



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**“Participación de la vía NF- κ B en la respuesta a
péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS”**

Como requisito para obtener el título
profesional de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

SERGIO MOLINA CAMPOS

Director de tesis: Doctora Rosa Elvira Nuñez Anita

Co-Director de tesis Fernando Calderón Rico



Morelia, Michoacán, Diciembre 2022

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la tutoría de la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita y la co-asesoría del M en C. Fernando Calderón Rico.

Además, agradecemos el financiamiento parcial por la CIC-UMSNH 2021-2022.

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.

Agradecemos también, el apoyo a la Beca CONACYT para tesis de Licenciatura en el periodo abril 2021 a mayo 2022. Que consistió en el Apoyo a Formación de Recursos Humanos de Tesis de licenciatura del proyecto A1-S-43236 etapa 2, con No. de becario 30881.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero externarles mi profundo agradecimiento y admiración a dos extraordinarias personas y científicos, a la Dra. Rosa Elvira Nuñez y al Dr. Alejandro Bravo, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible. Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por la paciencia, por las enseñanzas y consejos, pero, sobre todo, gracias por haberme transmitido una forma diferente de ver la ciencia y la vida, a partir, del esfuerzo, la dedicación y la constancia.

Quiero agradecer infinitamente a mi familia. A mi mamá, María Teresa y a mi tía Rosy quiero agradecerles por creer en mí, por sus consejos de nunca rendirme y esforzarme más, por sus regaños, así como por su apoyo emocional y económico desde que era pequeño hasta el día de hoy, para poder realizar y concluir mis estudios. A mi tía Flory y a mi abuelo Pedro por sus consejos y por su apoyo. Por último, quiero agradecer a mis 2 hermanos Víctor y Lalo por darme ánimo y motivación para seguir adelante. A ustedes mi familia, va dedicada esta tesis y mi trabajo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio, Franck, Fer, Wicho, Gaby, Roberto, J.M y Pedro. Gracias por ser solidarios conmigo, apoyarme, ayudarme, por corregirme cuando me equivocaba, así como, por compartirme su conocimiento y contribuir en una parte importante de mi formación en el área de la ciencia.

Por último, quiero agradecer a mis amigos y compañeros de la universidad, a Bryan y Angy por brindarme su amistad, por compartirme su conocimiento y por haber sido parte del mejor equipo de la sección 04.

“En el campo de la observación, el azar solo favorece a las mentes preparadas”

Luis Pasteur

ÍNDICE

1.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
2.- ÍNDICE DE TABLAS	6
3.- LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
4.- ABSTRACT	9
5.- RESUMEN.....	10
6.- INTRODUCCIÓN	12
6.1.- Historia de PRRSV.....	12
6.2.- Características generales del PRRSV	12
6.3.- Impacto económico del PRRSV.....	13
6.4.- Epidemiología	14
6.5.- Enfermedad y manifestaciones clínicas del PRRSV.....	14
6.6.- Genoma de PRRSV	15
6.7.- Interacción Virus-Hospedero	17
6.8.- Proteína GP5 del virus PRRS.....	18
6.9.- Proceso de Entrada e Infección del PRRSV	19
6.10.- Péptidos como estrategia terapéutica.....	21
6.11.- Respuesta inmune innata del PRRSV	22
6.12.- Respuesta inmune adquirida	23
6.13.- Mecanismo de modulación e inhibición de las vías relacionadas a Interferones	24
6.14.- Activación de macrófagos alveolares (AMΦ).....	25
6.15.- Familia de los factores nucleares de transcripción kappa B (NF-kB)	26
6.16.- Bioquímica de la activación de NF-Kb	28
7.- ANTECEDENTES.....	30
7.1.- Evaluación de la Activación de MΦ por el PRRSV	30
8.- JUSTIFICACIÓN	32
9.- HIPÓTESIS.....	33
10.- OBJETIVO GENERAL.....	33
11.- OBJETIVOS PARTICULARES	33
12.- MATERIALES.....	34
12.1.- Péptidos.....	34
12.2.- Reactivos qPCR (tiempo real)	34
12.3 Oligonucleótidos.....	35
12.4 Análisis estadístico.....	35
13.- METODOLOGÍA.....	36
13.1.- Síntesis de oligonucleótidos	36

13.2 Extracción de ARN	36
13.3. Transcripción Reversa.....	37
13.4. PCR punto final: Estandarización de Oligonucleótidos	37
13.5 PCR cuantitativa (qPCR)	38
13.6.- Metodología general.....	38
13.6.1.- PCR cualitativa gradiente para estandarización de las condiciones de PCR	38
13.7.- Electroforesis	39
13.8.- Estímulos	39
14.- RESULTADOS	40
15.- DISCUSIÓN.....	44
16.- CONCLUSIÓN.....	46
17.- BIBLIOGRAFÍA	47

1.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma, transcripción y traducción de PRRSV.

Figura 2. Interacción entre el receptor CD163 y el complejo heterotrimérico de PRRSV.

Figura 3. Topología de la proteína GP5 del virus PRRS.

Figura 4. Ciclo de replicación e infección de PRRSV.

Figura 5. Esquema de los miembros de la sub familia I de NF-kB.

Figura 6. Esquema de los miembros de la sub familia II de NF-kB.

Figura 7. Productos amplificados por PCR con gradiente de temperatura (Tm)

Figura 8. Expresión relativa del gen TLR2.

Figura 9. Expresión relativa del gen TLR4.

Figura 10. Expresión relativa del gen MYD88.

Figura 11. Expresión relativa del gen IKKA.

Figura 12. Expresión relativa del gen NF-KB1.

Figura 13. Expresión relativa del gen NF-KB2.

2.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligos directo (F) y reverso (R) 5' - 3'

Tabla 2. Concentración usada para la estimulación de células RAW 264.7

3.- LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Deoxyribonucleic acid

cDNA: Complementary Deoxyribonucleic acid

AP-1: Proteína activadora 1

ARN: Ácido Ribonucleico

CBP: Proteína de Unión a CREB

CD: Clúster de Diferenciación

CREB: Elemento modulador de respuesta a Adenosín Monofosfato Cíclico

DC/ pDC: Células dendríticas/ células detriticas plasmocitoides

DEXA: Dexametasona

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dpi: Días pos infección

HP-PRRSV: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino de Alta Patogenia

BDIE: Base de datos de Inmuno Epítopes

IFN: Interferón

IgG/ IgM: Inmunoglobulina G / Inmunoglobulina M

IKK β - α : Cinasa inhibidora del factor nuclear kappa B, subunidad beta y alfa

I κ B α : Inhibidor alfa de NF- κ B

IPS-1: Promotor beta de interferón 1

I κ B: Inhibidor de NF- κ B

JAK: Transductor de la Cinasa-Señal de Jano

JNK: Proteína cinasa activada por mitógeno 8/9/10

LPS: Lipopolisacáridos

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

M Φ : Macrófagos

NFAT: Factor Nuclear de las células T activadas

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Natural Killer

Nsp: Proteínas no estructurales

ORF: Marco de Lectura Abierta

P38: cinasa MAP p38

PKA: Proteína cinasa A

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PRRS: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

PRRSV: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

SFB: Suero Fetal Bovino

STAT: Transductor de señales y activadoras de la transcripción

TGF- β : Factor de crecimiento transformante Beta

TLR: Receptor Tipo Toll

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

URF: Unidades relativas de Fluorescencia

4.- ABSTRACT

The nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway plays an important role during viral infection and disease development. PRRSV infections can cause abnormal activation of NF- κ B, which subsequently results in an immunosuppressed state. The transcription factor NF- κ B is constitutively expressed in all cells of the immune system and is mainly involved in modulating the immune response at different levels. In mammals, it is involved in inflammation, immune cell differentiation, and activation. Previous data in our group have shown that peptides derived from GP5 protein are able to modify the expression of cytokine mRNAs, increasing the expression of TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-12 and the interferons INF α 4 and INF β 1 in an *in vitro* model in mouse macrophages after one hour of treatment, suggesting the polarization of macrophages to the M1 phenotype (proinflammatory phenotype). The induction of cytokine expression favored by peptides of the PRRS virus GP5 protein suggests the involvement of the NF- κ B signaling pathway in response to the stimulus. Indeed, the participation of this pathway is essential for the expression of genes that respond to infectious stimuli, in this case, to viral peptides. On the other hand, virtually all members of the Toll-like receptor (TLR) family recognize a wide variety of infectious antigens and converge at some point in the activation of the NF- κ B pathway. Lipopolysaccharide (LPS), for example, specifically binds to its TLR4 receptor, inducing NF- κ B activation. **Methods:** Mouse macrophages were stimulated with two peptides derived from GP5 protein from PRRSV. One hour after, mRNA was collected, and RT-qPCR was performed. The expression of genes related to the NF- κ B pathway that are upstream of signaling, such as IKKA, MYD88, NF- κ B1, and NF- κ B2, as well as mRNA expression of two members of the Toll-like receptor family, such as TLR2, TLR4. **Results:** Data showed that mRNA expression of IKKA and NF- κ B1 increased significantly compared with the control. Whereas no significant differences were observed in TLR2, TLR4, MYD88, and NF- κ B2 compared with the control. This information will allow us to make rational decisions for the selection of immunogens to prevent the porcine reproductive and respiratory syndrome.

5.- RESUMEN

La vía de señalización del factor nuclear- κ B (NF- κ B) juega un papel importante durante la infección viral y el desarrollo de enfermedades. Las infecciones por PRRSV pueden causar una activación anormal de NF- κ B, que posteriormente resulta en un estado inmunosuprimido. El factor de transcripción NF- κ B se expresa de forma constitutiva en todas las células del sistema inmunitario y está implicado principalmente en la modulación de la respuesta inmunitaria a diferentes niveles. En los mamíferos participa en la inflamación, la diferenciación y la activación de las células inmunitarias. Datos previos de nuestro grupo han demostrado que los péptidos derivados de la proteína GP5 son capaces de modificar la expresión de los ARNm de citoquinas, aumentando la expresión de TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-12 y los interferones INF- α 4 e INF- β 1 en un modelo in vitro en macrófagos de ratón después de una hora de tratamiento, lo que sugiere la polarización de los macrófagos al fenotipo M1 (fenotipo proinflamatorio). La inducción de la expresión de citocinas favorecida por péptidos de la proteína GP5 del virus PRRS sugiere la implicación de la vía de señalización de NF- κ B en respuesta al estímulo. De hecho, la participación de esta vía es fundamental para la expresión de genes que responden a estímulos infecciosos, en este caso a péptidos virales. Por otro lado, prácticamente todos los miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR) reconocen una amplia variedad de antígenos infecciosos y convergen en algún punto de la activación de la vía NF- κ B. El lipopolisacárido (LPS), por ejemplo, se une específicamente a su receptor TLR4, lo que induce la activación de NF- κ B. Métodos: Se estimularon macrófagos de ratón con dos péptidos derivados de la proteína GP5 de PRRSV. Una hora después, se recolectó el ARNm y se realizó RT-qPCR. Se analizó la expresión de genes relacionados con la vía NF- κ B que están antes de la señalización, como IKKA, MYD88, NF- κ B1 y NF- κ B2, así como la expresión de ARNm de dos miembros de la familia de receptores tipo Toll, como, TLR2, TLR4. Resultados: Los datos mostraron que la expresión de ARNm de IKKA y NF- κ B1 aumentó significativamente en comparación con el control, mientras que no se observaron

diferencias significativas en TLR2, TLR4, MYD88 y NF-kB2. Esta información nos permitirá tomar decisiones racionales para la selección de inmunógenos para la prevención del síndrome reproductivo y respiratorio porcino en un futuro cercano.

Palabras clave: PRRSV, NF-kB, Sistema inmune, macrófagos, virus.

6.- INTRODUCCIÓN

6.1.- Historia de PRRSV

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) se identificó en Europa y Estados Unidos a principios de la década de 1990 y desde entonces se ha convertido en un problema para la industria porcina en todo el mundo. El PRRSV causa una enfermedad persistente y a veces grave que se caracteriza por problemas respiratorios, pérdida de peso y bajo rendimiento de crecimiento, así como fallas reproductivas en cerdas gestantes (Zimmerman *et al*, 1997, Rossow, 1998). Las medidas para regular la enfermedad se han complicado por el patrón de infección subclínica persistente con brotes epidémicos ocasionales, así como por la alta heterogeneidad del virus y la falla de la respuesta de anticuerpos para proteger completamente contra la reinfección y el resurgimiento viral (Blaha, 2000, Meng, 2000, Murtaugh *et al*, 2002).

