector PX458-sgRNA1 en células A549, utilizando 10 μ g de DNA plasmídico, ha sido exitosa.

Para cuantificar de manera precisa la transfección, se realizó ensayos similares pero evaluando mediante citometría de flujo. Para esto, se llevó a cabo un ensayo completo con las tres guías y tres diferentes cantidades de DNA plasmídico (2.5 μ g, 5.0 μ g y 10 μ g), lo que permitió una comparación de la eficiencia relativa de transfección de las tres guías. Para estos ensayos se utilizó pEGFP-N1 como control positivo y células A549 no transfectadas como control negativo. La eficiencia de la transfección se evaluó a través de la fluorescencia de la proteína EGFP en el citómetro de flujo.

El análisis a través del citómetro de flujo y la generación de gráficos para cada muestra se realizó mediante el programa Flowjo v.10.8.1. Como se puede observar en la **Figura 21**, el control negativo no presentó células EGFP⁺ mientras que el control positivo, que es el vector pEGFP-N1 que también expresa GFP, alcanzó un porcentaje cercano al 50% de células positivas para EGFP. Por su parte, cada sgRNA presentó porcentajes variables de eficiencia que oscilaron entre el 13,5% y el 34,6%. La PX458-sgRNA1 (con porcentajes entre el 13,8% y el 16,8%) y PX458-sgRNA3 (con porcentajes entre el 29,6% y el 34,6%) presentaron menor variabilidad en comparación con la PX458-sgRNA2 (13.9 y 28.7%), donde se observó que a medida que aumentaba la cantidad de DNA plasmídico, aumentó la eficiencia (Tabla 5).

Tabla 5. Eficiencia de la transfección

Vector	Cantidad de DNA	Eficiencia
Control Negativo	9.9 µg	0.67%
pEGFP-N1	9.9 µg	49.60%
PX458-sgRNA1	2.50 µg	13.80%
	5.00 µg	13.50%
	10.00 µg	16.80%
PX458-sgRNA2	2.50 µg	13.90%
	5.00 µg	20.40%
	10.00 µg	28.70%
PX458-sgRNA3	2.50 µg	34.60%
	5.00 µg	33.10%
	10.00 µg	29.60%

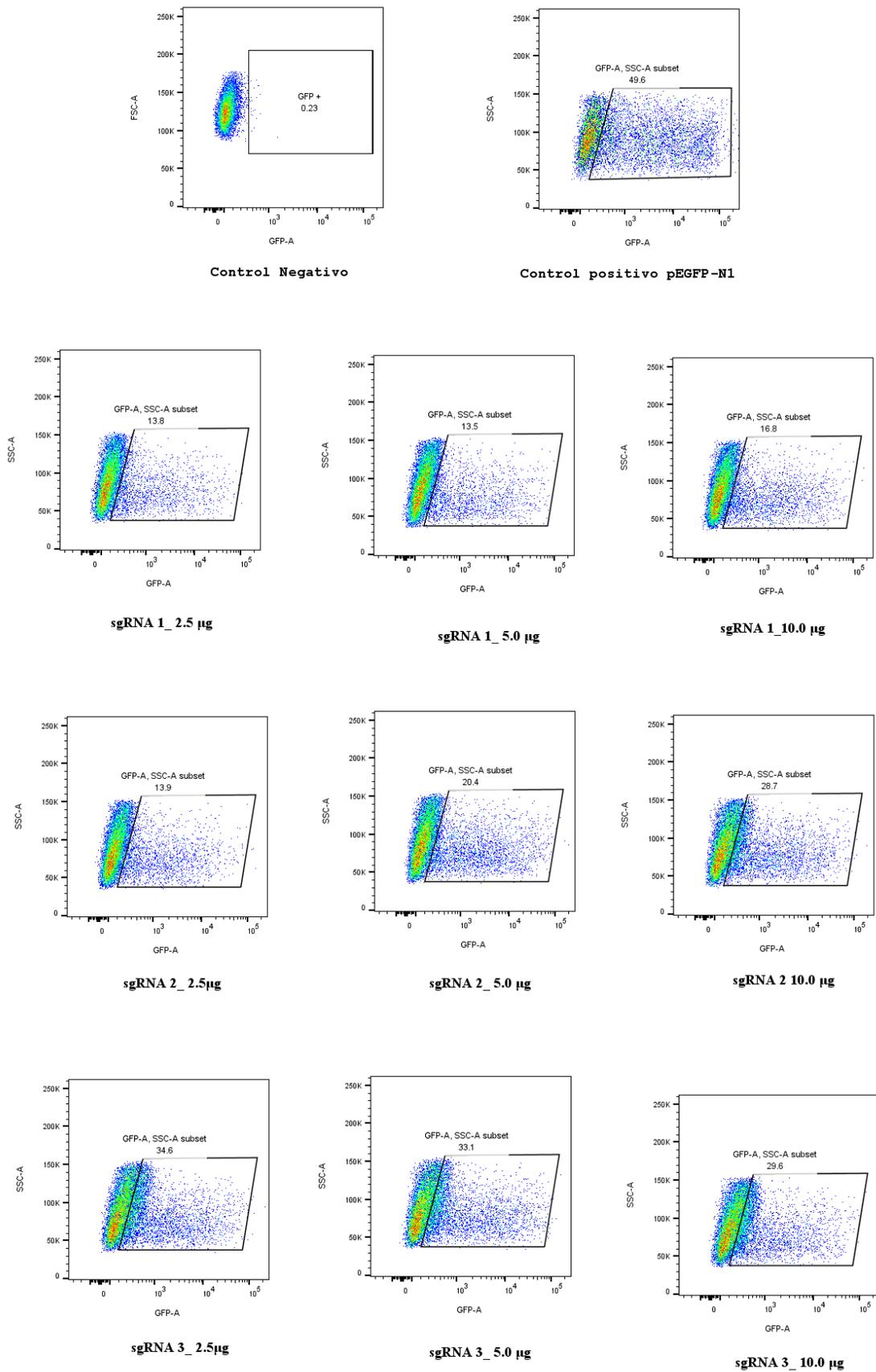


Figura 21. Análisis de transfección por citometría. Se realizó el análisis de cada una de las guías con las diferentes cantidades de DNA en el programa Flowjo v. 10.8.1.

Se ha presentado evidencia de que la cantidad de DNA de vectores CRISPR-Cas con sgRNA influye en el éxito de la edición genética específica y en la minimización de posibles cambios no deseados en otros genes (off-targets) ⁷⁵. Dado que no se contaba con un ensayo de nucleasa Surveyor ni la capacidad de secuenciar todo el genoma celular para identificar todas las modificaciones posibles, se optó por determinar si las propias sgRNAs o la cantidad de DNA influyen en la variabilidad de la eficiencia de transfección. Esto se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de diseño experimental de bloques al azar (DBCA) utilizando los datos obtenidos de la eficiencia de transfección de las tres guías con las tres cantidades diferentes de DNA, tal como se muestra en la Tabla 5. Dado que se controló la cantidad de DNA en tres niveles diferentes, se utilizaron bloques para evaluar con mayor precisión el efecto de las diferentes sgRNAs en la eficiencia de la transfección. El análisis DBCA se llevó a cabo utilizando el software Minitab v.21.3.

En la Tabla 6 se observa que las diferentes sgRNAs tienen un impacto significativo en la eficiencia de la transfección, como se confirma por el valor de p inferior a 0.05 (0.03). Por otro lado, las diferentes cantidades de DNA no tienen un impacto significativo en la eficiencia de la transfección, ya que el valor de p fue mayor a 0.05 (0.062). Según el análisis generado, el uso de las sgRNAs contribuyó en un 78.87% a la variabilidad del proceso de transfección. Esto podría significar que cada sgRNA presenta una variabilidad significativa en la eficiencia de la transfección y podría estar modificando off-targets cruciales en la célula, lo que a su vez afectaría la supervivencia celular. Esto es podría estar respaldado por la observación de un alto número de células muertas después de 48 horas post-transfección. Cabe señalar que otros factores, como la cantidad de vectores PX458 que se logra transfectar en cada caso o la posibilidad de superenrollamiento del plásmido, podrían estar involucrados en esta variabilidad. Sin embargo, este análisis es sólo una sugerencia de las posibles causas y no concluye sobre los factores precisos involucrados en el proceso de transfección.

Tabla 6. Análisis de varianza por DBCA.

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Guia	2	484.88	78.87%	484.88	242.44	9.51	0.030
Cantidad	2	27.95	4.55%	27.95	13.97	0.55	0.616
Error	4	101.94	16.58%	101.94	25.48		
Total	8	614.77	100.00%				

Para determinar cuál sgRNA estaba generando la variabilidad en la eficiencia de transfección, se realizó un análisis *post hoc* utilizando el método de Tukey después del análisis de varianza de DBCA. Los resultados indicaron que la PX458-sgRNA3 mostró una diferencia significativa con la sgRNA 1 (Tabla 7), mientras que la sgRNA 2 no presentó diferencias significativas con respecto a la sgRNA 1 y 3.

