



---

---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A LA INFECCIÓN POR  
EL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO”**

**TESIS QUE PRESENTA**

**Q.F.B. ALICIA GABRIELA ZAMORA AVILÉS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:**

**MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR**

**ASESORA-TUTORA:**

**D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA**

**CO-ASESORA**

**M en C. ILANE HERNÁNDEZ MORALES**

Morelia, Michoacán, México. Abril 2021.

## *Dedicatoria*

*A Abelardo y Alicia quienes fueron la tinta y el  
papel de esta tesis que ha de aportar un grano de  
arena a tan vasto mundo científico...*

*"a mis héroes, mis padres".*

---

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la tutoría de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la co-tutoría de la Dra. Ilane Hernández Morales a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y a la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES-UNAM) unidad León por las facilidades en las instalaciones y materiales para la realización de este trabajo. Además, agradecemos la financiación parcial por la CIC-UMSNH 2019-2021.

Agradecimiento al apoyo por parte de CONACYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONACYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular y al proyecto PAPIIT IA207519 de la UNAM.

Agradecemos también, el apoyo a Alicia Gabriela Zamora Avilés que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2019-2021 con No. de becario 73274 y número de CVU 949913, y por el apoyo otorgado en el marco de la Convocatoria *Programa de Fortalecimiento Académico para Indígenas Apoyos Complementarios para Mujeres Indígenas Becarias Conacyt 2020*.

---

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Un especial agradecimiento a la Dra. Elvira por instruirme desde que inició mi interés por esta área, sin duda los profesores que te atraen a áreas tan necesarias dentro de la investigación científica es lo que hace falta en todas las instituciones, y estoy completamente agradecida por el ejemplo de profesionalismo, constancia y dedicación que me ha brindado y con los cuales hoy parto feliz.

A la Dra. Ilane, por la seriedad, constancia y profesionalismo con la que compartió la enseñanza a lo largo de mi proyecto de tesis. Mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad.

A mis sinodales el Dr. Juan José Valdez Alarcón, Dr. Javier Oviedo Boyso y Dra. Esperanza Meléndez Herrera por enriquecer enormemente este trabajo de investigación científica con sus ideas y conocimientos.

A mis hermanos Elsa, Beatriz, Manuel, Miguel y Norma que me apoyaron en todo aspecto, los cuales me enseñaron que, a diferencia de muchas otras cosas, la esperanza puede recuperarse, me motivaron cada vez que me caía en este largo proceso del saber.

A Norma, quien fue el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ella tengo el espejo en el cual me quiero reflejar.

A mis sobrinos que con sólo una sonrisa hacen que todo en la vida valga la pena.

A mis amigas Brenda, Ana, Alexia, Lidia y Agnes, a mis primos Iván y Carlos, que me enseñaron a no seguir buscando respuestas a algo que es tan simple, “vivir”.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Uprobiocel, Miriam, Luis, Fernando, Francisco y Marco con quienes formamos un gran equipo, compartiendo largos días de trabajo y de quienes recibí apoyo siempre que lo necesité.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	I
INDICE DE TABLAS .....	II
ABREVIATURAS .....	III
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS .....	3
3.2. CUADRO CLÍNICO .....	3
3.3. TRANSMISIÓN .....	4
3.4. ETAPAS DE LA INFECCIÓN POR PRRSV .....	4
3.5. AGENTE ETIOLÓGICO .....	4
3.6. REPLICACIÓN DE PRRSV EN EL HOSPEDERO .....	6
3.7. REPLICACIÓN DE PRRSV <i>IN VITRO</i> .....	8
3.8. PRINCIPALES MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR PRRSV .....	9
3.8.1. <i>Inmunidad Innata</i> .....	9
3.8.2. <i>Inmunidad Adaptativa</i> .....	10
3.9. RESPUESTA INMUNE Y MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA EL PRRSV .....	11
3.9.1. <i>Respuesta inmune adaptativa</i> .....	11
3.9.2. <i>Respuesta inmune humoral</i> .....	12
3.10. ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES .....	20
3.11. INMUNODOMINANCIA .....	25
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>28</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>28</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
8.1. RATONES .....	28
8.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS .....	29
8.3. INMUNIZACIONES .....	29
8.4. PÉPTIDOS .....	30
8.4.1. <i>Análisis bioinformático</i> .....	30
8.4.2. <i>Síntesis de péptidos</i> .....	32
8.5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES Y ESPECÍFICOS CONTRA LOS PÉPTIDOS GP5B1, GP5B2 Y GP5B3 .....	33
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
8.6.1. <i>Análisis de anticuerpos</i> .....	35
8.7. LÍNEAS CELULARES .....	35
8.8. CLONA INFECCIOSA DE PRRSV .....	36
8.8.1. <i>Preparación de bacterias competentes</i> .....	36
8.8.2. <i>Propagación de la clona infecciosa de PRRSV</i> .....	37
8.8.3. <i>Transformación bacteriana</i> .....	38
8.8.4. <i>Extracción del plásmido</i> .....	39
8.8.5. <i>Caracterización del ADN plasmídico</i> .....	40
8.9. TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> .....	40
8.10. GENERACIÓN DE VIRUS .....	41

---

8.11.	DETECCIÓN DEL VIRUS .....	42
<b>8.11.1</b>	<b><i>Inmunofluorescencia</i></b> .....	<b>42</b>
<b>8.11.2</b>	<b><i>Extracción de ARN y transcripción inversa (RT-PCR)</i></b> .....	<b>42</b>
8.12.	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA LOS PÉPTIDOS GP5B1, GP5B2 Y GP5B3.	43
8.13.	INMUNODOMINANCIA E INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL .....	44
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
9.1	PÉPTIDOS .....	44
9.2.	EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS .....	50
<b>9.2.1</b>	<b><i>Evaluación de anticuerpos totales contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3</i></b> .....	<b>50</b>
<b>9.2.2</b>	<b><i>Evaluación de anticuerpos específicos contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3</i></b> .....	<b>52</b>
9.3.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE. ....	58
<b>10.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
12.1	ANEXO 1 .....	66
12.2	ANEXO 2: PREPARACIÓN DE LA CLONA INFECCIOSA PRRSV .....	67
<b>12.2.1.</b>	<b><i>Transformación bacteriana</i></b> .....	<b>67</b>
<b>12.2.2.</b>	<b><i>Extracción del ADN plasmídico</i></b> .....	<b>67</b>
<b>12.2.3</b>	<b><i>Transcripción in vitro</i></b> .....	<b>69</b>
<b>12.2.4</b>	<b><i>Generación del virus</i></b> .....	<b>70</b>
<b>12.2.5</b>	<b><i>Detección del virus</i></b> .....	<b>70</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>75</b>

---

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Representación esquemática del virus PRRS.....	6
<i>Figura 2.</i> Genoma, transcripción y traducción de PRRSV.....	7
<i>Figura 3.</i> Estructura general de una molécula de anticuerpo.....	14
<i>Figura 4.</i> Recombinación y expresión del gen de las cadenas pesada y ligera de Ig.....	17
<i>Figura 5.</i> Modelo que ilustra el bloqueo de un epítipo ampliamente neutralizante mediante anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes.....	24
<i>Figura 6.</i> Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida.....	30
<i>Figura 7.</i> Esquema de los ensayos de ELISA para la cuantificación de IgG totales e IgG1.....	33
<i>Figura 8.</i> Esquema del acoplamiento del péptido a la placa de forrado.....	34
<i>Figura 9.</i> Plásmido PRRSV NVSL # 97-7895 de ADNc de longitud completa.....	37
<i>Figura 10.</i> Diseño in silico del plásmido pFL12 de ADNc de longitud completa.....	38
<i>Figura 11.</i> Análisis en IEDB del péptido GP5B1, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV.....	47
<i>Figura 12.</i> Análisis en IEDB del péptido GP5B2, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV.....	48
<i>Figura 13.</i> Análisis en IEDB del péptido GP5B3, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV.....	49
<i>Figura 14.</i> Esquema de la distribución de los diferentes grupos experimentales <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<i>Figura 15.</i> Títulos de anticuerpos IgG1 contra BSA, GP5B1, GP5B2 y GP5B3 evaluados mediante ELISA.....	51
<i>Figura 16.</i> Simulación de la unión de cada epítipo a la microplaca y su posterior tratamiento con los anticuerpos específicos.....	52
<i>Figura 17.</i> Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating.....	53
<i>Figura 18.</i> Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating.....	53
<i>Figura 19.</i> Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating.....	54
<i>Figura 20.</i> Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<i>Figura 21.</i> Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating.....	56
<i>Figura 22.</i> Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating.....	57
<i>Figura 23.</i> Co-localización de células MARC-145 tratadas con DAPI e inmunofluorescencia usando el anticuerpo PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated.....	59

---

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Funciones efectoras mediadas por cada isotipo de anticuerpos. Modificada de Abbas, 2015.... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 2.</b> Participación de los anticuerpos neutralizantes (NAb), en la protección contra enfermedades virales. ....	23
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de oligoprimers en dirección 5´ a 3´, para caracterización del plásmido pFL12..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la reacción de transcripción in vitro. Manual Thermo Scientific TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 5.</b> Grupos experimentales y de control para la microneutralización.....	43
<b>Tabla 6.</b> Secuencia y análisis de los péptidos sintetizados por GenScript. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 7.</b> Secuencia y análisis de los epítomos sintetizados por GenScript. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 8.</b> Análisis estadístico descriptivo de los títulos de anticuerpos IgG1 producidos contra cada epítomo al día 45 post-inmunización .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 9.</b> Análisis estadístico descriptivo de los títulos de anticuerpos IgG2 producidos contra cada epítomo al día 45 post-inmunización. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>



---

## ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpos
Ags	Antígenos
APC	Células presentadoras de antígeno
ARNg	ARN genómico
ARNm	ARN mensajero
BCR	Receptor de superficie de células B
DI <sub>50</sub>	Dosis inféctate 50
DIFA	Ensayo de inmunofluorescencia directa
DMV	Vesículas de membrana doble
EAV	Virus de la arteritis equina
GP	Glicoproteína
h	Hora
HVR	Región hipervariable
ID	Inmunodominancia
IDD	Determinantes inmunodominantes
IEDB	Inmuno Epitope Data Base
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IVT	Transcription in vitro
kDa	Kilodaltones
LDV	Virus elevador de lactato deshidrogenasa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOI	Multiplicidad de infección
N	Asparagina
NAb	Anticuerpo neutralizante
NF-Kb	Factor nuclear kB
NSP	Proteína no estructural
orf	Marco de lectura abierta
PAM	Macrófago alveolar porcino

---

PCV	Circovirus porcino
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PRRSV	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino
Proteína N	Proteína de nucleocápside
Proteína M	Proteína de matriz
RE	Retículo endoplásmico
RTC	Complejo de replicación y transcripción
SH	Sulfato de heparina
TA	Temperatura ambiente
TCID <sub>50</sub>	Dosis infecciosa media en cultivo de tejido
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

---

## 1. RESUMEN

La infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) representa una gran preocupación para la industria porcícola debido a la afectación de los índices productivos y las pérdidas económicas asociadas. El PRRSV es un virus de ARN de polaridad positiva cuyo genoma contiene diez marcos de lectura abierta (*orfs*), que codifican para proteínas estructurales y no estructurales. Poco se sabe sobre los mecanismos inmunológicos del cerdo que confieren protección frente a la infección por el PRRSV. Se ha propuesto que una de las proteínas estructurales codificada en el *orf5*, denominada GP5, posee epítomos capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (NAb), los cuales constituyen uno de los principales mecanismos inmunológicos de protección contra la infección por PRRSV. Para comprender las bases moleculares de la interacción de los epítomos inmunodominantes con la respuesta inmune humoral, se diseñaron tres péptidos a través de predicciones hechas por mapeo de epítomos de la proteína GP5. Dichos péptidos sintéticos teóricamente podrían ser reconocidos por linfocitos B y fueron denominados GP5B1, GP5B2 y GP5B3. Algunos estudios sugieren que los NAb podrían tratarse de inmunoglobulinas del tipo IgG1, sin embargo, existe poca información en la literatura sobre los epítomos inmunodominantes de la proteína GP5 que los inducen. Mas aún no se conoce si dichos epítomos favorecen la producción de NAb. Objetivo: Evaluar la inmunogenicidad e inmunodominancia de péptidos de GP5 en un modelo murino inmunizado con tres péptidos que corresponden a secuencias predichas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes a través de la evaluación de Abs IgG1. Así mismo, se propone evaluar la capacidad neutralizante de los Abs generados después de la inmunización a través de ensayos de microneutralización. Resultados: los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3 son inmunogénicos e inducen la producción de anticuerpos específicos, IgG1 e IgG2, en ratones partir del día 45 post-inmunización. Los Abs están dirigidos en gran medida contra los epítomos neutralizantes, sin embargo, la inmunodominancia de estos epítomos está determinada por la conformación del péptido. Existe evidencia sólida que indica que los anticuerpos producidos contra estos péptidos podrían tener actividad neutralizante. Estos resultados proporcionan información valiosa para guiar el desarrollo de una vacuna contra el PRRSV.

**Palabras clave:** PRRSV, GP5, epítomo, anticuerpos neutralizantes, inmunodominancia.

---

## 2. ABSTRACT

The infection produced by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) represents a heavy burden to the pork industry due to the negative impact on production rates and associated economic losses. PRRSV contains a positive-sense single-stranded RNA genome comprised of ten open reading frames (*orfs*), encoding structural and non-structural proteins. There is a need to understand the immunological mechanisms that confer protection against PRRSV infection. The viral structural protein GP5 possesses epitopes capable of inducing the production of neutralizing antibodies (NAb) that represent the main immunological mechanisms of protection against PRRSV infection. To understand the molecular bases of the interaction between immunodominant epitopes and the humoral immune response, we designed three peptides based on predictions made by epitope mapping of GP5. Such synthetic peptides are likely recognized by B lymphocytes and were named GP5B1, GP5B2, and GP5B3. Some studies suggest that NAbs could be IgG1-type immunoglobulins, however, there is little information about the immunodominant epitopes of GP5 that induce them. Furthermore, it is not yet known whether these epitopes favor the production of NAbs. Objective: To evaluate the immunogenicity and immunodominance of GP5 peptides in mice immunized with three peptides that correspond to predicted sequences capable of inducing neutralizing IgG antibodies. Besides, we proposed to evaluate the neutralizing capacity of the antibodies generated after immunization using microneutralization tests. Results: the peptides GP5B1, GP5B2, and GP5B3 were immunogenic and induced the production of specific antibodies, IgG1 and IgG2, in mice after 45 days post-immunization. This indicates that the peptides trigger a specific humoral immune response. The antibodies generated recognized the neutralizing epitopes, and they might likely have neutralizing activity. Moreover, we determined that the immunodominance of these epitopes depends on the conformation of the peptide. These results provide valuable information to guide the development of a novel effective PRRSV vaccine.

---

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Antecedentes Históricos

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino, PRRS por sus siglas en inglés, fue descrito clínicamente por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) en 1987. En Asia, los primeros brotes de reportaron en Japón en 1988. Posteriormente, la infección se esparció rápidamente en países como Canadá, Holanda y algunos países de Europa. PRRS era conocido con diferentes nombres como, *Mystery swine disease* o *Blue-ear pig disease*, hasta que, en 1992 en el 1er Congreso Internacional sobre la enfermedad en EUA, fue adoptado el nombre actual. En ese mismo año fue descrito clínicamente por primera vez en México (López-Heydeck *et al.*,2015). Desde entonces este síndrome ha causado graves pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. EUA es uno de los países más afectados, donde el costo del PRRS es de más de \$1000 millones de dólares anuales, implicando costos tanto directos como indirectos (Hipra, SA 2019). Otros informes sugieren un impacto similar en países europeos.

#### 3.2. Cuadro Clínico

El PRRS es una enfermedad de fácil y rápida transmisión provocada por un virus patógeno del mismo nombre (PRRSV). Esta enfermedad se caracteriza por causar una amplia gama de signos clínicos como: fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero, edema en párpados, conjuntivitis, depresión, anorexia y diarrea. Correspondientes a diferentes grados de neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, linfadenopatías, entre otros. A nivel granja, en el área de reproducción aumentan las tasas de mortinatos, nacidos débiles, y en lechones lactantes incrementa la tasa de mortalidad. Además, la infección por este virus acarrea infecciones secundarias, del tipo bacteriano (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella cholerasuis*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma spp.*) y del tipo viral (circovirus porcino tipo 2, virus de la influenza porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gripe y parvovirus porcinos) (López-Heydeck *et al.*,2015).

---

### 3.3. Transmisión

Los cerdos pueden infectarse por contacto directo o por contacto con material contaminado con secreciones de cerdos infectados. Además, se puede transmitir por vía vertical durante el último trimestre de gestación. El virus puede entrar por vía oral y nasal, penetrando los epitelios nasales y/o tonsilares, llegando a su diana celular, los macrófagos alveolares (Pileri y Mateu 2016).

La dosis inféctate 50 (DI<sub>50</sub>) de PRRSV varía según la vía de exposición. Se ha estimado que la DI<sub>50</sub> por exposición oral y nasal es de 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup> partículas virales, respectivamente; mientras que por vía sexual la DI<sub>50</sub> es de 10<sup>3</sup> partículas virales (Pileri y Mateu 2016).

### 3.4. Etapas de la infección por PRRSV

La infección por PRRSV en un cerdo inmunocompetente desencadena una serie de acontecimientos. Después de la exposición inicial, sobreviene la infección temprana o aguda, que se caracteriza en muchos casos, por: la presencia de síntomas clínicos, abundante replicación en células diana (macrófagos del tejido alveolar y células dendríticas); lo que ocasiona una alta carga viral en los tejidos (los pulmones y el tracto respiratorio superior), que puede durar hasta un mes. Posterior a la fase aguda se da la fase persistente o tardía de la infección. En esta fase infecciosa tardía, el PRRSV persiste en un nivel bajo, pero continuo, de replicación viral, principalmente en tejido linfoide, incluyendo la amígdala y los ganglios linfáticos. Esto explica la transmisión eficiente del virus a cerdos a través de las secreciones. La replicación del virus disminuye hasta un punto en el que el virus ya no se detecta en la sangre y los cerdos ya no presentan signos evidentes de enfermedad clínica. La eventual desaparición de virus representa la etapa final de la infección. No se sabe exactamente cómo y cuándo desaparece el virus, pero la replicación se puede mantener hasta 250 días después de la infección (López y Osorio, 2004).

### 3.5. Agente etiológico

El virus del PRRS pertenece a la familia *Arteriviridae*, género *Porarterivirus*. Es un virus envuelto de ARN monocatenario de sentido positivo (Figura 1), con aproximadamente 15 Kb, que contiene 10 marcos de lectura abierta (*orfs* por sus siglas en inglés), los cuales se han denominado como *orf1a*, *orf1b*, *orf2a*, *orf2b*, *orf3*, *orf4*, *orf5*, *orf5a*, *orf6*, *orf7* (López-Heydeck *et al.*, 2015).

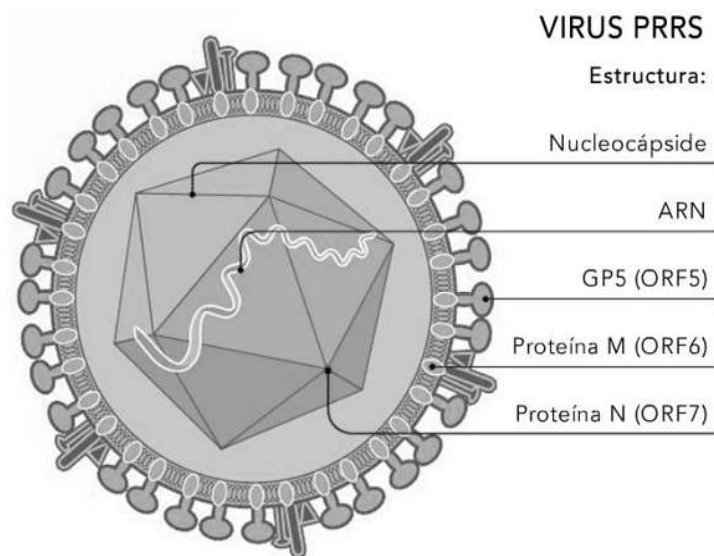
---

Los *orf1a* y *orf1b* constituyen aproximadamente tres cuartas partes del genoma de PRRSV. Estos codifican dos poliproteínas diferentes, pp1a y pp1ab, que se dividen en al menos 16 proteínas no estructurales (nsps: nsp1 a nsp12 y nsp1a y nsp1b, y nsp7a, y nsp7b). Estas proteínas tienen diversas funciones como, actividad de ARN polimerasa, actividades proteolíticas, así como actividades relacionadas con la transcripción y replicación viral (Figura 2). Los genes que están ubicados en el extremo 3' del genoma, denominados, *orfs 2-7*, se traducen en las proteínas estructurales GP2-GP5, N y M (Figura 2). Las glicoproteínas de la envoltura viral (GP2 a GP5) son las primeras que interactúan con los receptores de la célula huésped, iniciando la infección. La proteína nucleocápside (N), codificada por el *orf7*, es el principal elemento estructural dentro del virión y su función es empaquetar el ARN genómico viral (Figura 1) (ARNg). La proteína M, interactúa con el receptor celular de sulfato de heparán en macrófagos. Por último, se ha encontrado que nsp2, tradicionalmente clasificada como una proteína no estructural, está incorporada en múltiples isoformas dentro de la envoltura viral (Montaner-Trarbes *et al.*,2019).

El *orf5* codifica la proteína glicosilada GP5 de 25 kDa que se compone de 200 aminoácidos (en el genotipo norteamericano 2). Comprende un péptido señal entre los aminoácidos 1-30, en la región N-terminal que dirige a la proteína al retículo endoplásmico (RE), seguido de un ectodominio de aproximadamente 30 aminoácidos, que contiene varios sitios de N-glicosilación, dos de los cuales (N44 y N51) están altamente conservados entre las diferentes cepas del virus. La región entre los residuos 63 y 135 es hidrófoba y se supone que atraviesa tres veces la envoltura viral. La región C-terminal (135–200) se encuentra en el interior del virus. Es de destacar que existe una región hipervariable entre el aminoácido 27 y 31. Dado que esta región es rica en residuos de serina y asparagina, esto a menudo conduce a la adición o pérdida de sitios de N-glicosilación. En GP5 de PRRSV tipo 2, se identificó un epítipo neutralizante "epítipo B", capaz de inducir la producción de NAbs, considerados como un componente importante de la inmunidad protectora frente a PRRSV (López, 2015), además, se identificó un epítipo señuelo "epítipo A" (Thaa *et al.* 2013).

Se ha reportado que GP5 está implicada en la entrada del virus en las células diana ya que interactúa con los receptores de sialoadhesina de macrófagos alveolares de cerdo. Por lo tanto, GP5 es una proteína esencial en el proceso de infección (López, 2015). GP5 también

es muy importante para la inducción de NAbs ya que contiene epítomos inmunodominantes. Sin embargo, es una proteína que presenta mucha diversidad antigénica debido a mutaciones, por lo que contribuye a la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Por ello, GP5 es una de las proteínas más estudiadas de PRRSV (Cajero-Juárez *et al.*, 2017).