6.2.- Características generales del PRRSV

Basándose principalmente en similitudes en la organización del genoma y la estrategia de transcripción, los arterivirus se agrupan junto con coronavirus, torovirus y ronivirus en el orden Nidovirales (Cavanagh, 1997, Snijder *et al*, 1998). Al igual que en los coronavirus, el genoma de PRRSV de 15,1 a 15,5 kb se expresa a través de un conjunto de transcritos de ARNm subgenómicos (ARNm1-ARNm7), cada uno de los cuales se usa para la traducción de uno o dos marcos de lectura abiertos (ORF) (Conzelmann *et al*, 1993).

El PRRSV es un huésped muy restringido a las células porcinas del linaje de monocitos, donde sus principales células diana son los macrófagos alveolares de porcino (AMΦ) y es un virus persistente (Duan *et al*, 1997). En 1993 un grupo de investigadores observó que los síntomas clínicos predominantes eran dificultad respiratoria en cerdos jóvenes y falla reproductiva generalizada en cerdas preñadas, incluidos fetos momificados, mortinatos y abortados (Goyal, 1993). La

caracterización inicial de los genotipos aislados europeos (Tipo 1) y norteamericanos (Tipo 2) circulantes era divergente genéticamente. Aunque el fenotipo general de la enfermedad, los síntomas clínicos generales, la organización genómica y la emergencia temporal fueron similares, estas cepas diferían en ~40 % a nivel de nucleótidos.

6.3.- Impacto económico del PRRSV

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es el agente etiológico responsable de enfermedades respiratorias en cerdos destetados y en crecimiento, así como de fallas reproductivas en cerdas. La enfermedad que causa este virus es considerada una de las enfermedades porcinas más importantes a nivel mundial, con un impacto económico estimado en \$664 millones de dólares en pérdidas anuales para los productores estadounidenses, lo que quiere decir un incremento de 18.5% en los últimos 8 años tan solo en E.U.A. (Holtkamp *et al*, 2013, Neumann *et al*, 2005). En Europa la situación es similar y se han realizado modelos económicos de enfermedad, utilizando estimaciones por cada mil animales, para determinar la carga económica en el mejor y peor de los casos combinando fallo reproductivo y enfermedad respiratoria, estimando las pérdidas anuales a partir de una mediana de € 75,724, si la explotación se afecta levemente durante la lactancia y engorde, a una mediana de € 650,090 si una explotación, en este caso particular es de 1,000 cerdas se ven gravemente afectada en todas las fases productivas (Nathues *et al*, 2017).

El PRRSV se encuentra ampliamente distribuido en México, se considera un virus endémico, con reportes en Estado de México, Puebla, Sonora, Yucatán y Nuevo León. Sin embargo, no existen reportes hasta el momento de su epidemiología ni de costes económicos de todo el país debido a la pérdida de cerdos o al costo de lidiar con este virus. (López-Heydeck *et al*, 2015).

6.4.- Epidemiología

Desde su primera aparición hace más de tres décadas, se han reportado tres genotipos importantes, el americano, el europeo y el asiático, Esto por la región donde ocurrieron los primeros brotes y la región de aislamiento y caracterización. De estos genotipos el genotipo asiático fue denominado de alta patogenicidad o HP PRRSV. Esto porque el HP PRRSV provoca severos signos clínicos de alta patogenicidad y que son los más agresivos que los genotipos 1 y 2 en cerdos jóvenes, adultos y de todas las edades, según datos epidemiológicos reportados por el Centro de Control de Enfermedades de China, además fue asociado con una mayor mortalidad (CADC) (Tian *et al*, 2007).

En México, los datos de prevalencia son similares a los reportados en el resto del mundo, aunque el HP PRRSV no se ha reportado en México. Según estudios retrospectivos, la prevalencia nacional va de 20 a 70 % (Sierra *et al*, 2000; Macías *et al*, 2005; Cajero *et al*, 2016). Según datos epidemiológicos que identifican al virus en granjas con diferente grado de tecnificación, la prevalencia del virus varía de acuerdo con el periodo estacional en que se obtienen las muestras. En el periodo invernal se presenta el mayor número de incidencias.

Algunos países con explotaciones porcinas se han reportado que tienen el control de la propagación del PRRSV, por ejemplo, Australia, Suecia, Nueva Caledonia y gran parte de Sudamérica (Shi *et al*, 2010).

6.5.- Enfermedad y manifestaciones clínicas del PRRSV

En lechones recién nacidos y animales jóvenes la mortalidad llega a ser del 100%. En cerdas en etapa reproductiva, aumentan los índices de abortos, lechones momificados, mortinatos, nacidos débiles y repeticiones del celo. Las cerdas infectadas en el segundo tercio de la gestación presentan infertilidad generalizada que puede durar de 2 a 3 meses, afectando los índices productivos, el número de lechones vivos al nacimiento y la mortalidad antes del destete.

En el orden reproductivo también son afectados los cerdos macho ya que durante la infección se presenta disminución de la libido y baja calidad del semen. Además, que PRRSV se puede contagiar a través del semen.

Después de la infección inicial, el virus también favorece infecciones secundarias por otros virus y bacterias, que en conjunto forman el complejo respiratorio porcino (CRP o PRDC). El CRP agudiza los signos clínicos y llega a ser letal en cerdos de todas las edades (Hansen *et al*, 2010; Heydeck *et al*, 2013).

6.6.- Genoma de PRRSV

El genoma de PRRSV varía de 14,9 kb a 15,5 kb de longitud y expresa una variedad de proteínas accesorias y estructurales a través de dos mecanismos de transcripción distintos, contiene 11 marcos de lectura abierta (Open Reading Frames, *orfs* por sus siglas en inglés), los cuales se han denominado como ORF1A, ORF1A', ORF1B, ORF2A, ORF2B, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5A, ORF6, ORF7 (López-Heydeck *et al.*, 2015). Un ORF, es un marco de lectura abierto, es decir, es una secuencia de ADN que no incluye un codón de terminación y funciona como una señal de detención. La organización genómica y los perfiles de expresión asociados se representan en la figura 1.

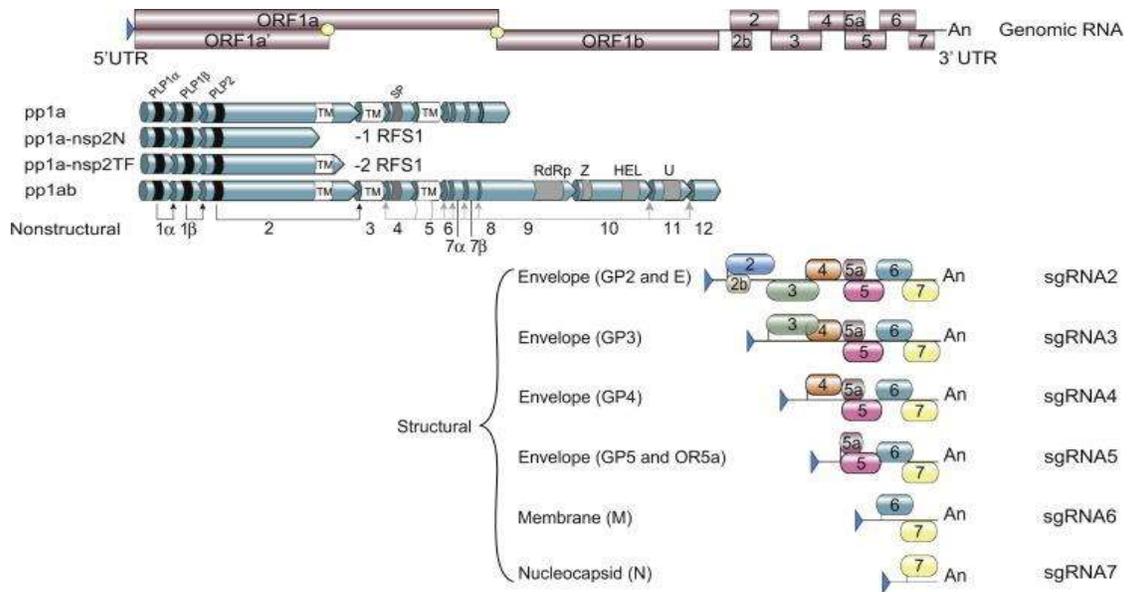


Figura 1.- Genoma, transcripción y traducción de PRRSV. La replicación de PRRSV progresa mediante una variedad de mecanismos reguladores genéticos y proteicos. La expresión de las primeras tres cuartas partes del genoma de 14,9–15,5 kb produce 4 poliproteínas conocidas (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF, pp1ab) a través de dos RFS programados documentados (*). Las poliproteínas se procesan cotraduccional y postraduccionalmente en al menos 16 proteínas no estructurales (nsps) replicasas (accessorias) distintas por cuatro proteasas virales codificadas PLP1 α , PLP1 β , PLP2 y SP. Los motivos de polimerasa reconocidos en pp1b son la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), el dominio de dedo de zinc (Z), el dominio helicoidal (HEL) y el dominio de endorribonucleasa específico de uridilato de nidovirus (NendoU; U). Las proteínas estructurales canónicas se expresan exclusivamente a través de un conjunto de ARN subgenómicos (sgRNA). Tomado de Kappes & Faaberg 2015.

Los ORF1a, 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.

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. 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).

6.7.- Interacción Virus-Hospedero

Las glicoproteínas de la cubierta viral (GP2 a GP5, M) son las primeras que interactúan con los receptores de la célula huésped para iniciar la infección (CD163) y están expuestas al sistema inmunitario cuando las partículas virales son en la sangre y la circulación del tejido linfóide (Figura 2). También hay otra proteína que contribuye a la estructura del virión, la proteína M, que se requiere durante la entrada viral para interactuar con el receptor celular de sulfato de heparán en los macrófagos. Más tarde, se cree que GP5 se une a la sialoadhesina y la internalización del virus y el desprendimiento se desencadenan por la formación de un heterotrímero viral (GP2a, GP3 y GP4) con el receptor eliminador CD163. (Figura 2). GP5 es la glicoproteína más abundante. Primero, interactúa con dos mediadores de entrada celular, glucosaminoglucanos de sulfato de heparán y sialoadhesina/CD169 (Viet *et al*, 2014, Shi *et al*, 2015,) para favorecer la entrada viral y luego, posiblemente, con la proteína N y su dominio similar al MHC para llevar el complejo de ARN N-viral al sitio de gemación (Figura 2). GP2, GP3 y GP4 están protegidas con glicosilaciones, como la mayoría de las proteínas de membrana de PRRSV, para evitar el reconocimiento y la neutralización de anticuerpos. GP2 tiene dos sitios de glicosilación, GP3 tiene siete y GP4 tiene cuatro, tres de los cuales están directamente relacionados con la supervivencia del virus, causando daño letal en la producción de virus cuando más de dos de estos sitios están mutados.

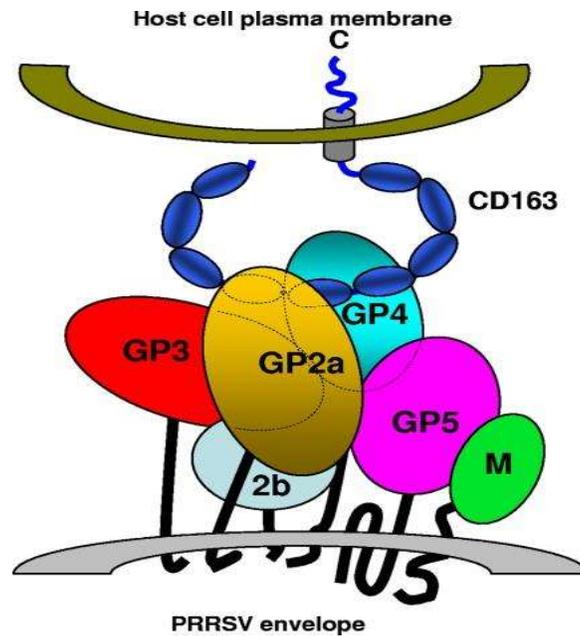


Figura 2. Interacción entre el receptor CD163 y el complejo heterotrimérico de PRRSV. Modificado de (Loving *et al*, 2015).

