



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES TERAPÉUTICAS E2CN Y E2NN DE
CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2**

TESIS

Que presenta:

ARACELI NAVA LÓPEZ

Para obtener el título de

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Asesora: Doctora en Ciencias Biomédicas Rosa Elvira
Nuñez Anita

Morelia, Michoacán, Mayo del 2015

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que me abrieron sus puertas y abrigaron durante el desarrollo de mi carrera.

Al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

A mi mesa sinodal el Dr. J. Jesús Conejo Nava, Adrián Sánchez Orozco y Rosa Elvira Nuñez Anita por tomarse el tiempo para la revisión de mi trabajo.

Agradecemos el financiamiento parcial de los programas PROMEP-SEP, PTC-358 y a la Coordinación de la Investigación Científica UMSNH CIC-2015.

A la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior (CNBES) por la beca TITULACIÓN-2014 folio 959203

Al programa PROMEP-SEP de apoyo a la incorporación de nuevos PTC (UMSNH-PTC 358), por la beca para la realización de tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres por formarme como una persona con valores y darme las bases para lograr todo lo que me propongo.

A mi hermano quien siempre ha estado para impulsarme y apoyarme en todos mis proyectos.

A mi esposo por su apoyo y comprensión durante toda la carrera.

A la Doctora Rosa Elvira Núñez Anita, por su apoyo, sus consejos, sus regaños y por brindarme su confianza y amistad.

A mis compañeros y amigos del CMEB por su apoyo, muy en especial a Humberto Contreras y Alejandro Huante.

A mis amigas y amigos que han estado en todo momento conmigo para apoyarme

Y muy en especial a todas esas personas que intentaron hacerme tropezar porque solo me impulsaron para ser más firme en mi camino.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. VIRUS	1
1.1. Estructura.....	1
1.2. Replicación	2
1.3. Clasificación de virus de Baltimore	3
2. CIRCOVIRUS PORCINO	5
2.1. Historia.....	5
2.2. Agente etiológico	6
2.3. Replicación	8
3. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCAVD)	11
3.1. Impacto económico.....	11
3.2. Epidemiología	11
3.3. Transmisión	12
3.4. Patogenia.....	13
3.5. Lesiones y signos clínicos.....	14
3.6. Diagnóstico	15
3.7. Tratamiento.....	16
3.8. Respuesta inmunológica.....	16
4. VACUNACIÓN CONTRA PCV2	18
4.1. Vacunas comerciales.....	18
4.1.1. Vacunas clásicas.....	18
4.1.2. Vacunas Recombinantes.....	18
4.1.3. Vacunas combinadas	21

4.2. Vacunas en fase experimental.....	21
5. ESTRATEGIAS DE DESARROLLO DE VACUNAS RECOMBINANTES.....	22
5.1. Transferencia de genes a células eucariotas.....	24
5.1.1. Vehículos virales	24
5.1.2. Electroporación	24
5.1.3. Microinyección.....	24
5.1.4. Precipitación con fosfato de calcio	25
5.1.5. Liposomas.....	25
5.2. Plataforma de expresión	26
5.2.1 Sistema de expresión inducible (Tet-on)	27
5.3. Biología sintética y obtención de candidatos vacunales	29
5.4. Caracterización de proteínas a través de bioinformática	30
5.4.1. Peso Molecular.....	30
5.4.2. pH.....	31
5.4.3. El Punto Isoeléctrico.....	31
5.4.4. El índice Alifático	31
5.4.5. Epítopes linfocitos B.....	31
5.4.6. Hidrofilicidad.....	32
5.4.7. Modelaje.....	32
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	35
1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
MATERIAL	36
1. MATERIAL BIOLÓGICO	36
1.1. Línea celular CHO Tet-On 3G ® Clontech.....	36
1.2. Plásmido pTRE2pur® Clontech	36
1.3. Plásmido pRSV-βgal.....	37
1.4. Anticuerpo anti-PCV 50X, (VMRD)	37
1.5. Anticuerpo anti- His-HRP (Invitrogene).....	37
1.6. Anticuerpo anti- ratón IgG policlonal unido a FITC (Sigma).....	37

1.7. Puromicina.....	37
2. SECUENCIAS PROTEÍCAS <i>IN SÍLICO</i>	38
3. HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES UTILIZADAS.....	39
3.1. CLC Main Workbench 7.5.....	39
3.2. Inmuno Epitope Data Base.....	39
3.3. Protscale.....	39
3.4. Swiss Model (MODELLER).....	40
METODOLOGÍA.....	41
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN.....	41
1.1. Digestión enzimática.....	41
2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA <i>IN SÍLICO</i> DE LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2.....	41
2.1. Frecuencia de Aminoácidos (FA), Longitud (L) Peso Molecular (PM), Punto Isoeléctrico (PI) e Índice Alifático (IA).....	41
2.2. Hidrofobicidad.....	42
2.3. Afinidad a Linfocitos B.....	42
2.4. Modelado de las proteínas.....	42
3. CULTIVO Y SELECCIÓN DE CLONAS PRODUCTORAS DE PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2.....	43
3.1. Cultivo celular.....	43
3.2. Transfección.....	44
3.3. Selección.....	44
3.4. Control de transfección.....	45
3.5. Viabilidad celular.....	46
4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2NN Y E2CN.....	46
4.1. Inmunodetección.....	46
RESULTADOS.....	48
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS E2C-N Y E2N-N.....	48
1.1. Digestión enzimática de los plásmidos.....	48

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA <i>IN SÍLICO</i> DE LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2	49
2.1. Frecuencia de Aminoácidos Peso molecular (PM), Punto isoelectrico (PI), Índice Alifático (IA)	49
2.2. Hidrofobicidad	50
2.3. Afinidad a Linfocitos B	51
2.4. Modelado de las proteínas.....	53
3. CULTIVO Y SELECCIÓN DE CLONAS PRODUCTORAS DE PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2	54
4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2NN Y E2CN	55
4.1. Inmunodetección.....	55
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFIA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Clasificación de los virus según Baltimore, 1975.	4
Figura 2.- Modelo de la estructura de PCV2..	8
Figura 3.- Mecanismo de entrada, replicación y liberación de viriones de PCV2..	9
Figura 4.-Lesiones encontradas en cerdos infectados con PCV2..	15
Figura 5.- Metodología para el diseño de una vacuna recombinante.....	23
Figura 6 .- Esquema de lipofección.	25
Figura 7 .- Funcionamiento de los sistemas de regulación por tetraciclina.	28
Figura 8 .-Células CHO 3G Tet On, transfectadas con el plásmido pPRSV- β -gal y teñidas con Xgal.	45
Figura 9.-Células teñidas con cristal violeta (Viabilidad)..	46
Figura 10.-Gel de agarosa al 0.8% de la digestión enzimática de los plásmidos pTREpur, pTRE- E2CN y pTRE- E2NN.....	48
Figura 11 .- Análisis del perfil hidrofílico de E2CN y E2NN.....	51
Figura 12.- Afinidad de epítopes con Linfocitos B en E2CN.....	52
Figura 13.- Afinidad de péptidos con Linfocitos B en E2NN.....	53
Figura 14 .-Estructura tridimensional de las proteínas recombinantes.....	54
Figura 15.-Clonas obtenidas con la transfección del plásmido que codifica para la proteína E2NN..	55
Figura 16.- Inmunofluorescencia de células CHO 3G Tet On, se empleó como primer anticuerpo el Ab anti-His hecho en ratón y como segundo anticuerpo el Ab anti-ratón unido a FITC.....	56
Figura 17.- Inmunofluorescencia de células CHO 3G Tet On, se empleó el anticuerpo Anti-PCV2 unido a FITC.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resumen de vacunas comerciales anti- PCV2..	20
Tabla 2.- Estrategias usadas para predecir el plegamiento de proteínas a partir de su secuencia.....	33
Tabla 3 .- Cantidad y frecuencia de residuos de aminoácidos, obtenidos en el programa de acuerdo con la secuencia de las proteínas recombinantes E2NN y E2CN	49
Tabla 5.- Valores asignados en la escala de Kyte y Doolittle para la hidrofobicidad. Los datos con signos negativos son carácter hidrofóbicos y los positivos hidrofílicos.	50
Tabla 7.- Péptidos con afinidad a linfocitos B en la secuencia de la Proteína Recombinante E2NN	52

RESUMEN

La salud animal es afectada por las enfermedades virales, mismas que se asocian a grandes pérdidas económicas. El Circovirus porcino Tipo 2 (PCV2) está asociado a diversas patologías, particularmente los cerdos de alrededor de 8 a 14 semanas de edad son afectados. Se ha reportado que la proteína de cápside E2 del virus, es altamente antigénica y necesaria para la interacción virus-célula blanco. Actualmente, hay algunas vacunas comerciales disponibles, elaboradas a partir del virus completo inactivado ó basadas en proteínas recombinantes virales. Sin embargo, se ha observado protección parcial, lo que se atribuye a la alta tasa de mutación del virus. En este trabajo se analizaron dos péptidos de la proteína E2 como probables candidatos vacunales, es decir, péptidos mínimos que puedan inducir la respuesta inmunológica necesaria para evitar la infección viral. Se caracterizaron los péptidos recombinantes denominados E2CN y E2NN de la proteína E2 a través de análisis *in silico* e *in vitro* para determinar su capacidad antigénica. Los resultados muestran que ambos péptidos podrían ser candidatos vacunales. Por otro lado, ensayos antígeno-anticuerpo mostraron que el péptido E2NN es el único que es reconocido por un anticuerpo policlonal anti-PCV2. En conclusión, este es el primer reporte en que se muestra que un péptido mínimo recombinante de la proteína E2 es un potencial candidato vacunal.

Palabras clave: Circovirus, Porcinos, Proteína recombinante, vacuna

ABSTRACT

Animal health is affected by virus diseases; these are associated with large financial losses. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated to several pathologies particularly pigs around 8 to 14 weeks of age are affected. It has been reported that the capsid protein virus E2, is highly antigenic and necessary to virus-host target cells interaction. Currently, there are some commercial vaccines, made from inactivated whole virus or recombinant proteins based on viral capsid protein. However, partial protection was observed, which is attributed to the high mutation rate of the virus. In this work, were characterized two peptides obtained from E2 protein as putative vaccine candidates, constructed from minimum peptides that could induce enough immune response to prevent viral infection. Recombinant protein called E2NN and E2CN were characterized by *in silico* and *in vitro* to determine their antigenicity. *In silico* analysis showed that both recombinant proteins could be vaccine candidates. On the other hand, antigen-antibody assays showed that E2NN protein is the only one that was recognized by a polyclonal anti-PCV2. In conclusion, this is the first report that showed a minimum recombinant peptide from E2 protein as potential vaccine candidate.