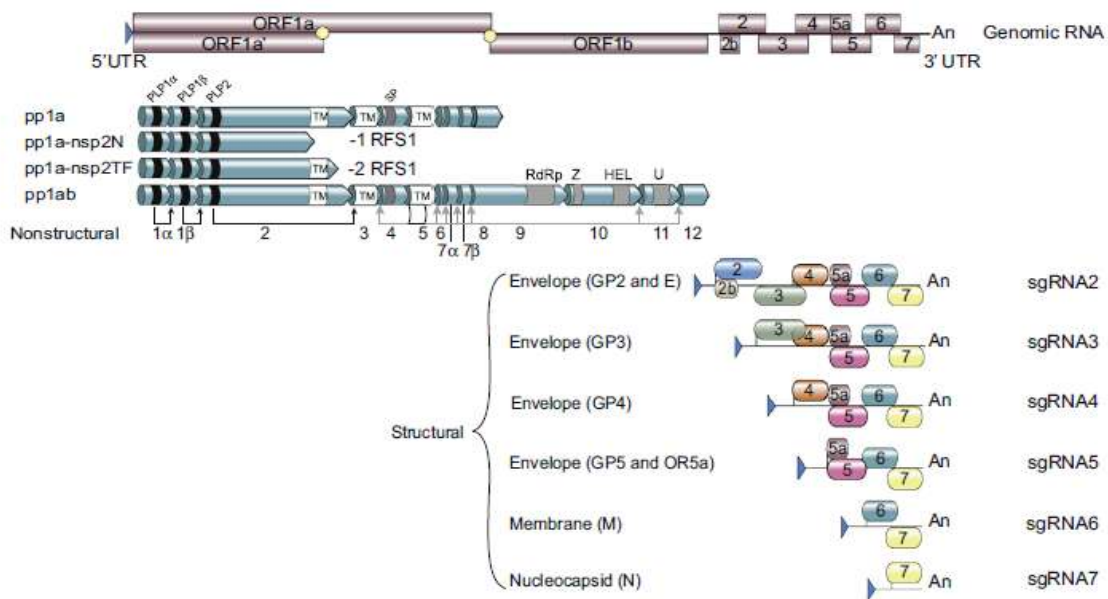
**Figura 1.** Representación esquemática del virus PRRS. Ubicación de las proteínas estructurales GP5, M y N. Se muestra como GP5 y la proteína M forman complejos heterodímeros. El genoma de ARN monocatenario se encuentra encapsulado por la proteína de nucleocápside (N). Recuperado de <https://razasporcinas.com/pigmarket/producto/guia-del-prrs-sindrome-respiratorio-y-reproductivo-porcino>.

### 3.6. Replicación de PRRSV en el hospedero

Los cerdos son el único huésped natural conocido de PRRSV, donde el macrófago alveolar porcino completamente diferenciado es su principal diana celular. En el modelo clásico para la infección por PRRSV de macrófagos, el primer paso es la interacción entre la proteína M del virus y el sulfato de heparina (HS) de la superficie de los macrófagos. El siguiente paso es la unión de los residuos glicosílicos de GP5 a la sialoadhesina de macrófagos, CD169. El heterodímero GP5-M es el complejo proteico predominante en la superficie del virión. Sin embargo, la internalización del virus se produce a través de la interacción entre el heterotrímero de la envoltura formado por GP2a, GP3 y GP4 y una proteína receptora del macrófago, CD163. Cerdos knock-out que carecen de CD169, siguen siendo permisivos para la infección con el virus PRRSV tipo 2, mientras que los cerdos knock-out que carecen de CD163 son completamente resistentes a la infección con ambos genotipos (Popescu *et al.*, 2017). PRRSV



entra en las células hospedadoras a través de endocitosis estándar mediada por clatrina. El endosoma se acidifica, las membranas se fusionan y el genoma viral se libera en el citosol (Popescu *et al.*, 2017). El ARN sirve como el ARNm para la traducción inmediata de las poliproteínas replicasa, pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab (Figura 2). Estas poliproteínas se escinden mediante proteinasas internas virales para generar 16 proteínas no estructurales (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019), que se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC por sus siglas en inglés). El RTC primero se involucra en la síntesis de ARN de cadena negativa para producir ARN de cadena única tanto de longitud completa como de cadena subgenómica (sg). Posteriormente, los ARN mensajero subgenómicos (ARNm sg) sirven como moldes para la síntesis de los ARNm sg de cadena positiva necesarios para expresar los genes de proteínas estructurales. Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides que se envuelven al brotar de membranas intracelulares lisas. Los nuevos viriones se liberan de la célula utilizando la vía exocítica. El sitio de ensamblaje y síntesis de ARN viral ocurre en vesículas de membrana doble (DM, por sus siglas en inglés), derivadas del retículo endoplásmico (Kappes y Faaberg, 2015).



**Figura 2.** Genoma, transcripción y traducción de PRRSV. El genoma de PRRSV se traduce inmediatamente en 4 poliproteínas (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF y pp1ab), las cuales se procesan dando como resultado al menos 16 proteínas no estructurales (nsps) con actividad replicasa. Las proteínas estructurales se expresan a través de un conjunto de ARN subgenómicos (ARNsg; 2-7) a través de un intermedio de ARN de polaridad negativa. Recuperado de Kappes y Faaberg. 2015.

---

### 3.7. Replicación de PRRSV *in vitro*

Como se ha revisado hasta ahora, el virus de PRRSV infecta a células totalmente diferenciadas del linaje monocito/macrófago, donde el receptor celular CD163 es determinante para la infección. Se ha demostrado que CD163 es capaz de mediar infección de líneas celulares no permisivas.

*In vitro*, PRRSV se aisló por primera vez en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos (PAM, *porcine alveolar macrophage*) y hasta ahora, estas células, así como monocitos sanguíneos recién aislados y células dendríticas derivadas de monocitos, siguen siendo las únicas células porcinas no modificadas genéticamente que pueden ser utilizadas para la propagación viral ya que pueden ser infectados por el virus y permitir su replicación (Welch y Calvert. 2010). Por otro lado, el uso de líneas celulares primarias presenta desventajas como el bajo número de células, la heterogeneidad de la población y, lo que es más importante, la corta vida útil de las células. Las líneas celulares inmortalizadas, utilizadas *in vitro* presentan algunos beneficios en comparación con las líneas celulares primarias. Hay dos líneas celulares inmortalizadas permisivas no porcinas que permiten el ciclo de replicación completo de PRRSV, las células MARC-145 y CL262, ambas subclones de la línea celular de riñón de mono MA104, que se usan rutinariamente para la propagación *in vitro* de PRRSV y para la producción a gran escala de cepas de vacuna de PRRSV. Nuevas líneas celulares se han modificado genéticamente para que sean permisivas para el PRRSV, como células PAM inmortalizadas que expresan la proteína CD163, células PK-15 que expresan la proteína sialoadhesina (CD169) y células de riñón de cerdo, felino y hámster recién nacido que expresan la proteína CD163 (Provost, *et al.*, 2012).

En la búsqueda de nuevos receptores para PRRSV en macrófagos porcinos Xie, J. y colaboradores, identificaron nuevos receptores de la familia de la sialoadhesina, los cuales fueron clonados y caracterizados como Siglec-3, Siglec-5 y Siglec-10. Solo la expresión de Siglec-10 pudo potenciar significativamente la infección de PRRSV en la línea celular transfectada con CD163. En comparación con sialoadhesina CD169, Siglec-10 fue igual de eficaz como receptor para PRRSV tipo 2, pero fue menos capaz de soportar la infección con PRRSV tipo 1 (Xie, J *et al.*, 2017).

---

### 3.8. Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por PRRSV

#### 3.8.1. Inmunidad Innata.

- PRRSV inhibe la producción y función de IFN: Los interferones del tipo I ( $\alpha/\beta$ ) son uno de los mecanismos antivirales más potentes en las primeras etapas de la infección (Montaner-Tarbes *et al.*,2019). Estudios demuestran que durante la replicación activa de PRRSV en los pulmones, la producción de IFNs se ve comprometida tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto sugiere que PRRSV posee diversas estrategias para inhibir la inducción y función de IFNs  $\alpha / \beta$ . Al menos seis proteínas virales (nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$ , nsp2, nsp4, nsp11 y N) se han identificado como antagonistas de IFNs; sin embargo, sus mecanismos de acción solo están parcialmente caracterizados (Ke y Yoo, 2017).
- PRRSV modula la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ : Durante la infección aguda por el virus de la influenza porcina en cerdos, tanto las células infectadas como las activadas, secretan altas concentraciones de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), coincidiendo con los síntomas clínicos y la eliminación efectiva del virus. En contraste, en la infección por PRRSV la cantidad de estas citocinas es significativamente menor (dependiendo de la cepa), lo que ocasiona que la activación de la inmunidad adaptativa se retrase y atenúe (Lunney *et al.*,2016). Se ha sugerido que la proteína nsp2 podría estar implicada en la supresión de estas citocinas, ya que cuando se usaron mutantes de esta proteína, hubo una fuerte activación de componentes involucrados en la señalización de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Montaner-Tarbes *et al.*,2019).
- PRRSV regula positivamente citocinas como IL-10 y/o TGF- $\beta$ : Los virus evaden la respuesta inmune del huésped al promover la secreción de citocinas inmunosupresoras como son IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estas citocinas causan supresión de la respuesta inmune innata y adaptativa en cerdos (Lunney *et al.*,2016). PRRSV aumenta los niveles de estas citocinas. La proteína N ha sido identificada como la responsable de la regulación positiva al menos de IL-10 *in vitro*. Se ha sugerido que la proteína N activa NF- $\kappa$ B, vía de señalización que regula la producción de IL-10 y otras proteínas proinflamatorias (Ke y Yoo, 2017).
- PRRSV inhibe receptores tipo toll (TLRs): Cuando un virus de ARN ingresa a la célula, se activan una serie de mecanismos de reconocimiento, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre los que se encuentran, los receptores tipo toll (TLR)

---

que residen en la membrana endosómica. Este tipo de receptor es capaz de detectar material extraño en la célula, activando diferentes vías de señalización que culminan en la activación de factores de transcripción necesarios para la producción de IFN  $\alpha/\beta$  (Ke y Yoo, 2017). PRRSV inhibe TRIF, una molécula adaptadora del TLR3, interfiriendo principalmente con la vía de señalización implicada en la producción de IFN- $\beta$  y la posterior respuesta inmune innata (Zhu *et al.*, 2012).

- PRRSV puede inhibir la función de las células NK: Las células naturales asesinas (NK, por sus siglas en inglés), son parte importante de la respuesta inmune innata antiviral. Estas células son capaces de identificar células infectadas por virus al reconocer al antígeno alterado a través del MHC-1, produciendo perforinas y granzimas que inducen apoptosis en las células infectadas (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019). En particular, en cerdos infectados por PRRSV, la función citotóxica de las células NK se reduce a partir de los dos días después de la infección y dura de tres a cuatro semanas; adicionalmente los cerdos muestran niveles bajos de IFN- $\alpha$ . Esto sugiere que hay una relación entre los niveles bajos de IFN y la actividad citotóxica reducida de las células NK, ya que la función de las células NK está regulada por los IFN tipo I y otras citocinas (Ke y Yoo, 2017).
- PRRSV interfiere con la presentación de antígeno y la activación de células T: los IFNs de tipo I pueden mejorar la presentación de antígenos en células dendríticas (DC) y su migración a los ganglios linfáticos. La presentación de antígeno mejorada facilita la maduración, proliferación y activación de células T. Sin embargo, debido a que PRRSV ha adquirido diversas estrategias para inhibir la inducción y función de IFNs, puede entonces interferir con la presentación correcta del antígeno y, en consecuencia, con la activación de linfocitos T (Mateu y Diaz, 2008).

### **3.8.2. Inmunidad Adaptativa.**

#### **3.8.2.1. Respuesta celular**

PRRSV induce una activación lenta, errática y de baja frecuencia de linfocitos T, que son células secretoras de INF- $\gamma$ . Los linfocitos T cooperadores Th1 (CD4<sup>+</sup>) pueden convertirse en células T de memoria, además, pueden mejorar la eficacia de destrucción de los macrófagos e inducir la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> al secretar IL-2 e IFN- $\gamma$ . Por otra parte, los linfocitos T cooperadores Th2 (CD4<sup>+</sup>) pueden promover la maduración de linfocitos B a células plasmáticas, mejorando su capacidad de secretar Abs específicos anti-PRRSV;

---

igualmente pueden inducir la conversión de linfocitos B a linfocitos B de memoria. Los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) causan la muerte de células infectadas específica y directamente, mediante apoptosis. Durante la infección por PRRSV, el número de células T CD4<sup>+</sup> disminuye rápidamente entre los 3–7 días post infección, luego aumentan ligeramente entre los 7–14 días, alcanzando su pico máximo a las 4 semanas post- infección. Se sabe muy poco acerca del papel de las células T CD8<sup>+</sup> en la eliminación virus. Tales respuestas anormales de células T sugieren que la infección con PRRSV interfiere con la función normal de las células T a través de mecanismos indirectos que aún no están bien descritos (Ke y Yoo, 2017).

### **3.8.2.2. Respuesta Humoral.**

PRRSV induce una respuesta temprana y fuerte de anticuerpos no neutralizantes: La respuesta de Abs mediada por linfocitos B es uno de los mecanismos antivirales más importantes del huésped. Aunque los Abs específicos para PRRSV aparecen en los primeros 5-7 días después de la infección, la eficacia de estos anticuerpos no está clara; de hecho, se ha sugerido que estos Abs pueden llegar a ser perjudiciales para el huésped, ya que al opsonizar la partícula viral para su fagocitosis, facilitan la entrada del virus a macrófagos. Los mecanismos moleculares por los cuales se producen estos Abs no neutralizantes se discuten a detalle más adelante.

## **3.9. Respuesta inmune y mecanismos de defensa contra el PRRSV**

### **3.9.1. Respuesta inmune adaptativa**

Los cerdos infectados por PRRSV desarrollan una respuesta de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> lenta, tardía e irregular, donde la proteína de la matriz M y glicoproteína GP5 poseen los epítopos de reconocimiento para estas células T CD4<sup>+</sup>. A partir de las cuatro semanas se observa un incremento importante, posteriormente esta respuesta vuelve a disminuir, este comportamiento retardado es similar a lo observado con los NAbs. A las 14 semanas, se desarrolla una hipersensibilidad contra el virus, que indica nuevamente una respuesta por parte de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; sin embargo, semanas después se vuelve a observar un decremento. La respuesta por parte de células T es importante ya que son una de las principales células secretoras de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, ocurre una activación policlonal de células B que a su vez induce una respuesta temprana, no protectora y vigorosa de anticuerpos homólogos

---

(López y Osorio, 2004). Los aspectos moleculares de esta respuesta se discuten a continuación.

### **3.9.2. Respuesta inmune humoral**

Los linfocitos B o células B, se originan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas, donde a través de estímulos inducidos por diversas citoquinas, se diferencian primero a células pro-B y finalmente a células B maduras. Son responsables de la inmunidad humoral, su función principal es la producción de Abs que serán secretados proporcionando inmunidad contra antígenos de patógenos y dirigiendo contra ellos una serie de mecanismos efectores destinados a destruirlos. Las funciones de los anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas, son determinadas por la cadena pesada y, por ello, los distintos isotipos de las inmunoglobulinas tienen distintas funciones. (Owen, 2014). La IgM es el primer isotipo expresado por las células B en desarrollo y las células B maduras, siendo por ello el isotipo que domina en la respuesta humoral primaria. La IgM funciona como receptor celular de las células B maduras en su forma monomérica y en su forma secretada, forma homopentámeros que circulan en la sangre donde activa el complemento con eficacia. La IgD fundamentalmente se encuentra asociada a la membrana de los linfocitos B maduros y en muy bajas concentraciones circulante en sangre. Los restantes isotipos IgG, IgA e IgE son secretados y expresados en la membrana de las células B memoria (Martin *et al.*, 2014). La IgG es el isotipo más abundante en sangre y en el compartimento extravascular. Los cuatro genes para la cadena pesada corresponden con las cuatro subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cuatro subclases de IgG reciben su numeración por el orden de sus concentraciones sanguíneas siendo la IgG1 la más abundante y la IgG4 la más escasa. La IgG1, la IgG2 y la IgG4 tienen unas vidas medias en suero de 25 días aproximadamente, superiores a las de los otros isotipos (Abbas, 2015). En la tabla 1 se resumen las principales características de los diferentes tipos de inmunoglobulinas. }

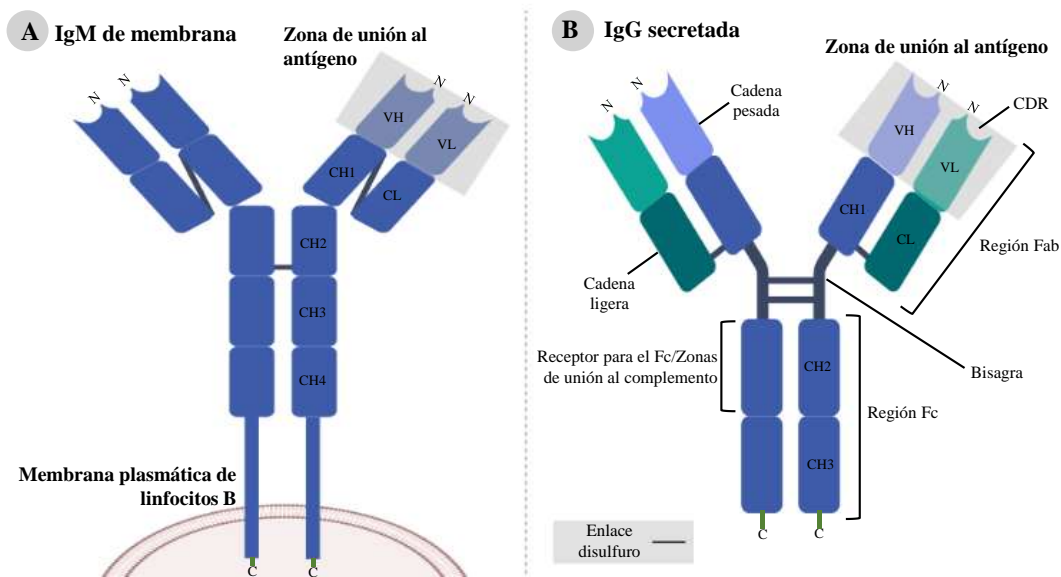
**Tabla 1.** Funciones efectoras mediadas por cada isotipo de anticuerpos. Modificada de Abbas, 2015.

Isotipo de Anticuerpo	Subtipos (Cadena H)	Concentración sérica en humanos (mg/ml)	Forma secretada	Funciones
<b>IgA</b>	IgA1 ,2 (a1 o a2)	3.5	Sobre todo, dímero; también monómero, trímero	Inmunidad de mucosas
<b>IgD</b>	Ninguno	Mínima	Monómero	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen
<b>IgE</b>	Ninguno	0.05	Monómero	Defensa contra parásitos helmintos, hipersensibilidad inmediata
<b>IgG</b>	IgG1-4	13.5	Monómero	Opsonización, activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, inmunidad neonatal, inhibición por retroalimentación de linfocitos B
<b>IgM</b>	Ninguno	1.5	Pentámero	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen (forma monomérica), activación del complemento

Los anticuerpos, son también BCR (receptor de célula B o en inglés, *B cell receptor*). Por medio de los BCR, las células B reconocen un antígeno, y generan señales intracelulares que determinarán el destino funcional de la célula B. Las señales generadas por el BCR deciden que las células B inmaduras autorreactivas inicien procesos de suicidio celular, o bien, que las células B maduras se activen e inicien su proliferación y diferenciación en células plasmáticas y células B memoria. Cuando las células B se transforman en células plasmáticas secretan Abs específicos solubles que dirigen a otras células del sistema inmune contra el antígeno (Martin *et al.*, 2014). Tanto los Abs secretados como los BCR poseen la misma estructura (Figura 3). En la estructura de los anticuerpos deben destacarse tres aspectos. En primer lugar, cada molécula monomérica de anticuerpo está formada por dos cadenas pesadas y otras dos ligeras, unidas covalentemente por puentes disulfuro (Figura 3). En segundo lugar, estas cadenas están a su vez formadas, cada una, por una serie de dominios de inmunoglobulina de estructura globular. En tercer lugar, estos dominios son de dos tipos. Los dominios variables son los responsables del reconocimiento de antígenos y son los que sufrirán



hipermutación somática. Los dominios constantes son lo que se someterán a un cambio de isotipo, que determinará su isotipo y en el caso de las cadenas pesadas las correspondientes funciones biológicas de dicha inmunoglobulina (Owen, 2014). Prácticamente toda la variación en los anticuerpos se concentra en la región variable de los mismos. Esta es la región responsable de que los anticuerpos puedan formar uniones químicas con diferentes antígenos y establezcan interacciones con ellos. La función de las regiones variables del anticuerpo es unirse al antígeno, mientras que la de las regiones constantes es desencadenar funciones efectoras específicas contra el patógeno portador del antígeno (Abbas, 2015). Entre las regiones variable y constante de la cadena pesada hay una región bisagra, que condiciona cómo una molécula de anticuerpo podrá interactuar con distintas moléculas de antígeno, pero, según se ha observado, su composición esta también relacionada con el tiempo de permanencia de estos anticuerpos en la circulación sanguínea. Los anticuerpos se unen a antígenos específicos por medio de interacciones químicas débiles de varios tipos: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, e interacciones hidrofóbicas. La suma de múltiples interacciones débiles genera una unión con alta afinidad global. Sin embargo, no se generan enlaces covalentes, lo que implica que la unión antígeno-anticuerpo será reversible (Martin et al., 2014).



**Fi-  
gura**

**3.** Estructura general de una molécula de anticuerpo. A. Diagrama esquemático de una molécula de IgM unida a la membrana en la superficie de un linfocito B. La molécula de IgM tiene un dominio CH más que la IgG, y la forma membrana del anticuerpo tiene porciones transmembrana y citoplásmica C terminales que anclan la molécula en la membrana plasmática. B. Diagrama esquemático de una molécula de IgG secretada. **CDR**, región hipervariable. **CH**, dominio constante de la cadena pesada. **CL**, dominio constante de la cadena ligera. **Fab**, fragmento de reconocimiento al antígeno. **Fc**, fragmento cristalizante. **VH**, dominio variable de la cadena pesada. **VL**, dominio variable de la cadena ligera. Modificado de Abbas, 2015; Creada con BioRender.com.



---

Si se trata una IgG de conejo con la enzima papaína en condiciones de proteólisis limitada, la enzima actúa sobre la región bisagra y escinde la IgG en tres piezas separadas. Dos de las piezas son idénticas entre sí y consisten en la cadena ligera completa (VL y CL) asociada a un fragmento V H-CH1 de cadena pesada. Estos fragmentos conservan la capacidad de unirse al antígeno, porque cada uno contiene los dominios VL y VH y se llaman Fab (fragmento de unión al antígeno, en inglés *antigen binding*) (Figura 3). La tercera pieza está compuesta de dos péptidos idénticos unidos por enlaces disulfuro que contienen los dominios de cadena pesada CH2 y CH3. Esta pieza de IgG tiene tendencia a asociarse a sí misma y a cristalizar en un enrejado, y se llama, por tanto, Fc (fragmento cristalizante) (Figura 3). Cuando se usa pepsina (en lugar de la papaína) para escindir la IgG de conejo en condiciones limitantes, la proteólisis se produce distal a la región bisagra, lo que genera un fragmento F(ab') de IgG con la bisagra y los enlaces disulfuro intercatenarios intactos y dos sitios idénticos de unión al antígeno.