Tabla 7. Comparaciones por parejas de Tukey. El software Minitab agrupa los tratamientos o grupos que son similares y los identifica con la misma letra. En este caso, la PX458-sgRNA3 no presentó diferencias significativas con la sgRNA 2, por lo que fueron agrupadas con la letra "A". Por otro lado, la sgRNA 1 y 2 no presentaron diferencias significativas, por lo que fueron agrupadas con la letra "B". Finalmente, la sgRNA 1 y 3 presentaron diferencias significativas, por lo que no tienen una letra de agrupación y se considera que hay una diferencia significativa entre ellas.

sgRNA	N	Media	Agrupación
sgRNA 3	3	32.4333	A
sgRNA 2	3	21.0000	A B
sgRNA 1	3	14.7000	B

Después de analizar estos resultados, se optó por utilizar el vector PX458-sgRNA3 para llevar a cabo un ensayo de enriquecimiento (sorting) de células transfectadas. El objetivo del procedimiento de sorting fue enriquecer las células que expresaran GFP, lo cual favorecería la presencia del vector PX458 con la sgRNA3 y, por lo tanto, la inhibición de la expresión de Smad 7. Con este fin, se realizaron ajustes en las condiciones de transfección para ambos vectores, el PX458 Ø y el vector PX458-sgRNA3. Uno de los cambios más significativos fue la reducción del tiempo de transfección, que pasó de 48 horas a 36 horas,

manteniendo el cultivo sin antibióticos y con un 20% de SFB bovino. Esto permitió obtener un mayor porcentaje de células viables, ya que en ensayos previos se observaron muchas células muertas o con signos de estrés. La **Figura 22** muestra los resultados del ensayo de sorting. En el panel izquierdo se observan las células no transfectadas, que no presentan células positivas para GFP. En el panel intermedio, correspondiente al PX458 Ø, se observó una eficiencia de transfección cercana al 20%. Por otro lado, en el panel derecho se muestra la transfección del vector PX458-sgRNA3, la cual alcanzó un porcentaje de células positivas para GFP del 34.5%.

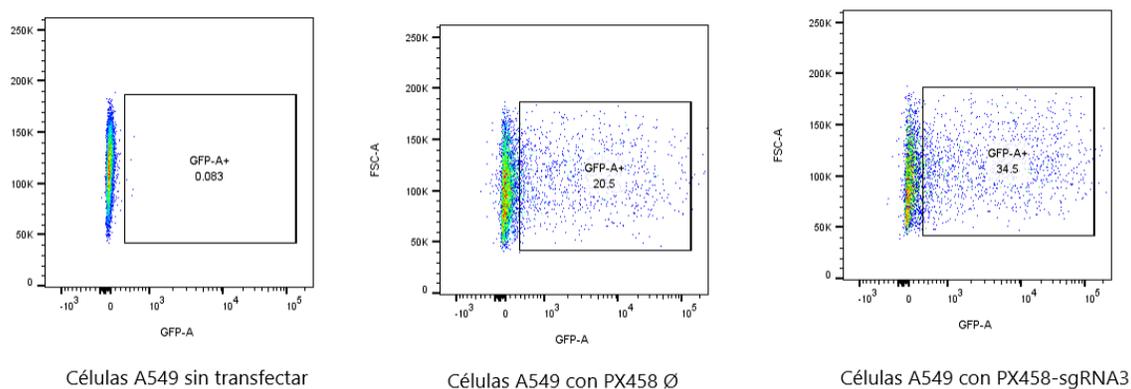


Figura 22. Sorting de células transfectadas. análisis de eficiencia de transfección en células A549 con el vector PX458 y el vector PX458 con la sgRNA. En las células no transfectadas, no se observaron células positivas para GFP, mientras que las células transfectadas con el vector PX458 Ø y el PX458-sgRNA3 presentaron una eficiencia del 20% y 34.5%, respectivamente.

Evaluación del silenciamiento de Smad 7

Después de realizar el sorting de las células transfectadas, se mantuvieron en cultivo. Sin embargo, debido a una contaminación en los cultivos, se perdieron las células seleccionadas. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, una parte de las células que habían sido transfectadas con la PX458-sgRNA3 se usó para el ensayo de sorting, mientras que la porción restante se mantuvo y se expandió para generar bancos celulares. De acuerdo con los resultados del citómetro, aproximadamente el 30% de estas células adquirió el

vector. Debido a la pérdida de las células A549 transfectadas enriquecidas, se optó por evaluar la cuantificación de la abundancia relativa de Smad 7 en estas células de los bancos celulares.

Se cultivaron células A549 no transfectadas (A549 N), células A549 transfectadas con el PX458 Ø (A549 Ø) y células A549 transfectadas con el vector PX458-sgRNA3 a partir de los bancos celulares. Posteriormente, se procedió a lisar las células y cuantificar la abundancia relativa de la proteína Smad7 mediante la técnica de Western blot, utilizando la β -actina como control interno. Se llevaron a cabo tres ensayos de manera independiente, es decir, se descongelaron dos viales de las células que no fueron sometidas al sorting y se utilizaron para la cuantificación de la abundancia relativa de Smad 7.

En la **Figura 23** se muestran imágenes de tres ensayos independientes. En el ensayo 1 (**Figura 23A**), se observa una disminución significativa en la intensidad de la banda de Smad7 en las células transfectadas con la PX458-sgRNA3 en comparación con las células A549 N y A549 Ø. A pesar de que la banda de β -actina es ligeramente más intensa en las células A549 N, lo que podría sugerir una mayor cantidad de la proteína Smad7. Sin embargo, el análisis densitométrico confirmó una disminución significativa en los niveles de Smad7 (**Figura 24A**). En un segundo ensayo independiente (**Figura 23B**) se realizó con células que fueron diluidas y cultivadas después de tomar células del primer ensayo. En este caso, se observó que la disminución de Smad 7 fue menos pronunciada en comparación con el primer ensayo, donde la intensidad de la banda de Smad 7 fue más notable en las células transfectadas con el vector PX458-sgRNA3, y el análisis densitométrico mostró que los niveles de expresión de Smad7 disminuyeron sólo en un 50% (**Figura 24B**).

El tercer ensayo (**Figura 23C**) se llevó a cabo con células tomadas de un vial nuevo que se dejaron crecer antes de su análisis. En esta instancia, se puede observar que la presencia relativa de la proteína Smad 7 volvió a estar presente en las células transfectadas con el vector PX458-sgRNA3, mientras que la intensidad de la banda de Smad 7 se vió reducida en comparación con las células A549 N y A549 Ø.

