

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UNA
POTENCIAL VACUNA DE ADN CONTRA EL VIRUS DE LA
TILAPIA DEL LAGO (TiLV)**

Br. MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN

TUMBES, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UNA
POTENCIAL VACUNA DE ADN CONTRA EL VIRUS DE LA
TILAPIA DEL LAGO (TiLV)**

Br. MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN

TUMBES, PERÚ

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autora. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.



Br. MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los diecinueve días del mes de octubre del año dos mil dieciocho, a las 12:00 horas, en el auditorio de la Escuela de Posgrado, Ciudad Universitaria se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 086-2018/UNTUMBES-EPG-D. Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila - Presidente, Mg. Jorge Humberto Carrasco Casariego - Secretario, Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier - Vocal y con Resolución Directoral N° 0142-2018/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Diseño y evaluación de vacunas tipo ADN contra el virus de la tilapia lacustre (TiLV), en *Oreochromis niloticus*, presentada por la egresada del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular Br. Mónica Paola Criollo Joaquin, asesorada por el Ph. D. Emmerik Motte Darricau.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Sobresaliente, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12:58 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 19 de octubre de 2018



Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Presidente



Mg. Jorge Humberto Carrasco Casariego
Secretario



Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier
Vocal

RESPONSABLES

vi

RESPONSABLES

Br. MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN



EJECUTOR

Ph. D. EMMERICK MOTTE DARRICAU



ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

vii

JURADO DICTAMINADOR

Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA



PRESIDENTE

Mg. JORGE HUMBERTO CARRASCO CASARIEGO

SECRETARIO

Ph. D. ERIC MIALHE MATONNIER



VOCAL

CONTENIDO

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES | 8 |
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS..... | |
| 2.1. Mantenimiento de ejemplares para el estudio..... | |
| 2.2. Predicción de la estructura de las proteínas del TiLV | |
| 2.3. Diseño del plásmido recombinante pTiLV-4..... | |
| 2.4. Construcción del plásmido recombinante pTiLV-4..... | |
| 2.5. Obtención de colonias recombinantes pTiLV-4..... | |
| 2.6. Detección de colonias recombinantes pTiLV-4 | |
| 2.7. Preparación del complejo transfectante pTiLV-4/ polietilenamina..... | |
| 2.8. Evaluación in vivo de la expresión del plásmido recombinante..... | |
| 3. RESULTADOS | |
| 3.1. Predicción de la estructura de las proteínas del TiLV | |
| 3.2. Construcción del plásmido pTiLV-4..... | |
| 3.3. Evaluación la expresión del gen viral predicho de la neuraminadasa del TiLV en tilapia | |
| 4. DISCUSIÓN..... | |
| 5. CONCLUSIONES..... | |
| 6. RECOMENDACIONES..... | |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | |
| 8. ANEXOS..... | |

AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES

Diseño y evaluación de la expresión de una potencial vacuna de ADN contra el virus de la Tilapia del Lago (TiLV)

Mónica Criollo-Joaquin^{*1}, Emmerik Motte^{*1, 2, 3}, Max Salvatierra⁴, Jorge Medina², Benoit Diringer^{1, 2}, Gustavo A. Sandoval⁵, & Eric Mialhe^{*1, 2, 3}.

1. *Maestría de Biotecnología Molecular, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú*
2. *Inca´biotec SAC, Calle Filipinas 2012, Tumbes, Perú*
3. *Concepto Azul SA, Guayaquil, Ecuador*
4. *Biotecoop, Tumbes, Perú*
5. *Grupo de investigación en Bioinformática y Biología Estructural, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú*

*Autores de correspondencia

Email Mónica Criollo_Joaquin. monicapaolacriollojoaquin@gmail.com.

Email Eric Mialhe. ericmialhe@yahoo.fr

Email Emmerik Motte. motte.emmerik@gmail.com.

Email Max Salvatierra. maxsa1002@gmail.com

Email Jorge Medina. jorgemedina_CA@hotmail.com

Email Benoit Diringer. diringerb@yahoo.fr

Email Gustavo Sandoval. gsandovalp@unmsm.edu.pe

Información sobre los autores: M C-J: Concepción, desarrollo experimental de la investigación y elaboración del manuscrito. E M: Concepción y asesoramiento en la investigación. M S: Asesoramiento de la investigación. J M: Desarrollo experimental de la investigación. G A S: Asesoramiento de la parte bioinformática de la investigación. E M: Director de Inca´biotec SAC, Concepción del proyecto y asesoramiento de la investigación.

Conflictos de intereses: Los autores no incurren en conflictos de intereses

Fuentes de financiamiento: Beca de maestría por parte de FONDECYT-CONCYTEC (Convenio de gestión N°000190-2015-FONDECYT de la Universidad Nacional de Tumbes) y el Círculo de Investigación en Biotecnología Molecular para el Desarrollo y la Sostenibilidad de los Sectores Acuícolas del Perú (asignación 132-2015-FONDECYT).

RESUMEN

El Virus de la Tilapia del Lago (TiLV), es un patógeno causante de mortalidades masivas tanto en poblaciones de tilapias cultivadas y silvestres alrededor del mundo. El desarrollo de una vacuna efectiva contra este patógeno emergente es imperativo para prevenir pérdidas económicas. En este trabajo se diseñó y evaluó un vector de expresión como una potencial vacuna de ADN contra este virus. Inicialmente, se realizó un análisis de enhebramiento para predecir las estructuras tridimensionales y las funciones de las proteínas del TiLV. Se encontraron homologías estructurales entre las proteínas correspondientes al segmento genómico 1 y al segmento genómico 4 del TiLV, con las proteínas de ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la influenza B (56%) y la proteína neuraminidasa que pertenece a la cápside del virus de la influenza A (12%), respectivamente. Se insertó el amplicón del gen neuraminidasa viral en el vector plasmídico de expresión pCMV. Finalmente, se inyectó el constructo plasmídico en juveniles de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* y se midió su expresión mediante RT-PCR en tiempo real a las 8h, 16h, 24h, 72h después de la segunda inyección inmunizante. Se logró detectar expresión en los cuatro tiempos evaluados logrando una mayor expresión a las 16 horas post inyección. Estos resultados constituyen el primer paso para el desarrollo de una vacuna efectiva para la protección de los stocks de tilapias alrededor del mundo.

Palabras clave: acuicultura, tilapia, homología estructural, expresión génica, neuraminidasa.

ABSTRACT

Tilapia Lake Virus (TiLV) is a pathogen that causes massive mortalities in both cultured and wild tilapia populations around the world. The development of an effective vaccine against this emerging pathogen is imperative to prevent economic losses. In this work an expression vector was designed and evaluated as a potential DNA vaccine against this virus. Initially, a threading analysis was done to predict the three-dimensional structures and functions of the TiLV proteins. Structural homologies were found between the proteins corresponding to the genomic segment 1 and the genomic segment 4 of the TiLV, with the RNA-dependent RNA polymerase proteins of the influenza B virus (56%) and the neuraminidase protein belonging to the virus capsid. of influenza A (12%), respectively. The amplicon of the viral neuraminidase gene was inserted into the expression plasmid vector pCMV. Finally, the plasmid construct was injected into juveniles of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and its expression was measured by real time RT-PCR at 8h, 16h, 24h, and 72h after the second immunizing injection. It was possible to detect an expression in the four evaluated times achieving a greater expression at 16 hours post injection. These results are the first step in the development of an effective vaccine for the protection of tilapia stocks around the world.

Keywords: aquaculture, tilapia, structural homology, gene expression, neuraminidase.