6.8.- Proteína GP5 del virus PRRS

GP5 es la mayor glicoproteína estructural de PRRSV. Tiene un tamaño de 200 aminoácidos (aa) y un peso molecular de aproximadamente 25 KDa, y tiene la función de facilitar la interacción del virus con su célula blanco. Finalmente, la proteína GP5 se encuentra formando un complejo heterodimerico con la proteína M a través de puentes disulfuro. Dicho complejo es esencial para el ensamble del virión ya que se ha sugerido que, al ser las proteínas con mayor presencia en la envoltura, son las responsables de la curvatura de la membrana (Dokland, 2010).

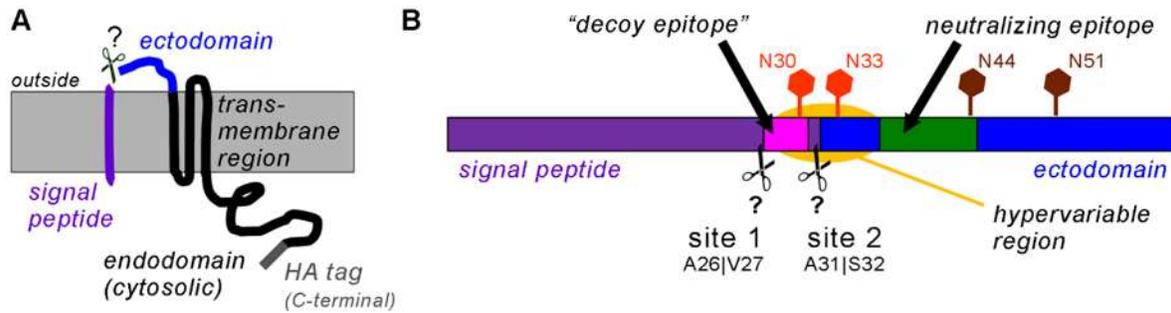


Figura 3 **A)**, Topología de PRRSV GP5 sin procesar con péptido señal (púrpura, ~30 aminoácidos), ectodominio (azul, ~30 residuos), un tramo transmembrana hidrofóbico (~70 aminoácidos, negro) y un endodominio citosólico/interno del virus (~70 residuos, negro). La posición de la C-Se indica la etiqueta HA terminal utilizada en este estudio (gris oscuro). Membrana en gris claro. **(B)**, se prevé que la escisión del péptido señal se produzca en dos sitios: en A26|V27 (sitio 1) o en A31|S32 (sitio 2), como se indica. El epítipo neutralizante (verde) está presente en todas las variantes predichas, pero el "epítipo señuelo" (magenta) no se conserva en la proteína madura por escisión en el sitio 2. Tomado de Thaa *et al*, 2013.

6.9.- Proceso de Entrada e Infección del PRRSV

El proceso de entrada del virus en su célula huésped (macrófagos alveolares porcinos) es el primer paso crucial en la infección. (Kreutz, 1998; Breedam *et al*, 2010). Estos factores celulares, incluidos heparán sulfato, CD163, sialoadhesina porcina (pSn), vimentina, CD151, CD209 (DC-SIGN), cadena pesada 9 de miosina no muscular (MYH9) y otros, están involucrados en la unión, internalización y liberación del genoma, como se muestra en Figura 4.

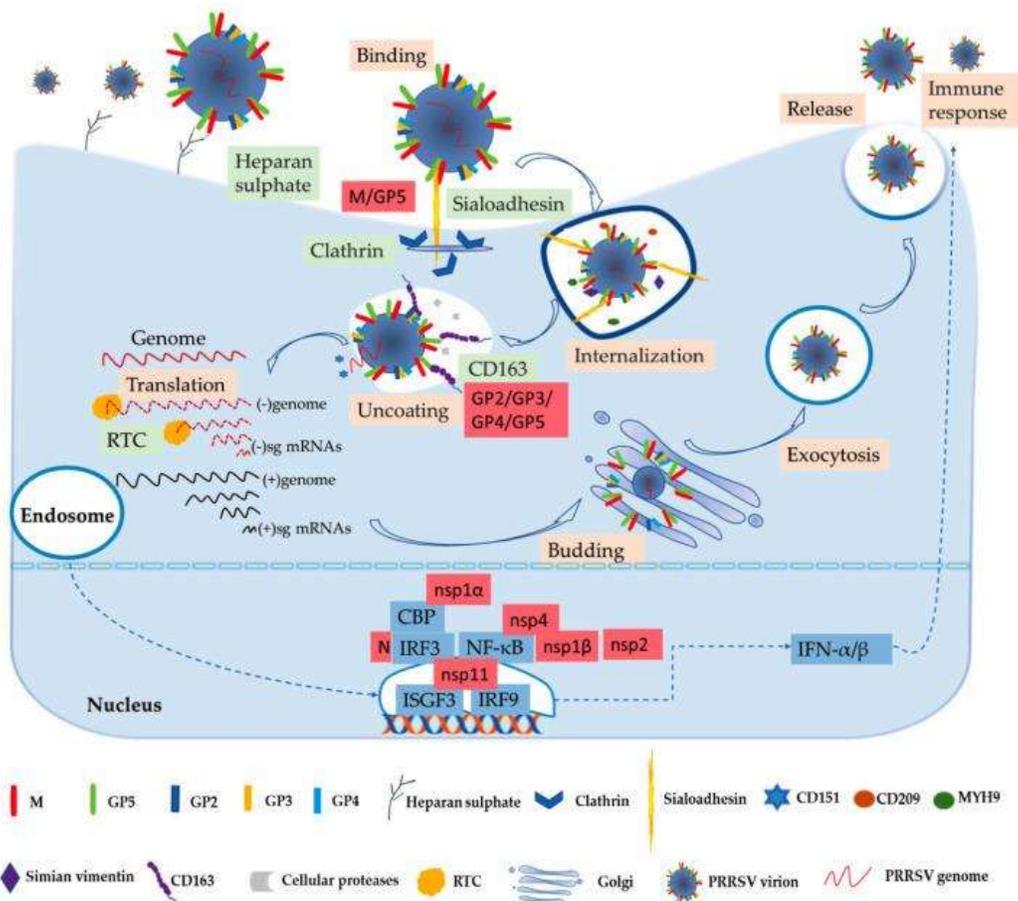


Figura 4. Ciclo de replicación e infección de PRRSV, incluida la unión, la internalización, el decapado, la traducción, el ensamblaje, la liberación del virión y la respuesta inmunitaria. La citocina IFN- α/β estimula primero la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped contra la infección por PRRSV. En este proceso, algunas proteínas virales estructurales y no estructurales importantes interactúan con factores del huésped. Tomado de Ma Jun *et al*, 2021.

En las primeras etapas, el PRRSV ingresa al macrófago a través de un proceso mediado por receptor. Los viriones de PRRSV se concentran en la superficie de la célula al interactuar con los glicosaminoglicanos de sulfato de heparán que están presentes en la superficie de las células de porcinos lo que promueve una unión más eficiente para la unión posterior a uno o más receptores involucrados en la internalización del virus. A continuación, la integración con pSn aumenta gradualmente. La pSn, una glicoproteína transmembrana de tipo 1 restringida por macrófagos alveolares de porcinos se identifica como un receptor de unión e internalización de PRRSV a través de la endocitosis mediada por clatrina. Tras la internalización con la participación de pSn, el genoma del virus que está presente

en el endosoma temprano se libera en el citoplasma, por acidificación del endosoma (Breedam *et al*, 2010). La última etapa depende de manera crítica de CD163, una familia de receptores ricos en cisteína (SRCR) para la eliminación de hemoglobina, que es el receptor más específico e indispensable para la entrada e infección del PRRSV tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.10.- Péptidos como estrategia terapéutica

Los péptidos son moléculas de señalización selectivas y eficaces que se unen a receptores específicos de la superficie celular. Dado su atractivo perfil farmacológico y sus propiedades intrínsecas, los péptidos representan un excelente punto de partida para el diseño de nuevas terapias y se ha visto que su especificidad se traduce en excelentes perfiles de seguridad, tolerabilidad y eficacia en humanos y otros mamíferos. Además, las terapias de péptidos se asocian típicamente con una menor complejidad de producción en comparación con los biofarmacéuticos basados en proteínas y, por lo tanto, los costos de producción también son más bajos, acercándose generalmente a los de las moléculas pequeñas.

En la actualidad, el control del PRRSV en el campo se basa en gran medida en el uso de vacunas de virus vivos modificados atenuados. Por otro lado, las vacunas disponibles en la actualidad solo confieren protección contra cepas homólogas y poseen una capacidad débil o nula para proporcionar protección cruzada a cepas heterólogas (Jeong *et al*, 2018).

El estudio, descubrimiento, así como la síntesis de proteínas y péptidos como agentes terapéuticos, en las últimas dos décadas se ha convertido en un enfoque y una herramienta para contrarrestar diversas patologías. Los péptidos con actividad terapéutica hoy en día tienen presencia en medicamentos aprobados, a través de la formulación de fármacos y actualmente en la formulación de vacunas.

6.11.- Respuesta inmune innata del PRRSV

La respuesta inmunitaria innata es el primer sistema con el que se encuentra cualquier patógeno, especialmente para prevenir la replicación viral y la invasión de los tejidos de las mucosas (vías respiratorias en el caso del PRRSV) y, lo que es más importante, para iniciar la fuerte respuesta inmunitaria adaptativa para luchar contra los agentes infecciosos intracelulares (Lunney *et al*, 2016).

Los interferones tipo I (IFN α/β) comprenden uno de los mecanismos más potentes contra los virus invasores en las primeras etapas de la infección, desencadenando una serie de genes estimulados por IFN (ISG) (Schneider *et al*, 2014). En términos generales, todas las células nucleadas tienen la capacidad de producir IFN α/β , pero las DC plasmocitoides (pDC) son las productoras más potentes de esta familia de citocinas (Asselin-Paturel & Trinchieri, 2005). Otros estudios han demostrado que la supresión de IFN tipo I es una estrategia importante del PRRSV para modular la defensa antiviral del huésped. De hecho, varias proteínas virales han sido identificadas como antagonistas de IFN (nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp4, nsp11 y N) (Lunney *et al*, 2014).

Entre las proteínas no estructurales del PRRSV con capacidad de modulación de IFN tipo I, nsp1 se ha considerado como el antagonista más fuerte de la producción de IFN- β al actuar sobre la fosforilación del factor regulador de interferón 3 (IRF3) y la translocación nuclear. Nsp2 es la proteína del PRRSV más grande (madura). Esta proteína es única en el contexto del PRRSV debido a su heterogeneidad genética, su participación en diversos roles que respaldan el ciclo de replicación viral y su empaquetamiento dentro del virión del PRRSV (Kappes *et al*, 2013). Estudios previos sugieren que nsp2 tiene diferentes roles relacionados con los mecanismos de evasión inmune. Se ha determinado que el dominio nsp2 OTU (dominio desubiquitinante dependiente de tiol) inhibe el factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF-kB) al interferir con el proceso de poliubiquitinación de I κ B α (factor nuclear del polipéptido ligero kappa) potenciador del gen en el inhibidor de células B) y, posteriormente, prevenir la degradación de la proteína I κ B α (Sun *et al*, 2010).

Las células asesinas naturales (NK) constituyen otro brazo poderoso del sistema inmunitario innato contra el PRRSV, particularmente si se considera el alto porcentaje de células NK circulantes en los cerdos (Denyer *et al*, 2006).

6.12.- Respuesta inmune adquirida

La modesta y retardada respuesta de anticuerpos neutralizantes mediada por células B es una de las principales características asociadas a las respuestas inmunes adquiridas por el PRRSV. A pesar de que los anticuerpos específicos contra PRRSV aparecen temprano, 7 a 9 días después de la infección, la eficacia de esos anticuerpos sigue sin estar clara. Los anticuerpos neutralizantes tardan más y aparecen casi 1 mes después de la infección (Loving *et al*, 2015). Curiosamente, el papel de los anticuerpos neutralizantes en la protección contra la forma respiratoria de la enfermedad es un vacío de conocimiento clave para el PRRSV. Este punto es crítico para definir con precisión los objetivos de las vacunas mejoradas basadas en la respuesta inmune humoral contra este virus.