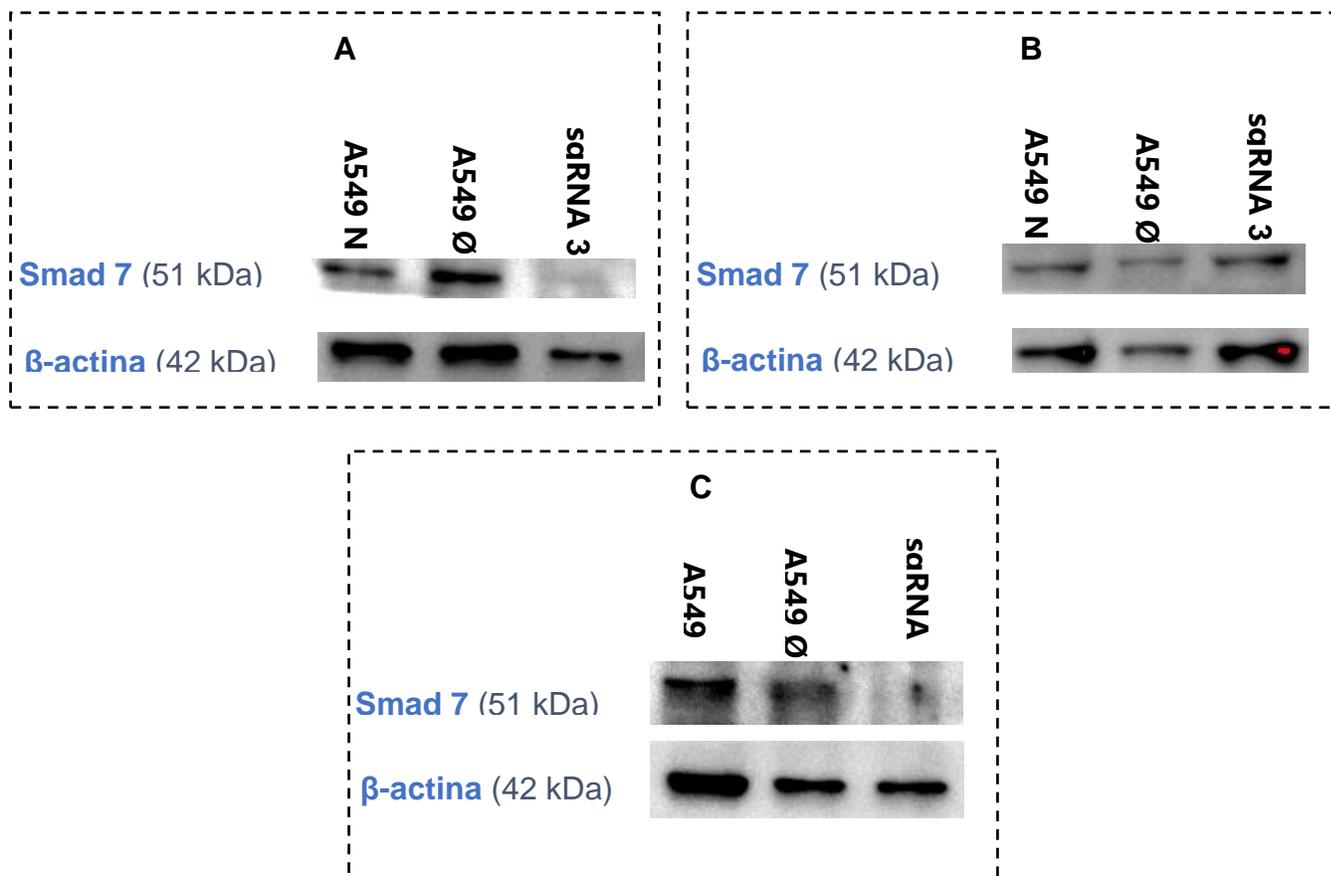


Figura 23. Análisis de la abundancia relativa de Smad 7 mediante Western blot. Para evaluar si las células A549 transfectadas con la PX458-sgRNA3 había un apagamiento para Smad 7, se llevaron a cabo tres experimentos independientes (A), (B) y (C), midiendo la abundancia relativa de Smad 7 presente en las diferentes células mediante Western blot. Posteriormente, se realizaron los análisis densitométricos correspondientes.

El análisis densitométrico confirmó nuevamente que de los niveles de Smad7 fueron significativamente menores que en las células A549 N y A549 Ø (**Figura 24C**). La visualización de las bandas y el análisis densitométrico se realizaron utilizando el software Image Lab v6.1, utilizando la β -actina como proteína de normalización para obtener los valores ajustados.

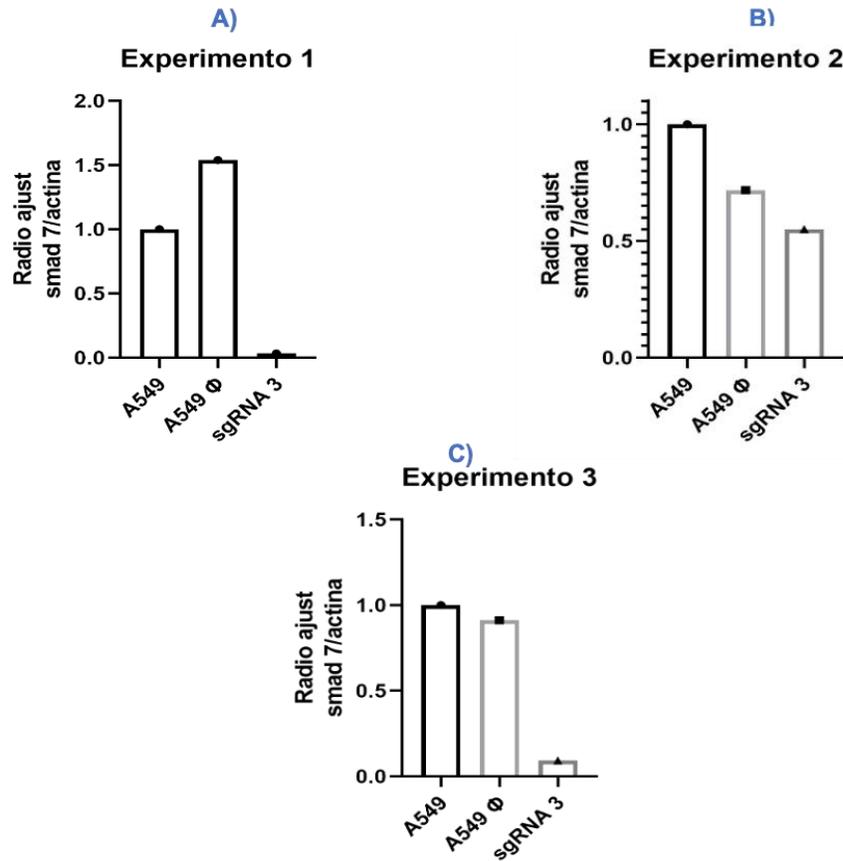


Figura 24. Análisis densitométrico de los tres ensayos. Se realizó un análisis densitométrico individualizado para cada ensayo (**A, B, y C**), comparando las células A549 N, A549 Ø y las células transfectadas con el vector PX458-sgRNA3.

Finalmente, se realizó un análisis estadístico para determinar si la disminución de la banda de Smad7 en las células transfectadas con la PX458-sgRNA3 fue significativa en los tres ensayos. Para esto, se utilizó el software GraphPad Prism y se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis post hoc de Dunn, utilizando como control las células A549. En base a este análisis y como se muestra en la **Figura 25**, la disminución de la intensidad de la banda de Smad7 en las células transfectadas con la PX458-sgRNA3 fue significativamente menor a la presencia de la proteína en las células A549 no transfectadas, todo lo cual parece indicar la reducción de los niveles de Smad7. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de Smad7 en las células A549 transfectadas con el PX458 Ø en comparación con las células A549 no transfectadas. En su

conjunto, estos resultados parecen sugerir que se logró reducir de manera significativa la expresión de Smad7 en células A549 mediante la tecnología CRISPR-Cas9.

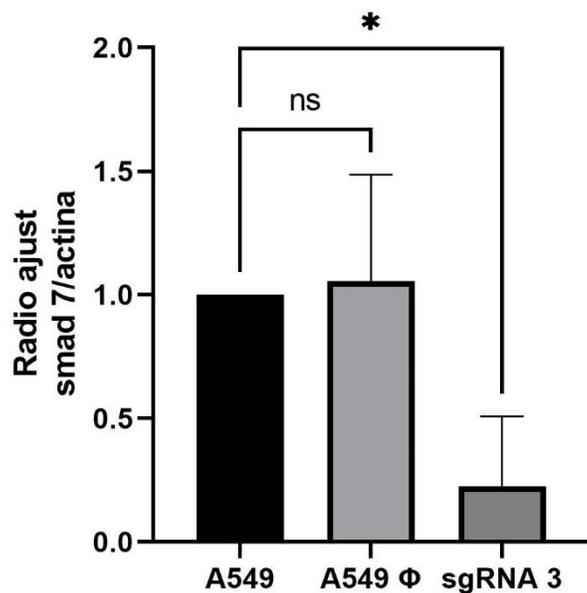


Figura 25. Análisis estadístico del efecto de la PX458-sgRNA3 sobre el silenciamiento de Smad 7. El análisis estadístico se basa en el promedio de los análisis densitométricos de los diferentes tratamientos de células obtenidos en los tres experimentos.

DISCUSIÓN

Eficiencia de la transfección de las sgRNA

A pesar de que el sistema de CRISPR-Cas ha abierto una puerta a la edición genética, sigue siendo una técnica con limitaciones. Una de las preocupaciones al editar el genoma con CRISPR-Cas9 es la posibilidad de cambios no deseados, ya que la técnica no es 100% eficaz. Entre los aspectos limitantes de la técnica, la sgRNA utilizada puede reconocer otras secuencias dentro del genoma, incluso si hay "mismatches", lo que significa que no habría una complementariedad perfecta entre la secuencia de la sgRNA y la que se quiere detectar. Estos reconocimientos erróneos pueden tener consecuencias letales en la célula, lo que nos lleva a considerar cuidadosamente las posibles implicaciones antes de utilizar el sistema CRISPR-Cas en la edición de genes. Es por eso que se han diseñado softwares para detectar los sitios más probables fuera del objetivo diana. Es importante tener en cuenta que puede haber modificaciones que no están en la lista de candidatos predichos^{75,98}.

Para nuestro caso particular, se diseñaron las sgRNAs mediante un software que evaluó tanto la probabilidad de hibridarse con la secuencia de Smad 7 como la probabilidad de modificar otros genes. De acuerdo a lo descrito en la Tabla 3, se muestra que la PX458-sgRNA3, en comparación de los otros sgRNA, presentó el menor riesgo (10%) de hibridar con genes no deseados. En contraste, las sgRNA 1 y 2 tuvieron una probabilidad del 14% y 22% respectivamente, de mostrar complementariedad con secuencias no deseadas. Dado que la sgRNA3 tuvo el menor porcentaje de posibilidad de unión a otros sitios y la mayor eficiencia en el proceso de transfección, alrededor del 30%, decidimos seleccionar la sgRNA 3 como la opción más adecuada para apagar la expresión de Smad 7. Esto no necesariamente significa que los otros sgRNA no sean funcionales para ocasionar el silenciamiento de la expresión de Smad 7, sino que, por circunstancias operacionales, se propuso realizar la verificación de su funcionalidad con sólo una de las secuencias guías.