Keywords: Circovirus, Porcine, Recombinant proteins, Vaccine

ABREVIATURAS

3D	Tercera dimensión
BCP	Banco de células primario
CHO	Ovario de hámster chino
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
IM	Intramuscular
MCS	Sitio Múltiple de Clonación
nm	Nanometros
nt	Nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Complejo respiratorio porcino
PCV	Circovirus porcino
PCV1	Circovirus porcino tipo 1
PCV2	Circovirus porcino tipo 2
PDNS	Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina
pH	Potencial de hidrógeno
PMWS	Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete
PR	Proteína recombinante
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PVCAD	Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino Tipo 2

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS

La palabra virus se utiliza en el mundo médico desde hace aproximadamente 200 años. A principios de 1790, significaba veneno o limo venenoso (Shors, 2009). Después en 1892 Ivanowsky demostró la existencia de unos organismos infecciosos tan pequeños que atravesaban filtros de porcelana con poros de menos de un micrómetro (Paniagua *et al.*, 2003).

En el siglo XX se descubrieron los virus como causantes de enfermedades infecciosas y se demostró que éstos eran los responsables de las enfermedades antes atribuidas a las bacterias. Fue el desarrollo de nuevas técnicas como los cultivos celulares, el avance en la microscopía y el advenimiento de técnicas de biología molecular que han permitido aislar e identificar los virus. Actualmente se sabe que existen virus de diferentes tamaños desde 30 nm hasta 0.1-0.3 μm (Paniagua *et al.*, 2003).

Los virus no son células, no poseen orgánulos y en cierto sentido no tienen metabolismo. Se conocen como parásitos de la maquinaria biosintética por ser intracelulares estrictos, ya que dependen de las células para su reproducción, síntesis de macromoléculas y muchas otras actividades. Estos son inertes fuera de sus células huésped. Pueden entrar en todos los tipos de células, animal, planta, y la célula bacteriana aunque cada uno tiene cierta especificidad, de acuerdo a sus proteínas de superficie (Lodish *et al.*, 2003; Paniagua *et al.*, 2003; Shors, 2009; 2013).

1.1. Estructura

Los virus están formados por un nucleóide de ácido ribonucleico o desoxirribonucleico, nunca ambos. Tanto en los virus de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) el ácido nucleico forma una hélice doble o simple, con disposición lineal o circular, con polaridad positiva o negativa.

El nucleóide queda envuelto por unidades proteínicas llamadas capsómeros, que forman una cubierta llamada cápside, ambos elementos forman la nucleocápside, en cuyo interior, en algunos virus, también puede haber polimerasas para la replicación de ácidos nucleicos y otras proteínas. Los capsómeros muestran generalmente configuraciones geométricas poliédricas. (Lodish *et al.*, 2003; Paniagua *et al.*, 2003; Prats, 2006).

Los virus más complejos pueden tener, además, una envoltura con fosfolípidos y glucoproteínas recubriendo la cápside. Los componentes de la cápside son proteínas específicas necesarias para la infectividad (Lodish *et al.*, 2003; 2004; Paniagua *et al.*, 2003; Flint *et al.*, 2004).

1.2. Replicación

Los virus, para su replicación dependen de su capacidad de penetrar en células de organismos vivos y de modificar el metabolismo de éstas, remplazando funciones del ADN celular, por las de su propio ácido nucleico. Las funciones de la célula huésped pueden cambiar por completo hacia la producción de nuevos componentes del virus en cuyo caso el ácido nucleico vírico es el modelo de producción (Paniagua *et al.*, 2003).

Todos los virus poseen un tipo de proteínas de unión que son las encargadas de unirse a los receptores celulares de una forma altamente específica, formando un complejo proteína del virus-receptor que es previo a la entrada del virus en la célula. La posibilidad o no de formar estos complejos con una célula es lo que determina el rango de especificidad del virus, ya que sólo puede infectar las células que poseen el receptor adecuado para interactuar con las proteínas de unión virales (Lázaro y Escarmís, 2002; Lodish *et al.*, 2003).

La replicación viral empieza con la adherencia del virus a las células, luego el virus introduce su material genético y pierde su cubierta, quedando el material genético expuesto a la maquinaria enzimática de la célula. Los genes virales se expresan y se producen los componentes del virión; se ensambla el virión y se liberan los virus infecciosos (Ossa, 1990).

Los virus penetran también en la célula por endocitosis. La liberación del virus puede ocurrir al romperse la célula infectada cuando es muy grande el número de virus o por inclusión en una gota que nace de la superficie celular (Paniagua *et al.*, 2003).

1.3. Clasificación de virus de Baltimore

Se sabe que la información genética está organizada en el genoma de una célula en los genes y que las células expresan esta información a través de ARN mensajero (ARNm) que se traduce en el citoplasma por los ribosomas y la maquinaria asociada para formar las proteínas. Este es el llamado dogma central conceptualizado por Francis Crick (Flint *et al.*, 2004).

Un principio importante es que todos los genomas virales deben copiarse para producir ARNs mensajeros que pueden ser leídos por los ribosomas y transcritos para producir proteínas. Un segundo principio es que no hay unidad en la diversidad, la evolución ha dado lugar a la formación de sólo siete tipos principales de genoma viral. El sistema de clasificación de Baltimore integra estos dos principios para construir un algoritmo molecular elegante para los virólogos. Cuando los virus se clasifican por este sistema, se encuentran menos de 10 vías para la producción de ARNm. Con este sistema, sólo conociendo la naturaleza del genoma viral, se pueden deducir los pasos básicos que deben tener lugar para producir ARNm (Figura 1).

El ARNm se define como cadena positiva (+), ya que contiene información inmediatamente traducible. En la Clasificación de Baltimore, una cadena de ADN que es secuencia equivalente también se designa una cadena (+). Los complementos de cadenas de ARN y ADN se designan cadenas negativas (-).

Designaciones tales como cadena + y - se aplican ampliamente para describir los genomas. El conocimiento de la polaridad de la cadena proporciona a los virólogos una visión inmediata de los pasos que deben tener lugar para iniciar la replicación y expresión del genoma viral (Flint *et al.*, 2004).

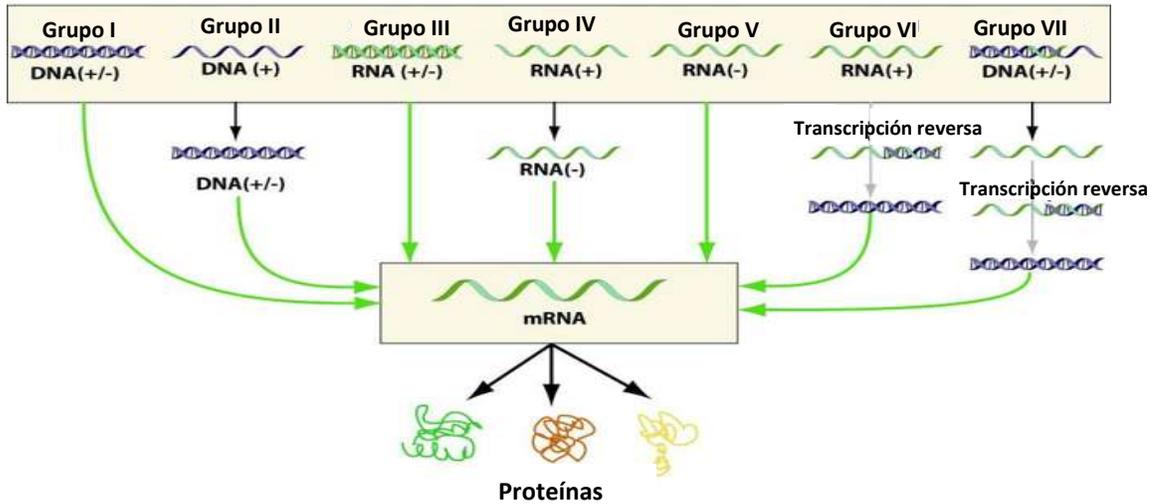


Figura 1.- Clasificación de los virus según Baltimore, 1975. David Baltimore inventó un sistema de clasificación basado en la química del genoma viral del virión y la polaridad de la cadena de ácidos nucleicos positivo (+) si son idénticos al ARNm viral y pueden ser transcritos directamente por la maquinaria del hospedero, ó bien negativo (-) si necesitan un paso intermedio de transcripción. Modificado de Young, 2013.

2. CIRCOVIRUS PORCINO

2.1. Historia

En 1974 fue descrito por primera vez el circovirus porcino (PCV), como un virus contaminante de la línea celular de riñón de cerdo PK-15, pero en este entonces fue denominado como picornavirus-like (Remujo, 2005; Noriega *et al.*, 2007; Mankertz, 2012; Walia *et al.*, 2014).

En 1991, se encontraron cerdos enfermos en Canadá, con apariencia muy delgada, a los cuales se les realizó la necropsia y el estudio patológico reveló unas lesiones en el sistema linfóide, pero como no se encontraron casos en otras granjas, no se continuó con la investigación (Fenaux *et al.*, 2004b; Segalés, 2007; Rincón *et al.*, 2014). Hasta 1994 se volvió a detectar la enfermedad, la cual por su cuadro clínico se creía que era causada por el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), pero todos los análisis para este virus fueron negativos (Fenaux *et al.*, 2004b; Segalés, 2007).

Luego en 1996, por la similitud de las lesiones linfoides con unas producidas por circovirus aviares en la bolsa de Fabricio se retomó la enfermedad y se enviaron muestras para su comparación con virus contaminantes de células (Segalés, 2007).

Para 1997 el PCV ya se había asociado a una enfermedad que afectaba a cerdos en etapa tardía del destete y temprana de engorda y en este año se confirmó su presencia durante la enfermedad en Canadá (Chen *et al.*, 2014; Noriega, 2007)

En 1998, a través de estudios de secuenciación nucleotídica, se constató que el PCV contaminante de las células era distinto al asociado a los casos de circovirus porcino y así estos agentes fueron clasificados como PCV tipo 1 (PCV1) y tipo 2 (PCV2), respectivamente. Considerándose a PCV1 con ausencia de patogenicidad y a PCV2 como patógeno en las piaras (Fenaux *et al.*, 2004c; Remujo, 2005; Segalés, 2007; Riveros, 2009; Hernández, 2011; Li *et al.*, 2012).

Los circovirus tipo 1 y 2 comparten sólo alrededor del 76% de nucleótidos de secuencia, pero tienen las organizaciones genómicas similares (Fenaux *et al.*, 2004a, b). Se ha sugerido que PCV1 y PCV2 pueden tener un origen evolutivo común (Olvera *et al.*, 2007).