Es importante tener en cuenta que los anticuerpos neutralizantes aparecen tarde en la infección por PRRSV y otros mecanismos inmunitarios (respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos o celular) podrían estar actuando para suprimir la replicación viral en la sangre, provocando que el virus se aísle en los tejidos linfoides y manteniendo una replicación subóptima que finalmente terminan en la eliminación viral. Para el tipo PRRSV-2 se ha demostrado que la inmunización de cerdos con péptidos de ectodominio del complejo GP5/M no indujo anticuerpos neutralizantes (Li & Murtaugh, 2012), aunque los anticuerpos específicos de ectodominio generados fueron capaces de unirse al virus.

Una característica importante que dificulta la validación de la ubicación de los epítopos neutralizantes es el número de glicosilaciones en o alrededor de ellos. Para las cepas de PRRSV-1, se pueden encontrar hasta 3 glicosilaciones en o flanqueando el epítipo neutralizante de GP5 que se encuentra entre los aminoácidos 37–45 (Faaberg *et al*, 2006). Mientras que para las cepas de PRRSV-

2 hay cuatro sitios de glicosilación potenciales. Cuando se probó, PRRSV con mutaciones en los sitios de glicosilación de GP5 (ya sea en N44 o en la región hipervariable, aguas arriba del epítipo neutralizante) mejoró la inmunogenicidad con una mayor concentración de anticuerpos dirigidos a este epítipo de 5 a 10 veces más en comparación con los inducidos por las cepas de tipo salvaje (Faaberg *et al*, 2006). Se obtuvieron los mismos resultados cuando se administró dos veces otro mutante de desglucosilación (doble desglucosilación en los supuestos restos de glicosilación en GP5), lo que confería una mejor protección contra la exposición homóloga (Lee *et al*, 2014). Además, cuando esta proteína se expresa temprano durante la infección, estimula la producción de anticuerpos neutralizantes tempranos e IFN- β , dos mecanismos antivirales principales, lo que demuestra su papel en la inducción salvaje de mecanismos de autoprotección del huésped (Gao *et al*, 2014). El ORF5 también se complementa con un pequeño cambio de marco del ARNm subgenómico llamado ORF5a, que codifica una proteína de membrana tipo I que consiste principalmente en una hélice alfa con un dominio que atraviesa la membrana (llamado GP5a).

6.13.- Mecanismo de modulación e inhibición de las vías relacionadas a Interferones

Se pueden dividir dos olas de modulación e inhibición en las vías de IFN. La primera ola consiste en que el PRRSV reduce la expresión del Receptor tipo Toll 3 (TLR3, por sus siglas en inglés) y el Factor regulador de interferón (IRF, por sus siglas en inglés) 7, la proteína Nsp1 α por otra parte tiene la capacidad de degradar la proteína de unión a CREB (CBP, por sus siglas en inglés) en el núcleo a través de la vía dependiente de proteosoma, la subunidad Nsp1 α inhibe la fosforilación de Inhibidor de NF- κ B (I κ B) en el citoplasma. Nsp2 inhibe la producción de IFN al bloquear la ubiquitinación de I κ B fosforilado y la fosforilación de IRF3 a través del Dominio de Tumor Ovárico (OTU), lo que resulta en la supresión de la activación de Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Nsp11, endorribonucleasa específica de uridilato (NendoU) con actividad

nucleasa bloquea la fosforilación y translocación de IRF3, suprime la fosforilación de IκB e inhibe la activación de NF-κB. Por otra parte, también suprime la producción de IFN-β a través de la degradación del ARN mensajero de Promotor beta de interferón 1 (IPS-1) y degradando el ARN mensajero de la Proteína de señalización antiviral mitocondrial (MARV).

La proteína N puede retrasar la progresión del ciclo celular y utilizar la maquinaria celular para la infección productiva, en MΦ alveolares porcinos ha sido identificada como la proteína de regulación positiva de IL-10 activando la vía de señalización NF-κB (Wongyanin *et al.*, 2012).

Para la segunda ola de señalización de IFN, PRRSV Nsp1β bloquea la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) e inhibe la translocación nuclear del complejo ISGF3, lo que conduce a la inhibición de la vía de transductores de la Cinasa-Señal de Jano (JAK)-STAT que resulta en inhibir las expresiones de ISG, suprime la exportación del ARN mensajero del huésped desde el núcleo al citoplasma.

6.14.- Activación de macrófagos alveolares (AMΦ)

Las células del linaje monocito-macrófago se caracterizan por su diversidad y plasticidad. En los tejidos, los monocitos/MΦ responden a las señales extracelulares con la adquisición de fenotipos funcionales específicos; a esto se le conoce como polarización o activación de MΦ.

El fenotipo de los MΦ polarizados M1-M2 puede revertirse *in vitro* e *in vivo*. Las vías de señalización para la activación clásica o alternativa del MΦ, comienzan en la membrana por la estimulación de los receptores de citocinas, luego la señal se propaga a las proteínas intracelulares y, finalmente, al núcleo donde se inducen los programas específicos de expresión génica.

Los MΦ se activan en respuesta a las diferentes señales extracelulares que involucran la activación de vías de señalización y factores de transcripción que dan

paso a la expresión de diferentes proteínas y receptores. Los principales factores implicados en la activación son STAT, NF- κ B, IRF, la Proteína Activadora 1 (AP-1), los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR- γ), el Elemento modulador de respuesta a Adenosín Monofosfato Cíclico (CREB) y el Factor Nuclear de las células T activadas (NFAT). Todos ellos forman una interfaz regulada entre sí para impulsar la polarización de los M Φ hacia un fenotipo particular.

6.15.- Familia de los factores nucleares de transcripción kappa B (NF- κ B)

Los miembros de la familia NF- κ B en células de mamífero se dividen en 2: subfamilia I p65 (RelA), c-Rel y RelB y subfamilia II p50/p105 (NF κ B1), p52/p100 (NF κ B2), (figura 5 y figura 6). Referente a su estructura todos los miembros de la familia NF- κ B presentan un dominio N-terminal común llamado RHD (del inglés Rel homology domain), también, en este dominio, es donde se encuentran las secuencias de localización nuclear NLS (del inglés Nuclear Localization Sequence) (Baeuerle & Henkel, 1994).

Las proteínas comparten una región conservada de 300 aminoácidos conocida como dominio de homología Rel que es responsable de la unión al ADN, la dimerización y la translocación nuclear de NF- κ B. En la mayoría de las células, los miembros de la familia Rel forman heterodímeros y homodímeros con distintas especificidades en diversas combinaciones (Beg & Baldwin 1993, Hayden & Ghosh, 2004). El NF- κ B clásico existe como heterodímeros que consisten en una subunidad de 50 kDa (p50) y una subunidad de 65 kDa (p65) (Ghosh *et al*, 1998). En condiciones fisiológicas normales, el NF- κ B queda secuestrado en el citoplasma como complejos inactivos por su interacción con un miembro de la familia inhibidora kappa B (I κ B). Cuando se estimulan con una amplia gama de estímulos proinflamatorios, las proteínas I κ B son fosforiladas por la quinasa I κ B (IKK) y degradadas en los proteosomas (Yang *et al*, 1999). Luego, la subunidad de NF- κ B p65 se fosforila mientras se expone su secuencia de señal de localización nuclear

(NLS), lo que conduce a la translocación nuclear y la posterior unión de NF- κ B a los elementos reguladores del ADN de los genes objetivo involucrados en diversas funciones biológicas (Beg & Baldwin 1993, Ghosh *et al*, 1998, May & Gosh, 1998).

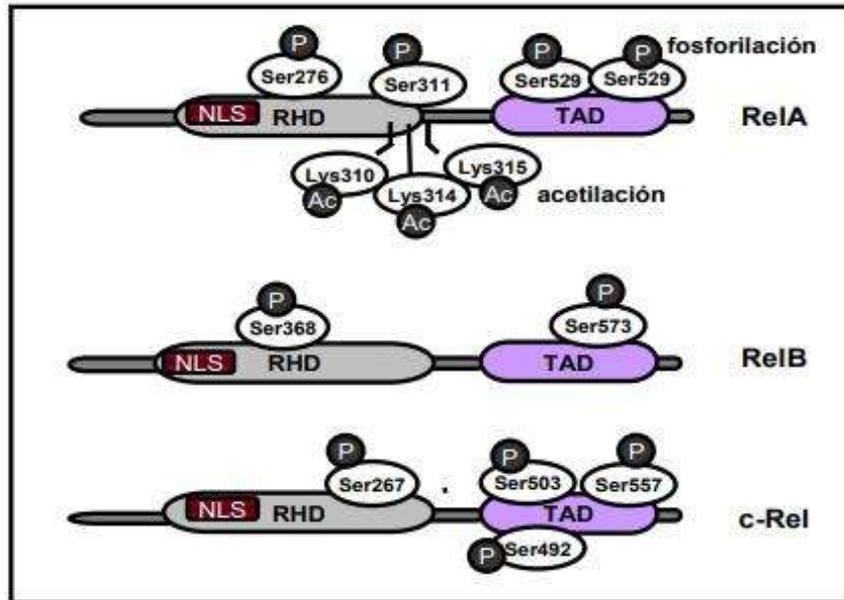


Figura 5. Esquema de los miembros de la sub familia I de NF- κ B. Tomado de (Hayden & Ghost, 2004, 2008).

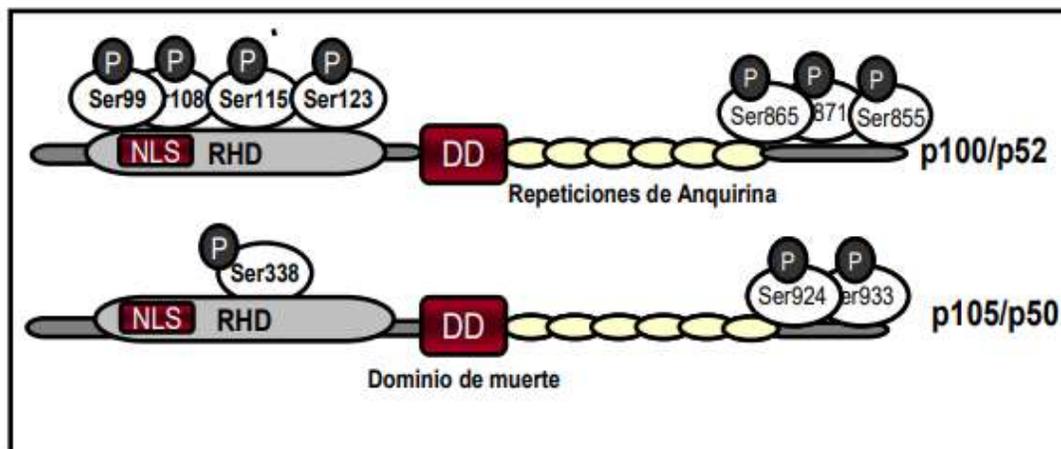


Figura 6. Esquema de los miembros de la sub familia II de NF- κ B. Tomado de (Hayden & Ghost, 2004, 2008).

Muchos virus codifican proteínas que activan o modulan las vías de señalización de NF- κ B para su propio beneficio (Santoro *et al*, 2003). Por ejemplo, la proteína del

tegumento UL37, codificada por el virus del herpes simple 1 (HSV-1), interactúa con el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF6), lo que resulta en la activación de NF- κ B (Goodkin *et al*, 2003). Del mismo modo, la activación de NF- κ B inducida por la proteína central del virus de la hepatitis C (VHC) y la proteína de membrana latente 1 del virus de Epstein-Barr (LMP1) es importante para la supervivencia de las células infectadas y la infección viral persistente (Waris *et al*, 2003, Mosialos *et al* 1995). Estudios previos del PRRSV han demostrado que la proteína de la nucleocápside (N) era un activador del NF- κ B (You *et al*, 1999, Luo *et al*, 2019) sin embargo, no está claro si las Nsp del PRRSV contribuyen a la activación de NF- κ B. El estudio actual demostró que la proteína no estructural 2 (Nsp2) del PRRSV solo podría activar la vía de señalización de NF- κ B y también se investigaron los posibles mecanismos moleculares para la activación de NF- κ B.