Por otro lado, la diferencia en la eficiencia de la transfección pudo haberse visto afectada por la presencia de modificaciones no deseadas, lo que podría haber afectado la supervivencia de las células y resultar en la generación de células muertas durante el proceso de los ensayos de transfección (Tabla 5). Las células muertas no se incluyeron en el análisis por citometría de flujo, por que sólo se recuperaron las células que se mantuvieron adheridas a la placa tras el tiempo de transfección. De esa manera, la PX458-sgRNA3, al presentar un menor riesgo de modificaciones no deseadas, pudo haber mostrado la mayor eficiencia en la transfección. Es interesante observar que las sgRNA 1 y 3 presentaron una eficiencia de transfección similar incluso a diferentes cantidades de DNA. Por el contrario, la eficiencia de la sgRNA 2 mostró mayor variación, aunque aumentó con el incremento de la cantidad de DNA plasmídico. Esto podría deberse al hecho de que la presencia de más DNA plasmídico aumente la cantidad de sgRNA y, por lo tanto, se adhiera más eficientemente al objetivo deseado. Si hay más cantidad de DNA plasmídico, puede haber una mayor expresión de la proteína GFP y, por ende, un aumento en la transcripción de sgRNA. Se ha observado que el aumento en la cantidad de DNA plasmídico en el vector de los sistemas de CRISPR-Cas9 resulta en una mayor probabilidad de unión al gen deseado. Esto pudo haber sucedido con la sgRNA 2, donde el aumento en la concentración del DNA plasmídico permitió una mayor expresión y unión de la sgRNA 2 al objetivo deseado, que es Smad 7, evitando así mutaciones no deseadas en los off-targets. A pesar de estas diferencias, es importante considerar que las tres sgRNA presentan una probabilidad significativa de modificar el genoma, siendo la sgRNA 2 la que presenta la mayor probabilidad, al haber obtenido un puntaje más alto para la unión a Smad7 con un 57% en comparación con las otras sgRNA

Con base en lo anterior, se realizó un análisis de varianza por DBCA para determinar si las sgRNAs o las diferentes cantidades de DNA plasmídico eran responsables de las diferencias en la eficiencia del proceso de transfección. Como se puede observar en la Tabla 6, de acuerdo con el análisis obtenido, la eficiencia de la transfección parece depender significativamente de las sgRNAs, presentando una contribución del 78.87% y un valor de p significativamente inferior a 0.05.

Además, el análisis mostró que el efecto fue independiente de la cantidad de DNA utilizada, con solo un 4.6% de contribución. El error del 16.58% que se presenta en el análisis de DBCA puede deberse a la variabilidad inherente de las sgRNAs..

El análisis post hoc de la eficiencia de transfección (Tabla 7) reveló que la PX458-sgRNA3 mostró diferencias significativas en comparación con la sgRNA 1, mientras que con la sgRNA 2 no hubo diferencias significativas. Sin embargo, dado que la sgRNA 2 presenta una mayor probabilidad de generar modificaciones no deseadas, se decidió seleccionar la PX458-sgRNA3 para realizar los ensayos de transfección adicionales y evaluar si hubo un silenciamiento de la proteína Smad 7.

Evaluación del silenciamiento de Smad7

Como se mencionó previamente, durante el proceso de transfección para el enriquecimiento de células positivas para EGFP, surgieron problemas técnicos de contaminación en los cultivos, lo que resultó en la pérdida de dichas células. No obstante, se realizaron ensayos con la parte restante que no había sido enriquecida y que había adquirido el vector en un 30%, con el propósito de evaluar el bloqueo de la expresión de Smad 7.

En la **Figura 23** se presentan los resultados de los tres ensayos de Western blot, donde se comparó la expresión de Smad7 en los tres tratamientos celulares independientes. En las células A549 N y A549 Ø, se observó una expresión basal de Smad7, mientras que en las células transfectadas con PX458-sgRNA3 se observó una presencia menor en los niveles de Smad7. Esta disminución fue muy evidente en los experimentos 1 y 3 (**Figura 23A y 23C**) y menos pronunciada en el experimento 2 (**Figura 23B**). Al comparar los niveles de intensidad de la banda de β -actina en el primer ensayo (**Figura 23A**), se observó que también fueron menores en las células transfectadas con PX458-sgRNA3. Sin embargo, un análisis cuantitativo (densitometría) confirmó que los niveles de expresión de Smad7 disminuyeron en las células transfectadas con la PX458-sgRNA3 en comparación con las células A549 Ø y A549 N, con una reducción de más del 80% (**Figura 24A**

y 24C). Es importante destacar que esta disminución se observó a pesar de tener un grupo de células con una eficiencia de transfección del 30%, lo que representa una limitación en el estudio.

En el segundo experimento, se observó una disminución en los niveles de Smad 7 del 50% (Figura 23B), aunque esta reducción no fue tan evidente como en los otros dos experimentos. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que, con un mayor número de divisiones celulares haya hecho posible que el efecto del bloqueo de Smad 7 se esté perdiendo. Esto se debe a que no se puede controlar con precisión qué células retienen el vector y cuáles no, a pesar de intentar homogeneizar la población celular antes de realizar la dilución. Esta limitación en la conservación de las células puede afectar la evaluación del efecto del apagamiento de Smad 7.

Sin embargo, al realizar un análisis densitométrico del promedio de los tres ensayos (Figura 23B), se confirmó que las células A549 transfectadas con el vector PX458-sgRNA3 presentaron una disminución significativa de Smad 7, con una reducción de más del 80%. Estos resultados sugieren que la modificación de Smad7 fue exitosa mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9, a pesar de las limitaciones en la conservación de las células y la posible pérdida del vector en la dilución del segundo ensayo.

Entender la relación entre patógeno viral y la célula huésped es crucial para combatir enfermedades. Uno de los elementos que sigue siendo controvertido es el papel del TGF- β durante la infección por el virus de la influenza, ya que puede actuar como un factor pro-viral o antiviral dependiendo de las condiciones⁹⁹⁻¹⁰³. Por lo tanto, es necesario seguir investigando el papel exacto que desempeña el TGF- β en la infección por el virus de la influenza. Es por lo tanto, de gran relevancia el poder contar con un modelo celular modificado donde la vía de señalización del TGF- β se altere de manera específica. Esto nos permitirá evaluar el impacto de esta cascada de señalización sobre la infección por el virus Influenza. A excepción de una publicación previa donde se inhibió la expresión de Smad7 por RNA de interferencia, no existe algún otro antecedente sobre el silenciamiento de la proteína inhibidora de la vía del TGF- β .

Estudios previos han evidenciado que Smad 6 y 7 parecen jugar un papel activo durante la infección por los virus de Hepatitis C y B ^{104–108} y potencialmente por el papilomavirus humano ¹⁰⁹. Por lo que resulta de gran interés saber cómo virus tan diferentes pueden alterar la expresión de Smad7 y generar respuesta como transformación celular, desdiferenciación, apoptosis y respuesta antiviral.

Por otro lado, se han encontrado evidencias que indican que las proteínas Smads se ven alteradas durante las infecciones de diferentes virus, con distintas funciones en dicha interacción. En este sentido, parecería que Smad 6 también participa en la interacción del TGF- β con algunos virus¹¹⁰. En ese orden de ideas, y considerando que algunos estudios sugieren que el papel de Smad 6 y 7 pudieran tener funciones redundantes, sería interesante, por lo tanto, considerar el silenciamiento conjunto tanto de Smad 7 como de Smad 6 en el proceso de infección del virus de la influenza. Esto se vuelve realizable, toda vez que se cuenta con la experiencia y los materiales para poder realizar el silenciamiento selectivo de Smad 6.

Consideramos que estos resultados brindarán la oportunidad de investigar si esta proteína tiene alguna implicación en la respuesta celular durante la infección por el virus de la influenza. Además, permitirá determinar su efecto sobre la replicación viral y elucidar su papel en la inducción de la muerte celular por apoptosis durante la infección viral.

Limitaciones del estudio

Debido a que este trabajo se inició durante la pandemia de SARS-CoV-2, se encontraron una serie de restricciones que afectaron la realización de algunos experimentos. A pesar de que se pudieron modificar los tiempos para realizar los experimentos, no se lograron cumplir con los objetivos iniciales de evaluar el efecto del silenciamiento de Smad 7 sobre la infección del virus de influenza y la inducción de apoptosis en las células infectadas.