Distintos genes codifican las cadenas pesadas y ligeras. El proceso por el cual se producen una amplia variedad de anticuerpos se conoce como recombinación somática, la cual es independiente de la estimulación antigénica y es la base principal que permite al sistema inmune producir anticuerpos con gran diversidad. La célula B reorganiza aleatoriamente tres *loci* distintos (Sánchez, 2010) como se muestra en la figura 4:

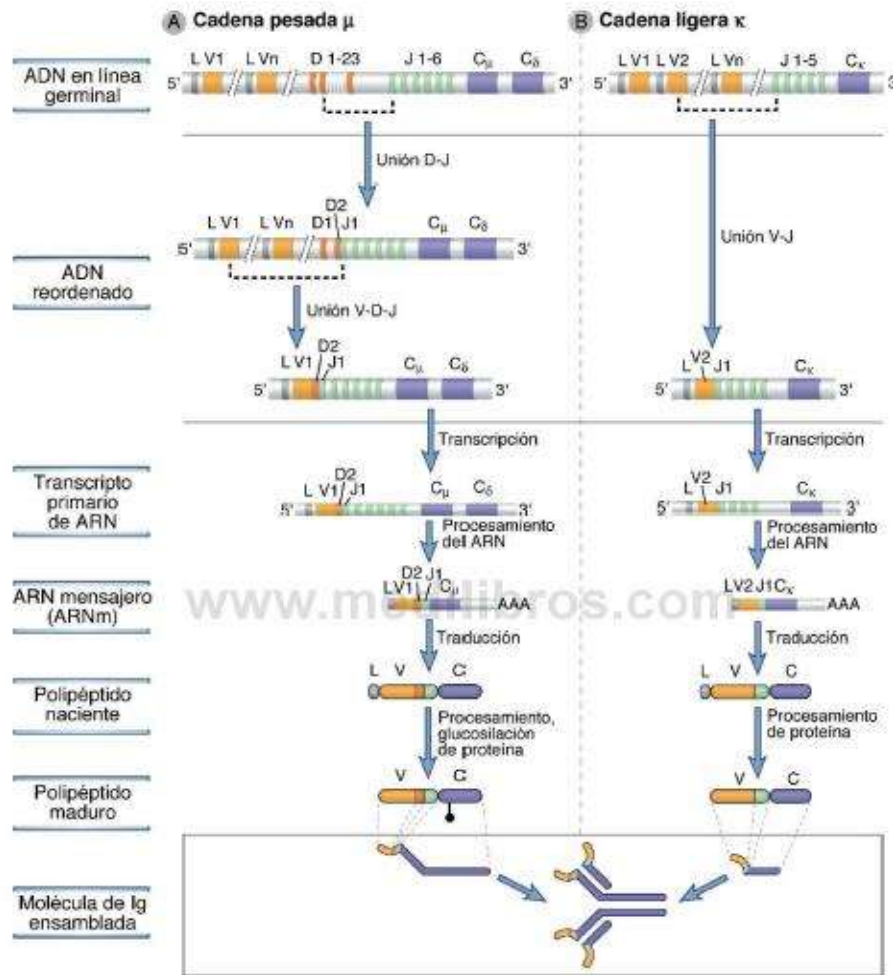
1. Locus H: codifica las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Está formado por tres grupos de genes:
  - Genes V: denominados así porque codifican variabilidad
  - Genes D: codifican la diversidad
  - Genes J: unión
2. Locus Kappa ( $\kappa$ ): codifican cadenas ligeras  $\kappa$ . Está formado por dos genes diferentes:
  - Genes V: variabilidad
  - Genes J: unión
3. Locus Lambda ( $\lambda$ ): codifican cadenas ligeras  $\lambda$ . Está formado por dos genes diferentes:
  - Genes V: variabilidad
  - Genes J: unión

---

En la especie porcina hay aproximadamente 30 genes VH, de los cuales solo 7 se usan comúnmente para formar más del 90% del repertorio de VDJ de cadena pesada; hay cinco genes DH, solo dos funcionales y, finalmente, cinco genes JH, siendo solo uno funcional (Young, 2020).

La parte constante de las cadenas pesadas en humanos, esta codificada por los genes C $\epsilon$ , C $\mu$ , C $\alpha$ , C $\gamma$ , y C $\delta$ , que codifican las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgE, IgM, IgA, IgG e IgD, respectivamente (Abbas, 2008). En el cerdo solo se han encontrado los genes C $\epsilon$ , C $\mu$ , C $\alpha$  y C $\gamma$ . Aunado a esto se han descrito ocho copias correspondientes al gen C $\gamma$  en el cerdo. El estudio de estos genes ha puesto de manifiesto, que en el cerdo existen al menos cinco subclases de IgG, que estarían codificadas por los genes C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2a, C $\gamma$ 2b, C $\gamma$ 3 y C $\gamma$ 4 (Sánchez, 2010).

La variedad de genes que codifican la cadena pesada porcina parece no ser suficiente para dar lugar a la enorme diversidad de inmunoglobulinas que se producen en la respuesta inmune. Para resolver esta aparente limitación se lleva a cabo un proceso de hipermutación somática en la región variable de la cadena ligera. El sistema inmune del cerdo crea la cadena ligera de los anticuerpos, que contiene una región variable de unión al antígeno, a partir de uno de los dos loci, lambda y kappa. El locus lambda contiene 12-13 regiones variables funcionales y 4 regiones de unión y el locus kappa contiene 14-50 regiones variables y 5 regiones de unión (Young, 2020).



**Figura 4.** Recombinación y expresión del gen de las cadenas pesada y ligera de Ig. Se muestra la secuencia de recombinación del ADN y su expresión génica en el caso de la cadena pesada de Ig (A) y la cadena ligera  $\kappa$  de Ig (B). En el ejemplo mostrado en A, la región V de la cadena pesada  $\mu$  está codificada por los exones V1, D2 y J1. En el ejemplo mostrado en B, la región V de la cadena  $\kappa$  está codificada por los exones V2 y J1. Recuperado de Abbas, 2015.

Una vez que se reorganizan los segmentos de la cadena pesada y ligera en la región variable, se expresan como un BCR que contiene dos copias de la cadena pesada, unidas a dos copias de la cadena ligera. Después la célula B sale de la médula ósea y es enviada a órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, el tejido mamario, las amígdalas y tejidos linfoides asociados al intestino (Owen, 2014).

Las células B se mueven a través de los folículos de los órganos linfoides secundarios en busca de antígenos específicos para sus BCRs. Los antígenos y quimiocinas de <70 kDa de peso molecular pueden alcanzar la zona de linfocitos B a través de conductos que se extienden entre el seno subcapsular y el folículo, e interactuar directamente con linfocitos B

---

específicos. Antígenos >70 kDa de peso molecular que entran en el ganglio a través de los vasos linfáticos aferentes no son capturados por los macrófagos del seno subcapsular ya que son demasiado grandes para entrar en los conductos. Estos antígenos pueden capturarlos células dendríticas residentes presentes en la región medular y transportarlos a los folículos, donde pueden activar los linfocitos B. Los antígenos polisacáridos pueden ser capturados por los macrófagos en la zona marginal de los folículos linfáticos esplénicos y mostrarse o transferirse a los linfocitos B en esta zona (Abbas, 2015). Estos conductos están formados por células reticulares foliculares (frc) envueltas alrededor de fibras de colágeno, y las células B son capaces de tener acceso a su contenido por medio de poros en los lados de los conductos (Owen, 2014).

La interacción con el antígeno, el cual será específico para cada célula B, puede ocurrir de dos maneras diferentes (Owen, 2014):

1. Con mayor frecuencia, las células B interactúan con el antígeno presentado a través de células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen presenting cell*), como los macrófagos o las células dendríticas
2. Reconocimiento directo del antígeno a través del BCR. El antígeno se endocita, se procesa y luego se presenta en la superficie de la célula a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II).

El reconocimiento del antígeno puede activar a la célula B; sin embargo, una activación óptima implica interacciones con células T CD4<sup>+</sup> o linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores, interactúan con los linfocitos B, activándolos, a través de la liberación de citocinas y el contacto con moléculas coestimuladoras que se encuentran en la superficie de las células T, como es el CD40L. La interacción con células T, mejora y amplifica la respuesta de las células B al antígeno, estimulando la proliferación, expansión clonal y cambio de isotipo (Young, 2020).

Tras la activación, la célula B tiene dos rutas, convertirse en célula B de memoria de larga duración o en una célula plasmática secretora de anticuerpos de corta duración. Ambos resultados son esenciales para el desarrollo de una inmunidad humoral adecuada y protectora. Cuando se estimula inicialmente, por el antígeno y por citocinas provenientes de células T auxiliares CD4<sup>+</sup>, la célula B inmadura tiene una IgM como su BCR. Después de la activación

---

y estimulación pasa por una mitosis rápida, creando numerosos clones de sí misma. Algunos de estos clones se convierten en células plasmáticas, secretando IgM específica de antígeno, diseñada para unir múltiples antígenos. Otras células B IgM<sup>+</sup>, con la correcta estimulación por parte de células Th, se convertirán en células B de memoria de larga duración, lo que a menudo implica el cambio de clase a inmunoglobulina, IgD, IgG, IgE o IgA, cada una de las cuales tiene propiedades únicas y áreas específicas de circulación (Owen, 2014). Estas células B de memoria mantienen las cadenas ligeras originales específicas de antígeno, pero cambian la región constante de la cadena pesada. Cuando estas células B de memoria se reactivan, por reestimulación durante infecciones repetidas posteriores, las células se convierten en células plasmáticas específicas de antígeno, con un nuevo isotipo, de una manera mucho más eficiente. Durante este proceso, los genes de las cadenas pesada y ligera de cada célula B pasan por una hipermutación somática casi constante, donde, a través de la actividad enzimática por la desaminasa inducida por activación (AID) y la replicación de ADN propensa a errores, los pares de bases se cambian y mutan. Esta mutación aleatoria puede, en raras ocasiones, conducir a la maduración por afinidad del BCR y el anticuerpo secretado, mejorando la respuesta, la unión y el reconocimiento al antígeno. Estas células B de memoria de larga duración persisten en sangre y órganos linfoides, a menudo durante toda la vida de un cerdo, y son importantes para la protección a largo plazo (Young, 2020).

En el caso de la infección por PRRSV se desarrolla una respuesta humoral inicial, rápida y fuerte, donde los anticuerpos no confieren protección e incluso pueden ser dañinos, debido a un mecanismo conocido como “mejora dependiente de anticuerpos” (ADE por sus siglas en inglés), en el cual, los anticuerpos específicos de PRRSV no neutralizantes pueden aumentar las tasas de infección, uniéndose al virus y dejando la fracción Fc libre. Los macrófagos se unirán al fragmento Fc de la inmunoglobulina e inducirán la entrada del virus a la célula. En sueros de cerdos infectados se han encontrado diferentes clases de anticuerpos (Hipra, SA, 2019):

- Ab IgM anti-PRRSV a los cinco días post-infección, sin embargo, resultan indetectables a partir de la segunda semana.
- Ab IgG anti-PRRSV entre los 7 -10 días post-infección con incremento en las segunda y cuarta semanas.

- 
- Ab IgA anti-PRRSV son detectados a partir de los 14 días post-infección con máximos a los 25 días hasta que desaparecen al mes aproximadamente.

### 3.10. Anticuerpos neutralizantes

Los NAbs son uno de los componentes más importantes en la inmunidad adaptativa natural y artificial, mediada por vacunas, contra las infecciones virales. La neutralización se puede definir como pérdida de infectividad, que se produce cuando la(s) molécula(s) de un anticuerpo se unen a una partícula del virus. Como requisito mínimo para la neutralización, los parátomos (sitios de unión al antígeno) de los Abs deben interactuar con los epítomos de los antígenos (Ags) virales. Desde una perspectiva estructural, los epítomos y paratopes pueden definirse como un conjunto de átomos en el Ag y el Ab, respectivamente, que están en contacto formando un complejo (Klasse y Sattentau, 2002).

Los anticuerpos tienen diferentes funciones efectoras, principalmente mediadas por la región Fc:

- Neutralización: la unión específica de un anticuerpo con su antígeno puede causar la neutralización viral, al bloquear la unión del virus a receptores de la célula y/o al inhibir cualquier cambio conformacional requerido para la fusión de la membrana viral o la liberación de viriones de la progenie (Zheng et al., 2019). Por lo tanto, el virus no es capaz de infectar a las células blanco.
- Toxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*): se produce cuando la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG (que a su vez está unida a los antígenos virales en la superficie de una célula infectada), se unen al receptor gamma IIIa (FcγRIIIa) de las células efectoras innatas como las células NK, los monocitos y los macrófagos. Esto conduce a la activación de una vía de señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup>, lo que provoca la liberación de gránulos citotóxicos y la apoptosis de las células blanco infectadas. La unión de la fracción Fc al receptor FcγRIIIa de las células efectoras, también induce la secreción de importantes citocinas antivirales (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ). Juntos, estos procesos pueden promover un entorno antiviral en el que se puede reducir la replicación del virus (Vanderven et al., 2017).
- Activación del complemento mediada por anticuerpos (ADC, *antibody-mediated complement activation*): El sistema del complemento está compuesto por más de 50

---

proteínas y receptores plasmáticos. Varias proteínas del complemento que se encuentran en la sangre circulan normalmente como precursores inactivos, que, al ser activados, inician una cascada proteolítica, lo que resulta en la liberación de mediadores de la inflamación, opsoninas y formación del complejo de ataque de membrana (MAC, por sus siglas en inglés) que provoca la lisis de microorganismos y/o células infectadas. El mecanismo dependiente de anticuerpos se da mediante la activación de la vía clásica del complemento que se inicia con la unión del componente C1q a los complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de los patógenos o mediante la unión directa de C1q a la proteína del virión mismo, lo que desencadena una serie de procesos como la deposición del MAC, causando la lisis de partículas virales envueltas y de células infectadas (Conde et al., 2017).

- Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, *antibody-dependent cellular phagocytosis*): las células del sistema inmune implicados en la ADCP deben expresar algún tipo de receptor para la región Fc de la inmunoglobulina. Entre las células que expresan estos receptores se encuentran monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (referidos como fagocitos profesionales). El fagocito puede ser activado directamente a través del receptor Fc o indirectamente a través de la unión del complemento al anticuerpo, facilitando la entrada de una o más partículas opsonizadas como patógenos y células infectadas. La internalización en la mayoría de los casos conduce a la destrucción de la partícula internalizada debido a su degradación en las fagolisosomas, aunque algunos patógenos han desarrollado mecanismos para sobrevivir dentro de los fagolisosomas. Dependiendo del tipo de célula, la fagocitosis mediada por anticuerpos conduce a diferentes resultados. En los macrófagos se potencializa su activación y resulta en el aumento de la destrucción de patógenos y presentación de antígenos. En las células dendríticas, conduce a una mayor secreción de IFN $\alpha$  (Tay et al., 2019)
- Inhibición de virus mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCVI, *antibody-dependent cell mediated virus inhibition*): es una medida de la actividad antiviral inducida por receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), ocurre cuando la fracción Fc del anticuerpo que está unido a células infectadas por virus, se une a células efectoras que expresan Fc $\gamma$ R, como las como las NK, los monocitos o los macrófagos. Esto da como

---

resultado la inhibición del virus debido por una parte a la muerte de la célula infectada y por otra parte debido a la liberación de diferentes citocinas. La actividad de anticuerpos ADCVI se ha asociado con la protección contra una gran cantidad de infecciones virales (Forthal et al.,2013).

- Inhibición de la transcitosis mediada por anticuerpos (antibody-mediated transcytosis inhibition): La transcitosis o transporte transcelular es un conjunto de procesos que permiten el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro, es decir, desde un dominio de membrana a otro distinto, mediante la formación de vesículas. Por ejemplo, en el virus del VIH-1 el anticuerpo se une al virus, bloqueando su adherencia a las células epiteliales para prevenir la transcitosis o por medio de la neutralización del virus dentro de las células epiteliales, redirigiéndolo hacia el compartimiento apical (Chomont et al.,2008).

Para PRRS, solo se ha sugerido un tipo de anticuerpo neutralizante, el cual inhibe la entrada del virus a la célula. Estos Abs, generalmente se encuentran a partir del día 28, aunque la respuesta inmune depende de cada individuo, presentándose siempre de manera diferente (López y Osorio *et al.*, 2004).

Los NAbs dirigidos contra la proteína GP5 son muy importantes para contrarrestar o prevenir la infección con PRRSV ya que su aparición en un cerdo infectado coincide con la eliminación del virus en la sangre.

Otras proteínas del PRRSV, en particular la proteína M y GP4 (en el genotipo europeo 1) también contienen epítomos inductores de anticuerpos neutralizantes. Los NAbs, contra PRRSV y otros virus se han reportado por varios autores (Tabla 2), a partir de la cuarta semana post-infección en títulos bajos (López y Osorio *et al.*, 2004).

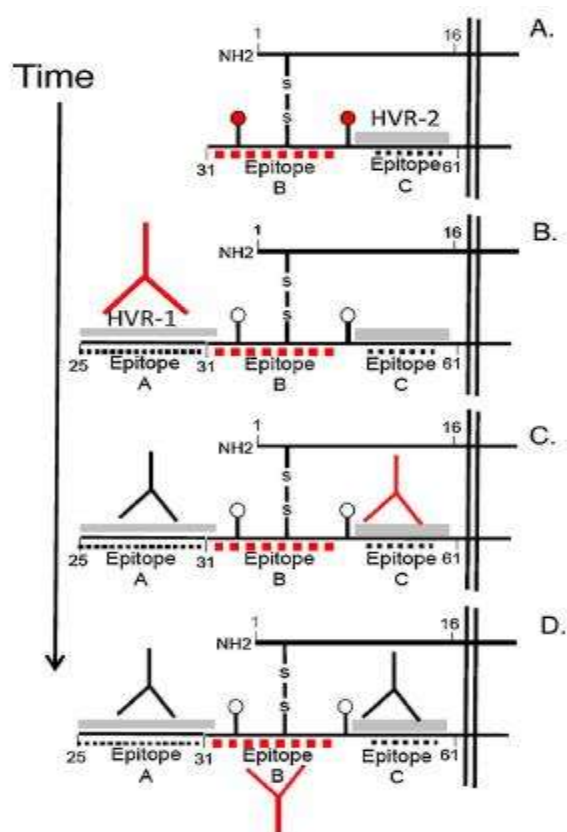


**Tabla 2.** Participación de los anticuerpos neutralizantes (NAb), en la protección contra enfermedades virales.

Participación de NAb	Virus	Cita
<b>NAb previenen o bloquean la viremia.</b>	PRRSV	Yoon <i>et al.</i> ,1996; Osorio <i>et al.</i> ,2002
<b>Aparición de NAb contra GP5, se correlaciona claramente con la desaparición de la viremia</b>	PRRSV	Murtaugh <i>et al.</i> , 2003
<b>Inmunización con proteínas GP5 y M de PRRSV confieren cierto grado de protección, y esto se correlaciona con la aparición de NAb</b>	PRRSV	Bastos <i>et al.</i> , 2004; Pirzadeh y Dea, 1998
<b>Cerdas expuestas repetidamente al PRRSV tuvieron una alta actividad neutralizante del suero. Los sueros neutralizaron cepas de PRRSV muy diversas y genotípicamente distintas</b>	PRRSV	Robinson <i>et al.</i> ,2015
<b>En el virus de la arteritis equina (EAV), la aparición de NAb en suero coincide con la eliminación del virus de la circulación</b>	EAV	Hammond <i>et al.</i> , 1997
<b>Para muchos virus que afectan a diferentes especies y que involucran infecciones por diferentes vías, existe una buena correlación entre la actividad neutralizadora de los anticuerpos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b>	VIH-1, Dengue, Ébola, Virus sincitial respiratorio (RSV) y Virus de la fiebre amarilla	Burton, 2002
<b>Los anticuerpos ampliamente neutralizantes presentan nuevas perspectivas para contrarrestar virus antigénicamente diversos</b>	VIH, influenza y hepatitis C	Burton <i>et al.</i> ,2012
<b>Anticuerpo monoclonal con una potente capacidad de neutralización cruzada contra diferentes glicoproteínas (GP) de ebolavirus</b>	Ébola	Fan <i>et al.</i> ,2020
<b>Anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos</b>	SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV	Jiang <i>et al.</i> ,2020; Wajenberg <i>et al.</i> ,2020

Los NAb contra la proteína GP5 están dirigidos hacia la región del ectodominio, más específicamente a dos epítopos, separados por 7 aminoácidos solamente. De estos dos epítopos uno funciona como un epítipo señuelo, induciendo una fuerte respuesta inmune humoral con

altos títulos de Abs no neutralizantes y disminuye la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el epítipo cercano (epítipo B). El principal epítipo responsable de la actividad neutralizante ha sido identificado como epítipo B (Figura 5A), el cual es reconocido por un anticuerpo neutralizante monoclonal (López y Osorio *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Modelo que ilustra el bloqueo de un epítipo ampliamente neutralizante mediante anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Recuperado de Popescu *et al.*, 2017.

El ectodominio de 61 aminoácidos que se encuentra en la proteína GP5 del PRRSV tipo II, tiene dos regiones hipervariables: (HVR) -1 y HVR-2. HVR-1 contiene una secuencia señal que posee dos sitios de escisión del péptido. Se ha identificado que el sitio de escisión preferido es en la posición 31, con un sitio de escisión alternativo situado corriente arriba en la posición 27. La secuencia polipeptídica creada por la escisión en la posición 27 expone HVR-1, que contiene al epítipo A (Figura 5B). Probablemente, la hipervariabilidad dentro del epítipo A le permite funcionar como un señuelo inmunológico que estimula continuamente la activación de nuevas células B (Ostrowski *et al.*, 2002). La aparición del anticuerpo dirigido contra el Epítipo B selecciona las mutaciones en HVR-1, lo que resulta en la selección

---

preferencial del sitio de división de la señal del péptido en la posición 27. La segunda región hipervariable, HVR 2, está ubicada justo debajo del epítipo B, contiene un tercer epítipo denominado como epítipo C. Anticuerpos neutralizantes homólogos que se dirigen al epítipo C, aparecen varias semanas después de la infección. La interacción de los anticuerpos con el epítipo C, bloquea aún más el reconocimiento del epítipo B, pero es eficaz para reducir la viremia (Figura 5C). Las mutaciones en HVR-2 resultan en el escape de la neutralización y la reaparición de la viremia. La región donde se encuentra el epítipo B es altamente conservada, además contiene dos sitios de N-glicosilación también conservados, en las posiciones 44 y 51. A través del tiempo, aparecen anticuerpos con actividades heterólogas y ampliamente neutralizantes (Figura 5D). El escape final de anticuerpos heterólogas y ampliamente neutralizantes se produce a través de cambios conformacionales más grandes en GP5, M y otras proteínas virales (Popescu *et al.*, 2017).

La importancia de los anticuerpos neutralizantes en la inmunidad protectora se ha demostrado con otros arterivirus, por ejemplo, la protección contra el virus de la arteritis equina (EAV, por sus siglas en inglés), el prototipo del grupo de arterivirus, está mediada principalmente por NAbs. La aparición de NAbs en el suero coincide con la eliminación del virus de la circulación. Los anticuerpos neutralizantes en este caso se dirigen principalmente contra la glucoproteína GL (el homólogo de EAV para GP5 de PRRSV). GL tiene un ectodominio de alrededor de 100 aminoácidos. El principal epítipo neutralizante en esta glicoproteína se encuentra dentro de la segunda mitad del ectodominio hidrófilo N-terminal entre los aminoácidos 99-106. La inmunización con una vacuna recombinante que comprende los aminoácidos 18-122 de GL indujo la producción de anticuerpos neutralizantes. Después del desafío, se encontró una correlación entre el nivel de NAbs y el grado de protección, confirmando la importancia tanto de los epítipos neutralizantes como de los anticuerpos neutralizantes en la protección contra EAV (López y Osorio 2014).

### **3.11. Inmunodominancia**

El fenómeno por el cual el sistema inmunitario del huésped responde solo a algunos de los muchos epítipos posibles en una proteína extraña se denomina inmunodominancia (ID). Para comprender mejor este concepto hay que definir primero que es un epítipo. Un epítipo es la porción específica de un antígeno macromolecular al cual se une un anticuerpo (Abbas 2015).

---

Las dimensiones de los epítomos pueden variar según una serie de factores complejos, pero una guía general considera de 6 a 12 aminoácidos (en las proteínas), y este puede ser presentado para que se generen anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (Angeletti *et al.*, 2017).