Por varias razones, la ruta del NF- κ B proporciona un objetivo atractivo para los patógenos virales. La activación del NF- κ B es un evento temprano inmediato (IE) rápido que ocurre minutos después de la exposición a un inductor relevante, no requiere la síntesis de proteínas de novo y da como resultado una fuerte estimulación transcripcional de varios genes virales y celulares tempranos. La activación de NF- κ B constituye un objetivo obvio porque muchos de sus genes objetivo (factores de crecimiento, citocinas y sus receptores, y protooncogenes) influyen profundamente en el ciclo de la célula huésped.

6.16.- Bioquímica de la activación de NF- κ B

En respuesta a una variedad de estímulos, incluidos patógenos virales y bacterianos, citocinas y agentes inductores de estrés (Pahl, 1999), el complejo citoplasmático latente NF- κ B/I κ B se activa por fosforilación; en el caso de I κ Ba, esta modificación se produce en las serinas 32 y 36 por el complejo I κ B quinasa (IKK). La fosforilación se dirige a I κ Ba para la ubiquitinación, la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina, en los residuos de lisina I κ Ba 21 y 22, después de lo cual el proteasoma 26S degrada esta subunidad inhibidora, lo que permite la liberación de proteínas NF- κ B. Así activado, NF- κ B se transloca al núcleo, donde

estimula la transcripción de genes que contienen la secuencia consenso 5'-GGGRNNYYCC-3'. La familia NF- κ B consta de cinco proteínas estructuralmente relacionadas (c-Rel, RelA, RelB, p50/p105 y p52/p100) que comparten un dominio de homología Rel NH₂ terminal de aproximadamente 300 aminoácidos que contiene secuencias esenciales para la dimerización, unión al ADN y transporte nuclear. Los miembros de la familia c-Rel, RelA y RelB poseen dominios de transactivación COOH-terminal, mientras que p50/p105 y p52/p100 funcionan como proteínas de unión a ADN cortas o proteínas inactivas más grandes que contienen dominios inhibidores COOH-terminal. Debido al potencial para generar diversos homodímeros y heterodímeros, estas proteínas pueden permitir la especificidad transcripcional al formar combinaciones que pueden interactuar específicamente con variantes estructurales del sitio de unión al ADN.

7.- ANTECEDENTES

7.1.- Evaluación de la Activación de MΦ por el PRRSV

La activación de MΦ se ve afectada durante la infección por el PRRSV porque éste se replica dentro de estas células; lo que facilita la infección, distribución y latencia en el organismo. Se conoce que la respuesta inmune adaptativa celular es un factor imprescindible para eliminar la infección con el PRRSV que, frecuentemente, no se evalúa. El factor activador más potente para el macrófago es el IFN γ . El IFN γ es una citocina importante producida por los MΦ y por otras células como las células dendríticas, las NK y los linfocitos T activados (Loving et al., 2015; Pileri and Mateu, 2016).

Datos en la literatura muestran que el IFN γ tiene actividad antiviral contra varios patógenos, incluido el PRSSV. Bautista y Molitor (1999), demostraron, mediante ensayos in vitro, que el pretratamiento con IFN γ exógeno induce la activación de MΦ tisulares de cerdo, disminuyendo la capacidad de replicación del PRRSV, lo que sugiere que la expresión de IFN γ media la respuesta antiviral favorable (Bautista & Molitor, 1999).

Recientemente datos experimentales sugieren que la polarización de los MΦ modula la infección por el PRRSV (Wang *et al*, 2017). La expresión de citocinas antivirales fue significativamente mayor en los MΦ M1 que en los MΦ M2 o en los controles no polarizados y tanto la replicación viral evaluada con una cepa altamente patógena, como la replicación viral con una cepa de PRRSV clásica, se vieron significativamente afectadas en los MΦ alveolares tipo M1. Además, durante la infección por el HP-PRRSV se observó la disminución en la expresión de los genes que están involucrados en las vías de señalización relacionadas con IFN, las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas, la fagocitosis y la presentación y el procesamiento de antígenos, lo que sugiere una función aberrante de los MΦ alveolares porcinos durante la infección (Wang *et al*, 2017).

Por otro lado, se conoce que en el caso del Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCV, por sus siglas en inglés), ciertos dominios de la proteína Z son determinantes

para bloquear la respuesta de activación de MΦ. Particularmente, el dominio N-terminal de esta proteína evita la activación de MΦ y se ha reportado que disminuye la expresión de IL-1β, IL-8, TNF-α, IL6 en MΦ infectados (Xing *et al.*, 2015). Es probable que proteínas estructurales del PRRSV, como GP5, pudiesen modular la activación y polarización de los MΦ, aunque esto no se ha estudiado.

Se ha demostrado que la propagación del PRRSV se favorece dependiendo del estado de activación del MΦ. Singleton *et al.*, (2016) demostraron que el PRRSV se replica en células mieloides porcinas en varios estados de activación o maduración, donde, dependiendo del factor estimulante, se facilita o evita la activación de MΦ. Es decir, en presencia de INFγ, los MΦ se activan hacia el inmunofenotipo M1 y se reduce la replicación del virus. Mientras que en presencia de IL-4, IL-10 y DEXA se favorece el inmunofenotipo M2 y se facilita la replicación viral (Singleton *et al.*, 2016).

En otro estudio se encontró que IL-10 y DEXA indujeron la diferenciación de MΦ hacia un fenotipo M2 o alternativo y favorecieron la expresión de los receptores virales CD163 y CD169, con lo que aumentó la replicación viral. Caso contrario, la inducción con IL-6 o M-CSF provocó un aumento menor en la expresión de CD163 y no resultó en un aumento de la replicación de PRRSV (Singleton *et al.*, 2018).

En este proyecto se evaluaron epítomos diseñados a partir de la proteína GP5 del PRRSV con características antigénicas, para determinar si estos epítomos son capaces de inducir la activación de MΦ, tal como lo hacen otras proteínas virales estructurales o inductores de diferenciación de MΦ. Además de establecer si posiblemente funcionen como futuros candidatos para limitar la replicación viral tras una infección por el PRRSV.

8.- JUSTIFICACIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) se encuentra entre las enfermedades con mayor impacto económico en la producción porcina moderna. La enfermedad tiene una distribución mundial y es endémica en la mayoría de los países productores de cerdos. El PRRSV muestra interacciones complejas con el sistema inmunológico y una alta tasa de mutación, lo que hace que el desarrollo y la implementación de estrategias de control sean un gran desafío. La respuesta inmune innata de los mamíferos (primera respuesta contra patógenos) es fundamental durante la etapa inicial de la defensa del huésped contra la infección por virus, antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida antígeno-específica. Una de las rutas de transducción de señales más importantes en las respuestas inmunes innata y adquirida es la mediada por la activación del factor nuclear kB (NF-kB). La actividad de NF-kB da como resultado la transcripción de genes que codifican citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmunoreceptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular y proteínas virales. Datos previos en nuestro laboratorio demostraron que cuando se cultivaron macrófagos de ratón con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 se indujo la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF α , sugiriendo un fenotipo proinflamatorio. Esta información indica que los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 podrían estar regulando la vía de señalización NF-KB. Es por eso que evaluar la participación de la vía de señalización NF-kB es de gran interés, para poder dilucidar a mayor detalle el efecto de los péptidos como estimulantes de esta vía.

9.- HIPÓTESIS

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 inducen la expresión de genes receptores TLR2, TLR4 transductores MYD88, IKKA, y amplificadores NF-kB1 y NF-kB2 relacionados con la vía de señalización NF-kB.

10.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de genes relacionados con la vía NF-kB en respuesta a péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS.

11.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar la prueba de PCR tiempo real para cuantificar la expresión de los genes TLR2, TLR4, MYD88, IKKA, NF-kB1 y NF-kB2.
2. Evaluar la expresión cuantitativa de genes TLR2, TLR4, MYD88, IKKA, NF-kB1 y NF-kB2 relacionados con la vía NF-kB.

12.- MATERIALES

12.1.- Péptidos

Se utilizaron tres péptidos generados a partir de la secuencia de la proteína GP5 del PRRSV, denominados GP5T1, GP5T2 y GP5T3; los cuales corresponden a epítomos de reconocimiento para linfocitos T, con un alto grado de conservación (por encima de 80% de homología) entre los diferentes genotipos reportados (Cui *et al.*, 2016). Para el diseño y caracterización de los péptidos se utilizaron las bases de datos, Immune Epitope Database (IEDB) y CCL Main Workbench 20.0. Se eligieron aquellas secuencias que tenían un alto grado de conservación entre cepas del virus, con una longitud aproximada de 15-30 aminoácidos, que fueran epítomos de reconocimiento para linfocitos T, además se evaluó su antigenicidad, hidrofiliidad, carga, solubilidad y peso molecular.

12.2.- Reactivos qPCR (tiempo real)

Las mezclas maestras SYBR® Green tienen una concentración doble y contienen dNTP, MgCl₂ y ADN polimerasa.

- Syber Green (Bio-Rad cat. 1725150)
- Oligonucleótidos

cDNA (banco de DNA complementario).

12.3 Oligonucleótidos

Para llevar a cabo la ejecución de la PCR punto final y PCR cuantitativa, los oligonucleótidos que se utilizaron en este proyecto fueron:

Tabla 1.- Secuencias de oligos directo (F) y reverso (R) 5' - 3'

Gen	Secuencias de oligo primers directo (F) y reverso (R) 5' - 3'	Tamaño de la banda de amplificación (pb)	Temperatura de alineamiento	Gen de referencia en la plataforma NCBI
Genes relacionados a citocinas y quimiocinas				
IKKA	F: AGGACCGTGTCTCAAGGAGCTGT R: CTCTGGTCCTCATTGCTTCACGA	389	60	NM_001162410.1
MYD88	F: ATCGCTGTTCTTGAACCCTCG R: CTCACGGTCTAACAAGGCCAG	199	60	NM_010851.3
NFKB1	F: GAAATTCCTGATCCAGACAAAAC R: ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG	194	59	NM_008689.2
NFKB2	F: CTGGTGGACACATACAGGAAGAC R: ATAGGCACTGTCTTCTTTCACCTC	195	60	NM_019408.3
TLR2	F: TGCTTTCCTGCTGGAGATTT R: TGTAACGCAACAGCTTCAGG	197	60	NM_011905.3
TLR4	F: ACCAATGCATGGATCAGAAA R: GTCTCCACAGCCACCAGATT	295	57	NM_021297.3
Gen Housekeeping				
GAPDH	F: TGGCAAAGTGGAGATTGTTGC R: CCACGACATACTCAGCACCG	260	60	NM_008084.3 NM_001289726.1

12.4 Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism, V5, este software fue utilizado para el procesamiento de datos, análisis estadísticos, y producción de gráficas de resultados obtenidos.

13.- METODOLOGÍA

13.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Se realizó una búsqueda amplia en la literatura de los oligos que se requirieron en el presente estudio. Posteriormente se corroboró que los oligos fueran útiles para amplificar el gen deseado utilizando las plataformas Primer-Blast, IDTDNA (herramienta y empresa donde se sintetizaron los oligoprimers) y NCBI (Centro nacional para la información biotecnológica, por sus siglas en inglés) para obtener la secuencia blanco y corroborar la amplificación *in silico* de los oligoprimers. Posterior a esto, se enviaron a sintetizar por un proveedor autorizado y certificado (IdtDNA San Diego, California).

13.2 Extracción de ARN.

El cultivo de células Raw 264.7 (MΦ de ratón) se realizó en 14 cajas de cultivo celular (100 mm de diámetro por 20 mm de alto, Corning TM) hasta que tuvieron una confluencia de 70 -80%. Posteriormente, se agregaron los estímulos control y los péptidos a la concentración reportada en la Tabla 2, se usaron dos cajas de cultivo por estímulo (7 condiciones por duplicado con un total de 14 cajas). Se incubó cada caja con los estímulos y medio DMEM base con 2% de SFB, a 37 °C y 5 % de CO₂, una hora después del estímulo se procedió a la obtención del RNA total.