Además, se presentaron problemas técnicos de contaminación en los cultivos que llevaron a la pérdida de células enriquecidas positivas para EGFP. Debido a esto, se trabajó con un "pool" de células en el que la eficiencia de transfección fue del 30%, lo que generó limitaciones en la evaluación del efecto de la pérdida de Smad 7 en la replicación del virus. Aunque se logró demostrar el silenciamiento de la proteína Smad 7, se observó que el silenciamiento se perdió en los pases de dilución posteriores, lo que dificultó aún más la evaluación del efecto de la pérdida de Smad 7 en la replicación del virus.

Otra limitación que se debe considerar es la falta de evaluación de los off-targets mediante algún ensayo experimental. Es crucial validar la precisión del silenciamiento a través de estos off-targets, utilizando ensayos como el ensayo de nucleasa Surveyor o la secuenciación de todo el genoma de las células A549. Esto permitiría confirmar que el silenciamiento de Smad 7 no afectó negativamente a otros genes o procesos celulares importantes. La inclusión de estos ensayos podría mejorar la confiabilidad y la calidad de los resultados obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

1. Se generaron 3 vectores para silenciamiento del gen Smad conteniendo guías de selección completas y con orientación correcta.
2. Mediante citometría de flujo, se mostró que la guía PX458-sgRNA3 mostró más alto nivel de transfección entre las condiciones evaluadas, en comparación con las otras guías.
3. Las células transfectadas con PX458-sgRNA3 mostraron una disminución significativa (80%) de los niveles de la proteína Smad7 al evaluar por western blot, en comparación con las células transfectadas con el PX458 Ø y células control.

Todo eso sugiere que la expresión selectiva de Smad7 fue exitosamente apagada empleando la técnica de CRISPR-Cas9. Sin embargo, el efecto que pueda tener esta modificación sobre la respuesta a la infección viral deberá ser evaluado en ensayos *in vitro* controlados.

PERSPECTIVAS

1. Llevar a cabo el enriquecimiento de células positivas para EGFP.
2. Confirmar el silenciamiento de Smad7 mediante la inhibición de la expresión de genes blanco.
3. Evaluar cual es el efecto del silenciamiento de Smad 7 sobre la replicación del virus de influenza e inducción de la apoptosis en células A549.
4. De confirmar si el silenciamiento de Smad 7 tiene un efecto en la inducción de apoptosis en células A549, evaluar si participa de manera directa o indirectamente.
5. Evaluar cómo el silenciamiento de Smad 7 afecta la respuesta inmune del huésped a la infección viral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
2. Krammer, F. *et al.* Influenza. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, (2018).
3. Gilarranz-Luengo, S. Virus de la gripe: Variación Genética y Patogénesis. (Universidad Complutense, 2017).
4. Ortín, J. Biología molecular del virus de la gripe. *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.* (2006).
5. Murillo Godínez, G. recordando a la gripe española. *Med. Interna Mex.* **27**, 463–467 (2011).
6. Eisfeld, A. J., Neumann, G. & Kawaoka, Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 28–41 (2015).
7. Solórzano-Santos, F. & Miranda-Navales, Ma. G. Influenza. *Bol. Méd. Hosp. Infant. México* **66**, 461–473 (2009).
8. Rao, S., Nyquist, A.-C. & Stillwell, P. C. 27- Influenza. in *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children (Ninth Edition)* (eds. Wilmott, R. W. et al.) 460-465.e2 (Content Repository Only!, 2019). doi:10.1016/B978-0-323-44887-1.00027-4.
9. Gutiérrez-Salinas, J. *et al.* Human influenza virus as example of emergent disease in Mexico. *Med. Interna Mex.* **32**, 213–224 (2016).
10. Mamelund, S.-E. Influenza, Historical. in *International Encyclopedia of Public Health* 597–609 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-012373960-5.00372-5.
11. Gutiérrez-Salinas, J. *et al.* Virus de la influenza humana como ejemplo de enfermedad emergente en México. *Med. Interna Mex.* **32**, 213–224 (2016).
12. Tognotti, E. Influenza pandemics: a historical retrospect. *J. Infect. Dev. Ctries.* **3**, 331–334 (2009).
13. da Costa, V. G., Saivish, M. V., Santos, D. E. R., de Lima Silva, R. F. & Moreli, M. L. Comparative epidemiology between the 2009 H1N1 influenza and COVID-19 pandemics. *J. Infect. Public Health* **13**, 1797–1804 (2020).

14. Iuliano, A. D. *et al.* Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet* **391**, 1285–1300 (2018).
15. Vieitez-Martinez, I. Análisis del estudio de brote de Influenza A H1N1 en México, de la vigilancia a la Inteligencia epidemiológica. Análisis del estudio de brote de Influenza A H1N1 en México, de la vigilancia a la Inteligencia epidemiológica. (Instituto Nacional de Salud Publica, 2014).
16. Secretaria de Salud. *Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Influenza 2021*. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2021> (2021).
17. Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales, P. & Narro-Robles, J. Comportamiento de las temporadas de influenza en México de 2010 a 2016, análisis y prospectiva. *Gac Med Mex* **153**, 205–213 (2017).
18. García-García, J. & Ramos, C. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública México* **48**, 244–267 (2006).
19. Schmolke, M. & García-Sastre, A. Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus: Immune evasion by influenza A viruses. *Cell. Microbiol.* **12**, 873–880 (2010).
20. van de Sandt, C. E., Kreijtz, J. H. C. M. & Rimmelzwaan, G. F. Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses* **4**, 1438–1476 (2012).
21. Melnick, J. L., Jawetz, E., Adelberg, E. A. & Riedel, S. CAPÍTULO 39: Ortomixovirus (virus de la influenza). in *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica* (McGraw-Hill, 2020).
22. Fukuyama, S. & Kawaoka, Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 481–486 (2011).
23. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, D49–D53 (2008).
24. Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F. & Zhuang, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 567–573 (2004).

25. Edinger, T. O., Pohl, M. O. & Stertz, S. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *J. Gen. Virol.* **95**, 263–277 (2014).
26. Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 803–833 (2010).
27. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533 (2011).
28. Sieczkarski, S. B. & Whittaker, G. R. Influenza Virus Can Enter and Infect Cells in the Absence of Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **76**, 10455–10464 (2002).
29. Gutiérrez, M. & López, S. MECANISMOS DE ENTRADA DE VIRUS: UNA MANERA DE CONOCER A LA CÉLULA. *Tip Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* **13**, 26–34 (2010).
30. Chen, C. & Zhuang, X. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11790–11795 (2008).
31. Carroll, S. M. & Paulson, J. C. Differential infection of receptor-modified host cells by receptor-specific influenza viruses. *Virus Res.* **3**, 165–179 (1985).
32. Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M. & Enquist, L. W. *Principles of virology*. (ASM Press, 2015).
33. Alvarado-Facundo, E. *et al.* Influenza Virus M2 Protein Ion Channel Activity Helps To Maintain Pandemic 2009 H1N1 Virus Hemagglutinin Fusion Competence during Transport to the Cell Surface. *J. Virol.* **89**, 1975–1985 (2015).
34. Manzoor, R., Igarashi, M. & Takada, A. Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2649 (2017).
35. Akole, A. & WRNAer, J. M. Model of influenza virus acidification. *PLOS ONE* **14**, e0214448 (2019).
36. Sakaguchi, T. [Structure and function of the influenza virus M2 ion channel protein]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* **55**, 2587–2592 (1997).

37. Kielian, M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 171–189 (2014).
38. Worch, R. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. *Acta Biochim. Pol.* **61**, 421–426 (2014).
39. Garcia, N. K., Guttman, M., Ebner, J. L. & Lee, K. K. Dynamic Changes during Acid-Induced Activation of Influenza Hemagglutinin. *Structure* **23**, 665–676 (2015).
40. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. H. & Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* **124**, 12–21 (2007).
41. Hutchinson, E. C. & Fodor, E. Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine* **30**, 7353–7358 (2012).
42. Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S. & Cusack, S. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res.* **234**, 103–117 (2017).
43. Shaw, M. L. & Stertz, S. Role of Host Genes in Influenza Virus Replication. in *Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection* (eds. Tripp, R. A. & Tompkins, S. M.) vol. 419 151–189 (Springer International Publishing, 2017).
44. Chutiwitoonchai, N. & Aida, Y. NXT1, a Novel Influenza A NP Binding Protein, Promotes the Nuclear Export of NP via a CRM1-Dependent Pathway. *Viruses* **8**, 209 (2016).
45. Neumann, G. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751–6758 (2000).
46. Brunotte, L. *et al.* The Nuclear Export Protein of H5N1 Influenza A Viruses Recruits Matrix 1 (M1) Protein to the Viral Ribonucleoprotein to Mediate Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* **289**, 20067–20077 (2014).
47. Simpson, C. & Yamauchi, Y. Microtubules in Influenza Virus Entry and Egress. *Viruses* **12**, 117 (2020).
48. Han, J. *et al.* Host factor Rab11a is critical for efficient assembly of influenza A virus genomic segments. *PLOS Pathog.* **17**, e1009517 (2021).