2.2. Agente etiológico

Los Circovirus Porcinos (PCV), pertenecen a la familia Circoviridae, ésta a su vez está dividida en dos géneros: Circovirus y Gyrovirus. Dentro del género Circovirus se encuentra el virus de la enfermedad del pico y de las plumas de los psitácidos (pericos, loros y guacamayas), el Circovirus de los canarios, el Circovirus del ganso, el Circovirus de las palomas, el PCV1 y el PCV2 (Fenaux *et al.*, 2004b; Remujo, 2005; Riveros, 2009).

Los PCV, son virus de estructura muy poco compleja, sin envoltura, con una cadena de ADN sencilla y forma circular de aproximadamente 1758 a 1768 nucleótidos, de tamaño muy pequeño entre 16 y 18 nm, con simetría icosaédrica. La organización genómica del PCV1 y el PCV2 es similar, el origen de replicación del ADN está representado por una estructura en horquilla asociado con varios factores de replicación *cis*, el tallo está formado por una secuencia palindrómica de 11 nucleótidos (nt), mientras que el *ápex* contiene 10 – 12 nt (10 en el PCV2) con una secuencia de octanucleótidos altamente conservada donde se ubica un sitio específico de escisión. A la derecha del tallo se encuentra una secuencia repetitiva de hexámeros que sirve como sitio de ligación para las replicasas virales (Hamel *et al.*, 2000; Rincón *et al.*, 2014).

El genoma de los circovirus se caracteriza por tener una región que codifica proteínas o marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) y una región no codificante involucrada en regular la transcripción y replicación del virus. Se han descrito potencialmente 6 ORFs con más de 200 nucleótidos (Noriega *et al.*, 2007). De estos 6, solo han sido caracterizados cuatro, el ORF1 que consta de 945 nucleótidos, que codifica 314 aminoácidos (aa), para la proteína *Rep*, responsable de la replicación viral. El ORF2 consiste en 702 o 705 nucleótidos, que

codifica 234 o 235 aa, para la proteína *Cap* conocida como E2 (Zhang *et al.*, 2014) que forma la cápside del virus, por medio de subunidades llamadas capsómeros, como se muestra en la figura 2 (Remujo, 2005; Noriega *et al.*, 2007; Segalés, 2007; Riveros, 2009; Hernández, 2011; Segalés *et al.*, 2013). El ORF3 tiene 104 aa su papel es en la apoptosis inducida por el virus (Gao *et al.*, 2014) y codifica para proteínas que parecen ser altamente conservadas entre cepas de PCV2 presentando más de un 95% de identidad a nivel de sus aminoácidos (Noriega *et al.*, 2007). El ORF 4 tiene 180 nucleótidos de longitud que codifican para 59 aa y se ha identificado en la transcripción y a nivel de traducción (Gao *et al.*, 2014).

El PCV2 considerado patógeno y relevante en las piaras por causar enfermedad, es un pequeño virus que contiene un genoma de ADN de cadena simple circular, de 1.767-1.768 kb (Hamel *et al.*, 2000; Fenaux *et al.*, 2004c).

Los análisis de secuencias de diferentes PCV2 de todo el mundo indican una relación filogenética, con una secuencia de nucleótidos de identidad más alto del 93%. Las secuencias con diversidad de nucleótidos fueron divididos en dos grupos principales, designados genotipos de PCV2 a y b. Hasta que se encontró un tercer genotipo, en la década de los 80's en Dinamarca, el cuál ha sido descrito y nombrado como PCV2c. Los genotipos PCV2a y PCV2b se han observado en la mayor parte de las explotaciones porcinas del mundo mientras que el tipo PCV2c solo ha sido encontrado en algunas partes de Europa (Guo *et al.*, 2010; Hernández, 2011; Segalés *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Otro estudio, de aislados en China, propuso un cuarto genotipo, que fue designado PCV2d. Al parecer, nunca se ha informado de secuencias PCV2d fuera de China. Por último, los datos preliminares sugieren que existiría un quinto genotipo en jabalíes de Europa y América del Sur, PCV2e (Segalés *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

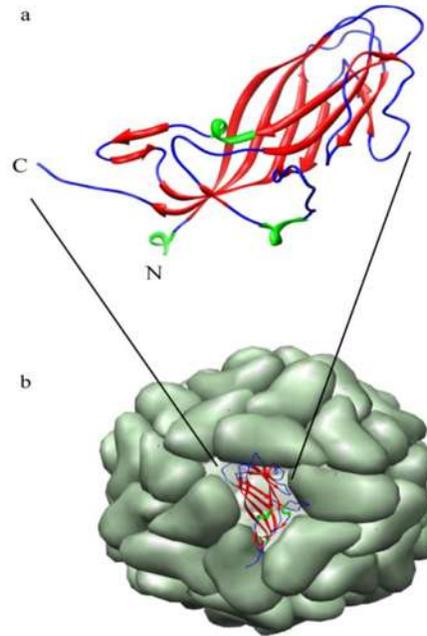


Figura 2.- Modelo de la estructura de PCV2. (a) La cinta muestra el modelo de la subunidad de la cápside con hélices, bucles y las hojas beta en verde, azul y rojo, donde también se pueden apreciar el amino y carboxilo terminal siendo representadas como puntas verde y azul, respectivamente. b muestra la estructura de la cápside viral, con las subunidades que la componen en gris. Tomado de Tribble y Rowland, 2011.

2.3. Replicación

Los circovirus replican su genoma a través del mecanismo del círculo rodante, un proceso utilizado por plásmidos bacterianos, fagos y por algunos virus de plantas y animales. La adhesión del PCV2 a la célula hospedera está mediada por glicosaminoglicanos, heparán sulfato y condroitín sulfato B que actúan como receptores celulares. Una vez dentro de la célula el virus pierde la cápside y el ADN entra en el núcleo. Para la replicación del genoma viral como primer paso, la molécula sencilla de ADN es convertida a moléculas intermediarias de doble cadena las cuales adquieren una estructura superhelicoidal que sirve como template para la síntesis de ADN viral, esta conversión se lleva a cabo por cebadores pero hasta el momento no se ha determinado el origen de éstos. Para iniciar la síntesis del nuevo ADN, el complejo *Rep* se debe unir a las dobles cadenas intermediarias de los hexanucleótidos H1/H2; como las proteínas *Rep* no tienen actividad polimerasa, se

presume que enzimas celulares realicen la extensión del ADN. La terminación del proceso de replicación ocurre con la síntesis de la estructura de horquilla de la nueva cadena y el desplazamiento de la cadena original de ADN, sin embargo se desconocen los eventos con los que culmina el proceso (Rincón, 2014).

El modelo de transcripción es muy complejo, la síntesis de ARN se lleva a cabo por enzimas celulares luego que la cadena sencilla de ADN es convertida en una molécula doble de ADN en el nuevo hospedero. La estrategia de transcripción es bidireccional y varios ARN son producidos por empalme alternativo (Rincón, 2014). El replicación se presenta en resumen en la figura 3.

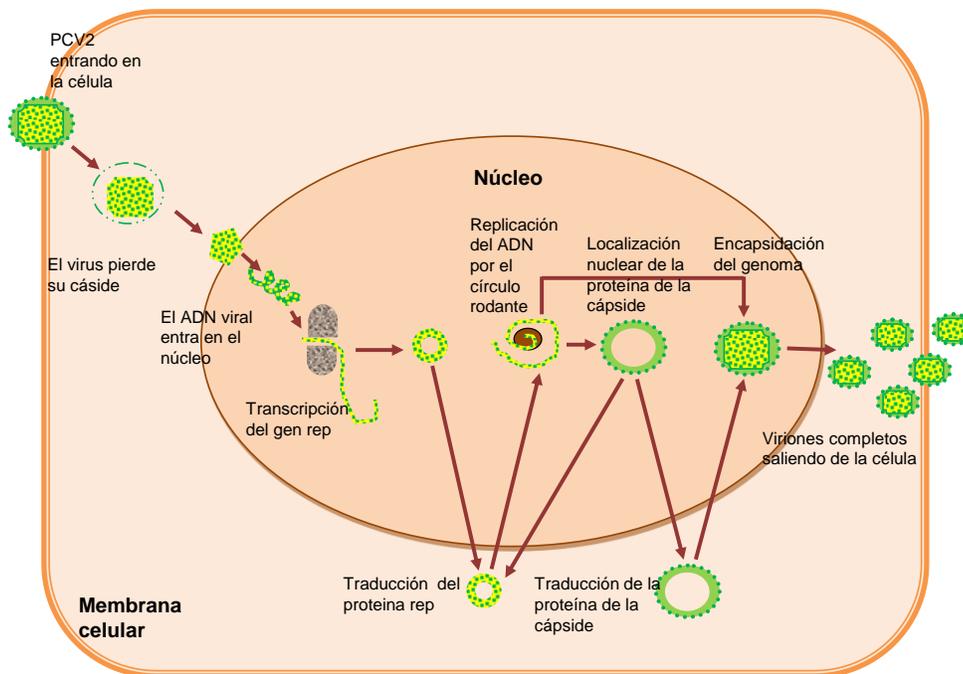


Figura 3.- Mecanismo de entrada, replicación y liberación de viriones de PCV2. ① El virus entra en la célula con la adhesión mediada por glicosaminoglicanos, heparán sulfato y condroitín sulfato B que actúan como receptores celulares. ② A continuación el virus libera el material genético y ③ este entra en el núcleo. ④ Donde se transcribe el gen *rep*, ⑤ se traduce en el retículo endoplásmico a proteína y ⑥ se replica el ADN por el círculo rodante. ⑦ Luego se transcribe y ⑧ traduce la proteína de la cápside. ⑨ Por último se lleva a cabo la encapsidación del genoma y ⑩ los viriones completos son liberados.

Para que se realice el proceso de replicación el virus tiene 2 principales ORFs. El ORF1, encargado de codificar para la proteína esencial de la replicación viral *Rep* y el ORF2 que codifica para una proteína estructural de la cápside *Cap*. Estos ORFs se transcriben en sentido inverso uno del otro (Chen *et al.*, 2014; Noriega, 2007).

3. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCAVD)

El PCV2, ha sido asociado a diferentes enfermedades y condiciones clínicas en los porcinos como el Síndrome Multisistémico de Emaciación Postdestete (PMWS), fallas reproductivas, Complejo respiratorio porcino (PRDC), Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS), Neumonía Necrotizante Proliferativa y Enteritis granulomatosa, por lo que en conjunto se han denominado especialmente en Norteamérica como Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino Tipo 2 (PVCAD) o como Circovirosis Porcina en Europa; se les denomina de esta manera debido a que durante estas patologías ha sido encontrado presente el virus (Riveros, 2009; Lee *et al.*, 2010; Carvajal, 2012).