Después del tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1mL de reactivo Trizol (Life Technologies, # Ref. 15596018) por caja, se homogenizó y recuperaron los lisados en un microtubo. Los tubos se incubaron a -20 °C por 24 h para lograr la lisis celular, después se descongeló rápidamente y homogenizó. Se adicionaron 300 µl de Cloroformo al 99 %, para luego homogenizar e incubar por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se obtuvieron 3 fases en el tubo, se retiró la fase acuosa transparente (aprox. 600 µl). La fase se recuperó en un microtubo con un volumen igual de isopropanol al 99 %, y se agitó por inversión; se incubó durante 4' a

temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante.

Finalmente, se adicionó 1 mL de Etanol al 70 % frío y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Luego se retiró el sobrenadante para dejar secar los tubos por 20'. Finalmente, se resuspendió el pellet de ARN en 40 µl de H₂O grado molecular. Los tubos que contenían el ARN se mantuvieron en hielo frapé, se cuantificó la extracción en el nano espectrofotómetro (NanoDrop 2000).

13.3. Transcripción Reversa

Se realizó la retro transcripción para obtener Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de la extracción de ARN de cada uno de los tratamientos. Se utilizó el kit RevertAid First Strand ADNc Synthesis (Thermo Fisher Scientific, # Cat. K1622), el cual contiene la enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Una vez sintetizado el ADNc se cuantificó cada reacción en el nanodrop.

13.4. PCR punto final: Estandarización de Oligonucleótidos

Para la estandarización de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados, ver Tabla 1, se realizó una PCR punto final cualitativa con gradientes de temperatura, y así se determinó la temperatura óptima de hibridación (T_m°) de cada uno de los oligonucleótidos. Además, se realizó una curva de diluciones de ADNc para determinar la concentración adecuada para una amplificación óptima con base en los amplicones de los genes constitutivos.

13.5 PCR cuantitativa (qPCR)

Se realizó PCR tiempo real para analizar la expresión de los diferentes genes. Se utilizó una mezcla para la Master Mix PCR: SYBER Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (TAKARA, no. de catálogo #RR420L). El gen constitutivo GAPDH, se utilizó como gen constitutivo normalizante para la reacción de PCR. Condiciones qPCR: desnaturalización inicial 95°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 grados por 15 segundos, alineamiento a la Tm° específica de cada gen por 30 segundos, elongación 60°C por 30 segundos, elongación final 72°C por 30 segundos. Se utilizó el equipo CFX96 Real Time System de Biorad.

Los datos obtenidos se analizaron con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (-delta CT) para cuantificar la expresión relativa de los genes evaluados. Este método usa los ciclos del umbral (CT) generados por el termociclador, determinando cambios en la expresión en relación con una muestra de referencia como normalizador. El primer ΔCT es la diferencia en el ciclo umbral entre los genes diana y de referencia. El $\Delta\Delta CT$ es la diferencia en ΔCT entre las muestras objetivo y las de referencia. La expresión génica relativa generalmente se establece en una para las muestras de referencia porque $\Delta\Delta CT$ es igual a 0 y, por lo tanto, 2^0 es igual a 1. Fórmula para el cálculo, $2^{\Delta\Delta CT} = 2^{\Delta CT} - \Delta CT$, el resultado se expresa en veces de cambio, del inglés Fold Change.

13.6.- Metodología general

13.6.1.- PCR cualitativa gradiente para estandarización de las condiciones de PCR

Se realizó una PCR cualitativa con gradientes de temperatura, para conocer la temperatura óptima de hibridación (Tm°) de cada uno de los oligonucleótidos. Así como también, se realizó una curva de diluciones de cDNA para conocer la concentración adecuada para óptima amplificación en base al oligonucleótido de los genes constitutivos o housekeeping o genes normalizadores. Se utilizó el termociclador Veriti de la Marca Applied Biosystems.

13.7.- Electroforesis

Para corroborar los amplicones de cada gen, se llevó a cabo electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En los cuales se depositaron los productos de PCR adicionados de un buffer de carga. Se utilizó un marcador de peso molecular que contiene fragmentos de ADN conocidos que van en una escala creciente de 100 en 100 pb. Para revelar la presencia de los amplicones se adicionó Bromuro de Etidio. Se utilizó el equipo de transiluminación MiniBIS-Pro Bioimaging System.

13.8.- Estímulos

Tabla 2.- Concentración usada para la estimulación de células RAW 264.7

ESTÍMULO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
CONTROL: CÉLULAS RAW 264.7	PBS 50 ul	-
LPS	1 µg/mL	(Tang <i>et al.</i> , 2018) Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021
DEXA	1 µg/mL	Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021
TNF- A	50 ng/mL	(Mastropietro <i>et al.</i> , 2015) Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021
GP5T1	5 µg/mL	Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021
GP5T2	5 µg/mL	(Vashisht <i>et al.</i> , 2008) Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021
GP5T3	5 µg/mL	Piña-Díaz <i>et al.</i> , 2021

14.- RESULTADOS

En la estandarización de la PCR por gradiente de temperatura se obtuvo que la temperatura a la cual amplificaron los genes, TLR2, TLR4, MYD88, IKKA, NF-kB1 y NF-kB2 fue de 60°C.

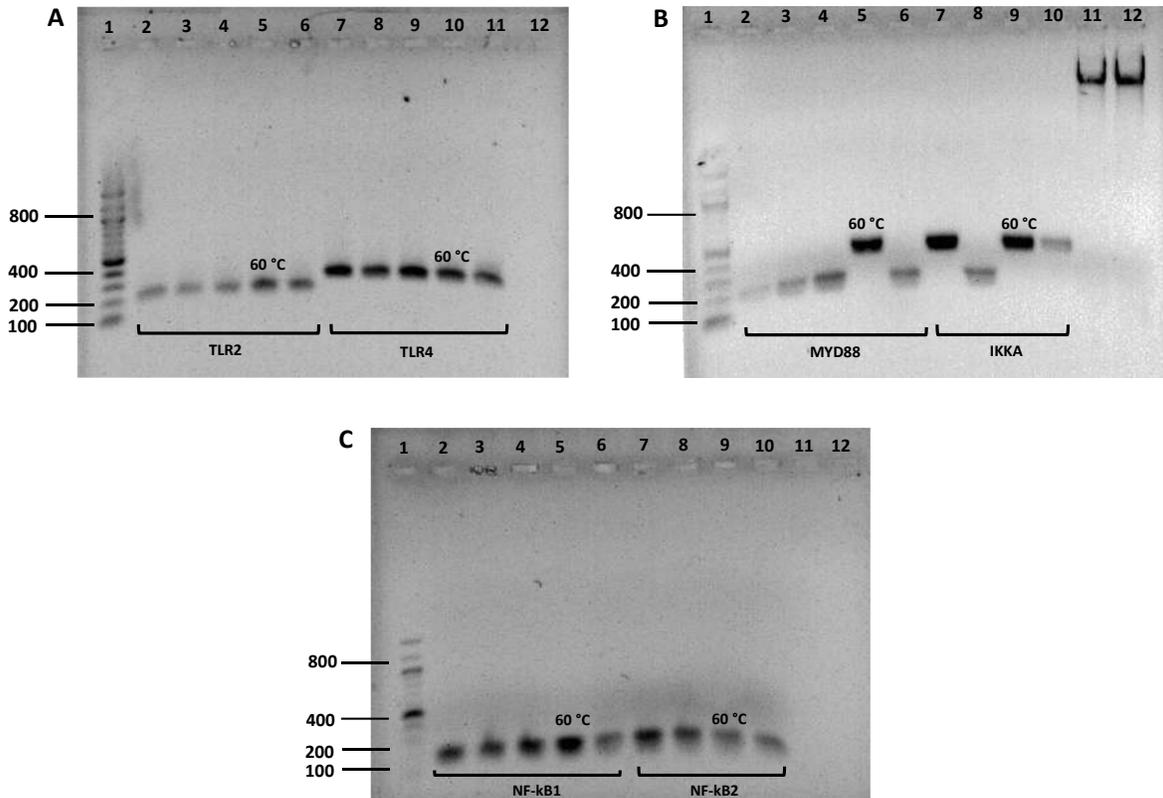


Figura 7.- Productos amplificados por PCR con gradiente de temperatura (T_m) a 60°C. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (A) Amplificación de los genes TLR2 (200 pb) en los carriles (2-6) y TLR4 (300 pb) en los carriles (7-11). **(B)** Segunda amplificación, de los genes MYD88 (200 pb) en los carriles (2-6) e IKKA (400 pb) en los carriles (7-10). **(C)** Tercera amplificación de los genes NF-kB1 (200 pb) en los carriles (2-6) y NF-kB2 (200 pb) en los carriles (7-10).

Los genes evaluados relacionados con la vía NF-kB fueron TLR2, TLR4, MYD88, IKKA, NF-kB1 y NF-kB2. Se analizó la expresión del mRNA de cada uno de los genes descritos. Se utilizaron macrófagos de ratón, los cuales fueron cultivados con péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV (probables epítomos T). Una hora después del tratamiento de los macrófagos, se obtuvo el mRNA total, seguido de retro transcripción. A partir del banco de cDNA, se realizó la validación del método

de PCR evaluando diferentes temperaturas de alineación para poder obtener un Amplicón único.

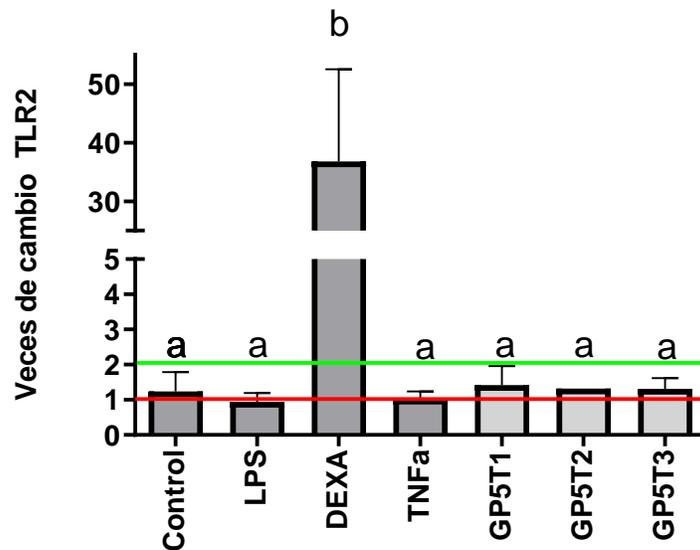


Figura 8. Expresión relativa del gen TLR2. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 µg/ml); DEXA (1 µg/ml); TNF-α (50 µg/ml); Péptidos: GP5T1 (1 µg/ml); GP5T2 (1µg/ml); GP5T3 (1µg/ml). Línea roja: expresión basal y línea verde: sobreexpresión. Los tratamientos se realizaron por duplicado bajo la condición de 1 hora.