49. Maria, E., Florres-Munguía, Vazquez-Moreno, L., Ramos, G. & Montfort, C. Glicobiología del virus de la influenza A. **49**, 74–87 (Abril 29, 5).
50. Böttcher-Friebertshäuser, E., Klenk, H.-D. & Garten, W. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathog. Dis.* **69**, 87–100 (2013).
51. Chaipan, C. *et al.* Proteolytic Activation of the 1918 Influenza Virus Hemagglutinin. *J. Virol.* **83**, 3200–3211 (2009).
52. Spittau, B., Dokalis, N. & Prinz, M. The Role of TGF β Signaling in Microglia Maturation and Activation. *Trends Immunol.* **41**, 836–848 (2020).
53. Alberts, B. *Molecular biology of the cell.* (Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015).
54. Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M. & Baran, Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* **37**, 8471–8486 (2016).
55. Elinos-Báez, C. M., Maldonado, V. & Melendez-Zajgla, J. Caspasas: Moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Med Mex* **139**, (2003).
56. García, M. & Vecino, E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **78**, 351–364 (2003).
57. Van Opdenbosch, N. & Lamkanfi, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* **50**, 1352–1364 (2019).
58. Jutinico Shubach, A. P., Mantilla Galindo, A. & Sánchez Mora, R. M. Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia Trachomatis. *Nova* **13**, 83–92 (2015).
59. Barranco Lampón, G. I., Ramírez-García, M. A., Márquez-González, H. & Lopez-Aguilar, J. E. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Resid.* **9**, 84–94 (2014).
60. Luna-López, A., López-Díaz, N. E., Gonzalez-Puertos, V., Triana-Martinez, F. & Königsberg-Fainstein, M. El fantástico mundo de la proteína Bcl-2. *Rev. Educ. Bioquim.* **27**,.
61. Hille, F. & Charpentier, E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150496 (2016).

62. Xu, Y. & Li, Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 2401–2415 (2020).
63. Viedma, I. Present and future of CRISPR/Cas systems in Biotechnology. *Biotechnol.- Apl.* **35**, 2101–2107 (2018).
64. Mojica, F. J. M. & Montoliu, L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* **24**, 811–820 (2016).
65. Martinez Oliva, B. G. Crispr, una herramienta para editar genomas. *Gac. Medica Boliv.* **43**, 179–183 (2020).
66. Thurtle-Schmidt, D. M. & Lo, T.-W. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **46**, 195–205 (2018).
67. Nidhi, S. *et al.* Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3327 (2021).
68. Lammoglia-Cobo, M. *et al.* La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investig. En Discapac.* **5**, 116–128 (2016).
69. Kozovska, Z., Rajcaniova, S., Munteanu, P., Dzacovska, S. & Demkova, L. CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomed. Pharmacother.* **141**, 111917 (2021).
70. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**, 569–573 (2014).
71. Chavez-Jacobo, Vi. M. El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* **21**, (2018).
72. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
73. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).

74. Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**, 1911 (2018).
75. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
76. Li, T. *et al.* CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 36 (2023).
77. Zhao, Z. *et al.* Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. *Biol. Proced. Online* **23**, 14 (2021).
78. Chacón.Salinas, R. & Sánchez.Cruz, P. Mecanismos Virales de Bloqueo de la Apoptosis como Estrategia de Evasión de la Respuesta Inmunológica. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**, 83–93 (2000).
79. Iranpour, M. *et al.* Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* **18**, e1 (2016).
80. Mehrbod, P. *et al.* The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* **10**, 376–413 (2019).
81. Lai, Y. *et al.* Regulation of Apoptosis by Enteroviruses. *Front. Microbiol.* **11**, 1145 (2020).
82. Ampomah, P. B. & Lim, L. H. K. Influenza A virus-induced apoptosis and virus propagation. *Apoptosis* **25**, 1–11 (2020).
83. Yi, E., Oh, J., Kang, H.-R., Song, M. J. & Park, S.-H. BST2 inhibits infection of influenza A virus by promoting apoptosis of infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **509**, 414–420 (2019).
84. Wang, X. *et al.* Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes Infect.* **16**, 178–186 (2014).
85. Shim, J., Kim, J., Tenson, T., Min, J.-Y. & Kainov, D. Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. *Viruses* **9**, 223 (2017).

86. Fujikura, D. & Miyazaki, T. Programmed Cell Death in the Pathogenesis of Influenza. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2065 (2018).
87. Gyurkovska, V. & Ivanovska, N. Distinct roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in viral and bacterial infections: from pathogenesis to pathogen clearance. *Inflamm. Res.* **65**, 427–437 (2016).
88. Tanaka, N. *et al.* Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells* **3**, 29–37 (1998).
89. Apelbaum, A., Yarden, G., Warszawski, S., Harari, D. & Schreiber, G. Type I Interferons Induce Apoptosis by Balancing cFLIP and Caspase-8 Independent of Death Ligands. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 800–814 (2013).
90. Peteranderl, C. & Herold, S. The Impact of the Interferon/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Signaling Axis on Disease Progression in Respiratory Viral Infection and Beyond. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
91. Fujikura, D. *et al.* Type-I Interferon is Critical for FasL Expression on Lung Cells to Determine the Severity of Influenza. *PLoS ONE* **8**, e55321 (2013).
92. Li, W., Moltedo, B. & Moran, T. M. Type I Interferon Induction during Influenza Virus Infection Increases Susceptibility to Secondary Streptococcus pneumoniae Infection by Negative Regulation of T Cells. *J. Virol.* **86**, 12304–12312 (2012).
93. Killip, M. J., Fodor, E. & Randall, R. E. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Res.* **209**, 11–22 (2015).
94. Herold, S., Ludwig, S., Pleschka, S. & Wolff, T. Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 75–82 (2012).
95. Herold, S., Becker, C., Ridge, K. M. & Budinger, G. R. S. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur. Respir. J.* **45**, 1463–1478 (2015).
96. Bustos-Rivera, G., Fernandez-Fernandez, D., Esquivel-Guadarrama, F. & Montiel-Hernandez, J. L. TGF-beta signaling inhibits the apoptotic and inflammatory cell response induced by influenza H1N1 virus infection. *Datos sin publicar* (2018).

97. BustosRivera-Bahena, G., López-Guerrero, D. V., Márquez-Bandala, A. H., Esquivel-Guadarrama, F. R. & Montiel-Hernández, J.-L. TGF- β 1 signaling inhibit the in vitro apoptotic, infection and stimulatory cell response induced by influenza H1N1 virus infection on A549 cells. *Virus Res.* **297**, 198337 (2021).
98. Anthon, C., Corsi, G. I. & Gorodkin, J. CRISPRon/off: CRISPR/Cas9 on- and off-target gRNA design. *Bioinformatics* **38**, 5437–5439 (2022).
99. Schultz-Cherry, S. & Hinshaw, V. S. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J. Virol.* **70**, 8624–8629 (1996).
100. Denney, L., Branchett, W., Gregory, L. G., Oliver, R. A. & Lloyd, C. M. Epithelial-derived TGF- β 1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection. *Mucosal Immunol.* **11**, 523–535 (2018).
101. Furuya, Y. *et al.* Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF- β Produced during Allergic Asthma. *PLoS Pathog.* **11**, e1005180 (2015).
102. Carlson, C. M. *et al.* Transforming Growth Factor- β : Activation by Neuraminidase and Role in Highly Pathogenic H5N1 Influenza Pathogenesis. *PLoS Pathog.* **6**, e1001136 (2010).
103. Li, N. *et al.* Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF- β -mediated expression of host cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 238–243 (2015).
104. Hany, N. M., Hammouda, A. M. A., Nabih, E. S. & Mohamed, S. M. The potential regulatory role of miR16 to the interplay between interferon and transforming growth factor beta pathways through IRF3 and SMAD7 in hepatitis C virus infected patients. *J. Cell. Biochem.* **120**, 12694–12701 (2019).
105. Zhang, F., Sodroski, C., Cha, H., Li, Q. & Liang, T. J. Infection of Hepatocytes With HCV Increases Cell Surface Levels of Heparan Sulfate Proteoglycans, Uptake of Cholesterol and Lipoprotein, and Virus Entry by Up-regulating SMAD6 and SMAD7. *Gastroenterology* **152**, 257-270.e7 (2017).
106. Liu, N. *et al.* Hepatitis B Virus Regulates Apoptosis and Tumorigenesis through the MicroRNA-15a-Smad7-Transforming Growth Factor Beta Pathway. *J. Virol.* **89**, 2739–2749 (2015).

107. Smola. The adenoviral E1A oncoprotein activates the Smad7 promoter: Requirement of a functional E-box. *Int. J. Oncol.* **35**, (2009).
108. Dennis, E. A. *et al.* Cytomegalovirus promotes intestinal macrophage-mediated mucosal inflammation through induction of Smad7. *Mucosal Immunol.* **11**, 1694–1704 (2018).
109. Pillai. Mutational analysis of Smad7 in human cervical cancer. *Oncol. Rep.* **21**, (2009).
110. Lai, L. Y. S., Gracie, N. P., Gowripalan, A., Howell, L. M. & Newsome, T. P. SMAD proteins: Mediators of diverse outcomes during infection. *Eur. J. Cell Biol.* **101**, 151204 (2022).