3.1. Impacto económico

Las enfermedades causadas por PCV2 se consideran de las principales en importancia económica en la porcicultura. Si los cerdos no se vacunan los productores pueden tener pérdidas de más de 20 dólares por cerdo, lo cual equivaldría a pérdidas que pueden pasar de 2000 millones de dólares solo en los Estados Unidos (Thacker, 2010). En Europa las pérdidas generadas por estos procesos patológicos se calculan entre 562 y 900 millones de Euros cada año (Quereda, 2009). La enfermedad está siendo controlada con la vacunación, sin embargo, son necesarias vacunaciones eficaces, económicas y prácticas, que eviten mermas y por tanto mayor ingreso al productor, además que de forma indirecta se ayude a la economía del consumidor.

3.2. Epidemiología

El PCV2 infecta de manera natural a los cerdos y jabalíes, causando o no enfermedad (Segalés, 2007; Carvajal, 2012; Halami *et al.*, 2014), principalmente a cerdos de entre 2 y 4 meses de edad, etapa tardía del destete y temprana de engorda (Villa *et al.*, 2013). Este virus se ha detectado además en roedores, mosquitos, ganado y en terneros afectados con pancitopenia neonatal bovina. En

terneros se ha demostrado de manera experimental que si se les inocula el cultivo viral, llegan a presentar signos de la enfermedad (Halami *et al.*, 2014).

Las infecciones con PCV2 han sido prevalentes en porcinos domésticos en todo el mundo desde algunas décadas y comúnmente el virus está de manera endémica presente en todos los países con industria porcina intensiva, aunque existen países en los cuales la infección está presente, pero el proceso clínico no ha sido aún descrito (Noriega *et al.*, 2007; Segalés, 2007; Guillermo y Torres, 2009; Riveros, 2009). Éste virus es uno de los patógenos más frecuentes encontrados en las explotaciones porcícolas, a nivel mundial la prevalencia va del 30 al 60% (Larochelle *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2011; Rose *et al.*, 2012). La infección por PCV2 ha sido informada en Norteamérica, Europa (España, Francia, Reino Unido, Bélgica, Irlanda), Latinoamérica, Asia y África (Noriega *et al.*, 2007).

En México son pocos los reportes en que se muestra la prevalencia de este virus, según datos de estudios retrospectivos la prevalencia va del 20 al 70 % (Ramírez *et al.*, 2007). Las enfermedades asociadas al PCV2 se han reportado en diferentes estados, pero no se ha confirmado la presencia del virus con pruebas de laboratorio. En el estado de Michoacán por ejemplo, se encontraron 50 casos con lesiones sugestivas de PMWS en una granja de ciclo completo en el 2003, y en el estado de México un caso de PDNS. En Sonora se informó de un caso de PMWS en 2004; en Tamaulipas 2 casos de PDNS en 2005 y en 2006 en Yucatán 13 casos con lesiones de PDNS y PMWS provenientes de 2 granjas. Además en 2007 se describieron en Yucatán 30 casos con lesiones microscópicas compatibles con el PCV2 en una granja (Guillermo y Torres, 2009) y en Puebla, en 2013 se diagnosticó y confirmó el PCV2 en base a los signos clínicos y carga viral por PCR cuantitativa, en donde los cerdos presentaban PDNS y PMWS a la necropsia (Villa *et al.*, 2013).

3.3. Transmisión

El PCV2 se ha detectado en distintas vías de excreción, incluyendo secreciones nasales, saliva, moco traqueal, orina, heces, semen y secreciones oculares, lo que

indicaría que PCV2 podría excretarse por cualquier vía orgánica. De estas se asume que la ruta de transmisión más probable sea la vía oro-nasal, lo que indicaría que la transmisión horizontal permite que el contagio sea muy frecuente. La susceptibilidad a padecer la enfermedad se considera individual ya que existen diversos factores que permitirán que se desarrolle o no, algunos de estos son la edad, la coinfección con otras enfermedades, la respuesta inmunitaria de cada individuo y sigue en discusión si la raza genera predisposición, algunos estudios concluyen que las cruces de Large White/ Duroc son más susceptibles (Segalés, 2007; Noriega, 2007; Quereda, 2009; Riveros, 2009).

La transmisión transplacentaria del PCV2 ha sido demostrada mediante el seguimiento de infecciones experimentales intranasales en cerdos, indicando que la transmisión vertical de PCV2 es factible (Noriega *et al.*, 2007; Madison and Opriessnig, 2011).

3.4. Patogenia

El virus es adquirido por el cerdo ya sea por contacto con otro cerdo infectado o por algún fómite en el ambiente. Una vez en el interior del huésped el PCV2 infecta linfocitos susceptibles de tejidos linfoides localizados en superficies, como los que se encuentran en el intestino delgado. Estos linfocitos deben dividirse activamente para que el virus se replique, esto se favorecerá si el animal se encuentra co-infectado con otro agente infeccioso, ya que esto estimulará a que estos linfocitos se repliquen con mayor rapidez. Una vez que se hayan formado suficientes copias del virus, el linfocito morirá y estos serán liberados. A continuación acceden a torrente sanguíneo y linfático, de aquí se propagan por todo el organismo, infectando diversos tejidos y órganos. Una vez que se incrementa la cantidad de linfocitos infectados, la diseminación en heces y secreciones oro-nasales comienza y se presenta depleción linfoide. La eliminación de los linfocitos dañados se efectúa por la infiltración de histiocitos en el tejido. Debido a que la enfermedad por PCV2 es crónica el proceso se repite y puede durar meses (Riveros, 2009; Lee *et al.*, 2010; Thacker, 2010; Carvajal, 2012).

3.5. Lesiones y signos clínicos

El PCV2 generalmente no es suficiente para desencadenar la enfermedad clínica. Dentro de los factores que favorecen que este virus induzca la enfermedad, se encuentran otros virus como el del PRRS y el parvovirus; así como también la estimulación del sistema (ver en patogenia y respuesta inmunológica) (Hernández, 2011).

Los signos clínicos varían entre granjas, se puede observar pérdida de peso, de tal manera que se observa a los cerdos afectados con la espina dorsal marcada por la emaciación. Retraso en el crecimiento, frecuentemente acompañado de palidez. Trastornos respiratorios, como la disnea o muy probable neumonía intersticial (Figura 4). Digestivos, como la diarrea y estómago distendido. Linfoides como nódulos linfáticos agrandados (Figura 4), con depleción de linfocitos e infiltración histiocitaria en los folículos de los tejidos linfoides; los nódulos inguinales en estos animales aparecen aumentados de tamaño y claramente visibles. También se pueden presentar casos de lesiones en la piel simulando picaduras de insectos hasta manchas cianóticas difusas en la región del periné y el abdomen. En los primeros meses se presenta la miocarditis, ésta se puede complicar produciendo un fallo cardiaco congestivo. La nefritis intersticial es otra lesión habitual que se asocia a la infección por PCV2, caracterizada por ganglios linfáticos agrandados (Figura 4A), manchas blanquecinas distribuidas de forma generalizada (Figura 4B). Además de desórdenes reproductivos incluyendo abortos, mortinatos y momificación fetal. Se puede presentar inflamación granulomatosa en órganos como el pulmón, hígado, riñón, corazón e intestino (Figura 4C). (Boissésou *et al.*, 2004; Segalés, 2007; Riveros, 2009; Thacker, 2010; Hernández, 2011; Carvajal, 2012; Villa *et al.*, 2013; Karuppanan *et al.*, 2014).

Otros signos clínicos menos comunes son: tos, pirexia, úlceras gástricas, desórdenes del sistema nervioso central y muertes súbitas en un menor grado. Algunos de estos signos pueden provenir de la implicación de infecciones secundarias ó coinfecciones (Riveros, 2009).



Figura 4.-Lesiones encontradas en cerdos infectados con PCV2. A, se observan ganglios linfáticos abdominales aumentados de tamaño. B, un riñón con manchas blancuecinas distribuidas de forma generalizada típico de la circovirosis, la flecha señala un quiste. C, un pulmón afectado con neumonía intersticial Tomadas de Segáles, 2007.

3.6. Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la circovirosis porcina no puede establecerse exclusivamente en base a los hallazgos clínicos y macroscópicos, estos solo aportan indicios. De hecho el cuadro clínico puede confundirse con la infección por PRRSV y Parvovirus, este es un síndrome excepcional (Segalés, 2007; Hernández, 2011). Para el diagnóstico diferencial se requiere del estudio histopatológico de los órganos linfoides de los animales afectados u otros que incluyan la detección del virus a través de serología o biología molecular (Krakowka *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2006; Quereda, 2009).

Entre varias pruebas serológicas, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se utiliza comúnmente para la verificación de los niveles de anticuerpos anti-PCV2 (Shin *et al.*, 2014). La PCR cuantitativa también se ha utilizado para medir la presencia de PCV2 en distintos tejidos de cerdos infectados de forma natural o experimental (Hamel *et al.*, 2000; Feanux *et al.*, 2004a, b; Hernández, 2011; Halami *et al.*, 2014).

El método más habitual para detectar el virus es la inmunohistoquímica, mientras que la hibridación *in situ* permite la detección del ADN viral (Krakowka *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2004; Hernández, 2011).

3.7. Tratamiento

La respuesta a los antibióticos para el tratamiento de coinfecciones bacterianas no es buena y en algunos casos puede resultar hasta negativa, sobre todo cuando existen lesiones renales, ya que la eliminación de las sustancias inyectadas puede verse alterada (Guillermo y Torres, 2009).

El éxito del tratamiento y control de las enfermedades asociadas al PCV2 se ha centrado principalmente en asegurar prácticas que reduzcan al mínimo el estrés, en la eliminación de coinfecciones o reducir al mínimo su efecto y en la eliminación de posibles factores desencadenantes que produzcan estimulación del sistema inmune (Guillermo y Torres, 2009).

3.8. Respuesta inmunológica

El sistema inmunitario del cerdo juega un papel importante en el control de la infección por PCV2, manteniendo la infección subclínica en la mayoría de los casos (Segalés, 2011). El desarrollo de una fuerte respuesta humoral, caracterizada por un desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti-PCV2, está directamente correlacionado con la lucha efectiva frente al patógeno (Rodríguez y Díaz, 2012).