En el caso de un antígeno proteico reconocido por un linfocito T, un epítomo es la porción peptídica que se une a una molécula del MHC para ser reconocida por el TCR. Por otra parte, un epítomo inmunodominante se puede definir como el epítomo de un antígeno proteico que desencadena la mayor parte de la respuesta en un sujeto inmunizado con la proteína natural. Los epítomos inmunodominantes corresponden a los péptidos de la proteína que se generan mediante proteólisis dentro de la APC y se unen con más avidez a las moléculas del MHC II y tienen más probabilidades de estimular a los linfocitos T (Abbas 2015).

La ID es un fenómeno complejo de inmunogenicidad que es diferente para cada inmunógeno, incluso es diferente entre epítomos dentro del mismo inmunógeno. En la actualidad se sabe poco acerca de la ID de células B y anticuerpos. El desarrollo de vacunas de nueva generación para virus antigénicamente variables, se basan en atacar regiones conservadas de proteínas virales, con el fin de evitar que la respuesta inmune se dirija contra epítomos con alta variación genética (Angeletti *et al.*, 2017).

Algunos péptidos inmunogénicos, contienen epítomos dominantes que provocan respuestas más fuertes, denominados determinantes "inmunodominantes" (IDD), estos, son reconocidos por las poblaciones de células T y B afines más abundantes. Otros péptidos inmunogénicos inducen respuestas más débiles y se denominan determinantes "subdominantes" los cuales son reconocidos por las poblaciones de células T y B menos abundantes. Las respuestas antivirales a los determinantes inmunodominantes y subdominantes forman una jerarquía ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, etc.) que es notablemente reproducible entre individuos (Yewdell, 2006).

Existen varios factores que influyen en el dominio o subdominio de un péptido, incluyendo la afinidad de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la estabilidad del complejo MHC-péptido, el procesamiento y la presentación de antígenos, y el repertorio de receptores de células T y B. A pesar de estas reglas, la jerarquía de epítomos ha resultado ser muy dinámica. El concepto de inmunodominación implica que la inmunodominancia y el subdominio son cuestiones contextuales; es decir, el lugar de un epítomo dado en la jerarquía depende de otros epítomos (Van Der Most *et al.*, 2003).

---

De tal manera que la ID se puede definir como una jerarquía de respuestas a diferentes epítomos. Sin embargo, una característica clave de la ID, que a menudo se pasa por alto, es que la eliminación de una secuencia dominante permite que el huésped responda con mayor fuerza a los epítomos previamente subdominantes y cualquier explicación mecanicista de la ID se debe abordar desde cómo la presencia de un epítomo dominante limita las respuestas inducidas por epítomos subdominantes. Los efectos de la ID ocurren no solo durante las infecciones virales sino también durante la vacunación. Una vacuna que podría inducir respuestas a todos los epítomos, dominantes y subdominantes, podría ser más eficaz que las vacunas convencionales. Por lo tanto, una comprensión completa de los mecanismos que subyacen a la ID puede permitir el diseño de vacunas que induzcan respuestas inmunes mucho más amplias (Rodríguez *et al.*, 2002). El problema con PRRSV y en particular con la proteína GP5, es que posee epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Los anticuerpos no neutralizantes incluso pueden llegar a ser perjudiciales para el hospedero. Además, el conocimiento que se tiene de los epítomos inmunodominantes de GP5 es escaso, de ahí la importancia de estudiar la inmunodominancia de estos epítomos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En la última década, el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) ha sido causa de graves pérdidas económicas en la industria porcícola en todo el mundo. El conocimiento que se tiene sobre los fenómenos que suceden en la interacción entre el PRRSV y la respuesta inmune humoral del cerdo es escaso. El virus es capaz de modular la respuesta inmune del cerdo para favorecer su persistencia en animales infectados, pero los mecanismos inmunológicos específicos se desconocen. Las vacunas existentes contra PRRSV han mostrado una capacidad limitada de protección.

La proteína GP5 del virus es altamente inmunogénica, pero se conoce muy poco sobre los epítomos inmunodominantes y el tipo de anticuerpos que genera. Ante esta problemática, es necesario realizar nuevos estudios para identificar las subunidades de la proteína GP5 suficientes para inducir anticuerpos neutralizantes y limitar la replicación viral. Por ello, en el presente estudio se evaluó la respuesta adaptativa humoral generada por tres péptidos que contienen epítomos de reconocimiento para linfocitos B, sintetizados a partir de la secuencia de la proteína GP5 del PRRSV.

---

Este tipo de estudios nos acercan a comprender las bases moleculares de la interacción de los epítomos inmunodominantes con los elementos de la respuesta inmune humoral, permitiéndonos comprender la relación entre la inmunodominancia de péptidos de GP5 de PRRSV y la respuesta inmune antiviral.

## **5. HIPÓTESIS**

Los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3 serán capaces de inducir una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos neutralizantes.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta inmune adaptativa humoral en respuesta a tres péptidos que contengan epítomos de reconocimiento para linfocitos B, generados a partir de la proteína GP5 del virus PRRS, denominados GP5B1, GP5B2 y GP5B3.

## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar la producción de anticuerpos totales y específicos contra los antígenos GP5B1, GP5B2 y GP5B3 en un modelo murino.
2. Evaluar la producción de anticuerpos neutralizantes a partir de la inmunización de ratones con los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3.
3. Comparar la inmunodominancia entre los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Ratones:**

Se utilizaron ratones Balb/c (Harlan, Indianapolis, IN), de entre 6-9 semanas, con un peso de entre 22-25 g. IN). Se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 1$  ° C) a una humedad del 50% en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h: 12 h y alimento (Purina Certified Rodent Chow) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos de manejo y cuidado se

---

realizaron de acuerdo con el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, EEE.UU.) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999.

### **8.2. Obtención de muestras sanguíneas**

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de los ratones a través de punción de la vena caudal. La punción se realizó con agujas de 0.80 mm de diámetro, los ratones se sujetaron con un dispositivo de inmovilización de fabricación casera. La sangre fue recolectada por capilaridad con pipetas Pasteur humedecidas con EDTA [500 mM] pH 8. Finalmente, por centrifugación se obtuvieron los sueros control y experimental.

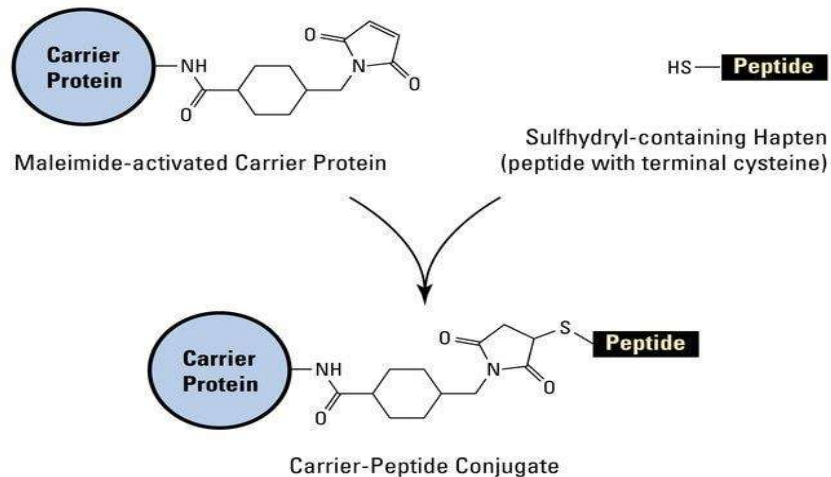
### **8.3. Inmunizaciones**

Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea con los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3, realizando un seguimiento de los ratones a través del tiempo, con periódicas tomas de muestra sanguínea.

Esquema de inmunizaciones:

- Día 0: se obtuvo el suero preinmune (control) y se realizó la 1ra inmunización.
- Día 15: se obtuvo el suero de la 1ra inmunización y se hizo una 2da inmunización
- Día 30: se obtuvo el suero de la 2da inmunización y se hizo una 3ra inmunización.
- Día 45: se obtuvo el suero de la 3ra inmunización y se procedió al sacrificio del ratón para recuperar sangre periférica.

Las inmunizaciones se realizaron con un conjugado formado por el péptido y una proteína acarreadora, albúmina sérica bovina activada con maleimida (inject Maleimide Activated BSA- que se denominará como BSA-maleimida). El conjugado se generó por medio de una reacción de acoplamiento mediada por un grupo -SH en el extremo C-terminal del péptido y un grupo imida presente en la proteína acarreadora, dando como resultado un acoplamiento estable, según especificaciones del proveedor (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida. Recuperado de Novo Biotechnology, 2015.

Este conjugado fue mezclado con adyuvante completo de Freund. Se usaron, 30  $\mu$ l de péptido [1mg/ml], 30  $\mu$ l de BSA-maleimida [1 mg/ml] (imject Maleide Activated BSA de Thermo-fisher) y 60  $\mu$ l de adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich), para la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores se sustituyó el adyuvante completo por adyuvante incompleto de Freund; con un volumen total de 120  $\mu$ l para cada ratón.

#### 8.4. Péptidos

Se diseñaron tres péptidos denominados como GP5B1, GP5B2 y GP5B3. El péptido GP5B3 está constituido por la mezcla de epítomos neutralizantes de los péptidos GP5B1 y GP5B2. Los péptidos diseñados presentaron las siguientes características:

- Sintéticos
- Generados a partir de la proteína GP5
- Epítomos de reconocimiento para linfocitos B
- Alto grado de homología entre cepas
- Longitud de 27-32 aminoácidos

##### 8.4.1. Análisis bioinformático

Actualmente existen varias herramientas computacionales que nos permiten diseñar péptidos a partir de una proteína, entre estos se encuentra el *Immuno Epitope Data Base* (IEDB, por sus siglas en inglés). Es un recurso disponible gratuitamente financiado por el NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), el cual cataloga datos experimentales



---

sobre epítomos reconocidos por anticuerpos y células T estudiados en humanos, primates y otras especies animales. Incluye más del 95% de todas las enfermedades infecciosas, alergias, autoinmunidad y trasplantes. El IEDB también posee herramientas para la predicción y análisis de epítomos.

El método general usado por el IEDB para el análisis de epítomos a partir de secuencias de proteínas se basa en parámetros tales como la hidrofiliidad, accesibilidad, polaridad y antigenicidad de las cadenas de polipéptidos que además correlaciona con la ubicación de epítomos continuos. Esto ha llevado a una búsqueda de reglas empíricas que permitan predecir la posición de los epítomos continuos a partir de ciertas características de la secuencia de proteínas. Todos los cálculos de predicción se basan en escalas de propensión para cada uno de los 20 aminoácidos. Cada escala consta de 20 valores asignados a cada uno de los residuos de aminoácidos en función de su propensión relativa a poseer la propiedad descrita por la escala.

**Hidrofiliidad:** Proporciona una medida de la afinidad de los distintos aminoácidos a ambientes acuosos. Para este método el programa construye una escala hidrofílica basada en los tiempos de retención de los péptidos durante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna de fase inversa.

**Antigenicidad:** Se define como la capacidad del antígeno de ser reconocido por anticuerpos y/o receptores de células B. El programa hace uso de un método empírico en el cual se utilizan las propiedades fisicoquímicas de los residuos de aminoácidos y su frecuencia de aparición en los epítomos segmentarios conocidos experimentalmente para predecir los determinantes antigénicos en las proteínas. Este método se ha aplicado a una gran cantidad de proteínas por diversos autores, demostrando que el método puede predecir los determinantes antigénicos con aproximadamente un 75% de precisión, lo cual es superior a la mayoría de los métodos conocidos

**Epítomos de reconocimiento para linfocitos B:** Porción del péptido que será reconocido principalmente por anticuerpos y BCRs. El programa predice la ubicación de los epítomos lineales estimando características fisicoquímicas de los aminoácidos en la cadena polipeptídica. Las características que se toman en cuenta son hidrofiliidad, área superficial accesible, formación de hojas beta plegadas y flexibilidad. La probabilidad se estima utilizando una combinación de un modelo de Markov y un método de escala de propensión. Predice si los

---

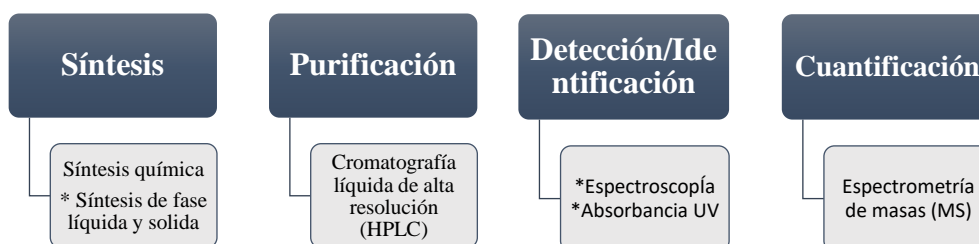
residuos con puntuaciones superiores al umbral (0.35) forman parte de un epítipo y se colorean en amarillo en el gráfico (donde los ejes Y representan las puntuaciones de residuos y las posiciones de residuos de los ejes X en la secuencia).

Es importante destacar que además de las herramientas empleadas por el software, se hizo un análisis exhaustivo en la literatura sobre los epítipos de la proteína GP5 de PRRSV, que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, tomando en cuenta además si estos estaban o no conservados dentro de la secuencia de la proteína, para poder determinar cuáles serían los mejores candidatos.

#### 8.4.2. Síntesis de péptidos

La síntesis de los péptidos fue realizada por Genscript Biotech Corporation, empresa de biotecnología global.

La síntesis, caracterización y aplicación adecuada de los péptidos requieren métodos analíticos específicos. En la actualidad se utilizan diversos métodos para aislar, purificar, detectar y cuantificar todo tipo de péptidos. Sin embargo, algunos son más específicos dependiendo de la naturaleza del péptido y sus aplicaciones. En particular para la síntesis de GP5B1, GP5B2 y GP5B3 se siguió el siguiente esquema:

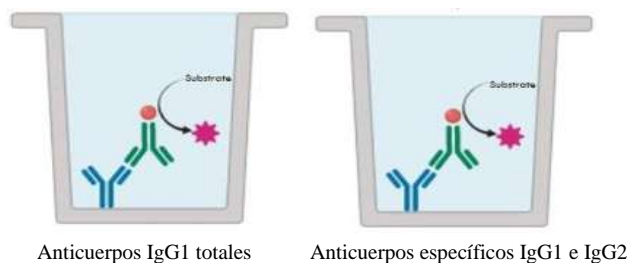


## 8.5. Detección de anticuerpos totales y específicos contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3

Se realizó la inmunización de ratones Balb/c con los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3. Posteriormente se obtuvieron las muestras sanguíneas, de las cuales, por centrifugación, se obtuvieron los sueros control y experimental.

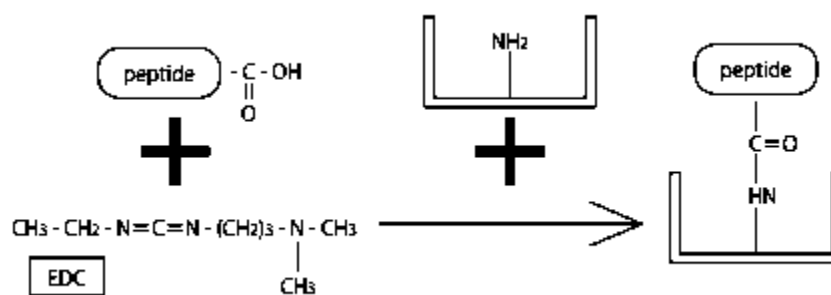
Se utilizó la técnica Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para la cuantificación total de inmunoglobulinas del tipo G1 (IgG1) (Figura 7).

La ELISA directa se realizó en placas de 96 pocillos de alta unión (EIA/RIA Plate, 96 well) de la marca COSTAR No. Cat. 3361. En la placa se colocó 1 µl los sueros de ratones (para que los anticuerpos presentes en el suero se unieran a la superficie de cada pozo) y 99 µl de buffer de carbonatos, se dejó incubando durante toda la noche, al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05% y se realizó un bloqueo utilizando BSA [10 mg/ml] suspendida en PBS/Tween 0.05% y se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente (TA) en oscuridad, transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05% seguido de la adición del anticuerpo anti IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) y se incubó nuevamente 3 horas a TA en oscuridad. Después se volvió a realizar 3 lavados con PBS/Tween 0.05% y se adicionó 100 µl de ABTS (sustrato para la reacción enzimática). Finalmente se cuantificó la intensidad colorimétrica catalizada por la enzima HRP del conjugado que se unió a los anticuerpos IgG1 en los sueros de los ratones, realizando lecturas cada 5 minutos a 415 nm en el lector microlector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader).



**Figura 7.** Esquema de los ensayos de ELISA para la cuantificación de IgG totales e IgG1. Creada con BioRender.com.

La detección de IgG específicas de antígeno se realizó mediante ELISA indirecta. Primero, cada péptido se adhirió a la superficie de la placa de ELISA utilizando el kit comercial Takara Peptide Coating Kit, No. Cat. MK100, según especificaciones del fabricante. Peptide Coating Kit permite unir eficientemente proteínas de bajo peso molecular o péptidos sintéticos que fuesen de difícil adsorción en placas comunes, por medio de la unión de los grupos carboxilo (-COOH) libres en los péptidos a los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) del fondo de la superficie de la microplaca (Figura 8), además se adicionaron 10 µl de solución de acoplamiento que incluye el kit y se incubaron toda la noche en oscuridad. Posteriormente se hicieron 3 lavados con agua tridestilada, se agregaron 200 µl de la solución de bloqueo, y se dejó incubando durante 2 horas a TA. Transcurrido el tiempo se hicieron otros 3 lavados con agua tridestilada, se colocaron 99 µl de PBS/gelatina 0.1% y se adicionaron los sueros pre-inmunes y los sueros obtenidos 45 días post-inmunización y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05% seguido de la adición del anticuerpo (se utilizó por separado los conjugados anti IgG1 e IgG2 con HRP) y se incubó nuevamente 3 horas a TA en oscuridad. Después se volvieron a realizar 3 lavados con PBS/Tween 0.05% y se adicionaron 100 µl de ABTS (sustrato para la reacción enzimática). Finalmente se cuantificó la intensidad colorimétrica catalizada por la enzima HRP del conjugado que se unió a los anticuerpos IgG1 o IgG2 (según el caso) en los sueros de los ratones, realizando lecturas cada 5 minutos a 415 nm en el lector microelector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader).



**Figura 8.** Esquema del acoplamiento del péptido a la placa de forrado. Tomado de Takara Bio Inc. Manual peptide coating kit.

---

## 8.6. Análisis estadístico

### 8.6.1. Análisis de anticuerpos

Los datos representan la media de tres repeticiones de cada suero (replicas técnicas) de siete animales (replicas biológicas) por grupo, y se expresan como media  $\pm$  S.E.M.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía para evaluar si había diferencias entre las medias de todos los grupos. Después se hizo una prueba de Tukey para determinar qué medias eran diferentes con respecto de los controles (ratones inmunizados con BSA-maleimida).

Se hicieron también comparaciones (dentro de los grupos) de los sueros pre-inmunes contra los sueros del día 45 post inmunización, mediante una prueba de Tukey, para determinar si eran diferentes.

Finalmente se hizo una comparación de las medias de los resultados obtenidos de cada epítopo mediante una prueba de t de Student.

Las diferencias con  $P < 0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Se utilizó el software GraphPad PRISM V8, para el análisis estadístico y la elaboración de gráficas.

## 8.7 Líneas celulares

**PK15 SIALOADESINA+/ CD163+**: Células epiteliales de riñón de cerdo que expresan, de forma recombinante, los receptores de PRRSV sialoadhesina (Sn) y CD163 indispensables para la entrada del virus en macrófagos. Las células expresan de manera constitutiva el plásmido pcADN3.1D / V5-HisTOPO que contiene el ADNc de Sn y un plásmido pBUD con ADNc de CD163. Por lo tanto, es susceptible a PRRSV.

Estas células fueron donadas por el Dr. Hans Nauwynck de la Universidad de Gante en Bélgica. Las células se propagaron en cajas para cultivo celular de 100 mm, con 6 ml de medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 0.5%. Se incubaron en una estufa de cultivo en condiciones estándar: 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Los lavados se realizaron con PBS. Las células se criopreservaron con SFB y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se almacenaron a -80°C.

---

**MARC-145:** Línea celular de riñón embrionario de mono verde africano que se propagó a partir de la subclona MA104. Tienen morfología epitelioide. Expresan de forma recombinante el receptor CD163 que utiliza PRRSV para la entrada en macrófagos. Las células fueron sembradas en cajas para cultivo celular de 100 mm, con 6 ml de medio DMEM alto en glucosa suplementado con SFB al 10% y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 0.5%. Se incubaron en una estufa de cultivo en condiciones estándar: 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Los lavados se realizaron con PBS. Las células se criopreservaron con SFB y DMSO al 10% y se almacenaron a -80°C.

## **8.8. Clona infecciosa de PRRSV**

### **8.8.1. Preparación de bacterias competentes**

La preparación de bacterias competentes fue realizada como se describe en Chang *et al.*, 2017. Se usaron las células supercompetentes **SURE 2** (Stratagene) que tienen una alta eficiencia de transformación y además detienen los eventos de reordenamiento genético no deseados en los plásmidos utilizados para clonación, especialmente de plásmidos mayores a 6 Kb. La cepa SURE 2 carece de ciertos componentes de las vías que catalizan el reordenamiento y la eliminación de estructuras secundarias y terciarias no estándar, que ocurren con frecuencia en el ADN eucariota y que impiden la clonación del ADN eucariota en cepas convencionales. Las células SURE 2 tienen restricción de algunos alelos (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR-) y son deficientes de endonucleasa (endA) y recombinación (recB recJ). Son resistentes a kanamicina, tetraciclina y cloranfenicol.

Se utilizó el método de cloruro de calcio para generar bacterias SURE2 competentes y transformación por medio de choque térmico (Chang *et al.*, 2017). Tres buffers fueron preparados para la generación de bacterias competentes:

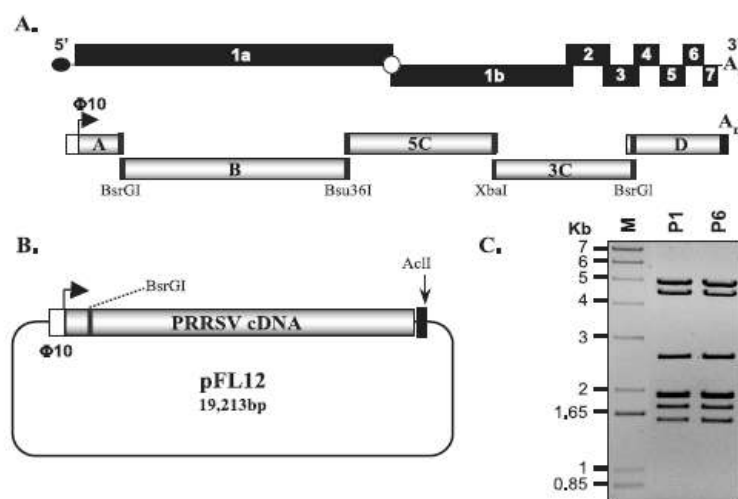
1. CaCl<sub>2</sub> 1M (solución concentrada 10x)
2. CaCl<sub>2</sub> 0.1M (solución de trabajo)
3. CaCl<sub>2</sub> 0.1M + Glicerol al 15% (solución de trabajo).

Todas las soluciones fueron filtradas con membranas de 22µm y guardadas en refrigeración.