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de los exones de Smad 7.

- Exón 1

ATTGCCTGCTTCTCCCCACCCCCAAATTAAGTTGCTTAGCAAGGGGGAAAGAGGCTTTTTTC
CTTCTTCCAACAGCCCAGCCGAACGCCTTTTCGTTTTTTGCCCCGCGGACCTTCCATGTAG
GAAGCCGAGGCTGGCGAGCCCGACATTCGGGAGCCACTGCGGGGGGGCCTCTTTTTGGGGA
GGCGCCGACGGGGGCAGGCTCGGCCGTCCCCAGGGAAGCGGCGGCCGGGTTCTCCGGGGC
GCGCCGGGGCCGGAGAGCCGCGCAGGGCGCGGGCCGCGCGGGGTGGGGCAGCCGGAGCGCA
GGCCCCGATCCCCGGCGGGCGCCCCGGGCCCCCGCGCGCGCCCCGGCCTCCGGGAGACT
GGCGCATGCCACGGAGCGCCCCCTCGGGCCGCGCCGCTCCTGCCCGGGCCCCCTGCTGCTGC
TGCTGTGCGCTGCGCCTGCTGCCCAACTCGGCGCCCGACTTCTTCATGGTGTGCGGAGGT
CATGTTTCGCTCCTTAGCAGGCAAACGACTTTTCTCCTCGCCTCCTCGCCCCGCATGTTTCAG
GACCAAACGATCTGCGCTCGTCCGGCGTCTCTGGAGGAGCCGTGCGCCCCGGCGGCGAGGAC
GAGGAGGAGGGCGCAGGGGGAGGTGGAGGAGGAGGCGAGCTGCGGGGAGAAGGGGCGACGG
ACAGCCGAGCGCATGGGGCCGGTGGCGGCGGCCCGGGCAGGGCTGGATGCTGCCTGGGCAA
GGCGGTGCGAGGTGCCAAAGGTCACCACCATCCCCACCCGCCAGCCGCGGGGCGCCGGCGCG
GCCGGGGGCGCCGAGGCGGATCTGAAGGCGCTCACGCACTCGGTGCTCAAGAACTGAAGG
AGCGGCAGCTGGAGCTGCTGCTCCAGGCCGTGGAGTCCCGCGGCGGGACGCGCACCGCGTG
CCTCCTGCTGCCCGGCCGCTGGACTGCAGGCTGGGCCCCGGGGGCGCCCGCCGGCGCGCAG
CCTGCGCAGCCGCCCTCGTCCTAC

- Exón 2

AGTCTCATTGAGCCTGACTCGAGTAATGATTAAGTGGCTGCCCGGAGCCCAGACGGGTGAC
AAGGTGCTGTGGTCTGTCTTACGATGGGCAGTGAAGCCTGAGCAGACCATTAATAATCAGC
ATCAAGGCCGCGAGTCAGCCTTTTGGAAATGTGTGGTTTGTCTTTCATGCTGTTTAGAGCGT
GCTTAAAGATGGATCTTGGTGTTTTTATTTGTGTATTTATTTCTTCTCTCCCCTTTTCAA
ATCCACAGCAGACTGTCCAGATGCTGTGCCTTCCTCCGCTGAAACAGGGGGAACGAATTAT
CTGGCCCCTGGGGGGCTTTCAG

- Exón 3

ATTCCCAACTTCTTCTGGAGCCTGGGGATCGGTACACTGGTGCCTGGTGGCATACTGGGA
GGAGAAGACGAGAGTGGGGAGGCTCTACTGTGTCCAGGAGCCCTCTCTGGATATCTTCTAT
GATCTACCTCAGGGGAATGGCTTTTGCCTCGGACAGCTCAATTCGGACAACAAGAGTCAGC
TGGTGCAGAAGGTGCGGAGCAAATCGGCTGCGGCATCCAGCTGACGCGGGAGGTGGATGG
TGTGTGGGTGTACAACCGCAGCAGTTACCCCATCTTCATCAAGTCCGCCACACTGGACAAC
CCGGACTCCAGGACGCTGTTGGTACACAAGGTGTTCCCCGGTTTCTCCATCAAGGCTTTTCG
ACTACGAGAAGGCGTACAGCCTGCAGCGGCCCAATGACCACGAGTTTATGCAGCAGCCGTG
GACGGGCTTTACCGTGCAGATCAGCTTTGTGAAGGGCTGGGGCCAGTGCTACACCCGCCAG
TTCATCAGCAGCTGCCCCTGCTGGCTAGAGGTCATCTTCAACAGCCGGTAGCCGCGTGCGG
AGGGGACAGAGCGTGAGCTGAGCAGGCCACACTTCAAACACTTTTGCTGCTAATATTTTCC
TCCTGAGTGCTTGCTTTTCATGCAAACCTTTTGGTCGTTTTTTTTTTTTGTTTGGTTGGT
TTTCTTCTTCTCGTCCTCGTTTTGTGTTCTGTTTTGTTTCGCTCTTTGAGAAATAGCTTATG
AAAAGAATTGTTGGGGGTTTTTTTTGGAAGAAGGGGCAGGTATGATCGGCAGGACACCCTGA
TAGGAAGAGGGGAAGCAGAAATCCAAGCACCACCAAACACAGTGTATGAAGGGGGGCGGTC
ATCATTTCACTTGTGAGGAGTGTGTGTGAGTGTGAGTGTGCGGCTGTGTGTGCACGCGTGT
GCAGGAGCGGCAGATGGGGAGACAACGTGCTCTTTGTTTTGTGTCTCTTATGGATGTCCCC
AGCAGAGAGGTTTGCAGTCCCA

Anexo 2. Vectores y simulación en Snap Gen

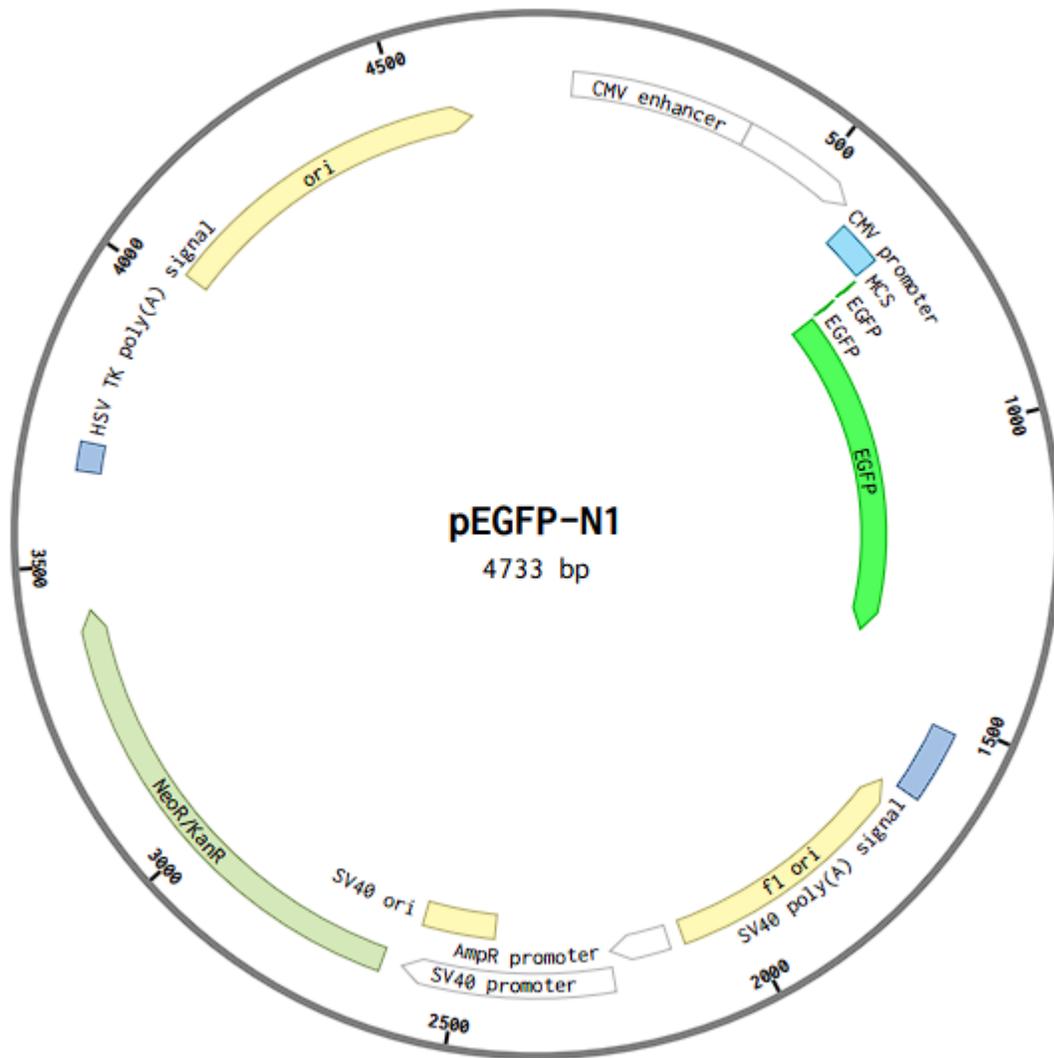


Figura 26. Vector pEGFP-N1. Este vector contiene la expresión de la proteína EGFP, el cual utilizamos como control positivo, en el proceso de transfección.