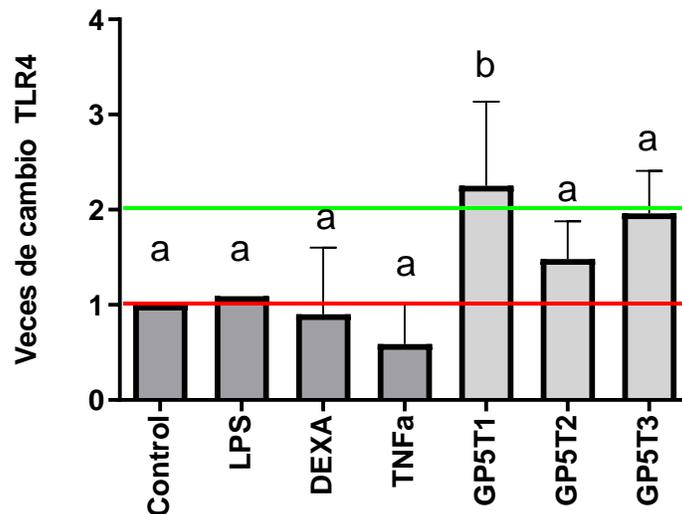


Figura 9. Expresión relativa del gen TLR4. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 µg/ml); DEXA (1 µg/ml); TNF-α (50 µg/ml); Péptidos: GP5T1 (1 µg/ml); GP5T2 (1µg/ml); GP5T3 (1µg/ml). Los tratamientos se realizaron de manera individual bajo la condición de 1 hora

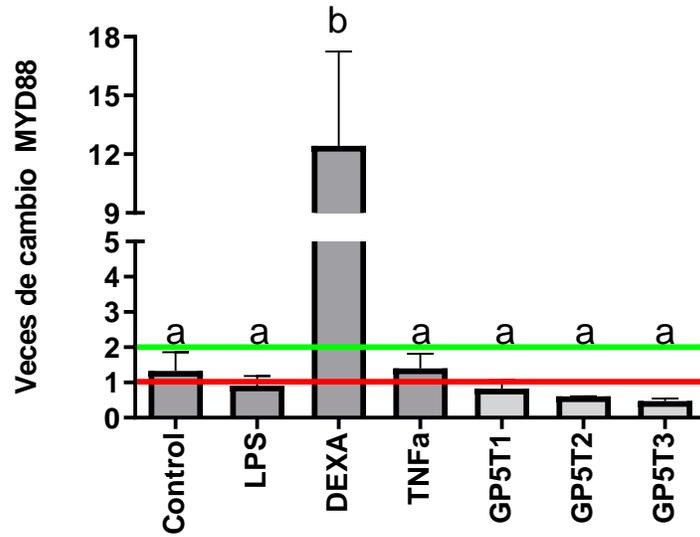


Figura 10. Expresión relativa del gen MYD88. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 µg/ml); DEXA (1 µg/ml); TNF-α (50 µg/ml); Péptidos: GP5T1 (1 µg/ml); GP5T2 (1µg/ml); GP5T3 (1µg/ml). Los tratamientos se realizaron por triplicado bajo la condición de 1 hora.

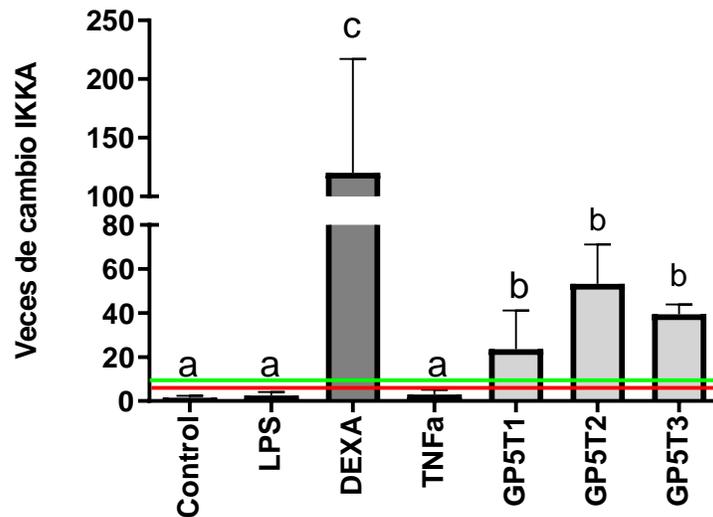


Figura 11. Expresión relativa del gen IKKA. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 µg/ml); DEXA (1 µg/ml); TNF-α (50 µg/ml); Péptidos: GP5T1 (1 µg/ml); GP5T2 (1µg/ml); GP5T3 (1µg/ml). Los tratamientos se realizaron de por triplicado bajo la condición de 1 hora.

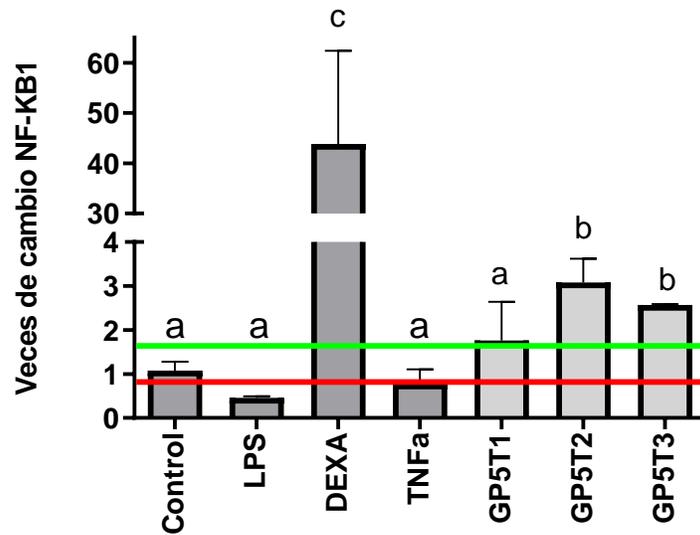


Figura 12. Expresión relativa del gen NF-KB1. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 $\mu\text{g/ml}$); DEXA (1 $\mu\text{g/ml}$); TNF- α (50 $\mu\text{g/ml}$); Péptidos: GP5T1 (1 $\mu\text{g/ml}$); GP5T2 (1 $\mu\text{g/ml}$); GP5T3 (1 $\mu\text{g/ml}$). Los tratamientos se realizaron de por triplicado bajo la condición de 1 hora.

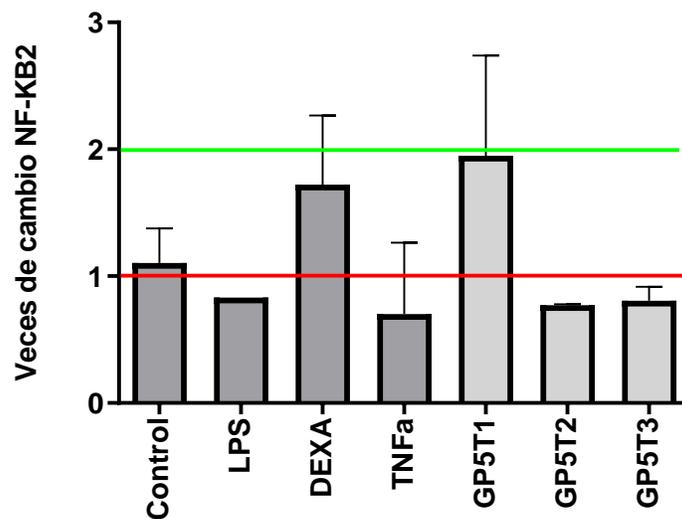


Figura 13. Expresión relativa del gen NF-KB2. Control (sin estímulo), los estímulos utilizados fueron: LPS (1 $\mu\text{g/ml}$); DEXA (1 $\mu\text{g/ml}$); TNF- α (50 $\mu\text{g/ml}$); Péptidos: GP5T1 (1 $\mu\text{g/ml}$); GP5T2 (1 $\mu\text{g/ml}$); GP5T3 (1 $\mu\text{g/ml}$). Los tratamientos se realizaron de por triplicado bajo la condición de 1 hora.

15.- DISCUSIÓN

Una de las rutas de transducción de señales más importantes en la respuesta inmune es, la mediada por la activación del factor nuclear NF-kB. La actividad de NF-kB da como resultado la transcripción de genes que codifican para citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmuno-receptores, otros factores de transcripción y moléculas de adhesión celular. Datos previos en nuestro grupo de trabajo, han mostrado que péptidos derivados de la proteína GP5, GP5T1, GP5T2 y GP5T3 derivados de la proteína GP5 del PRRSV, son capaces de modificar la expresión de los ARNm de las citocinas, aumentando la expresión de TNF α , IL-1b, IL-6, e IL-12 y los interferones INF- α 4 e INF- β 1 en un modelo *in vitro* en macrófagos de ratón, después de una hora de tratamiento. Dichos datos sugirieron la polarización de macrófagos al fenotipo M1 (fenotipo proinflamatorio). La inducción de la expresión de citocinas favorecida por péptidos de la proteína GP5 del PRRSV sugirió la participación de la vía de señalización NF-kB en respuesta al estímulo. Por otro lado, también se demostró en un modelo de macrófagos de cerdo, después ser cultivados con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3, se observó un aumento en la abundancia de la proteína fosforilada p-P65 la cual está relacionada con la activación de la vía NF-kB. La proteína P65 forma un dímero con la proteína P50 y se encuentran en el citoplasma en su forma inactiva, cuando la vía NFkB se activa, P65 se fosforila y se transloca al núcleo, de tal manera que la fosforilación de P65 es un indicador de la activación de dicha vía. En este mismo modelo de macrófagos de cerdo se demostró la activación del elemento de respuesta de NF-kB después de la transactivación y evaluación del gen reportero GFP, lo cual fortalece la hipótesis de la participación de la vía NFkB (Ortega- Flores *et al.*, Datos no publicados 2022).

En concordancia con lo anterior, (Morales-Gachuz., 2021, tesis de licenciatura), mostró que la expresión de TNF- α sistémico (medido en suero sanguíneo), disminuyó en lechones naturalmente infectados con el PRRSV, en comparación con animales libres de patógenos específicos. Considerando que TNF constituye una familia de citocinas bien caracterizadas en la literatura como inductores y

reguladores de NF- κ B, este dato apoya la idea de la respuesta a péptidos virales mediada por NF- κ B.

Efectivamente, la vía NF- κ B regula la expresión de genes que responden a estímulos infecciosos, en este caso, nos resultó interesante evaluar su posible participación en respuesta a péptidos virales.

Por otro lado, prácticamente todos los miembros de la familia de receptores Toll like (TLR) reconocen una gran variedad de antígenos infecciosos y convergen en algún punto en la activación de la vía de NF- κ B. Por ejemplo, el Lipopolisacárido (LPS), se une específicamente a su receptor TLR4, induciendo la activación de NF- κ B. Considerando en conjunto los datos, en este trabajo nos propusimos explorar genes relacionados con la vía NF- κ B que están río arriba de la señalización, tales como IKKA, MYD88, NF- κ B1 y NF- κ B2, así como evaluar la expresión de dos miembros de la familia de receptores tipo Toll, tales como, TLR2 y TLR4. Se conoce poco sobre la participación de la vía NF- κ B en respuesta al PRRSV, por lo tanto, será la primera vez que se evaluó la regulación de estos genes utilizando como estímulo tres péptidos derivados de la proteína GP5 del mismo. Esta información obtenida, los datos obtenidos en el presente trabajo servirán para la toma de decisiones racionales futuras o de próximos trabajos para la selección de inmunógenos que permitirán la prevención del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

Los resultados obtenidos, mostraron que no se observaron diferencias significativas en la expresión TLR2, TLR4, MYD88 y NF- κ B2 con respecto a las células control, lo que significa que probablemente los péptidos derivados de la proteína GP5 no utilizan esta ruta de señalización para ejercer sus efectos en el macrófago, los cuales fueron descritos con anterioridad en nuestro grupo de trabajo e indican que los péptidos virales (GP5T1, GP5T2 y GP5T3) son capaces de polarizar al macrófago a un fenotipo M1. De manera muy interesante, encontramos un aumento en la expresión del ARN mensajero de IKKA y NF- κ B1 en macrófagos de ratón, directamente relacionado con el tratamiento con los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV. Considerando en conjunto todos estos datos, este trabajo contribuyó en dilucidar los posibles mecanismos que subyacen en la respuesta de

los macrófagos a los péptidos virales. Sugiriendo la posible participación de la vía NF-KB. Actualmente se llevan a cabo pruebas de transactivación del elemento *cis* del promotor de NF-KB, para sumar evidencia de la participación de dicha vía en respuesta a los péptidos virales.

Por otro lado, el hecho de que los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 hayan estimulado la expresión de IKKA y NF-kB1 y no hayan estimulado la expresión de TLR2 y TLR4 no significa que los péptidos no se unen a esos receptores de membrana para ejercer sus efectos proinflamatorios, para poder confirmar ese hecho, sería necesario realizar más ensayos para poder esclarecer el mecanismo por el cual actúan estos péptidos sobre las células M θ de ratón, que implicarían la selección de otros genes para próximos proyectos. Para el caso de TLR2 los genes que se propondrían como candidatos para futuros ensayos, son los genes implicados en la vía, tales como Rac1, P13K y AKT (Sustrato 1 de toxina botulínica, fosfoinositol-3-cinasa y Cinasa de Serina Treonina, respectivamente), los cuales también conduce a la activación de NF-kB. Al ser TLR2 un receptor que puede activarse por esa vía y por la vía mediada por MYD88, se podría llegar a tener un panorama más claro de los genes que participan en la vía y así poder construir la ruta que se activa en respuesta a la presencia de los péptidos GP5T1, GP5T1 y GP5T3.