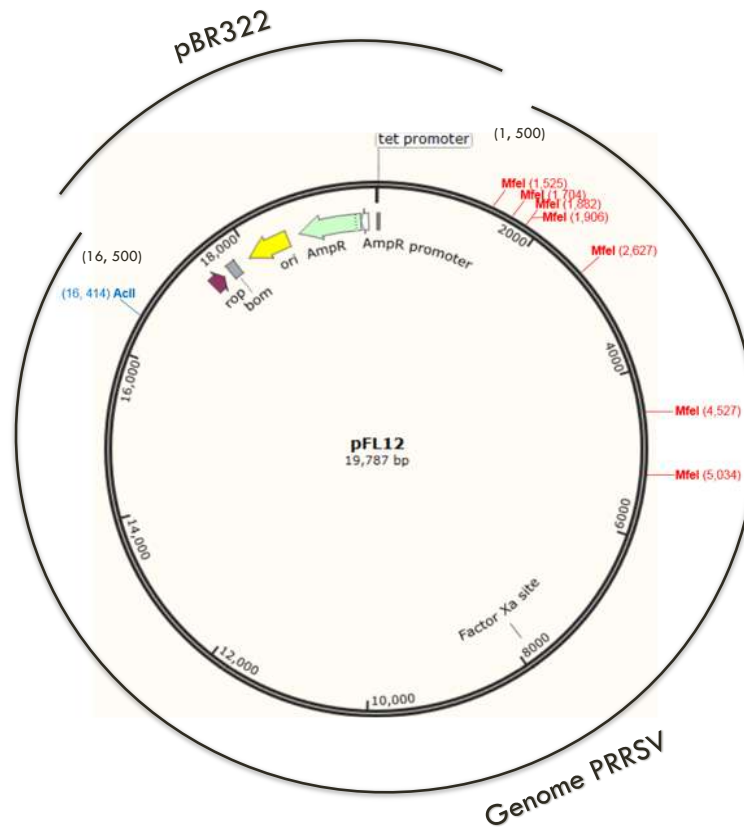
Se inoculó 1 ml de medio LB líquido con las bacterias y se incubaron toda la noche a 37°C a 200rpm. Se agregó el cultivo de toda la noche a 99 ml de medio LB fresco (sin antibióticos). Se incubó a 37°C a 200 rpm de 3-4 horas hasta una DO= 0.35. Después el medio de cultivo se colocó en tubos de 50 ml y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Se centrifugaron a 4 ° C a 4000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió cada pastilla de células con 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M helado, y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se volvió a centrifugar a 4 ° C a 4000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se combinaron todas las pastillas resuspendiendo en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M helado con glicerol al 15%. Finalmente, las bacterias se dividieron en alícuotas de 200 µl y se almacenaron rápidamente a -80°C.

### 8.8.2. Propagación de la clona infecciosa de PRRSV

El plásmido pFL12 que contiene el genoma completo de PRRSV tipo II (cepa NVSL #97-7895), clonado en el vector pBR322 con resistencia a ampicilina (Figura 9 y 10), fue donado por el Dr. Asit K. Pattnaik de la Universidad de Nebraska. El plásmido liofilizado fue reconstituido en agua para su posterior utilización.



**Figura 9.** Plásmido PRRSV NVSL # 97-7895 de ADNc de longitud completa. (A) Representación del genoma de PRRSV, (B) Plásmido pFL12-PRRSV y (C) Restricción con la enzima *MfeI* en la que se observa el patrón de bandas de acuerdo con el mapa del plásmido. Recuperada de Truong et al., 2004.



**Figura 10.** Diseño *in silico* del plásmido pFL12 de ADNc de longitud completa. El genoma de PRRSV (NVSL#97-7895) fue clonado dentro del plásmido de bajo número de copias, pBR322. En rojo se muestra la restricción con la enzima *MfeI*, donde se observa el sitio de cada corte de acuerdo con el mapa del plásmido. En azul se muestra la restricción con la enzima *AclI*, donde se observa un sitio único de corte que linealiza el plásmido. Diseñado en SnapGene.

### 8.8.3. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó como lo describe STRATAGENE en la ficha técnica correspondiente a las células supercompetentes Sure 2, con algunas modificaciones. Se descongelaron las bacterias en hielo. Una vez descongeladas, se mezclaron suavemente y se puso una alícuota de 100  $\mu$ l en cada tubo de polipropileno, los cuales fueron previamente enfriados en hielo. Se agregaron 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol 1.22 M y se incubaron durante 10 minutos en hielo agitando suavemente cada 2 minutos. Pasado este tiempo se agregó 1  $\mu$ l de ADN plasmídico [50  $\mu$ g/  $\mu$ l] y se incubaron en hielo 30 minutos. Se aplicó el choque térmico poniendo los tubos en baño maría a 42°C durante 30 segundos. Finalmente, los tubos se incubaron en hielo



---

durante 2 minutos. Se agregaron 900  $\mu$ l de medio SOC (pre-calentado a 42° C) y se incubó a 37°C 1 hora con agitación (230 rpm). El cultivo se concentró en una pastilla por medio de centrifugación y se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio. Toda la alícuota se sembró en placas de agar LB con ampicilina [100  $\mu$ g/ ml]. Las placas se incubaron a 37 ° C en postura invertida durante 24 horas para el crecimiento de colonias bacterianas.

#### 8.8.4. Extracción del plásmido

Se realizó miniprep y maxiprep para la extracción del ADN plasmídico a pequeña y gran escala, respectivamente. Para la miniprep se utilizó el kit ZYMO RESEARCH (No. Cat. D4036) según especificaciones del proveedor.

Para la extracción del plásmido a gran escala se utilizaron dos métodos:

1. Kit QIAGEN Plasmid Maxikit 25 (No. Cat. 12163) siguiendo las especificaciones del proveedor.
2. Método de lisis alcalina descrito en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001. Se cultivaron las bacterias previamente transformadas en 200 ml de LB líquido con ampicilina [100 $\mu$ g/ml] a 37° C por 24 horas. Se pasó el medio a tubos falcón de 50 ml y se centrifugaron a 3,500 rpm por 15 minutos a 10°C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 18 ml de la solución **I**, se dejó reposando 5 minutos a TA. Después se adicionaron 18 ml de la solución **II** y se dejó reposando 5 minutos a TA. Por último, se adicionaron 18 ml de la solución **III** y se dejó reposando otros 5 minutos a TA. Pasado este tiempo se filtró con ayuda de un embudo y fibra de vidrio y se recibió el filtrado en un tubo falcón de 50 ml. Se aforó cada tubo a 45 ml con isopropanol y se dejó reposando toda la noche a 4°C. Al otro día se centrifugo a 4,000 rpm durante 25 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió en 750  $\mu$ l de etanol al 70% frío 2 veces. Y se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Luego se centrifugó 4 minutos a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se suspendió en 650  $\mu$ l de agua. Después se centrifugó 4 minutos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó 5  $\mu$ l de RNasa y se homogenizó con vortex. Se incubo 1h en baño maría a 37°C. Se adicionó un volumen de PEG 800 (Polietilenglicol al 13% + NaCl 6M) y se incubó a TA 5 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se

lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío. Se retiró el etanol y se dejaron secar las paredes del tubo. Finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua y se cuantificó.

### 8.8.5. Caracterización del ADN plasmídico

Para la caracterización del ADN plasmídico extraído se diseñaron cinco pares de oligoprimers (Tabla 3) a partir de la secuencia del genoma de la cepa de PRRSV tipo II (cepa NVSL #97-7895).

**Tabla 3.** Secuencias de oligoprimers en dirección 5' a 3', para caracterización del plásmido pFL12

ESPECIE	ORF	SECUENCIA DE PRIMER (5' 3')	AMPLICON pb
PRRSV	3	FW: GGATGTACCGCACCATGGAA RV: CCTGTCATGCGCAGATTGTG	187
PRRSV	4	FW: AAGGCCACTTGACCAGTGTT RV: ATGCTGCGGTAGTGTGGTT	368
PRRSV	5	FW: TGCTCGCGATTGCTTCTTT RV: ATGAGAGCTGCTGTGCTGT	84
PRRSV	6	FW: CCTTGACACAGTCGGTCTGG RV: AGGACATGCAGTTCCTCGCA	140
PRRSV	7	FW: GTTGGGTGGCAGAAAAGCTG RV: GGGGCTTCTCCGGGTTTA	210

Como otro punto de control se realizaron ensayos de restricción con la enzima *MfeI* (No. Cat.R3589). Los tamaños esperados de los productos de digestión son 1525, 1704, 1882, 1906, 2617, 4527 y 5034 pb (Figura 4C). También se utilizó la enzima *AclI* de corte único (No. Cat. R0598S/L) para linealizar el plásmido.

### 8.9. Transcripción *in vitro*

Se utilizó el kit TranscriptAid T7 High Yield Thermoscientific (No. Cat.K0441) siguiendo las especificaciones del proveedor. El primer paso fue la linealización del plásmido con la enzima *AclI* (No. Cat.R0598S), para posteriormente purificar por fenol-cloroformo. Después se preparó una reacción con los componentes de la tabla 4 a TA.

**Tabla 4.** Componentes de la reacción de transcripción in vitro. Manual Thermo Scientific TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit.

Componente	Cantidad
DEPC-H <sub>2</sub> O	c.b.p 20 µl
5x transcriptAid Buffer	4 µl
ATP/CTP/GTP/UTP mix*	8 µl
ADN	1 µg
TranscriptAid enzyme mix	2 µl
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>

Seguido de mezclar bien e incubar a 37° C durante 2 horas. Finalmente se purificó el ARN resultante.

### 8.10. Generación de virus

Para la transfección del ARNm viral, se utilizó el método de lipofección, con Lipofectamine LTX & PLUS (Invitrogen, No. Cat. MAN0007822) según especificaciones del proveedor. Se utilizaron cultivos de células MARC-145. Después del tratamiento las células fueron sembradas en una placa de cultivo celular de 6 pozos e incubadas durante 12-16 h a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después se aspiró el medio para eliminar las células muertas y los desechos. Se agregó 1.5 ml de medio de crecimiento fresco y se incubaron hasta la manifestación de efecto citopático caracterizado por cambios morfológicos en la célula (generalmente entre 48 y 72 h después de la transfección). El sobrenadante fue recuperado y las células se tripzinaron y sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (30 minutos a -80°C y 5 minutos a 37°C). Las células junto con el sobrenadante fueron centrifugados para separar de los restos celulares. El sobrenadante se utilizó para hacer pasajes en cultivos celulares de MARC-145 en cajas de 100mm (5 pases). Finalmente se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80 °. Queda por determinar los títulos de virus, cuantificando la cantidad de virus necesaria para producir efecto citopático en el 50% de los cultivos infectados (TCID 50, por sus siglas en inglés).

---

## **8.11. Detección del virus**

### **8.11.1 Inmunofluorescencia**

Una de las opciones para la detección del virus es la de inmunofluorescencia directa (DIFA *direct immunofluorescence assay*, por sus siglas en inglés). La prueba de DIFA es uno de los métodos de detección de antígenos virales más sensibles y rápidos, permitiéndonos su detección y cuantificación rápida. Para ello se utilizó el anticuerpo PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated (Casa Comercial: CIPQUIM, Catalogo No.bs-4504R-FITC) que se une de manera específica a GP5 e indica que el virus está replicándose y produciendo proge- nie viral.

Procedimiento: después de la infección en las células MARC-145 con el virus, se tomaron 2 x 10<sup>5</sup> células y se sembraron en cajas de 24 pozos, dejando adherir durante 24 horas en medio completo. Al día siguiente se retiró el medio y se lavaron con PBS. Después se fijaron con 700 µl de paraformaldehído al 2%, y se incubaron 20 minutos a TA. Se lavaron 3 veces con PBS/Tritón al 0.03% y se agregó una solución bloqueadora (PBS-Tritón 0.3% con suero de ternera al 10%), dejándose incubar por 2 horas a TA en cámara húmeda. Después se lavaron 2 veces con PBS-Tritón. A continuación, se agregó el anticuerpo policlonal anti-PRRSV-GP5conjugado con FITC (anti-PRRSV-GP5/FITC) a una concentración de 1:200 en PBS/Tritón al 0.03%. Se incubaron primero 2 horas a TA y después toda la noche en refrige- ración y en ausencia de luz. Finalmente se hicieron 3 lavados con PBS/Tritón al 0.03% y uno más con agua destilada para luego dejarse en glicerol al 40%. Se observaron al micros- copio de luz en fondo claro, con luz ultravioleta a un objetivo de 10X, zoom de 4X.

### **8.11.2 Extracción de ARN y transcripción inversa (RT-PCR)**

Se tomo una alícuota de sobrenadante y de las células MARC-145 infectadas, donde el ARN se obtuvo mediante tratamiento con Trizol LS (Invitrogen) según especificaciones del pro- veedor. El ARN se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó. La reac- ción de RT-PCR se estableció usando el kit RevertAid First Strand cDNA ThermoScientific (No.Cat. K1622) según especificaciones del proveedor. La reacción se incubó a 55 ° C du- rante 1 h para la síntesis del ADNc. Después de la síntesis de ADNc, el ADN diana se am- plificó mediante PCR utilizando los cinco pares de primers correspondientes a cinco diferen- tes *orfs* de PRRSV.

## 8.12. Detección de anticuerpos neutralizantes contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3.

Para el objetivo número dos se realizarán ensayos de microneutralización. Esta técnica se basa en el hecho de que cuando un virus se une a anticuerpos específicos, pierde su capacidad de infectar porque no se puede unir al receptor en la célula blanco, es decir se neutraliza. La técnica se llama microneutralización debido a que solo se requiere una pequeña cantidad de suero y se realiza en microplacas.

**Tabla 5.** Grupos experimentales y de control para la microneutralización.

	PK15 sialoadhesina+/CD163+	PRRSV	SUERO
Control negativo	✓		
Control positivo	✓	✓	
Experimental	✓	✓	✓

La prueba emplea una dosis constante de virus mezclado con diferentes diluciones del suero que en teoría contendrían los anticuerpos específicos. El título de anticuerpo será la máxima dilución capaz de neutralizar al virus, por lo menos en el 50% de las placas.

Se utilizarán cultivos de células epiteliales de riñón de cerdo (PK15 SIALOADESINA+/CD163+) que expresan de forma recombinante los receptores de PRRSV, los cuales se tratarán con los sueros de los ratones inmunizados y PRRSV (marcado con un anticuerpo fluorescente).

Se medirá la fluorescencia en el fluorómetro varioskan LUX que medirá de manera cuantitativa las unidades relativas fluorescentes.

---

### **8.13. Inmunodominancia**

Con los datos obtenidos del objetivo número 1 y 2, se determinó que péptido fue capaz de inducir de manera más temprana y exacerbada anticuerpos específicos del tipo IgG1 e IgG2.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Péptidos**

El análisis de las características fisicoquímicas de los péptidos sintéticos de GP5 se realizó con el software Inmuno Epitope Data Base (IEDB), en donde se evaluaron parámetros tales como la hidrofiliidad, antigenicidad, linealidad y capacidad de ser reconocidos por linfocitos B.

Como se puede ver en la tabla 6, tanto las secuencias coloreadas en azul como las secuencias coloreadas en verde corresponden a epítomos neutralizantes, los cuales han sido experimentalmente probados por otros autores, mientras que la secuencia en negro corresponde a un epítomo altamente antigénico que de igual manera ha sido reportado por varios autores. La cisteína en rojo fue adicionada para formar el conjugado con la BSA-maleimida (ABS) por medio de una reacción de acoplamiento mediada por un grupo -SH de la cisteína. La BSA se utilizó como proteína acarreadora para hacer más inmunogénicos a los péptidos y para evitar su rápida excreción a través de riñón.

**Tabla 6.** Secuencia y análisis de los péptidos sintetizados por GenScript. En azul se muestra la secuencia del epítipo neutralizante 1(PNEU1), en verde se muestra la secuencia del epítipo neutralizante 2 (PNEU2) y en negro se muestra la secuencia del epítipo antigénico (PANT).

Péptido	Secuencia	Tamaño	MW	Solubilidad	Pureza
GP5B1	SSSNLQLIYNLTGKVEVEGHLI- DLKRVVLC	30 aa	3364.93	DMSO y H <sub>2</sub> O	95.6%
GP5B2	TPVTRVSAEQWGRPGKVEVEGHLI- DLKRVVLC	32 aa	3573.15	DMSO y H <sub>2</sub> O	96.1%
GP5B3	SSSNLQLIYNLTPVTRVSAEQWGRPC	27 aa	3044.42	DMSO	96.3%

EL software IEDB nos proporciona solo valores estimados de antigenicidad ya que no hay un parámetro establecido que nos indique si el péptido será antigénico o no, o si será capaz de ser reconocido por células B. Debido a esto, no solo se tomaron en cuenta los valores obtenidos por el software, sino también se consideró información previa generada en nuestro grupo de trabajo para otros péptidos. A partir de esto, se consideró que un valor de antigenicidad por encima de 1.0 es suficiente para inducir la producción de anticuerpos específicos. Por otra parte, para evaluar los epítipos de células B, se toman en consideración parámetros tales como hidrofiliidad, flexibilidad, área superficial accesible, formación de hojas beta plegadas, polaridad y propensión antigénica de las cadenas polipeptídicas para poder predecir la posición de los epítipos. Las predicciones se basan en escalas de propensión para cada uno de los 20 aminoácidos, donde valores por encima de 0.5 son predictivos del reconocimiento por parte de los linfocitos B.

Además, se mandaron sintetizar los epítipos por separado para la determinación de anticuerpos específicos (tabla 7).

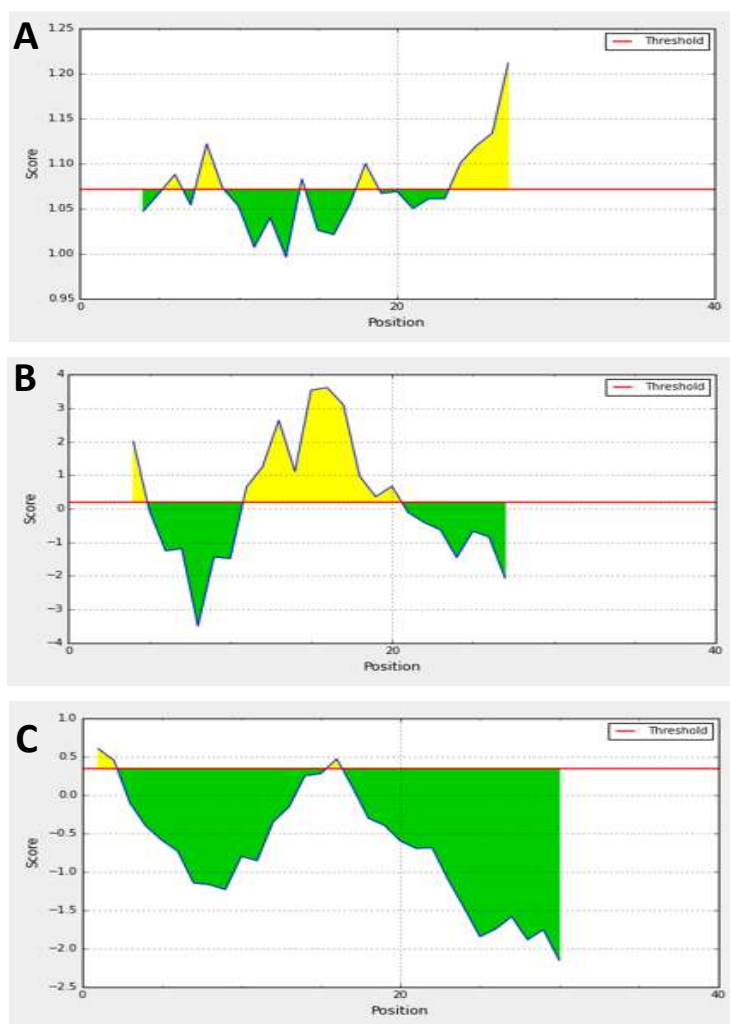
**Tabla 7.** Secuencia y análisis de los epítomos sintetizados por GenScript.

Epítopo	Secuencia	Tamaño	MW	Solubilidad	Pureza	Referencias
<b>PNEU1</b>	<b>SSSNLQLIYNLT</b>	12 aa	1375.53	DMSO y H <sub>2</sub> O	97.9%	Piñeyro <i>et al.</i> , 2016
<b>PNEU2</b>	<b>TPVTRVSAEQWGRP</b>	14 aa	1583.75	DMSO y H <sub>2</sub> O	96.8%	Bo-Kyoung <i>et al.</i> , 2020
<b>PANT</b>	<b>GKVEVEGHLI- DLKRVL</b>	18 aa	2007.41	DMSO	95.2%	Zhou <i>et al.</i> , 2009



## GP5B1

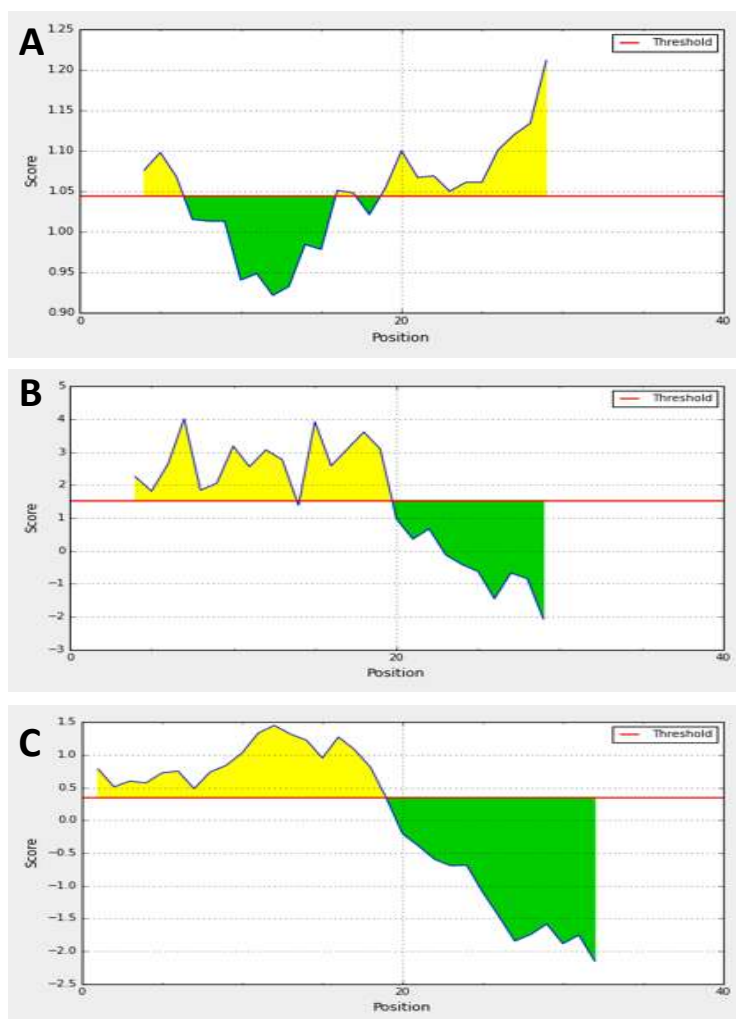
Los resultados obtenidos para el péptido GP5B1, fueron satisfactorios. Se puede observar que solo una región entre los aminoácidos 23-30 tiene valores de antigenicidad por encima de 1.20; se espera que este fragmento del péptido sea suficiente para generar una respuesta inmune específica (Figura 11A). En la figura 11B podemos ver como una parte del péptido es hidrofílico entre los aminoácidos 10-21 y el resto es hidrofóbico. Lo cual nos indica que su reconstitución puede ser tanto en agua como en solventes orgánicos. La probabilidad de que el péptido sea reconocido por linfocitos B es muy baja, apenas alcanzando el límite de 0.5, esto se debe a que los valores están influenciados por los epítomos adyacentes, a pesar de ello se espera, que sea capaz de inducir una respuesta inmune. (Figura 11C).



**Figura 11.** Análisis en IEDB del péptido GP5B1, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV. A. Análisis de hidrofiliidad, B. Análisis de antigenicidad y C. análisis de reconocimiento por parte de linfocitos B. Se colorean de amarillo en el grafico las mejores puntuaciones para cada una de las gráficas.