Los análisis que se han hecho *in vivo* han demostrado que el PCV2 se asocia con mayor frecuencia a células monocíticas (monocitos, macrófagos y células dendríticas). Se ha descrito que el PCV2 infecta células dendríticas en estado maduro e inmaduro y una de las principales consecuencias de la infección es la incapacidad que tienen las células dendríticas para presentar antígenos a los linfocitos T y B, ya que disminuye la expresión de las moléculas responsables de estimular a los linfocitos. Además de esta asociación persistente con las células dendríticas mielomonocíticas, los antígenos de PCV2 pueden ser ocasionalmente encontrados en células endoteliales, células epiteliales y en linfocitos (Noriega *et al.*, 2007; Quereda, 2009; Hernández, 2011).

Las infecciones experimentales con PCV2 han demostrado que los cerdos generan una respuesta de anticuerpos frente al virus a partir de los 10 a 21 días post-

infección. Generalmente, los cerdos infectados presentan los isotipos IgG1, IgG2 e IgA, aunque hay reportes que han asociado la presencia de IgM con procesos virémicos. Estos anticuerpos generados por la infección tienden a durar meses. De tal forma, que se considera que la inmunidad humoral calostrual es protectora. La inmunidad materna es un punto crítico en el control de la enfermedad por PCV2 en los lechones, por eso es importante que las cerdas y especialmente las de reemplazo sean vacunadas para que presenten anticuerpos en contra del virus y estos sean transferidos a sus crías (McKeown, 2005; Segalés, 2007; Quereda, 2009; Hernández, 2011).

En base a los resultados disponibles de inmunidad humoral y celular, se ha referido que los animales afectados de circovirosis porcina presenten un síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Segalés, 2007; Hernández, 2011).

4. VACUNACIÓN CONTRA PCV2

Además de la mejora de las prácticas de manejo y explotación, la disponibilidad de varias vacunas anti-PCV2 ofrece una opción inmunológica para reducir el impacto de estas patologías (Bucarey *et al.*, 2014). Con la vacunación existe una disminución de la replicación del virus en los tejidos, en algunos casos con eliminación completa del mismo, la no aparición de signos clínicos, el mantenimiento de la ganancia media diaria de peso, el descenso de la mortalidad y la reducción en los costes de medicación (Hernández, 2011; Segalés, 2011; Rodríguez y Díaz, 2012; Villa *et al.*, 2013).

El uso de vacunas frente a PCV2 a nivel de campo, es la mejor alternativa para evitar la enfermedad en las granjas, además de contrarrestar los efectos subclínicos que esta genera (Segalés, 2011; Rodríguez y Díaz, 2012).

4.1. Vacunas comerciales

4.1.1. Vacunas clásicas

La vacuna Circovac® de Merial, está elaborada con virus inactivados y adyuvante de aceite mineral; en presentación de emulsión inyectable para cerdas. La dosis es de 2 ml por vía IM. Para las cerdas jóvenes se realiza una segunda dosis a las 3 o 4 semanas, o como mínimo 2 semanas antes de la cubrición y 2 semanas antes del parto. En cerdas reproductoras la segunda dosis debe administrarse de igual forma a las 3 o 4 semanas antes de la cubrición y mínimo 2 semanas antes del parto. La vacuna causa una inmunización pasiva de los lechones por vía del calostro, a través de inmunización activa de las cerdas jóvenes y cerdas reproductoras. Se ha mostrado que reduce las lesiones en tejidos linfoides asociadas a la infección por PCV2 y la mortalidad de los animales. La duración de la inmunidad va hasta las cinco semanas después de la transferencia pasiva de anticuerpos mediante la toma del calostro (Segalés, 2007; Quereda, 2009; Riveros, 2009; Hernández, 2011; Rodríguez y Díaz, 2012).

4.1.2. Vacunas Recombinantes

Las vacunas comercializadas más recientemente frente a PCV2 se basan en el uso de la proteína de la cápside (*Cap*), ya que es la proteína que ha demostrado mayor capacidad inmunogénica y duradera respuesta humoral (Ferrari *et al.*, 2014).

La vacuna Suvaxyn PCV2® de Fort Dodge es un virus quimera atenuado en el cual el gen *Cap* de PCV2 ha sido insertado en el esqueleto genómico del PCV1 en forma de suspensión, que se aplica a cerdos sanos de 4 semanas de edad o mayores. Sirve como ayuda en la prevención de la viremia causada por PVC2 y como ayuda en el control de la depleción linfóide. Al vacunar al animal, la inmunidad dura hasta 4 meses. La vía de administración es intramuscular (IM) y la dosis es de 2 ml (Quereda, 2009; Riveros, 2009).

La vacuna Circumvent de Merck es una vacuna subunitaria inactivada, en un vector de baculovirus muerto, con microsol y diluvac forte como adyuvante. Para su uso en cerdos de 3 semanas de edad, para una respuesta inmune efectiva y duradera se recomiendan 2 dosis de 2 ml por vía IM. Ayuda a la prevención de la viremia y la diseminación del virus causadas por PCV2 (Crisci *et al.*, 2012).

La vacuna Ingelvac de CircoFLEX® se encuentra basada en la expresión de la proteína *Cap* usando como vector un sistema de Baculovirus, es de una sola dosis usada en la prevención de la enfermedad asociada a Circovirus, en cerdos de 3 semanas de edad o mayores. Se debe utilizar 1 ml de producto por vía IM. La vacuna protege al animal hasta que termina su ciclo y sale para sacrificio. Tiene un tiempo de retiro de 21 días (Riveros, 2009; Coll, 2010).

Fostera PCV de Pfizer® contiene un virus quimérico muerto compuesto por PCV2 y PCV1. El resultado es un genoma del ORF1 de PCV1 y el ORF2 de PCV2. Es de una sola dosis usada en la prevención de la enfermedad asociada a Circovirus, en cerdos de 3 semanas de edad o mayores, se administran 2ml vía IM. Ha demostrado una reducción de PCV2 en tejido linfóide y la inmunidad dura 4 meses (Crisci *et al.*, 2012).

La vacuna Porcilis PCV® está basada en la expresión de la proteína Cap usando como vector un sistema de Baculovirus, ha sido diseñada para cerdos a partir de las 6 semanas de edad y se presenta en forma de emulsión inyectable. Se requieren dos vacunaciones con un intervalo mínimo de 4 semanas entre sí. Se recomienda aplicarlas a las 6 y 10 semanas de edad. Se administra por vía intramuscular (IM) y comienza a proteger al animal contra el *Circovirus* manteniendo esta protección durante 22 semanas (Riveros, 2009). Resumen de vacunas comerciales en tabla 1.

Nombre de la vacuna	Compañía	Tipo de vacuna	Colectivo de aplicación	Dosis y edad/momento de aplicación
Circovac	Merial	Inactivada, virus entero	Cerdas	2 dosis a primerizas en aclimatación y 1 dosis por ciclo
Circumvent	Merck	Inactivado, vector de baculovirus muerto	Lechones	2 dosis, la primera en lechones de 3 semanas en adelante
Fostera PCV	Pfizer	Quimérica recombinante	Lechones	1 dosis en lechones de 3 semanas en adelante
Suvaxyn PCV2	Pfizer/ Fort Dodge	Inactivada, virus quimérico entero	Lechones	1 dosis en lechones de 3 semanas en adelante
Ingelvac Circoflex®	Boehringer-Ingelheim	Subunidad, proteína de la cápside	Lechones	1 dosis en lechones de 3 semanas en adelante
Porcilis PCV	Intervet – Schering Plough	Sub-unidad, proteína de la cápside	Lechones	2 dosis, la primera en lechones de 3 semanas en adelante

Tabla 1.- Resumen de vacunas comerciales anti- PCV2. Modificada de Guillermo y Torres, 2009; Riveros, 2009; Crisci *et al.*, 2012).

4.1.3. Vacunas combinadas

Actualmente también existen vacunas combinadas, tal es el caso de la aplicación conjunta frente a PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*, se considera importante su uso para simplificar el manejo en granja reduciendo el número de aplicaciones por animal (Farreres y Puig, 2008).

4.2. Vacunas en fase experimental

Dado el impacto que tiene el PCV2 y sus interacciones con otros agentes infecciosos, son varias las vacunas que se encuentran en estado experimental. Se están elaborando formulaciones que contengan vacuna contra PCV2, además de que confieran protección contra otros agentes infecciosos que se encuentran coinfectando a los porcinos. Tal es el caso de la combinación con *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus* (Lin *et al.*, 2014).

También se encuentran en experimentación vacunas en las que la proteína *Cap* es transfectada a un microorganismo para que este la produzca. Tal es el caso de lo que hizo Silva *et al.* (2014) quien clonó el gen *Cap* PCV2 en un vector para la expresión secretora pPICZ α A en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* después de la inducción de metanol, para que esta produjera la proteína.

Otra alternativa que está en experimentación en la que se utilizó el vector pEGFP-N1 para construir una vacuna recombinante de la proteína *Cap* de PCV2, este estudio demostró que pEGFP-*Cap* recombinante alivia sustancialmente la infección por PCV2 en ratones (Sylla *et al.*, 2014).

Recientemente se han propuesto las vacunas orales con el uso de micropartículas de quitosano (7 mg en 200 μ l de PBS, administrados oralmente en ratones) ya que parecen ser un sistema seguro y simple en la que basar vacunas orales de PCV2. Puesto que el quitosano tiene propiedades antibacteriana, así como buena viabilidad y biocompatibilidad, bajo costo y una habilidad para abrir las uniones entre células por lo tanto puede ser un polímero adecuado para su uso como vehículo de administración. Además la evidencia reciente muestra que la administración de

micropartículas de quitosano cargadas con antígeno pueden ser dirigidos específicamente a las placas de Peyer, mejorando de este modo las respuestas inmunitarias tanto locales y sistémicos (Bucarey *et al.*, 2014).

5. ESTRATEGIAS DE DESARROLLO DE VACUNAS RECOMBINANTES

Un problema en la producción a gran escala de vacunas es que existen microorganismos que no pueden cultivarse o que se cultivan con dificultad de manera que se aumentan los costos y disminuyen la viabilidad de la producción de las vacunas (Sguazza, 2003).

La tecnología de ADN recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Así pues, se considera una proteína recombinante (PR) o proteína heteróloga a aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo (Poutou *et al.*, 1994; Guerrero *et al.*, 2004). En la figura 5 se describen los pasos generales para la obtención de las PRs.

Para la producción de PR es necesario usar un sistema de expresión específico, de acuerdo a la necesidad (Guerrero *et al.*, 2004). Los sistemas más utilizados para la producción de proteínas recombinantes en EUA y Europa son los microorganismos, con un 55 % (del cual 39 % corresponde a *E. coli* y un 15 % a levaduras) y células de mamífero, específicamente células de ovario de hámster (CHO), con un 35 % (Guevara, 2013).