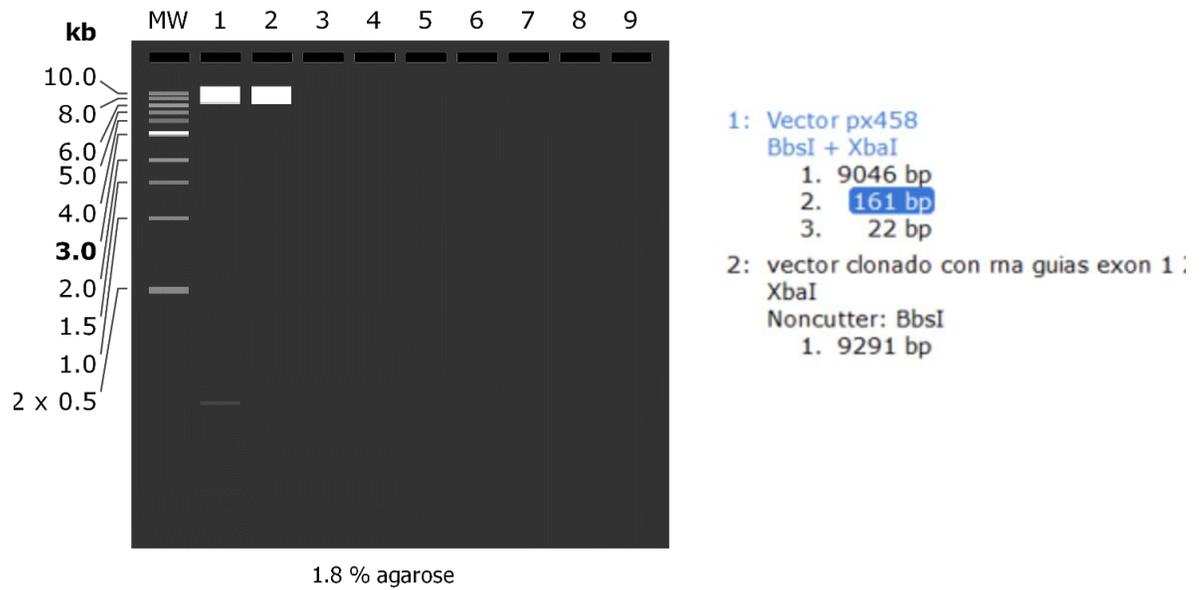


Figura 27. Simulación del perfil de digestión con BbsI y XbaI del PX458 Ø y del vector con sgRNA. Se puede apreciar que el PX458 Ø genera 3 fragmentos de DNA (carril 1) y el vector con la sgRNA solo un fragmento (Carril 2), debido a que BbsI no corta. El fragmento de 22 pares de base no se visualiza debido a que se sale del carril.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Marcos Domínguez González

Título de la tesis: Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

10/Septiembre/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2023-09-13 15:11:18 | Firmante

GOFZxFUaQq6ltcR4DvvC03tztTwbszKaAkejF2BgGm+/+CC0sjuoR40vswVamJ50TqvXT/J3bRnww0FwrcDFiF2qdG/20Z/7kTl7dggNF/sUoG0J6KEqtWvT5T1GyOjofs6HMZ/D4y9/fA+Jwd98izAz1JIHRN3T5vS7FhPRcAL4mM5LrpN3FJNMlbT80DGg4WxzkkFeTjz/6MNasCTfdqsr6Qlyj3mZRimfe/k2XvGRkMBjihDYOQBmqq8pmNtQOJccsVE/ZG0Ue5pn/Y75lcS7VUOBIE7y+WpSB1O95FRvJFJvqIBq8Oqp4Z87X1WL/+Orvz7L3adQ8a02QfRjQ==

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



[xQ9zoeXvm](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cyHSLZZtuGzxRi8r3GjPSE9ZMzibqBjE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Marcos Domínguez González

Título de la tesis: Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. José Luis Montiel Hernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

10/Septiembre/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2023-09-13 15:06:56 | Firmante

JPUW4Hlkrj+ub6OochYt20fcGsPsgR54KyuNywnau7svuz0mZrN/iwwvs5870S9icQb++yR5//RX9uaCa6Qyw4nB9SbBuSNDKYGRy/XK2BEDJecbDMEjmU0gBoO7YHEf2Pqkmtv
W92mHV'Sgp/nE6UGv1B+rh+ntgbaa5G5xm6j0lpE4K0a5vTG4Cc8A/X4kqPWA6ovgV9Omd/Ry2CYMM+MGxVWknQXX0Fnzky4+Krjoi/pV7r2ECSIH9luLtCxY4C7Dwj8Tqca88V
6pcnyULv2SgNmXibUgREpftJVllo+H+rCIS9MwjoA8kMDM0RY7Jw4bRgdCCY8m0tnA3i/sQ==

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



[idRxjM4K9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3RJWR8igqsX51gGNfs8bJC2uqL3YVHcs>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Marcos Domínguez González

Título de la tesis: Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

10/Septiembre/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2023-09-14 22:28:17 | Firmante

nAVvBZ/NO2uG/Dy4BndhB4paAQ5Bcj1+08x5J7rjCx/QkOkmt93qAA+LLLLRvMRRm9CCBbt0DbzTEelQ1pN72iegmWIm5MMI3xXVTuqqJ1kgRMYpV+pcoZX7pxBeRoadccmBBS
nYpi1vSXNRGwrKD40aRs/TQKptBkCJRec21v5RDlXgR/6UNdWjDnSKL3SdmKXbhh66LqU/HjU94Bpk/5/AjBK6ngfXdWb0QIBPTyPSEK9avSTZjy0CIHw5FQTfdKHqU3rugm22lm
gGFF1Q7WxvzYrPzysnwUcV3U0FForq1vPxthkHpvBbR/4ldGmP+p5dlITr1rKr3Gzx9jh6Agw==

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



[gzSRIFoPa](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M0REPJIUUN9OEr62eRbNlptczzxyqy>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Marcos Domínguez González

Título de la tesis: Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Ramón Antonio González García Conde

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

10/Septiembre/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-09-18 12:55:02 | Firmante

sVP1d3hJs+tv+HAjszl/Q5/QCqDl1w9yj+Vuu8Dh4q2WfSAO958ggZGaf7d4moMyY6NcTgtNnsEWi3b8IOZvYegTWv/MW745nAJ7L1Ag1GoWPvo44+vDeM3i8Ww0w6PhjLDgBX
bVknIExttHQbsvq6pw5wVeA3tSXYZJfswZvKBSM7QHeSbi/mKeS/k03HR3iwlr9HaZB5AYt1qCYOoORtbGWIV/aKEcu51s3dcllf5zrBCL+pirgyX6CVOzcfQby1WHaD7ElddJbx2Fc
zTNwknwsByRF4Yas3873c6Dy3Bh8HOeiKM6c+k01U8t6CexVqAjlOjkw1jsy09q+pQNA==

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



[hLr4uxAak](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KXYZutyRQoCybrqsj5UqDzbnT4AkYi1n>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Marcos Domínguez González

Título de la tesis: Silenciamiento de la proteína inhibitoria Smad 7 en células A549 mediante el sistema de CRISPR-Cas9: una estrategia para explorar su papel en la respuesta celular al virus de influenza

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Tomas David López Díaz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

10/Septiembre/2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ | Fecha:2023-09-13 15:19:35 | Firmante

o/eEJGeMy5MPjglhZAsFERVd+qpp/2Quq8tJHblvLqDx6Ek+gJKFCQPIJbeq0jliBcbNlfhUMzTGDYm8p2hk1fzvHF5+wLg/Ov68hUWILLKhcciCImqxxsFea49N00qJp17zaPj8nfX2s
pn2hiSnODQsJcuODI1S9/ezHAMeipJ83AkCl42wtyGVsxV0SjZXUBCrIO9xkD77cDX9Ld+y3baBBsG9pi9NGXSDog07f+ARX6UC/y1OqJ455sOvR6S6IWera72GYcsFiwyLh6jAT
0Jrp4LjNigl2H3h4d5U5Jzs60nAdWzYVYy+Zc8Ftbj1lcJ1qRwr0k1V9A1sZkYrg==

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



[BMmSCovbq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JTqwBtjMcY0hnRcHSVEILrkGGBvvt0j0>