## GP5B2

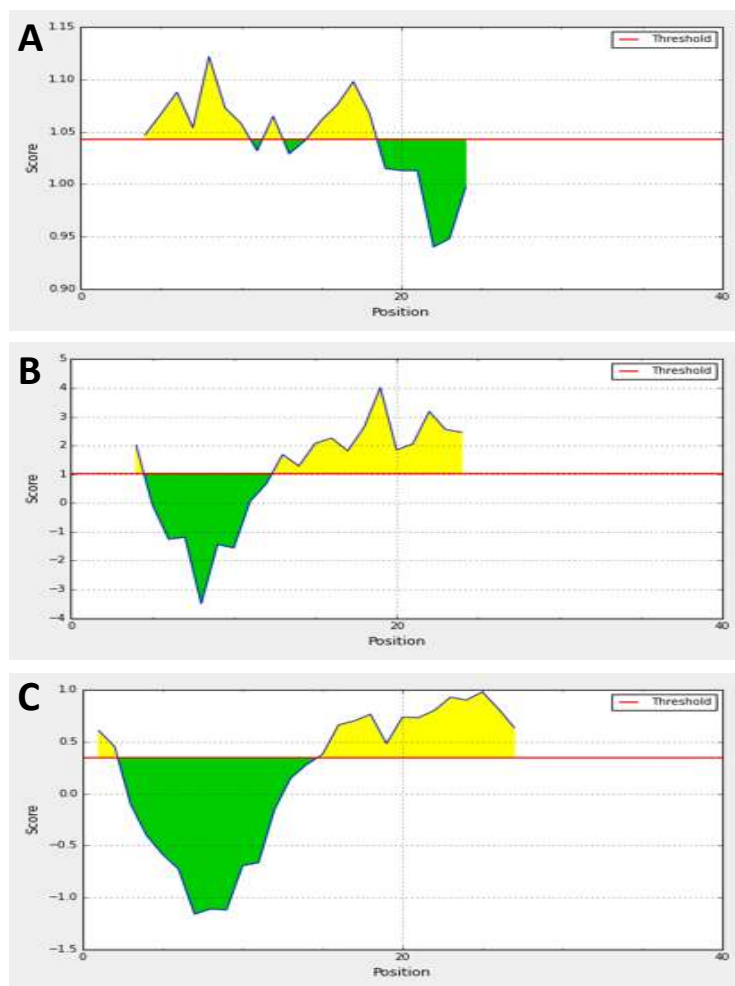
En el caso del péptido GP5B2 los resultados obtenidos difieren mucho del péptido anterior. Se puede observar en la figura 12A que la región más antigénica se encuentra entre los aminoácidos 18-32, alcanzando puntajes de antigenicidad por encima de 1.20 por lo cual se espera que sea capaz de inducir una respuesta inmune específica. Por otra parte, se puede ver como gran parte del péptido es hidrofílico, comprendiendo los aminoácidos 1-21, y el resto es hidrofóbico, lo cual nos indica que se puede reconstituir tanto en agua como en solventes orgánicos (Figura 12B). Finalmente, en la imagen 12C se puede apreciar una gran zona del péptido entre los aminoácidos 19-32, con puntajes superiores a 0.5, lo cual predice que esta región en particular podría ser reconocida por linfocitos B. Todas estas características hacen de este péptido un excelente candidato para el desarrollo de este trabajo.



**Figura 12.** Análisis en IEDB del péptido GP5B2, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV. A. Análisis de hidrofiliidad, B. Análisis de antigenicidad y C. análisis de reconocimiento por parte de linfocitos B. Se colorean de amarillo en el grafico las mejores puntuaciones para cada una de las gráficas.

## GP5B3

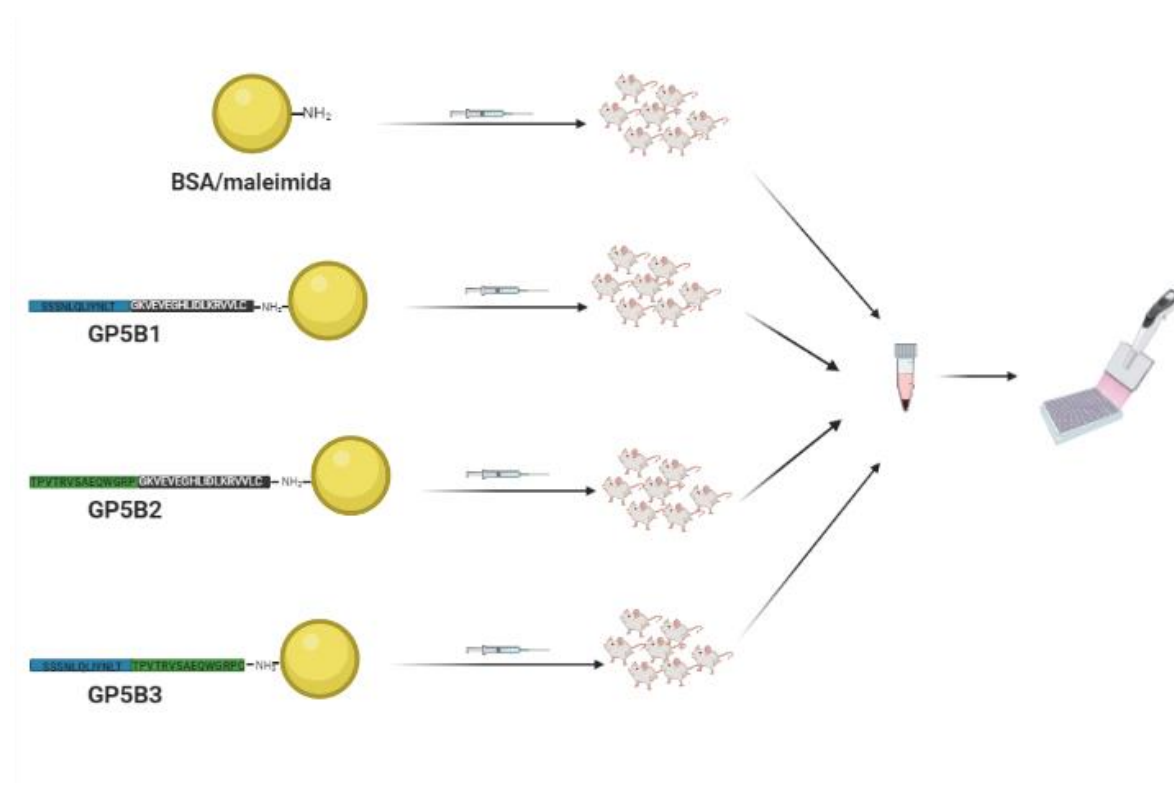
Para el péptido GP5B3 se combinaron los dos epítomos neutralizantes dando como resultado características interesantes. Se puede observar como casi todo el péptido es antigénico, comprendido entre los aminoácidos 1-28, alcanzando valores de antigenicidad superiores a 1.10, lo que en teoría induciría una respuesta inmune específica (Figura 13A). En la figura 13B podemos ver como la región del péptido entre los aminoácidos 13-27, es hidrofílica y solo una pequeña porción del péptido es hidrofóbica lo que indica que su reconstitución debe ser preferentemente en solventes orgánicos. Finalmente, en la Figura 13C, podemos ver que hay un fragmento considerable del péptido que puede ser reconocido por linfocitos B, entre los aminoácidos 15-30, alcanzando valores cercanos a 1.0. Por lo anterior el péptido GP5B3 también es un excelente candidato para el desarrollo del presente proyecto.



**Figura 13.** Análisis en IEDB del péptido GP5B3, generado a partir de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV. A. Análisis de hidrofiliidad, B. Análisis de antigenicidad y C. análisis de reconocimiento por parte de linfocitos B. Se colorean de amarillo en el grafico las mejores puntuaciones para cada una de las gráficas.

## 9.2. Evaluación de la producción de anticuerpos

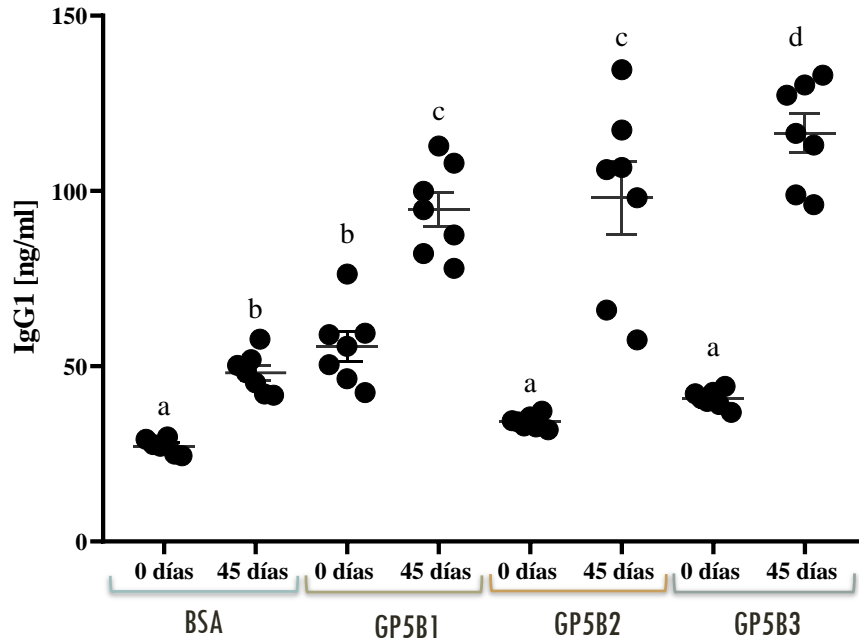
### 9.2.1 Evaluación de anticuerpos totales contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3



**Figura 14.** Esquema de la distribución de los diferentes grupos experimentales. Creada con BioRender.com.

En la evaluación de los títulos de anticuerpos totales IgG1 contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3, se siguió el esquema de inmunizaciones anteriormente mencionado, donde se obtuvo el suero pre-inmune al día 0, seguido de una primera inmunización. Posteriormente se hizo el seguimiento del ratón a través del tiempo, con tomas de muestra sanguínea cada 15 días hasta el día 45, utilizando siete ratones por grupo. Con los sueros obtenidos se realizaron los ensayos de ELISA directa. En la figura 14 se observa cómo fueron distribuidos los diferentes grupos experimentales.

Se determinó que los tres péptidos fueron capaces de inducir anticuerpos específicos, con resultados estadísticamente significativos 45 días después de la inmunización, por lo cual solo se presentan los títulos de anticuerpos pre-inmunización (control) y a los 45 días (sueros de la tercera inmunización) (Figura 15).



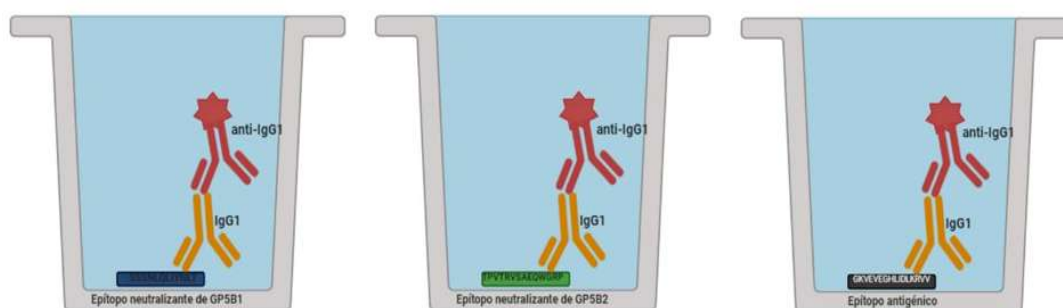
**Figura 15.** Títulos de anticuerpos IgG1 totales detectados en los grupos inmunizados con BSA, GP5B1, GP5B2 y GP5B3 evaluados mediante ELISA. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.

Los sueros pre-inmunes de todos los grupos de tratamiento mostraron una concentración basal de IgG1. El grupo tratado únicamente con BSA mostró un aumento significativo de IgG1 a los 45 días. Sin embargo, se consideró como un título de anticuerpos basal ya que el título de anticuerpos registrado fue igual que en el grupo pre-inmune de GP5B1 (Figura 15).

Todos los grupos tratados con los péptidos mostraron un aumento significativo comparado con los títulos de sueros pre-inmunes. GP5B1 mostró una media de  $98 \pm 12.2$  ng/ $\mu$ l, GP5B2 media de  $98 \pm 12.2$  ng/ $\mu$ l y GP5B3 media de  $127 \pm 9.5$  ng/ $\mu$ l.

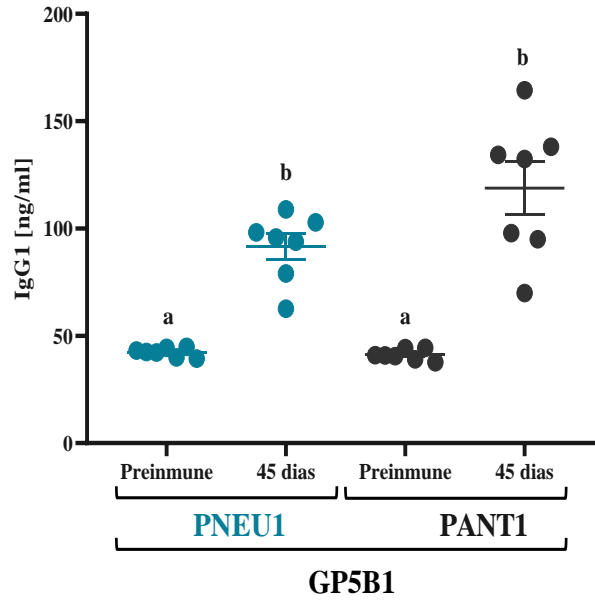
## 9.2.2 Evaluación de anticuerpos específicos contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3

Para determinar la especificidad y el isotipo de los anticuerpos generados por los ratones inmunizados se realizó una prueba de ELISA utilizando los péptidos sintéticos, correspondientes los epítomos neutralizantes y al epítomo antigénico (Tabla 7), como antígenos de captura. Cada epítomo se unió, de manera independiente, a la superficie de la microplaca como se describió anteriormente (Figura 8), y se trataron con los sueros pre-inmune y los sueros del día 45 post-inmunización de cada grupo experimental, seguida de la detección independiente, por una parte, con el conjugado anti IgG1 y por otra parte con el conjugado anti IgG2, ambos con HRP (figura 16).

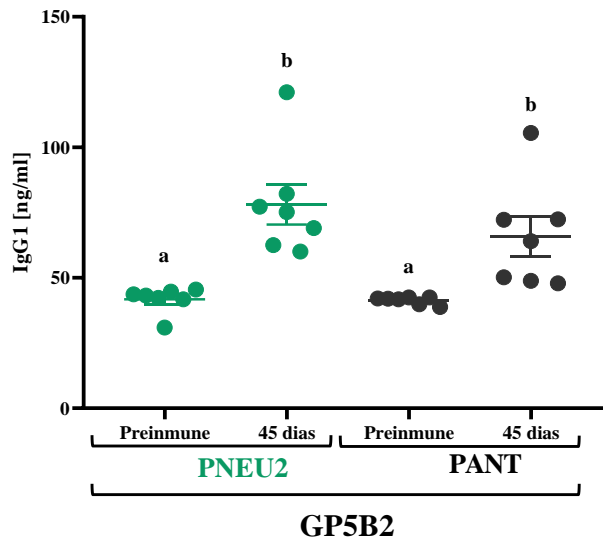


**Figura 16.** Simulación de la unión de cada epítomo a la microplaca, su posterior tratamiento con los anticuerpos específicos y la detección con los conjugados anti IgG1 e IgG2 con HRP **A.** Unión del epítomo neutralizante 1 (PNEU1). **B.** Unión del epítomo neutralizante 2 (PNEU2). **C.** Unión del epítomo antigénico (PANT). Creada con BioRender.com.

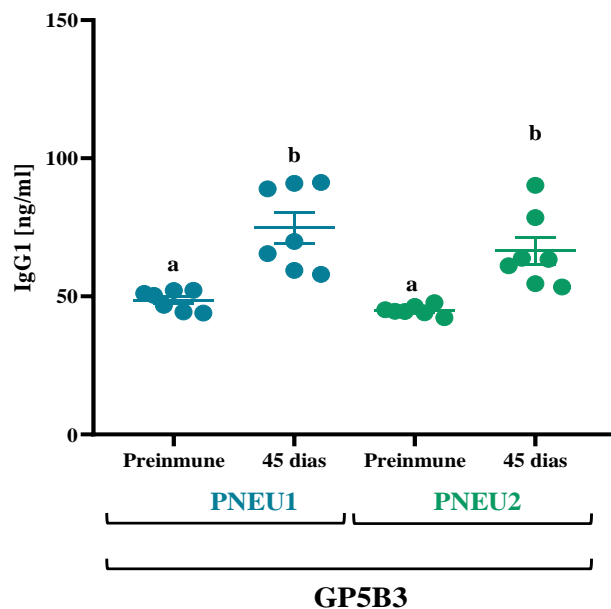
Los resultados demostraron la unión específica de los anticuerpos generados por los ratones inmunizados a los epítomos adheridos a las microplacas de ELISA, lo que implica que los péptidos sintéticos son inmunogénicos e indujeron la producción de anticuerpos específicos contra PNEU1, PNEU2 y PANT (Figuras 17 a 19).



**Figura 17.** Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.



**Figura 18.** Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.



**Figura 19.** Títulos de anticuerpos IgG1 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.

En el caso de GP5B1(Figura 17) la concentración de anticuerpos IgG1 dirigidos contra el epítipo neutralizante 1(PNEU1) al día 45, no fue estadísticamente diferente con respecto al epítipo antigénico (PANT), este último, cabe destacar, se unió a los epítipos neutralizantes con el propósito hacerlos más antigénicos. En GP5B2 (Figura 18) ocurrió algo similar, la concentración de anticuerpos dirigidos contra el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) al día 45, no fue diferente con respecto al péptido antigénico (PANT). Finalmente, la evaluación de anticuerpos producidos contra cada uno de los epítipos neutralizantes en GP5B3 (PNEU1 y PNEU2) fueron muy similares sin diferencia significativa (Figura 19).

Se realizaron comparaciones de las medias obtenidas de los anticuerpos específicos (IgG1 e IgG2) inducidos contra los epítipos contenidos en los diferentes péptidos (Tabla 8 y 9), para poder evaluar así su comportamiento y determinar si la presencia de un epítipo en particular limita o amplifica la respuesta de otro.

La tabla 8 resume la concentración de anticuerpos IgG1 inducida contra cada epítipo.

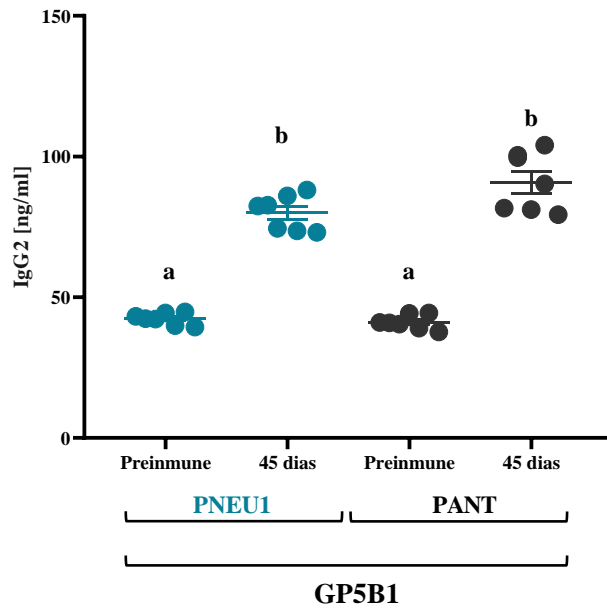


**Tabla 8.** Análisis estadístico descriptivo de los títulos de anticuerpos IgG1 producidos contra cada epítipo al día 45 post-inmunización. Las medias con una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (Análisis descriptivo).

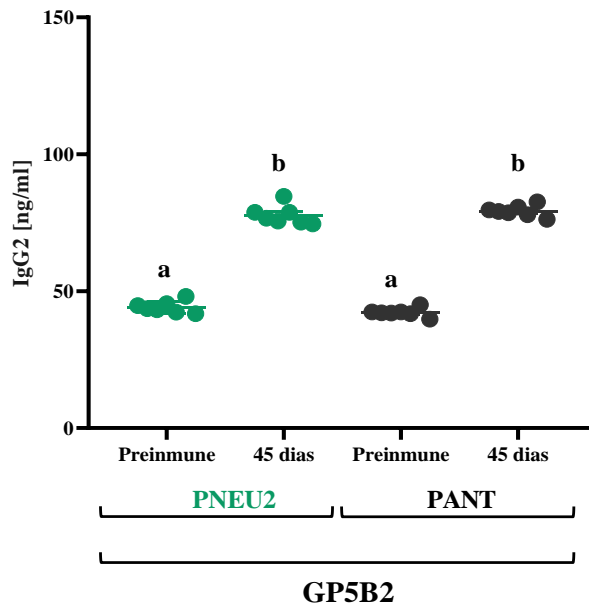
PÉPTIDO	EPÍTOPO	MEAN	±SEM	CI
GP5B1	PNEU1	91.6 <sup>a</sup>	5.9	77.03
	PANT	111.3 <sup>b</sup>	11.3	82.13
GP5B2	PNEU2	78.1 <sup>c</sup>	7.7	59.19
	PANT	65.8 <sup>c</sup>	7.7	46.91
GP5B3	PNEU1	69.7 <sup>c</sup>	5.4	56.34
	PNEU2	66.4 <sup>c</sup>	5.0	54.10

Con base en los resultados obtenidos de la tabla 8, la concentración de anticuerpos IgG1 generados contra PNEU1 a partir de la inmunización con GP5B1 (unión de péptidos PNEU1-PANT) y GP5B3 (unión de péptidos PNEU1-PNEU2) fue estadísticamente diferente ( $p=0.0196$ ), induciendo una mayor cantidad de anticuerpos al estar unido a PANT. Para PNEU2 no hubo diferencia significativa al estar unido tanto a PANT (GP5B1) como a PNEU1 (GP5B2) ( $p=0.2285$ ). Finalmente, para PANT se encontró diferencia significativa al estar unido a los diferentes epítipos neutralizantes ( $p=0.0060$ ), induciendo una mayor cantidad de anticuerpos al estar unido a PNEU1.

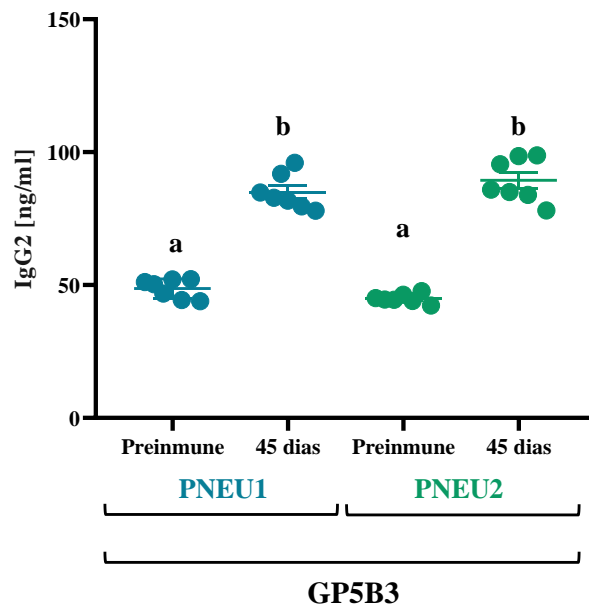
En el caso de los anticuerpos IgG2 específicos de antígeno, al igual que para los IgG1, se encontró que hay una inducción de anticuerpos contra el epítipo antigénico y contra los epítipos neutralizantes con diferencia estadísticamente significativa a partir del día 45 post-inmunización (Figuras 20 a 22).