La sobreexpresión de PR ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida. Otra ventaja del uso de las PR es que se puede hacer mutagénesis dirigida para modificar su secuencia de aminoácidos, esto permite cambiar la secuencia de aminoácidos y conferir o suprimir características específicas que se deseen estudiar, como la estabilidad térmica, la inmunogenicidad,

propiedades estructurales o alguna otra de interés industrial, médico o farmacológico (Guevara, 2013). Estas proteínas recombinantes tienen muchas utilidades en los diferentes campos. En el área de la investigación y la medicina se han utilizado para la generación de vacunas, siendo estas proteínas capaces de desencadenar una respuesta inmune (antígenos) (Sguazza, 2003; Guerrero *et al.*, 2004).

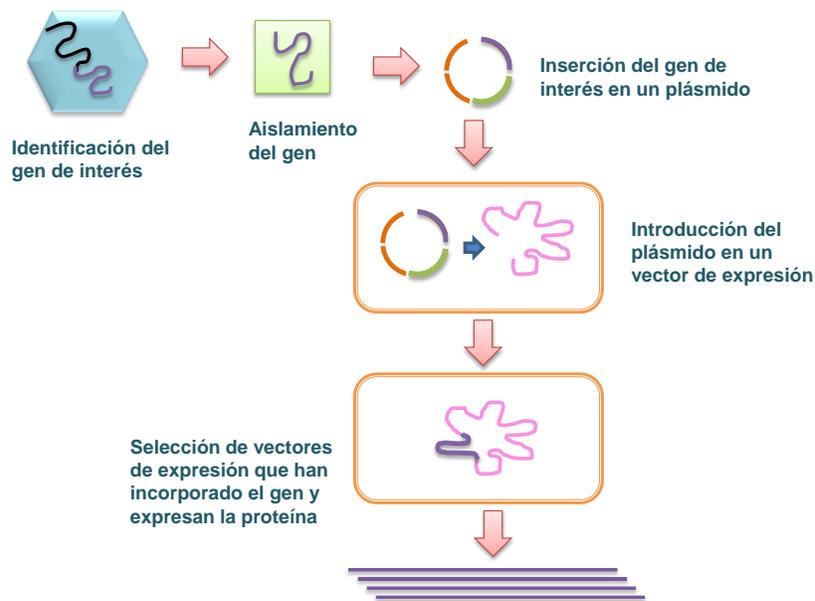


Figura 5.- Metodología para el diseño de una vacuna recombinante. Modificado de Guerrero *et al.*, 2004.

Las vacunas recombinantes, entonces, están basadas en el uso de un vector no patógeno al cual se le ha insertado el gen o genes que codifican para aquella proteína o péptido que desencadena una respuesta inmunitaria eficaz (Rodríguez y Díaz, 2012).

Estas vacunas han venido a sustituir las antiguas vacunas, ya que se pueden elaborar con fragmentos específicos sin tener que utilizar el organismo patógeno completo, lo que genera mayor seguridad en la elaboración y aplicación. Además de que para que estas tengan mayor potencia se les pueden agregar coadyuvantes que potencien su antigenicidad, logrando así una respuesta inmune mayor que una vacuna tradicional (Muller *et al.*, 2003; Sguazza, 2003; Guerrero *et al.*, 2004).

5.1. Transferencia de genes a células eucariotas

5.1.1. Vehículos virales

El fundamento de esta forma de transferencia de genes se basa en unir su material genético con ADN o ARN foráneo y en la facilidad para introducirlo en las células blanco, aunado a su eficaz expresión genética. El genoma viral puede ser modificado en sus regiones víricas al permutar éstas por genes de interés, sin comprometer la propiedad infectiva viral así como la expresión del gen terapéutico. Se cultivan y se purifican en medios especiales con la finalidad de lograr una máxima inocuidad para introducirlos al individuo o la célula de interés. Los principales virus que se utilizan son retrovirus, adenovirus y virus de adenoasociación (Bustos, 2009).

5.1.2. Electroporación

Se basa en la aplicación de un pulso eléctrico al conjunto ADN terapéutico/ células en suspensión, dicha mezcla se coloca entre dos electrodos y se aplica un pulso eléctrico, con tal proceso el ADN entra al citoplasma a través de los poros formados en la membrana celular durante el pulso eléctrico. Esta técnica es poco eficiente ya que muchas células no sobreviven a la intensidad del voltaje que es inherente al procedimiento (Bustos, 2009).

5.1.3. Microinyección

Por este método se dispone ADN plasmídico directamente en el núcleo de las células, con la asistencia de una micropipeta de vidrio que es introducida hasta el núcleo celular, en donde se deposita el ADN foráneo, con la ayuda de un micromanipulador en un microscopio óptico. La inyección directa al núcleo evita la generación citoplasmática y lisosomal del material genético. Las células que sobreviven presentan una alta eficacia de expresión del transgen; esta técnica es muy laboriosa, necesita de una gran práctica y habilidad de quien la maneja, además requiere de un adecuado aislamiento de las células a modificar (Bustos, 2009).

5.1.4. Precipitación con fosfato de calcio

Consiste en formar un precipitado insoluble entre el cloruro de calcio y el DNA que forma microagregados que se depositan sobre la membrana celular y posteriormente son endocitados. Es una técnica económica pero con bajo rendimiento (Navarro *et al.*, 2008).

5.1.5. Liposomas

Los liposomas, son microvesículas formadas por lípidos como vehículos para transportar información genética a células, presentan una serie de ventajas: son poco inmunogénicos, de fácil degradación, poco tóxicos y atraviesan membranas. Adicionalmente se han diseñado liposomas con lípidos catiónicos, que son lípidos sintéticos. Los lípidos catiónicos tienen la propiedad de interactuar con las cargas negativas del ADN y formar lipocomplejos catiónicos, que en su momento interactúan con las cargas negativas de las membranas celulares lo que favorece su introducción a la célula por fagocitosis (Figura 6) (Bustos, 2009).

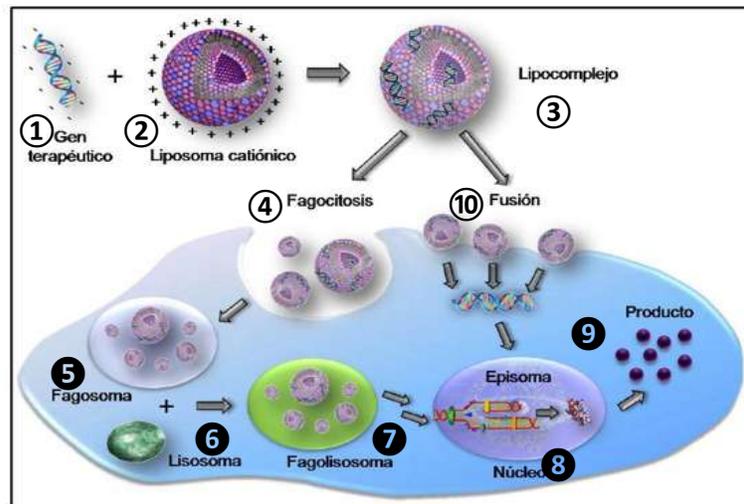


Figura 6 .- Esquema de lipofección. Primero se selecciona y aísla el gen de interés (ADN) ①, este se unirá al liposoma catiónico ②, formando un lipocomplejo ③, éste penetra a la célula por fagocitosis ④, o por fusión ⑩. Si entra por fagocitosis, se forma un fagosoma ⑤, que al unirse con un lisosoma ⑥, se forma un fagolisosoma ⑦, de esta manera el gen de interés se integra en el ADN ⑧ y este puede ser transcrito y traducido al producto final ⑨ (proteínas, ARN, etc.). Si entra por fusión entonces se pierde el lipocomplejo y el gen entra desnudo al citoplasma, de ahí entra al núcleo para integrarse al ADN para que se genere el producto final. Modificado de Bustos, 2009.

5.2. Plataforma de expresión

Para que un organismo superior sobreviva es necesaria la coordinación del metabolismo de millones de células, las cuales llevan a cabo funciones específicas tales como: la nutrición, la relación intercelular y la reproducción. Estas similitudes entre los diferentes tipos de células proporcionan un marco común para la biología celular, permitiendo que los principios básicos puedan ser extrapolados y generalizados a otros tipos de células. Es por ello que diversos tipos celulares y organismos son extensamente utilizados en cultivos debido a su fácil crecimiento y manipulación experimental. Una de las aplicaciones más interesantes del cultivo celular ha consistido en la obtención de productos de uso terapéutico, como las vacunas (Palomares *et al.*, 2007; Tavira *et al.*, 2009).

Las primeras vacunas producidas en cultivos de células de mamífero fueron aquellas contra la viruela y la fiebre amarilla en los años 30's. El aislamiento de virus solamente pudo ser posible gracias al descubrimiento de la posibilidad de propagar células *in vitro* (Tavira *et al.*, 2009). La producción de virus para vacunas fue la primera razón por la que se cultivaron células animales a gran escala. Actualmente se utilizan también algunos virus para la producción de proteínas recombinantes (Palomares *et al.*, 2007).

Las células también han resultado eficaces para la producción de proteínas seleccionadas previamente por sus características como antígenos ideales para la generación de vacunas. Estas se pueden expresar de manera estable o transitoria. La estable lleva a cabo un proceso extenso y complejo aunque a largo plazo con vasta producción. Por otro lado la expresión transitoria de una proteína en células es una importante tecnología para la generación de vacunas. La expresión transitoria del gen, cumple todos los requisitos en materia de cantidad y calidad de los productos. Para las líneas celulares CHO y HEK293 se han optimizado protocolos que permiten la producción de proteínas con un alto rendimiento (Guevara *et al.*, 2014).

Los sistemas diseñados con el propósito de fabricar moléculas recombinantes pueden resultar inestables, lo cual dependerá de que tan extraña sea la nueva molécula para el hospedero. Con el fin de lograr la estabilidad de estas producciones, es que se elaboran los Bancos de Células Primarios (BCP), que constituyen además una vía para conocer si las alteraciones generadas por la interacción del hospedero con la construcción genética atentan contra la obtención del producto adecuado.

El BCP, consiste en un conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que se almacena bajo condiciones que garanticen su estabilidad genética. A partir de BCP es que se prepara el Banco de Células de Trabajo.

La construcción y caracterización del BCP debe ser el primer paso en la producción de fármacos por la vía de ADN recombinante. El conocimiento detallado del mismo no se limita al banco como tal sino que abarca desde la verificación de la construcción genética hasta la identificación del hospedero empleado para la expresión del producto (Poutou *et al.*, 1994).