16.- CONCLUSIÓN

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 derivados de la proteína GP5 del virus PRRS, indujeron la expresión de los genes IKKA y NF-kB1, genes río arriba de la señalización de NF-kB. Lo anterior, fortalece la hipótesis de que la vía de señalización NF-kB está involucrada en la respuesta de macrófagos a péptidos virales, los cuales son probables epítomos reconocidos por linfocitos T.

17.- BIBLIOGRAFÍA

1. Aiki-Raji, C. O., Adebisi, A. I., Abiola, J. O., & Oluwayelu, D. O. (2018). Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus antibodies in commercial pigs, southwest Nigeria. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.07.006>
2. Asselin-Paturel, C., & Trinchieri, G. (2005). Production of type I interferons: Plasmacytoid dendritic cells and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 202(4), 461–465. <https://doi.org/10.1084/jem.20051395>
3. Baeuerle, P. A., Henkel T. (1994). Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 141–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.12.1.141>
4. Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H. S., Xiao, Z., & Murtaugh, M. (2004). Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68(4), 267–273.
5. Bautista, E. M., & Molitor, T. W. (1999). IFN γ inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Archives of Virology*, 144(6), 1191–1200. <https://doi.org/10.1007/s007050050578>
6. Beg, A., & Jr, A. S. B. (1993). The IKB proteins : multifunctional egulators of Rel / NF-KB transcription actors. 2064–2070.
7. Blaha, T. (2000). Review article The “ colorful ” epidemiology of PRRS. 31, 77–83.
8. Cajero, M., José, J., 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). <https://doi.org/10.21933/j.edsc.2017.12.204>
9. Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629–633.

10. Chen, Z., Graham, S. P., Lamp, B., Montaner-Tarbes, S., Fraile, L., del Portillo, H. A., & Montoya, M. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science* *Www.Frontiersin.Org*, 6, 38.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
11. Cui, J., O'Connell, C. M., Costa, A., Pan, Y., Smyth, J. A., Verardi, P. H., Burgess, D. J., Van Kruiningen, H. J., & Garmendia, A. E. (2019). A PRRSV GP5-Mosaic vaccine: Protection of pigs from challenge and ex vivo detection of IFN γ responses against several genotype 2 strains. *PLoS ONE*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208801>
12. Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M. A., Zuber, B., & Takamatsu, H. H. (2006). Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110(3–4), 279–292.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.10.005>
13. Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Research*, 154(1–2), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
14. Duan, X., Nauwynck, H. J., & Pensaert, M. B. (1997). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In *Arch Virol* (Vol. 142).
15. Duinhof, T. F., van Schaik, G., van Esch, E. J. B., & Wellenberg, G. J. (n.d.). Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.001>
16. Faaberg, KS, Hocker, JD, Erdman, MM, Harris, DLH, Nelson, EA, Torremorell, M. y Plagemann, PGW (2006). Respuestas de anticuerpos neutralizantes de cerdos infectados con mutantes naturales de GP5 N-

- glicano del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. *Inmunología viral*, 19(2), 294–304. doi:10.1089/vim.2006.19.294
17. Fang, Y., Schneider, P., Zhang, W. P., Faaberg, K. S., Nelson, E. A., & Rowland, R. R. R. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: Analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Archives of Virology*, 152(5), 1009–1017. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0936-y>
18. Gao, J., Ji, P., Zhang, M., Wang, X., Li, N., Wang, C., Xiao, S., Mu, Y., Zhao, Q., Du, T., Sun, Y., Hiscox, J. A., Zhang, G., & Zhou, E. M. (2014). GP5 expression in Marc-145 cells inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by inducing beta interferon activity. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.030>
19. Gao, Z. Q., Guo, X., & Yang, H. C. (2004). Genomic characterization of two Chinese isolates of Porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of Virology*, 149(7), 1341–1351. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0292-0>
20. Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF- κ B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>
21. Goodkin, M. L., Ting, A. T., & Blaho, J. A. (2003). NF- κ B Is Required for Apoptosis Prevention during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, 77(13), 7261–7280. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7261-7280.2003>
22. Hayden, M., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.*, 18(18), 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704.bone>
23. Holtkamp, D. J., Kliebenstein, J. B., Neumann, E. J., Zimmerman, J. J., Rotto, H. F., Yoder, T. K., Wang, C., Yeske, P. E., Mowrer, C. L., & Haley, C. A. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72–84.
24. J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(3), 385–392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
25. Jeong, J., Kim, S., Park, C., Kang, I., Park, K. H., Ham, H. J., & Chae, C. (2018). Effect of vaccination with a porcine reproductive and respiratory syndrome subunit vaccine on sow reproductive performance in endemic farms. *Veterinary Record*, 182(21), 602. <https://doi.org/10.1136/vr.104547>
26. Jeong, J., Park, C., Oh, T., Park, K. H., Yang, S., Kang, I., Park, S. J., & Chae, C. (2018). Cross-protection of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 vaccine against a heterologous PRRSV-1 challenge in late-term pregnancy gilts. *Veterinary Microbiology*, 223(June), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.008>
27. José, J., 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). <https://doi.org/10.21933/j.edsc.2017.12.204>
28. Kappes, M. A., Miller, C. L., & Faaberg, K. S. (2013). Highly Divergent Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Incorporate Multiple Isoforms of Nonstructural Protein 2 into Virions. *Journal of Virology*, 87(24), 13456–13465. <https://doi.org/10.1128/jvi.02435-13>
29. Karl-Klaus Conzelmann, Nico Visser, Peter Van Woensel, Heinz-Jürgen Thiel (1993). Molecular Characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, a Member of the Arterivirus Group, *Virology*, Volume 193, 329-339. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1129>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682283711293>)

30. Kreutz, L. C. (1998). Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res* 53, 121–128.
31. Lee, J. A., Kwon, B., Osorio, F. A., Pattnaik, A. K., Lee, N. H., Lee, S. W., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., & Lee, J. B. (2014). Protective humoral immune response induced by an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing the hypo-glycosylated glycoprotein 5. *Vaccine*, 32(29), 3617–3622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.083>
32. Li, J., & Murtaugh, M. P. (2012). Dissociation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralization from antibodies specific to major envelope protein surface epitopes. *Virology*, 433(2), 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.026>
33. López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6(1), 69. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v6i1.4024>
34. Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>
35. Lunney, J. K., Boddicker, N. J., Bjorkquist, A., Rowland, R. R., Reecy, J. M., & Dekkers, J. C. M. (2014). Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Genetics Selection Evolution*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-18>
36. Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>

37. Luo, S., Lu, X., Liu, C., Zhong, J., Zhou, L., & Chen, T. (2019). Site specific PEGylation of β -lactoglobulin at glutamine residues and its influence on conformation and antigenicity. *Food Research International*, 123(May), 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.038>
38. May, M. J., & Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today*, 19(2), 80–88. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01197-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01197-3)
39. Meng, X. J. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 74, 309–329.
40. 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
41. Mosialos, G., Birkenbacht, M., Yalamanchill, R., Van Arsdale, T., Ware, C., & Kleff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, 80(3), 389–399. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90489-1)
42. Murtaugh, M. P., Xiao, Z., & Zuckermann, F. (2002). Immunological Responses of Swine to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection. *Veterinary Microbiology*, 15(4), 533–547.
43. Nam, E., Park, C. K., Kim, S. H., Joo, Y. S., Yeo, S. G., & Lee, C. (2009). Complete genomic characterization of a European type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Korea. *Archives of Virology*, 154(4), 629–638. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0347-3>
44. Nathues, H., Alarcon, P., Rushton, J., Jolie, R., Fiebig, K., Jimenez, M., Geurts, V., & Nathues, C. (2017). Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level – An economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*, 142, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.006>
45. Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., & Zimmerman

46. Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, 47(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>
47. Plagemann, P. G. W., & Moennig, V. (1992). ARTERITIS VIRUS, AND SIMIAN HEMORRHAGIC FEVER VIRUS: 41.
48. Ropp, S. L., Wees, C. E. M., Fang, Y., Nelson, E. A., Rossow, K. D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J. E., Benfield, D. A., & Faaberg, K. S. (2004). Characterization of Emerging European-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in the United States. *Journal of Virology*, 78(7), 3684–3703. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3684-3703.2004>
49. Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Veterinary Pathology*, 35(1), 1–20. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
50. Santoro, M. G., Rossi, A., & Amici, C. (2003). NF- κ B and virus infection: Who controls whom. *EMBO Journal*, 22(11), 2552–2560. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg267>
51. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24555472; PMCID: PMC4313732.
52. Shi, C., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., & Zhang, J. (2015). PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Archives of Microbiology*, 197(4), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1088-1>
53. Shi, M., Lam, T. T. Y., Hon, C. C., Hui, R. K. H., Faaberg, K. S., Wennblom, T., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., & Leung, F. C. C. (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Research*, 154(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014>

54. Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>
55. Singleton, H., Graham, S. P., Frossard, J. P., Bodman-Smith, K. B., & Steinbach, F. (2018). Infection of monocytes with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) strain Lena is significantly enhanced by dexamethasone and IL-10. *Virology*, 517(November 2017), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.017>
56. Snijder, E. J., & Meulenber, J. J. M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, 79(5), 961–979. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-961>
57. Snijder, E. J., & Meulenber, J. J. M. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, 79(5), 961–979. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-961>
58. Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S. R., & Fang, Y. (2010). The Cysteine Protease Domain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 2 Possesses Deubiquitinating and Interferon Antagonism Functions. *Journal of Virology*, 84(15), 7832–7846. <https://doi.org/10.1128/jvi.00217-10>
59. Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., ... Gao, G. F. (2007). Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526>
60. Van Breedam, W., Delputte, P. L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., & Nauwynck, H. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91(7), 1659–1667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.020503-0>

61. Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
62. Veit, M., Matczuk, A. K., Sinhadri, B. C., Krause, E., & Thaa, B. (2014). Membrane proteins of arterivirus particles: Structure, topology, processing and function. *Virus Research*, 194, 16–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.010>
63. Villarreal, L. P., Defilippis, V. R., & Gottlieb, K. A. (2000). Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology*, 272(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0381>
64. WANG, L., HU, S., LIU, Q., LI, Y., XU, L., ZHANG, Z., ... HE, X. (2017). Porcine alveolar macrophage polarization is involved in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(11), 1906–1915. doi:10.1292/jvms.17-0258
65. Waris, G., Livolsi, A., Imbert, V., Peyron, J. F., & Siddiqui, A. (2003). Hepatitis C Virus NS5A and Subgenomic Replicon Activate NF- κ B via Tyrosine Phosphorylation of I κ B α and Its Degradation by Calpain Protease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40778–40787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303248200>
66. Wongyanin, P., Buranapraditkul, S., Yoo, D., Thanawongnuwech, R., Roth, J. A., & Suradhat, S. (2012). Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg). *Journal of General Virology*, 93(6), 1236–1246. <https://doi.org/10.1099/vir.0.040287-0>
67. Xing, J., Chai, Z., Ly, H., & Liang, Y. (2015). Differential Inhibition of Macrophage Activation by Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Pichinde

- Virus Is Mediated by the Z Protein N-Terminal Domain. *Journal of Virology*, 89(24), 12513–12517. <https://doi.org/10.1128/jvi.01674-15>
68. Yang, J. P., Hori, M., Sanda, T., & Okamoto, T. (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear factor- κ B, RelA- associated inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15662–15670. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15662>
69. You, L.-R., Chen, C.-M., & Lee, Y.-H. W. (1999). Hepatitis C Virus Core Protein Enhances NF- κ B Signal Pathway Triggering by Lymphotoxin- β Receptor Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Journal of Virology*, 73(2), 1672–1681. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.2.1672-1681.1999>
70. Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Wills, R. W., & Swenson, S. L. (1997). General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Veterinary Microbiology*, 55(1–4), 187–196. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01330-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01330-2)