**Figura 20.** Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.



**Figura 21.** Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) y el epítipo antigénico (PANT) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (P<0.05). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.



**Figura 22.** Títulos de anticuerpos IgG2 específicos contra el epítipo neutralizante 1 (PNEU1) y el epítipo neutralizante 2 (PNEU2) evaluados a través del kit comercial Takara Peptide Coating. Análisis estadístico en grupos (n=7). Las medidas en cada barra seguidas de una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ). ANOVA de una vía, prueba post hoc Tukey, los datos presentan  $\pm$ S.E.M.

En GP5B1 (Figura 20) la concentración de anticuerpos IgG2 dirigidos contra PNEU1, no fue estadísticamente diferente con respecto a PANT. En GP5B2 paso exactamente lo mismo, la concentración de anticuerpos dirigidos contra PNEU2, no fue diferente con respecto al PANT, lo que indica que se producen anticuerpos en las mismas concentraciones tanto para el epítipo antigénico como para los epítipos neutralizantes (Figura 21). Para el péptido GP5B3 el cual está conformado por los dos epítipos neutralizantes (PNEU1 Y PNEU2), tampoco se encontró diferencia significativa en la inducción de anticuerpos específicos contra cada epítipo (Figura 22). En la tabla 9 se resume la concentración de anticuerpos IgG2 inducida contra cada epítipo.

**Tabla 9.** Análisis estadístico descriptivo de los títulos de anticuerpos IgG2 producidos contra cada epítipo al día 45 post-inmunización. Las medias con una letra minúscula diferente son estadísticamente diferentes (Análisis descriptivo).

PÉPTIDO	EPÍTOPO	MEAN	±SEM	CI
GP5B1	PNEU1	80 <sup>a</sup>	2.3	74.28
	PANT	90.9 <sup>b</sup>	3.9	81.26
GP5B2	PNEU2	77.7 <sup>c</sup>	1.3	74.56
	PANT	79.2 <sup>c</sup>	0.7	77.39
GP5B3	PNEU1	82.2 <sup>a</sup>	1.9	77.58
	PNEU2	89.3 <sup>b</sup>	3.0	81.95

Con base en los obtenidos de la tabla 9, la concentración de anticuerpos IgG2 generados contra PNEU1 a partir de la inmunización con GP5B1 (unión de péptidos PNEU1-PANT) y GP5B3 (unión de péptidos PNEU1-PNEU2) no fue estadísticamente diferente ( $p= 0.4814$ ), ya que se generaron las mismas concentraciones de anticuerpos al estar unido tanto a PANT como a PNEU2.

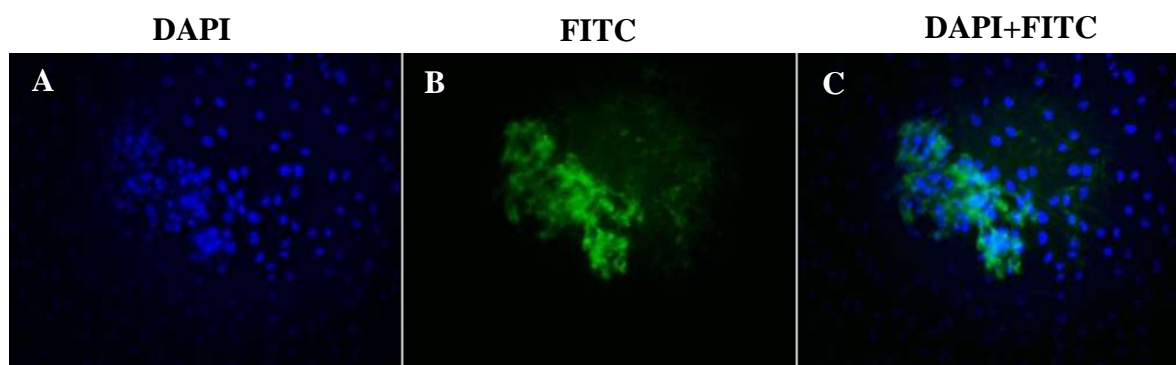
Para PNEU2, la concentración de anticuerpos generados a partir de la inmunización con GP5B2 (unión de péptidos PNEU2-PANT) y GP5B3 (unión de péptidos PNEU1-PNEU2) fue estadísticamente diferente ( $p= 0.0046$ ), donde GP5B3 indujo un mayor título de anticuerpos IgG2 que GP5B2, induciendo una mayor cantidad de anticuerpos al estar unido a PNEU1.

Para PANT se encontró diferencia significativa al estar unido a los diferentes epítipos neutralizantes ( $p= 0.0134$ ), induciendo una mayor cantidad de anticuerpos al estar unido a PNEU1.

### 9.3. Evaluación de la capacidad Neutralizante.

Para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por los péptidos de GP5 se generó un stock de virus PRRS a partir de la clona infecciosa contenida en el pFL12.

Este resultado en particular es muy importante ya que el virus es material indispensable para los experimentos de microneutralización con los sueros de ratones inmunizados con los tres péptidos de manera independiente. En la figura 23 se puede observar la detección del virus por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated. En el anexo 2 se incluye la información completa de la preparación de la clona infecciosa de PRRSV. Se encuentran en curso los ensayos de microneutralización.



**Figura 23.** Co-localización de células MARC-145 tratadas con DAPI e inmunofluorescencia usando el anticuerpo PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated. Células transfectadas con 2  $\mu$ g de ARNm-pFL12. A. Células vistas con el canal para DAPI, se muestran los núcleos celulares en color azul. B. Canal FITC, las células positivas marcadas en verde. C. Co-localización de Imágenes A y B. Microscopio de luz, objetivo 10X y enfoque 4X.

## 10. Discusión

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad infecciosa que causa más pérdidas económicas en la industria porcícola en todo el mundo. Una de las razones es que la vacunación ha tenido un impacto limitado en la prevención y el control del PRRSV (Montaner-Trarbes *et al.*,2019). El método más utilizado para el control de PRRSV es la vacunación con biológicos tradicionales, que constan de virus atenuados o inactivados, pero estos no han logrado inducir una protección total frente al patógeno, incluso se han reportado un sin número de casos en que los virus atenuados causan enfermedad debido a una reversión en la virulencia (Cajero-Juárez *et al.*,2017). El uso de subunidades virales, como los péptidos, eliminaría la problemática de reversión a la virulencia y, además, evitaría la interferencia generada por epítomos no neutralizantes (como los epítomos señuelo que se encuentran en la proteína GP5). La proteína GP5 de PRRSV tiene gran relevancia inmunológica, ya que no solo es una de las proteínas más abundantes en la envoltura del virus, sino que además es la más variable (esto explica por qué las vacunas disponibles actualmente

---

protegen contra una infección homóloga, pero no heteróloga). Aunado a esto, en la región del ectodominio de GP5, se ha propuesto la presencia de un epítipo neutralizante "epítipo B", capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, considerado como un componente importante de la inmunidad protectora frente a PRRSV y un epítipo señuelo "epítipo A" (Thaa *et al.* 2013). Además, se ha reportado que GP5 está implicada en la entrada del virus en las células diana (Xie, J *et al.*, 2017). Todas estas características le han permitido a GP5 convertirse en una de las proteínas más estudiadas de PRRSV. Por ello, conocer las interacciones entre el sistema inmune humoral y los epítipos inmunodominantes en GP5 suficientes para limitar la replicación viral es de vital importancia. En este estudio, se utilizaron tres péptidos que contienen epítipos de reconocimiento para linfocitos B, generados a partir de regiones conservadas del ectodominio de la proteína GP5 del virus del PRRS (GP5B1, GP5B2 y GP5B3).

Tanto los linfocitos T cooperadores como los linfocitos B, requieren de una activación inicial por las APC para que se lleve a cabo la reacción del centro germinal. Esta reacción consiste en la interacción entre linfocitos T cooperadores y linfocitos B, previamente activados y estimulados por las APCs, que ocurre en el borde del folículo del ganglio linfático. Como se ha revisado, la maduración por afinidad, cambio de isotipo y generación de células B plasmáticas de larga vida y de memoria, depende de esta interacción entre linfocitos (Abbas, 2015). Si bien, los epítipos que conforman GP5B1, GP5B2 y GP5B3, son epítipos de reconocimiento para linfocitos B, una vez procesados y presentados a través del MHC-II de la APC, existe una alta probabilidad de que sean reconocidos también por células T. Con ello, se favorecería la respuesta inmune adaptativa humoral contra PRRSV.

Los resultados indican que los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3 son inmunogénicos e inducen la producción de anticuerpos específicos en ratones partir del día 45 post-inmunización. Esto concuerda con estudios previos que han evaluado la inducción de anticuerpos contra los epítipos que conforman estos péptidos, como el estudio realizado por Piñeyro y colaboradores en 2016, en el cual, se insertó el epítipo SSSNLQLIYNLT (PNEU1), en el extremo C-terminal del gen de la cápside PCV1, demostrando la producción de anticuerpos específicos contra el epítipo PNEU1, sin embargo, estas inmunizaciones las hicieron en cerdos y no presentaron los valores de anticuerpos. En otro artículo publicado por Bo-Kyoung y colaboradores en 2020, probaron el epítipo TPVTRVSAEQWGRP (PNEU2). Sustituyeron

---

el epítipo señuelo de la cápside de PCV2 por el epítipo PNEU2 de PRRSV y encontraron anticuerpos específicos contra este epítipo, con títulos elevados al día 42 post-inmunización en ratones. Para el péptido antigénico (PANT) no se encontraron datos sobre inmunizaciones realizadas en condiciones experimentales, sin embargo, se ha reportado que este péptido es altamente antigénico ya que es capaz de ser reconocido por sueros de cerdos infectados con diferentes cepas de PRRSV (Zhou *et al.*, 2009).

Además, esto coincide con resultados previos obtenidos en nuestro equipo de trabajo con otros péptidos de la proteína GP5, en donde se observó una respuesta de anticuerpos específica a partir del día 30 y 45 post inmunización.

Con base en los datos obtenidos podemos sugerir que la inmunidad humoral que estimulan los péptidos GP5B1 y GP5B2 es muy similar, mientras que la respuesta contra el péptido GP5B3 tuvo un mejor resultado después de la inmunización y reinmunización en ratones con respecto a los otros dos péptidos, ya que se indujeron anticuerpos en mayores concentraciones, lo que concuerda con lo encontrado en la literatura, ya que al estar conformado por la unión de dos epítipos neutralizantes, se esperaba que fuera más inmunogénico.

Se evaluaron principalmente las inmunoglobulinas del tipo IgG1 ya que se ha sugerido para varios virus como el VIH (Kadelka *et al.*,2018), influenza (Huber *et al.*,2006), virus de la fiebre amarilla (Burton, 2002), por mencionar algunos, que este isotipo está asociado con neutralización viral. Además, para tener un panorama más amplio de la respuesta humoral generada contra estos péptidos, se evaluó también la producción de inmunoglobulinas del tipo IgG2. Chen y colaboradores en 1998, estudiaron los anticuerpos neutralizantes producidos contra la proteína VP3 codificada en el *orf 5* del virus elevador de lactato deshidrogenasa (LDV), un arterivirus murino, que tiene más del 60% de similitud a nivel de aminoácidos con la proteína GP5 de PRRSV, y encontraron que los principales anticuerpos producidos contra esta proteína eran del tipo IgG1 e IgG2.

IgG1 e IgG2 tienen diferentes funciones efectoras según la literatura, debido a factores que producen cambios en su estructura. Estas subclases de anticuerpos producidas contra un antígeno en particular poseen los mismos dominios variables, por lo cual se unen al mismo epítipo sin embargo tendrían diferencias en su función (Irani *et al.*,2015).

---

Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales IgG1 e IgG3 humanos específicos contra gp120 del VIH, están relacionados con la neutralización del virus. Sin embargo, IgG3 tiene una mayor capacidad neutralizante (Cavacini et al., 2003).

Por el contrario, en un estudio de la respuesta inmune humoral contra el enterovirus humano, en el cual se utilizaron inmunoglobulinas purificadas del tipo IgG, se encontró que las subclases IgG1 e IgG2 eran las más efectivas en la neutralización, y que IgG3 inducía una mayor infección (Cao et al., 2013).

En cerdos, la IgG1 tiene una vida media más larga que las otras subclases de IgG y juega un papel importante en la inmunidad protectora del cerdo contra infecciones virales (Butler, J. (2012). Con base en estos antecedentes y en nuestros resultados, se puede proponer que, IgG1 es la subclase predominante y, por lo tanto, la más importante para la neutralización viral. Sin embargo, la IgG2 podría tener actividad neutralizante, aunque menor que IgG1 debido al menor título de estos anticuerpos. En consecuencia, estas dos subclases de IgG podrían actuar de manera sinérgica.

Para determinar contra que epítipo en particular se estaban generando estos anticuerpos se realizó la detección de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos de antígeno mediante ELISA indirecto, utilizando los epítipos (Tabla 7) como antígenos de captura. Los resultados obtenidos indican que los anticuerpos producidos contra los péptidos son específicos y reconocen en grado similar, tanto a los epítipos neutralizantes como al epítipo antigénico.

Los niveles más altos de anticuerpos se produjeron contra el epítipo PANT, sin embargo, hay que recordar que este epítipo se unió a los epítipos neutralizantes con el único propósito de hacerlos más inmunogénicos, lo cual concuerda con los resultados. En cuanto a los epítipos neutralizantes, PNEU1 no solo indujo mayores títulos de anticuerpos, sino que además parece ser, que está potenciando la respuesta de anticuerpos contra los otros epítipos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el contexto determina la inmunodominancia de ciertos epítipos. Como se ha descrito en la literatura, la inducción de anticuerpos es diferente para cada epítipo incluso si se encuentra dentro del mismo antígeno, debido a que la ausencia o presencia de una secuencia dominante permite que el huésped responda con mayor o menor fuerza a otros epítipos presentes (Abbott y Crotty, 2020).



---

Hasta el momento no hay estudios donde se haya evaluado la inmunodominancia de estos mismos péptidos.

Por otra parte, como se comentó anteriormente se generó un stock de virus PRRS a partir de la clona infecciosa contenida en el pFL12, el cual, junto con los sueros de los ratones inmunizados, son indispensables para los ensayos de microneutralización. El uso de una clona infecciosa es una herramienta de gran utilidad para caracterizar la función de los componentes virales, además de proporcionar un modo de inoculación simple y estandarizado que mejora la reproducibilidad y facilita los estudios de interacción virus-huésped (Pasin *et al.*,2019), lo cual es complicado de lograr con un virus del tipo salvaje, debido a las variaciones que se pueden encontrar del mismo y a su difícil aislamiento. A pesar de que no se concluyeron los ensayos de microneutralización, para corroborar la capacidad neutralizante de los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos, los hallazgos en la literatura nos pueden ayudar a sugerir que, tanto PNEU1 como PNEU2 pueden estar induciendo anticuerpos del tipo neutralizante. En un estudio en el que se inmunizaron ratones Balb/c con una proteína de fusión que contenía la secuencia completa de la proteína GP5 de PRRSV, encontraron anticuerpos del tipo IgG1 que reconocían específicamente ciertas regiones de la proteína, donde además determinaron que los Abs inducidos, tenían actividad neutralizante (Pirzadeh y Dea, 1997).

En contraste, en otro estudio en el cual midieron mediante ensayos de ELISA indirecto la unión de anticuerpos policlonales y monoclonales del tipo IgG1 e IgG2 a péptidos sintéticos, de la glicoproteína de la envoltura VP-3 (proteína muy similar en tamaño, estructura y secuencia de aminoácido a GP5 de PRRSV) codificada por *orf 5* del LDV, los investigadores lograron identificar un epítipo de neutralización ubicado en el ectodominio entre los aminoácidos 30-60. Asimismo, se encontró que los anticuerpos con actividad neutralizantes eran del tipo IgG2 (Chen *et al.*,1998).

Además de los datos anteriores, se ha sugerido que el principal epítipo neutralizante de PRRSV, se encuentra dentro del ectodominio de GP5, entre los aminoácidos 37-45 (Popescu *et al.*, 2017; López y Osorio, 2004; Montaner-Trarbes *et al.*,2019); PNEU1 (SSSNLQLIYNLT) se encuentra en esta misma región del ectodominio (residuos de aminoácidos 35-46).

---

Por su parte, PNEU2 (TPVTRVSAEQWGRP) se localiza en la parte del endodominio de la proteína GP5 de PRRSV (residuos de aminoácidos 186-200) (Bo-Kyoung *et al.*, 2020). Aunque no se encuentra en la región del ectodominio se ha reportado que tiene actividad neutralizante. En el mismo estudio hecho por Bo-Kyoung y colaboradores en 2020, además de evaluar la producción de anticuerpos específicos evaluaron su capacidad de neutralización, encontrando que se producían anticuerpos del tipo neutralizante contra este epítipo.

Juntos estos datos, apoyan la idea de que tanto PNEU1 y PNEU2 son epítopos que inducen la producción de anticuerpos neutralizadores contra PRRSV.

Estos resultados proporcionan evidencias para sugerir que se está montando una respuesta inmune humoral favorable para el hospedero, contra los péptidos GP5B1, GP5B2 y GP5B3, y en específico contra los epítopos neutralizantes que los conforman.

## **11. Conclusiones**

Los ratones inmunizados con GP5B1, GP5B2 y GP5B3, generaron anticuerpos específicos contra estos péptidos alcanzando títulos significativos a los 45 días post-inmunización. Los anticuerpos se indujeron de manera más exacerbada contra el péptido GP5B3, lo cual sugiere que este podría ser el péptido inmunodominante.

En la evaluación de anticuerpos específicos de epítipo, el epítipo PANT indujo la mayor concentración de anticuerpos, lo cual concuerda con las predicciones de antigenicidad. De los epítopos neutralizantes, objeto de interés en este trabajo, PNEU1 no solo indujo mayores títulos de anticuerpos, sino que además parece ser, que está potenciando la respuesta de anticuerpos contra los otros epítopos, tanto en el péptido GP5B1 como en el péptido GP5B3. De tal manera que podemos sugerir que este epítipo en particular tendría el rol inmunodominante dentro de los epítopos neutralizantes.

Los experimentos para determinar el potencial neutralizante de los anticuerpos se encuentran en curso. Sin embargo, hay evidencia sólida, que indica que efectivamente podrían estar tratándose de epítopos neutralizantes, generando así una inmunidad humoral protectora para el huésped. Estos resultados nos proporcionan información valiosa sobre la relación entre la

---

immunodominancia de péptidos de GP5 de PRRSV y la respuesta inmune antiviral para guiar el desarrollo de una vacuna contra el PRRS.

---

## 12. ANEXOS

### 12.1 ANEXO 1

- **SOC: medio de crecimiento**
  - Bactotripton 2 %
  - Bacto extracto de levadura 0.5 %
  - NaCl 10 mM
  - KCl 2.5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub> 20 mM
  - Glucosa 20 mM
  
- **Solución I**
  - 50 mM de D-glucosa
  - 25 mM de Tris-HCl (pH 8)
  - 10mM de EDTA (pH 8)
  
- **Solución II**
  - 0.2 N de NaOH
  - 1% de SDS
  
- **Solución III**
  - 58.8g de acetato de potasio
  - 23 ml de ácido acético
  - Aforar a 200 ml con agua

---

## 12.2 ANEXO 2: Preparación de la Clona infecciosa PRRSV

### 12.2.1. Transformación bacteriana

Se obtuvieron cerca de 53 colonias transformantes, de las cuales se guardaron alícuotas de cada una en glicerol 20%, para su posterior evaluación.

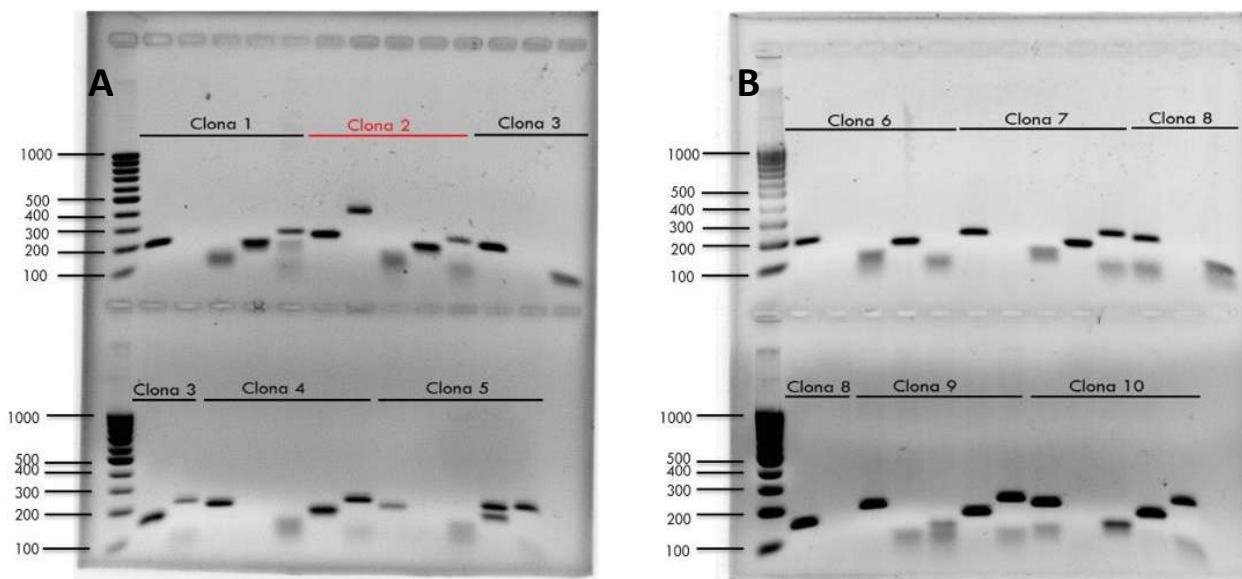
### 12.2.2. Extracción del ADN plasmídico

Se realizó la extracción del ADN plasmídico de las primeras 10 colonias seleccionadas (Tabla 7).

Cuantificación de ADN plasmídico de 10 colonias transformantes con el plásmido PFL12-PRRSV.

<i>Colonia</i>	<i>Concentración ADN (ng/<math>\mu</math>l)</i>	<i>260/280</i>
1	26.2	1.94
2	31.7	2.07
3	25.1	0.54
4	23.3	1.97
5	23	1.97
6	25.2	2.00
7	21.3	2.00
8	20.3	2.11
9	33.5	2.01
10	19.2	1.89

Se realizó PCR de cada una de las muestras usando los 5 pares de oligoprimers diseñados.

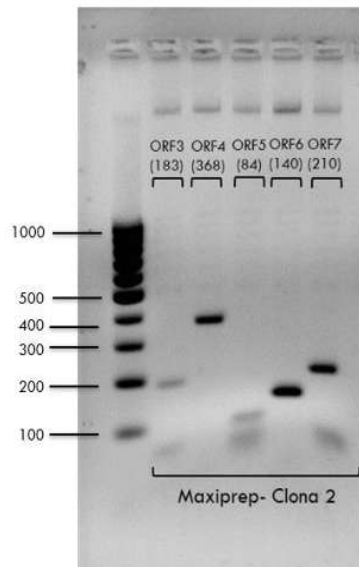


Electroforesis en gel de agarosa 1%. Primers utilizados *orfs* 3-7 de PRRSV, amplicones esperados 187, 368, 84, 140, 210 respectivamente. Para cada clona se utilizaron los 5 pares de primers. A. clonas 1-5 y B. clonas 6-10.