5.2.1 Sistema de expresión inducible (Tet-on)

Los genes exógenos deben permanecer silenciados cuando su expresión no es necesaria. Los sistemas procedentes de eucariotas superiores están basados en mecanismos reguladores específicos de las células de distintas especies. Se usan construcciones en las que el gen de interés se encuentra bajo el control de un promotor que responde a una sustancia o estímulo exógeno determinado. Actualmente, el sistema para la regulación de la expresión de genes exógenos más utilizado en eucariotes es el sistema de regulación por tetraciclina.

El sistema de regulación por tetraciclina, adaptado para células de mamífero consta de dos componentes: un transactivador híbrido (tTA), que se construyó mediante la fusión del dominio de unión al ADN del represor TetR con el dominio C-terminal del activador transcripcional VP16 del virus del herpes simple (HSV). El segundo

componente consta de un promotor mínimo fusionado a las secuencias del operador tetO; éstas son las secuencias que regularán la expresión del gen que queremos controlar. Una versión llamada Tet-on (Figura 7), se basa en un transactivador denominado rtTA. El rtTA consta de los mismos componentes que tTA, pero su parte TetR se ha obtenido mediante mutagénesis al azar de la versión original, de manera que se obtuvo una proteína nueva capaz de unirse a las secuencias del operador tetO solamente en presencia de tetraciclina (Muñoz, 2005; Cavagnari, 2010).

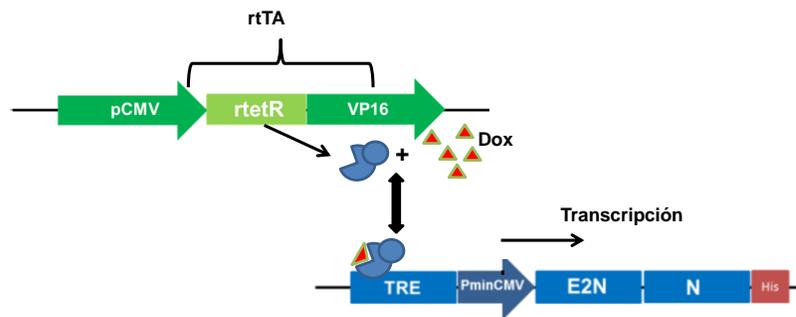


Figura 7 .- Funcionamiento de los sistemas de regulación por tetraciclina Tet-on. Se representa la regulación del plásmido pTRE-E2NN.

La expresión estable del sistema de regulación por tetraciclina en líneas celulares presenta distintos problemas. La obtención de una línea celular en la que se pueda controlar la expresión de genes exógenos implica un proceso largo, que incluye varios pasos. En primer lugar, se introduce, de manera estable, el transactivador en la línea celular, y se seleccionan aquellas clonas que expresan el transactivador de manera funcional. En un segundo paso, se introduce el plásmido que contiene, el gen a regular bajo el control del promotor *tetO*. Finalmente, se realiza un segundo cribado para encontrar un clon regulable por tetraciclina. Una de las mayores dificultades de este proceso reside en establecer una línea celular primaria que exprese el transactivador de manera estable. Durante el proceso de identificación y selección de los clones positivos, muchos de ellos pierden su capacidad reguladora debido a fenómenos de silenciamiento de la expresión del transactivador (Muñoz, 2005).

5.3. Biología sintética y obtención de candidatos vacunales

Recientemente, se han descrito innovaciones importantes en el campo de las vacunas. La primera es el uso de técnicas modernas de biología molecular las cuales han permitido la invención de vacunas más seguras y eficaces; y la segunda ha sido la revolución en el diseño de vacunas producto de la biología sintética.

La biología sintética, es una nueva área de la biología y la tecnología para analizar o visualizar toda la información genética de un organismo. Ésta fusiona la biología molecular, la ingeniería genética y herramientas computacionales, para crear sistemas biológicos con funciones novedosas. (Yero, 2006; Aguilar *et al.*, 2012).

El desarrollo de la esta área permite el desarrollo de vacunas que, a partir de la secuencia genética y por análisis computacional (*in silico*), predicen aquellos antígenos más probables a ser candidatos vacunales. A este proceso, aplicado por primera vez a *Neisseria meningitidis* serogrupo B, se le denomina vacunología inversa (Agramonte *et al.*, 2006; Yero, 2006).

Con los métodos clásicos para obtener un candidato vacunal primeramente, se tendría que aislar el patógeno, seguido de la determinación y aislamiento de las estructuras inmunológicas (5-15 años), de aquí se obtendrían los candidatos vacunales, los cuales se tendrían que secuenciar, para posteriormente clonarlos y purificarlos. Después se inmunizarían animales y se evaluaría su capacidad de inducir una respuesta inmune. Este proceso consume gran cantidad de tiempo y recursos y rinde un número limitado de posibles candidatos dentro de un período definido de tiempo (Yero, 2006).

Por otro lado, la biología sintética emplea los análisis *in silico* para la búsqueda de candidatos vacunales partiendo del análisis de la secuencia nucleotídica, lo que permite detectar los candidatos, los cuales son posteriormente clonados, expresados y purificados como proteínas recombinantes, usados para inmunizar animales de experimentación y finalmente evaluados según su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora; empleando menor tiempo y minimizando los ensayos

de prueba y error. Permitiendo así, cumplir con los criterios necesarios para ser candidatos vacunales, como lo son el estar conservado antigénicamente entre la mayoría de los aislamientos clínicos, inducir anticuerpos funcionales, proteger en un modelo animal, ser seguro y eficaz para su uso en la práctica médica (Agramonte *et al.*, 2006; Yero, 2006).

5.4. Caracterización de proteínas a través de bioinformática

Caracterizar el gen que codifica una proteína es de gran utilidad porque permite en muchos casos completar la secuencia de aminoácidos. Adicionalmente, el conocimiento de la secuencia genética que codifica una proteína permite su clonación en un vector de expresión y una síntesis más eficiente de la proteína en un organismo distinto del que normalmente la produce (Rodríguez, 2009).

En la actualidad, en la identificación de proteínas se utilizan diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, entre otros. Todos estos métodos generalmente son lentos, laboriosos o caros (Rodríguez, 2009). La bioinformática tiene la capacidad de acelerar este proceso de descubrimiento permitiendo la rápida generación de secuencias de aminoácidos para posteriores análisis en el laboratorio (Agramonte *et al.*, 2006).

5.4.1. Peso Molecular

La determinación precisa del Peso Molecular es una componente clave de todos los experimentos de caracterización macromolecular. Para las proteínas, la determinación del peso molecular confirmará el nivel de purificación y aislamiento de la proteína y el grado de agregación. Para polímeros, el peso molecular, es un determinante fundamental de muchas propiedades físicas como la rigidez, resistencia, viscoelasticidad y dureza (Agredo, 2006).

5.4.2. pH

La resistencia de una proteína a diferentes pHs puede indicar el grado de estabilidad de su estructura. Los H⁺ y los OH⁻ del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. (Rodríguez, 2009).

5.4.3. El Punto Isoeléctrico

El punto isoelectrico es el pH para el cual una proteína presenta carga neta compensada (igual número de cargas positivas que negativas) y la solubilidad de la proteína es mínima durante ensayos experimentales, facilitando su aislamiento en un campo eléctrico (Werner, 2007).

5.4.4. El índice Alifático

El índice alifático, o volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas, permite inferir que la proteína es altamente termoestable, de acuerdo con observaciones en las cuales las proteínas de origen mesofílico con alto índice alifático tienden a ser más termoestables.

5.4.5. Epítopes linfocitos B

Un requisito esencial para generar linfocitos B de memoria y anticuerpos es la presentación de péptidos antigénicos a moléculas del CMH de clase II, este tipo de presentación origina lo que se denomina respuesta humoral. Estos péptidos pueden ser predichos por medio de programas computacionales. En la inmunidad específica humoral los linfocitos B juegan un papel fundamental, ya que son los precursores de las células de memoria y los anticuerpos que van a ser los principales actores en la respuesta inmune secundaria (Ramírez, 2014).

5.4.6. Hidrofilicidad

La hidrofilicidad nos proporciona una medida de la afinidad de los distintos aminoácidos a ambientes acuosos (Torres, 2009).

5.4.7. Modelaje

Las funciones de una proteína están íntimamente asociadas a la forma en que la cadena de aminoácidos se pliega en el espacio tridimensional. Así, para comprender las funciones de una proteína es necesario conocer su secuencia de aminoácidos y su estructura 3D, o plegamiento. El plegamiento de una proteína está determinado por la conformación espacial que adopta cada uno de los residuos de aminoácidos que la componen. Por ello es muy importante encontrar métodos acertados para predecir la estructura tridimensional de las proteínas, partiendo únicamente de la secuencia de aminoácidos. Para tal fin es necesario recurrir a las computadoras, cuyo núcleo de procesamiento está basado en silicio, de ahí el término “*in silico*” (Rodríguez *et al.*, 2011).

Para el modelaje de proteínas se han diseñado diversos programas con estrategias y características para los diferentes requerimientos. Se sabe que ningún programa es 100% exacto en su predicción, pero proporciona una aproximación que permite darse una idea de la estructura real. Al final la intención de estos programas como los son Gromacs, Rosetta, Swiss Model tienen la intención de imitar mediante algoritmos lo que sucede en la naturaleza, para replicarlo y presentarlo de una manera gráfica y elegante. En la tabla 2, se muestran algunos programas computacionales, las estrategias que utilizan y sus características,

Estrategia	Programas	Características
Simulaciones de dinámica molecular	GROMACS, AMBER, NAMD	Se simula la vibración y el movimiento atómico y se busca imitar el camino de plegamiento natural. Su limitación es el tiempo de computo requerido.
Métodos de simulación "Monte Carlo"	GROMACS, ROSETTA "AB INTIO"	Se hacen movimientos aleatorios y se aceptan los movimientos que conducen a una menor energía. Estos métodos garantizan hallar el resultado deseado pero a tiempos muy largos.
Redes neuronales	Predicción de estructura secundaria y de contactos entre aminoácidos	Se emplea una red de células interconectadas entre sí que se pueden entrenar para dar el resultado. Se ha logrado la predicción de detalles del plegamiento, pero no de la estructura final.
Modelado por semejanza u homología	SWISS- MODEL, SAM-T08, 3D- JIGSAW, I-TASSER, MODELLER	Son los más acertados. Solo se pueden emplear si se conoce una proteína con una estructura muy parecida a la que se espera para la proteína problema.

Tabla 2.- Estrategias usadas para predecir el plegamiento de proteínas a partir de su secuencia (Tomado de Rodríguez *et al.*, 2011).