De las 10 colonias analizadas solo el ADN plasmídico extraído de la colonia número dos, amplificó con los 5 pares de primers, correspondiendo además con los tamaños de amplicones esperados. Por otra parte, se realizó el ensayo de restricción usando la enzima *MfeI*, sin embargo, no se obtuvo ningún patrón de bandeo. Aun así, se realizó la maxiprep de la clona 2 usando el kit QIAGEN, donde nuevamente se realizó PCR para corroborar los resultados de la miniprep, dando como resultado la amplificación de los 5 amplicones esperados. Sin embargo, al realizar el ensayo de restricción usando la enzima *MfeI*, no se obtuvo ningún patrón de bandeo, por lo cual se siguen evaluando el resto de las colonias transformantes obtenidas.

Cuantificación de ADN plasmídico de la clona 2, transformante con el plásmido PFL12-PRRSV.

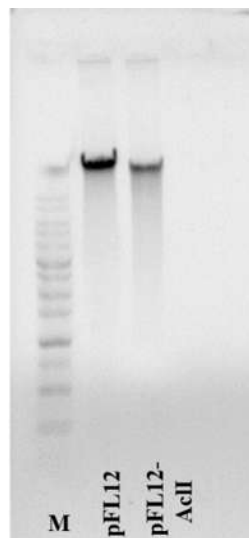
Clona	Concentración	
	ADN ng/μl	260/280
2	100	1.89



Electroforesis en gel de agarosa 1%. Primers utilizados *orfs* 3-7 de PRRSV, amplicones esperados 187, 368, 84, 140, 210 respectivamente.

### 12.2.3 Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* (IVT por sus siglas en inglés) es el siguiente paso en la generación del virus. Para ello, primero, se realizó la linealización del plásmido pFL12 con la enzima *AclI*, corroborando que se haya llevado a cabo una linealización completa. Posteriormente se realizó la IVT.



Electroforesis en gel de agarosa 0.6%. Perfil de restricción observado tras la digestión del plásmido pFL12 con la enzima *AclI*. M: marcador de peso molecular; Pfl12: control; Pfl12-*AclI*: Digestión completa de pFL12 con la enzima *AclI*.

---

De la transcripción in vitro se obtuvieron concentraciones elevadas de transcrito:

Cuantificación del ARN transcrito a partir del plásmido PFL12-PRRSV.

<i>Clona</i>	<i>Concentración</i>	
	<i>ARN ng/μl</i>	<i>260/280</i>
2	12 747	1.9

#### **12.2.4 Generación del virus**

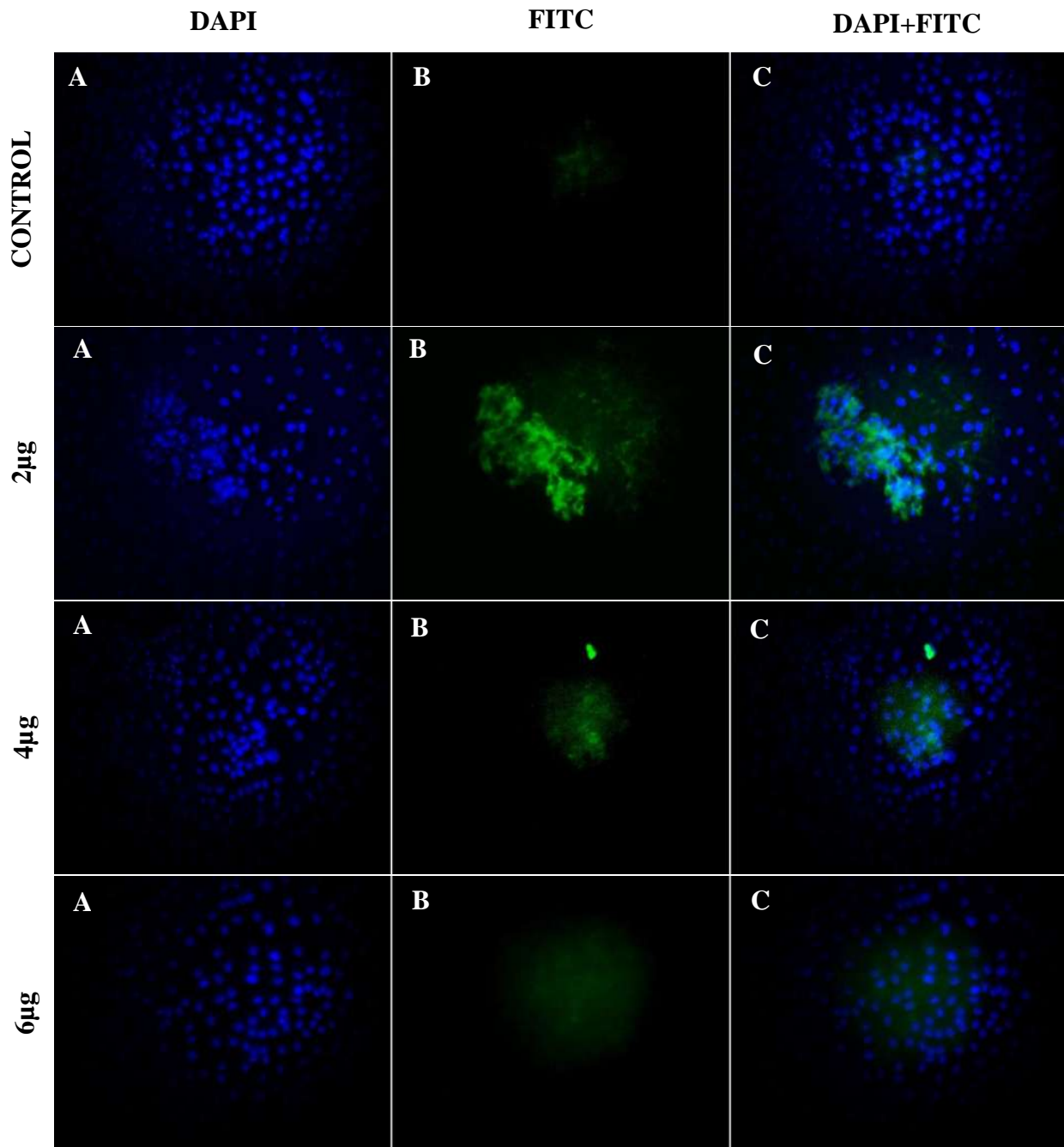
Para la generación del stock de virus PRRS a partir de la clona infecciosa contenida en el pFL12, se transfectaron por duplicado cultivos de células MARC-145 en placas de 6 pozos con el ARN obtenido del plásmido pFL12, mediante el método de lipofección (Figura 24). Se utilizaron 2, 4 y 6 μg del transcrito.

#### **12.2.5 Detección del virus**

##### **12.2.5.1 Inmunofluorescencia**

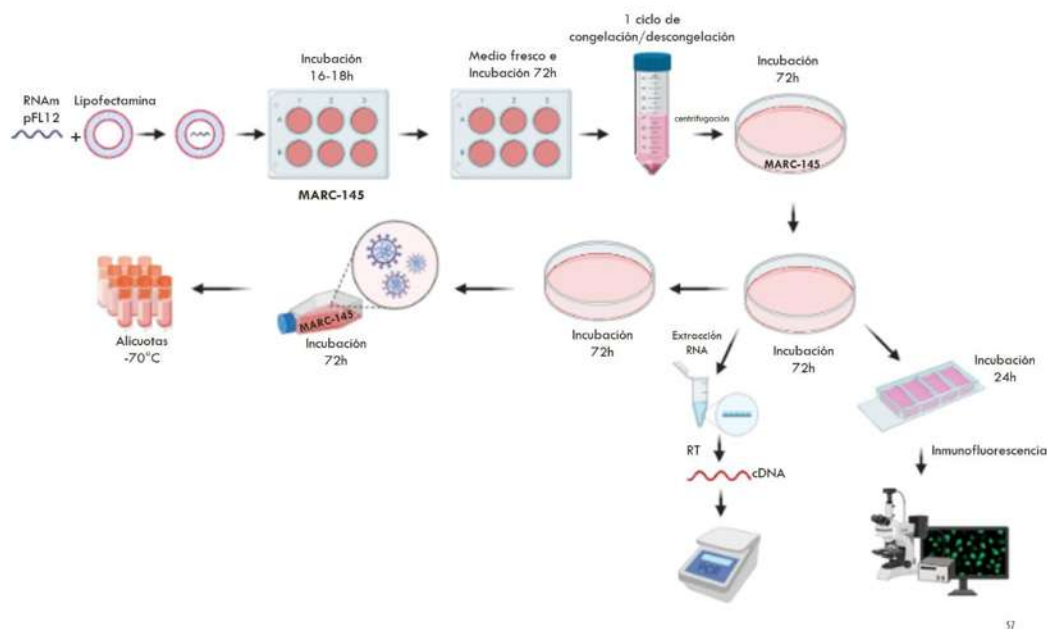
Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la eficacia de transfección obteniendo los siguientes resultados.





Co-localización de células Marc-145 tratadas con DAPI e inmunofluorescencia usando el anticuerpo PRRSV-GP5 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated. Primer panel, células control; segundo panel células transfectadas con 2 µg de ARNm-pFL12; tercer panel células transfectadas con 4 µg de ARNm-pFL12; cuarto panel células transfectadas con 6 µg de ARNm-pFL12. A. Células vistas con el canal para DAPI, se muestran los núcleos celulares en color azul. B. Canal FITC, las células positivas marcadas en verde. C. Colocalización de Imágenes A y B. Microscopio de luz, objetivo 10X y enfoque 4X.

Una vez detectado el virus, se seleccionaron las dos mejores condiciones (2 y 4  $\mu\text{g}$ ), se tomó el sobrenadante y se pasó a cultivo de células MARC-145 frescas en cajas de 100mm, después de 3 días se recolectó el sobrenadante y se realizaron dos pases más. El cuarto pase del sobrenadante se realizó en botellas de cultivo celular de 75  $\text{cm}^2$ . En la figura 24 se muestra el esquema general para la obtención del virus.



Esquema general para la obtención del virus PRRS. Diseñado en BioRender.com.

Se tomó todo el sobrenadante del último pase y se guardó en alícuotas de 1ml con SFB al 20%, además, se tomó una alícuota más para la extracción del genoma viral.

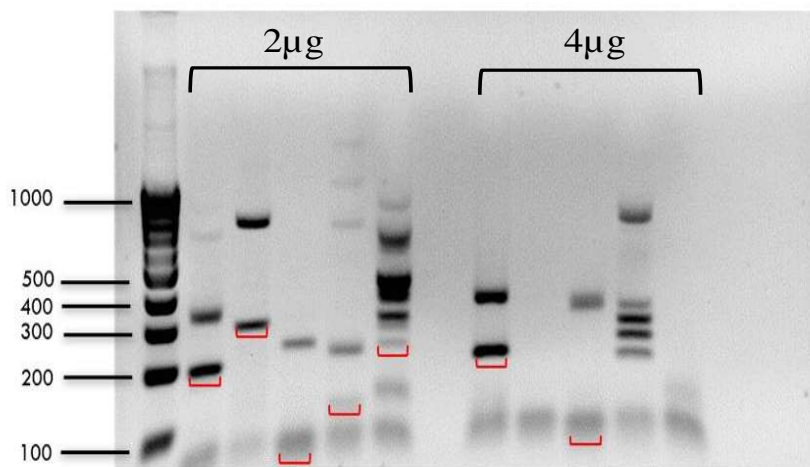
Cuantificación del ARN extraído de los sobrenadantes del cultivo en MARC-154.

Condición	Concentración	
	ARN $\text{ng}/\mu\text{l}$	260/280
2 $\mu\text{g}$	332.4	1.95
4 $\mu\text{g}$	330.3	1.97

Posteriormente se realizó una retrotranscripción obteniendo concentraciones elevadas de ADNc. Finalmente, el ADN obtenido se amplificó mediante PCR utilizando los 5 pares de primers correspondientes a 5 diferentes *orfs* de PRRSV, donde, a pesar de que hubo uniones inespecíficas, en la condición donde se usaron 2 $\mu$ g de ARNm para la transfección, se encontraron los 5 amplicones esperados, mientras que, donde se usaron 4 $\mu$ g solo se encontraron 2 de los 5 amplicones.

Cuantificación del ADNc obtenido a partir del ARN extraído.

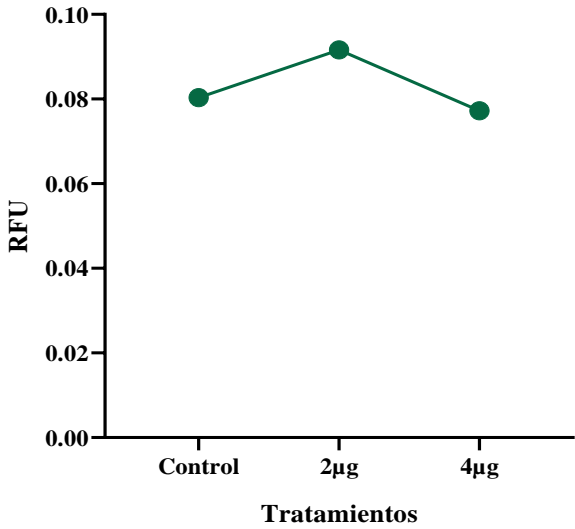
Condición	Concentración ADNc ng/ $\mu$ l	260/280
2 $\mu$ g	3985.4	1.75
4 $\mu$ g	4092.0	1.72



Electroforesis en gel de agarosa 1.2%. Primers utilizados *orfs* 3-7 de PRRSV, amplicones esperados 187, 368, 84, 140, 210.

---

Adicional a esto, se midió la intensidad de fluorescencia en el variokan LUX, donde en la condición de 2 $\mu$ g, se encontró mayor intensidad de fluorescencia con respecto al control



Evaluación de la fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-PRRSV-GP5/FITC

---

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
2. Abbott, R. K., & Crotty, S. (2020). Factors in B cell competition and immunodominance. *Immunological reviews*, 296(1), 120-131.
3. Angeletti, D., Gibbs, J. S., Angel, M., Kosik, I., Hickman, H. D., Frank, G. M., ... & McDermott, A. B. (2017). Defining B cell immunodominance to viruses. *Nature immunology*, 18(4), 456.
4. Azam, A. (2018). Etude de la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'hormone humaine H2-relaxine et de modifications non-naturelles: perspectives pour la réduction de l'immunogénicité des protéines et peptides thérapeutiques (Doctoral dissertation, Paris Saclay).
5. Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Reviews Immunology*, 2(9), 706-713.
6. Burton, DR, Poignard, P., Stanfield, RL y Wilson, IA (2012). Los anticuerpos ampliamente neutralizantes presentan nuevas perspectivas para contrarrestar virus altamente antigénicamente diversos. *Science*, 337 (6091), 183-186
7. Butler, J. (2012). The porcine antibody repertoire: variations on the textbook theme. *Frontiers in immunology*, 3, 153.
8. Cajero-Juárez, M., Sánchez-Vázquez, R., Valdéz-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., & Nuñez-Anita, R. E. (2017). Opciones vacunales contra los virus patógenos de porcinos PRRS y PCV2, un binomio frecuente. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 5(12).
9. Cao, R. Y., Dong, D. Y., Liu, R. J., Han, J. F., Wang, G. C., Zhao, H., ... & Qin, C. F. (2013). Human IgG subclasses against enterovirus Type 71: neutralization versus antibody dependent enhancement of infection. *PLoS one*, 8(5), e64024.
10. Cavacini, L. A., Kuhrt, D., Duval, M., Mayer, K., & Posner, M. R. (2003). Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. *AIDS research and human retroviruses*, 19(9), 785-792.
11. Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1, 22-25.
12. Charerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology*, 1(1), 23.
13. Chomont, N., Hocini, H., Gody, JC, Bouhlal, H., Becquart, P., Krief-Bouillet, C., ... y Bélec, L. (2008). Los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 no inhiben la transcitosis viral a través de las células epiteliales de la mucosa. *Virología*, 370 (2), 246-254.
14. Conde, J. N., Silva, E. M., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2017). The complement system in flavivirus infections. *Frontiers in microbiology*, 8, 213.
15. Fan, P., Chi, X., Liu, G., Zhang, G., Chen, Z., Liu, Y., ... & Chen, W. (2020, January). Potent neutralizing monoclonal antibodies against Ebola virus isolated from vaccinated donors. In *MAbs* (Vol. 12, No. 1, p. 1742457). Taylor & Francis.
16. Flores-Mendoza, L., & Hernández, J. (2010). Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Veterinaria México*, 41(2), 139-159.
17. Forthal, D. N., Landucci, G., Chohan, B., Richardson, B. A., McClelland, R. S., Jaoko, W., ... & Overbaugh, J. (2013). Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI) antibody

---

activity does not correlate with risk of HIV-1 superinfection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 63(1), 31.

18. Gong, E. Y. (2013). *Antiviral Methods and Protocols*. Beerse Belgica: Humana Press.
19. Huber, V. C., McKeon, R. M., Brackin, M. N., Miller, L. A., Keating, R., Brown, S. A., ... & McCullers, J. A. (2006). Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9), 981-990.
20. Irani, V., Guy, A. J., Andrew, D., Beeson, J. G., Ramsland, P. A., & Richards, J. S. (2015). Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Molecular immunology*, 67(2), 171-182.
21. Jiang, S., Hillyer, C., & Du, L. (2020). Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends in immunology*, 41(5), 355-359.
22. Jose Angel Cordova Villalobos, J. L. (2010). *La epidemia de influenza A/H1N1 en Mexico*. Mexico: Panamericana.
23. Jung, B. K., Kim, H. R., Jang, H., & Chang, K. S. (2020). Replacing the decoy epitope of PCV2 capsid protein with epitopes of GP3 and/or GP5 of PRRSV enhances the immunogenicity of bivalent vaccines in mice. *Journal of Virological Methods*,
24. Klasse, P. J., & Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology*, 83(9), 2091-2108.
25. Kadelka, C., Liechti, T., Ebner, H., Schanz, M., Rusert, P., Friedrich, N., ... & Trkola, A. (2018). Distinct, IgG1-driven antibody response landscapes demarcate individuals with broadly HIV-1 neutralizing activity. *Journal of experimental medicine*, 215(6), 1589-1608.
26. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2014). *KUBY Inmunología*. Mexico D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.
27. Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479, 475-486.
28. Ke, H., & Yoo, D. (2017). The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design for PRRS virus. *Veterinary microbiology*, 209, 75-89.
29. Laboratorios Hipra, SA 2019
30. Lewis, G. K., Pazgier, M., Evans, D. T., Ferrari, G., Bournazos, S., Parsons, M. S., ... & Finzi, A. (2017). Beyond viral neutralization. *AIDS research and human retroviruses*, 33(8), 760-764.
31. Li, K., Chen, Z., & Plagemann, P. (1998). The neutralization epitope of lactate dehydrogenase-elevating virus is located on the short ectodomain of the primary envelope glycoprotein. *Virology*, 242(2), 239-245.
32. López-Heydeck, S. M., *et al.*, (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1).
33. López, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 155-163.
34. Lunney, JK, Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., y Renukaradhya, GJ (2016). Virus porcino del síndrome respiratorio y reproductivo (PRRSV): patogénesis e interacción con el sistema inmunológico. *Revisión anual de biociencias animales*, 4, 129-154.

- 
35. Martín, A. P., Escudero, J. B., Rodríguez, H. B., & Martín, D. D. (2014). Funciones de los linfocitos B. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1752-1759.
  36. Mateu, E., & Diaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*, 177(3), 345-351.
  37. Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key gaps in the knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in veterinary science*, 6.
  38. Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., López, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241–4250.
  39. Pasin, F., Menzel, W., & Daròs, J. A. (2019). Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant biotechnology journal*, 17(6), 1010-1026.
  40. Pérez Durán, F. (2020). Evaluación de la respuesta inmune contra subunidades proteicas del virus PRRS en un modelo murino (Tesis posgrado). Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo
  41. Phani B. Das. (2010). The glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their role in infection and immunity (Thesis for the degree of doctor). *University of Nebraska-Lincoln*.
  42. Pileri, E., y Mateu, E. (2016). Revisión de la transmisión del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino entre cerdos y granjas y su impacto en la vacunación. *Investigación veterinaria*, 47 (1), 108.
  43. Piñeyro, P. E., Kenney, S. P., Giménez-Lirola, L. G., Heffron, C. L., Matzinger, S. R., Opriessnig, T., & Meng, X. J. (2015). Expression of antigenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a modified live-attenuated porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine virus (PCV1-2a) as a potential bivalent vaccine against both PCV2 and PRRSV. *Virus research*, 210, 154-164.
  44. Piñeyro, P. E., Kenney, S. P., Giménez-Lirola, L. G., Opriessnig, T., Tian, D., Heffron, C. L., & Meng, X. J. (2016). Evaluation of the use of non-pathogenic porcine circovirus type 1 as a vaccine delivery virus vector to express antigenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 213, 100-108.
  45. Pirzadeh, B., & Dea, S. (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Journal of General Virology*, 78(8), 1867-1873.
  46. Popescu, L. N., Triple, B. R., Chen, N., & Rowland, R. R. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary microbiology*, 209, 90-96.
  47. Provost, C., Jia, J. J., Music, N., Lévesque, C., Lebel, M. È., del Castillo, J. R., ... & Gagnon, C. A. (2012). Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virology journal*, 9(1), 267.
  48. Reynard, O., & Volchkov, V. E. (2015). Characterization of a novel neutralizing monoclonal antibody against Ebola virus GP. *The Journal of infectious diseases*, 212(suppl\_2), S372-S378.



- 
49. Robinson, S. R., Li, J., Nelson, E. A., & Murtaugh, M. P. (2015). Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 203, 56-65.
  50. Rodriguez, F., Harkins, S., Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2002). Immunodominance in virus-induced CD8+ T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *Journal of Virology*, 76(9), 4251-4259.
  51. Sánchez V.M. (2010). Curso de introducción a la inmunología porcina. Mexico. Recuperado de <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/inmunologia/ca042.htm>
  52. Tay, MZ, Wiehe, K. y Pollara, J. (2019). Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos en respuestas inmunitarias antivirales. *Fronteras en inmunología*, 10 , 332.
  53. Thaa, B., Sinhadri, B. C., Tievesch, C., Krause, E., & Veit, M. (2013). Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PloS one*, 8(6), e65548.
  54. Truong, H. M., Lu, Z., Kutish, G. F., Galeota, J., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2004). A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus. *Virology*, 325(2), 308-319.
  55. Vanderven, H. A., Jegaskanda, S., Wheatley, A. K., & Kent, S. J. (2017). Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus. *Current opinion in virology*, 22, 89-96.
  56. Van Der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Lanier, J. G., Wherry, E. J., Puglielli, M. T., Blattman, J. N., ... & Ahmed, R. (2003). Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. *Virology*, 315(1), 93-102.
  57. Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., Altman, D. R., Bailey, M. J., Mansour, M., ... & Cordon-Cardo, C. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 370(6521), 1227-1230.
  58. Wang, C. Y., & Walfield, A. M. (2005). Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications. *Vaccine*, 23(17-18), 2049-2056.
  59. Wang, P. P., *et al.*, (2016). Sequence and Phylogenetic Analyses of the Nsp2 and orf5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boars from South China in 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-12.
  60. Welch, S. K. W., & Calvert, J. G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus research*, 154(1-2), 98-103.
  61. Xiao, S, *et al.*, (2010). Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS ONE*, 5(6).
  62. Yewdell, J. W. (2006). Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity*, 25(4), 533-543.
  63. Young, J. (2020). Characterization of Broadly Neutralizing Antibodies to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV).
  64. Zheng, Q., Jiang, J., He, M., Zheng, Z., Yu, H., Li, T., ... & Song, S. (2019). Viral neutralization by antibody-imposed physical disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), 26933-26940.



- 
65. Zhou, Y. J., Yu, H., Tian, Z. J., Liu, J. X., An, T. Q., Peng, J. M., ... & Wang, M. (2009). Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus of GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology*, 138(1-2), 1-10.
  66. Zhu, L., Zhou, Y., & Tong, G. (2012). Mechanisms of suppression of interferon production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Acta Virol*, 56(1), 3-9.