La estrategia que se utilizó en el presente fue el modelado por semejanza u homología, con el programa SWISS- MODEL, ya que las secuencias a modelar son parte de la secuencia de la proteína E2 de PCV2 la cual ya ha sido modelada y además de acuerdo con Rodríguez *et al.* 2011, se consideran los modelos más acertados.

JUSTIFICACIÓN

La industria porcícola ha sido afectada por enfermedades virales en la última década, tal es el caso del virus de la influenza A/H1N1 y el virus de la diarrea viral porcina, cuyas pérdidas económicas asociadas no han sido cuantificadas. Otro virus que afecta de manera endémica la producción porcina es el PCV2, ocasionando mermas principalmente en cerdos entre 2 y 4 meses. En los últimos años se han elaborado distintas vacunas para prevenir las enfermedades asociadas a dicho virus, sin embargo, a la fecha la enfermedad está presente en las piaras.

En México, la investigación y desarrollo biotecnológico de candidatos vacunales son escasos y por tanto se recurre a la adquisición de productos elaborados en otros países, cuyas cepas modelo no confieren la protección necesaria.

La proteína *cap*, también llamada E2 ha demostrado ser un antígeno importante para el desarrollo de vacunas contra PCV2, cuya función principal es el reconocimiento de los receptores localizados en las células del hospedero. Por tanto, es significativo el análisis de dicha proteína, debido a que no se conocen las regiones mínimas responsables de la protección. En este trabajo se proponen dos candidatos vacunales recombinantes, la proteína recombinante E2CN y la E2NN, obtenidas del extremo carboxilo y amino respectivamente, de la secuencia genética que codifica para la proteína E2.

HIPÓTESIS

Las proteínas recombinantes E2CN y E2NN de PCV2 poseen características para inducir la respuesta inmune.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN de PCV2 producidas a pequeña escala

1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización de los plásmidos que codifican para las proteínas E2CN y E2NN
- Caracterización *in silico* de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN de PCV2
- Identificación molecular de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN

MATERIAL

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Línea celular CHO Tet-On 3G® Clontech

Las células CHO Tet-On 3G son una línea celular de tejido epitelial derivado de las células de Ovario de Hamster Chino (clona CHO-K1), estas expresan el transactivador regulador de tetraciclina Tet-On 3G. La expresión inducible de cualquier gen puede ser introducido por transfección a esta línea celular, para esto un vector debe contener el gen de interés bajo el control de un promotor responsable de tetraciclina. La expresión es inducida por la adición de doxiciclina al medio de cultivo.

1.2. Plásmido pTRE2pur® Clontech

Es un plásmido que responde a la expresión de un gen de interés en el sistema Tet-On® y Tet-Off® de Clontech, en líneas celulares con éste sistema de expresión. pTRE-2pur contiene un Sitio Múltiple de Clonación (MCS) inmediatamente después del promotor mínimo de Citomegalovirus (CMV) Tet-responsable. Los genes insertados en el MCS serán regulados por tTA y rtTA en los sistemas Tet-Off y Tet-On respectivamente. Este plásmido contiene el elemento TRE que consiste en 7 copias de la secuencia del operador Tet 19pb. TRE se encuentra arriba del promotor mínimo CMV que carece del potenciador que es parte del promotor de CMV completo. En consecuencia es silenciosa en ausencia de unión TetR o rTetR a las secuencias de tetO. Se debe tener en cuenta que el inserto clonado debe tener un codón de iniciación. El gen de resistencia a puromicina se utiliza para seleccionar directamente transformantes estables.

1.3. Plásmido pRSV- β gal

El pRSV- β - galactosidasa es un vector de control positivo para el seguimiento de la eficacia de transfección de células de mamífero. El promotor SV40 y el potenciador de la unidad de transcripción temprana del gen de la *lac Z*, que codifica la enzima β -galactosidasa. El pRSV- β - galactosidasa como control se puede utilizar de forma rápida y directamente en cultivos de células por quimiluminiscencia. La enzima β -galactosidasa reportera también se usa ampliamente para análisis histoquímicos *in situ* utilizando el sustrato X-gal.

1.4. Anticuerpo anti-PCV 50X, (VMRD)

Anticuerpo policlonal dirigido a secuencias de la cápside de PCV2 originado en cerdo y unido a Isotiocianato de Fluoresceína a concentración de 50X. No cruza con PCV1. Usado en cultivos celulares.

1.5. Anticuerpo anti- His-HRP (Invitrogene)

Es un anticuerpo monoclonal IgG que detecta en proteínas recombinantes la etiqueta de polihistidinas en el grupo carboxilo terminal (C-Terminal). El anticuerpo esta hecho en ratón y puede ser usado en bacterias, insectos o células de mamífero.

1.6. Anticuerpo anti- ratón IgG policlonal unido a FITC (Sigma)

Anticuerpo secundario policlonal, conjugado con fluorocromo, utilizado para inmunofluorescencia. Reacciona con suero de ratón y con todas las IgG de ratón.

1.7. Puromicina

La puromicina es un antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas por inhibición de la transducción. Es un aminonucleósido derivado de la bacteria *Streptomyces*

alboniger, que causa la terminación prematura de la cadena durante la traducción que tiene lugar en los ribosomas. Parte de la molécula se parece a el extremo 3' del ARNt aminoacilado, así que se introduce en el ribosoma y a las transferencias a la cadena en crecimiento, provocando la formación de una cadena naciente puromycylated y liberación la cadena prematura, debido a la posición 3' que contiene un enlace amida en lugar del enlace éster normal de ARNt esto hace a la molécula mucho más resistente a la hidrólisis y detiene al ribosoma.

La puromicina se utiliza en la biología celular como agente selectivo en sistemas de cultivo celular. Es tóxico para las células procariotas y eucariotas. La resistencia a la puromicina es conferida por el gen que codifica un *Pac* puromicina N-acetil transferasa que fue encontrado en una cepa de *Streptomyces* productora.

2. SECUENCIAS PROTEÍCAS *IN SÍLICO*

Las secuencias utilizadas para la caracterización *in silico* de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN se diseñaron de las porciones carboxilo y amino terminal, respectivamente, de la proteína E2 de PCV2, la cual codifica para la cápside del virus, a estas secuencias se les añadió una secuencia que codifica para un péptido de la proteína N de PRSS, la cual es considerada muy antigénica, además para tener un sitio de reconocimiento en la proteína se añadió una cola de 8 histidinas. Las secuencias se muestran a continuación en código de una letra. En negro las secuencias de la proteína E2, en azul la secuencia de la proteína N y en rojo la cola de histidinas. Mismas que fueron clonadas en el plásmido de expresión pTRE2Pur.

E2CN

MATALTYDPYVNYSSRHTITQPFSYHSRYFTP KPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLR LQ
TAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFREFNFKDPPLNP GGGGGPGKKNKK
KSPEKPHFPLATEDDVRHHFTPSPR HHHHHHHH

E2NN

MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGY
TVKRTTVRTPSWAVDMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFYRIRKVKVEFWPCSPIT
QGDRGVGSSAVILDDNFVTKGGGGPGKKNKKSPEKPHFPLATEDDVRHHFTPSH
HHHHHHH

3. HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES UTILIZADAS

3.1. CLC Main Workbench 7.5.

Las funcionalidades principales de CLC Workbench 7.5 son utilizados para el análisis de datos de secuencias de proteínas, como el análisis de la expresión génica, diseño de oligonucleótidos para PCR, la clonación molecular, análisis filogenéticos y la gestión de datos de la secuencia, entre una amplia variedad de otras características.

3.2. Inmuno Epitope Data Base

Las herramientas aquí tienen la intención de predecir las regiones de las proteínas que son susceptibles de ser reconocidos como epítomos en el contexto de una respuesta de células B.

3.3. Protoscale

Este programa permite calcular y representar el perfil producido por algunas escalas de aminoácidos en una proteína seleccionada. Una escala de aminoácidos se define por un valor numérico asignado a cada tipo de aminoácido. Las escalas más utilizadas son las de hidrofobicidad o hidrofiliidad y los parámetros de conformación de estructura secundaria, pero existen muchas otras escalas que se basan en

diferentes propiedades físicas y químicas de los aminoácidos. Protscale ofrece 57 escalas predefinidas introducidas en la literatura.

3.4. Swiss Model (MODELLER)

Este programa acomoda los aminoácidos en el espacio correspondiente a la secuencia problema, basándose en la estructura 3D de uno o varios posibles moldes. Cuenta con herramientas para realizar el alineamiento de secuencias entre el problema y el, o los moldes, pero también es posible realizar el alineamiento de manera externa y alimentar al programa. Tiene también varias herramientas para realizar pequeñas corridas de dinámica molecular que permiten mejorar el acomodo de las regiones de la secuencia problema que no están representadas en ninguno de los moldes disponibles. El cual se basa en encontrar semejanzas con modelos de estructuras ya existentes y busca un espacio a los aminoácidos que no se encuentran en la estructura ya predicha, de acuerdo con sus propiedades.

METODOLOGÍA

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN

1.1. Digestión enzimática

Para identificar las construcciones de los plásmidos que codifican para las proteínas E2CN y E2NN; se realizó una digestión enzimática de los plásmidos pTRE-E2CN, pTRE-E2NN y pTREpur2, para realizar el corte se utilizaron las enzimas de restricción PvuII, EcoRI y la combinación de BamHI con EcoRV, de acuerdo con el mapa del plásmido. Posteriormente se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con un marcador de peso molecular de 100 pb. Se utilizó como solución de corrida el tampón TBE 0.5X y bromuro de etidio para la visualización del ADN. Por último el gel se observó con luz ultravioleta, en el transluminador.

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA *IN SÍLICO* DE LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2

Para la caracterización *in silico* se utilizaron las secuencias en código de una sola letra de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN.

2.1. Frecuencia de Aminoácidos (FA), Longitud (L) Peso Molecular (PM), Punto Isoeléctrico (PI) e Índice Alifático (IA)

Para la predicción *in silico* de FA, L, PM, PI, IA, se utilizó el programa CLC Main Workbench 7.5. Se introdujo la secuencia de las proteínas y se guardó en el programa, a continuación, en la barra de menú se eligió Toolbox y en el menú que se desplegó se seleccionó la opción de General Sequence Analysis, donde se desplegó otro menú, se eligió la opción de Create Sequence Statistics, y se guardó la información.

2.2. Hidrofobicidad

Se utilizó el servidor ProtScale para predecir la hidrofobicidad. Se introdujo como dato de entrada la secuencia en código de una letra de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN. La obtención de los perfiles de hidrofobicidad fue realizada mediante el algoritmo de Kyte-Doolittle (1982), el cual emplea una escala que otorga valores de hidrofobicidad para cada uno de los aminoácidos con variaciones entre 3,5 (glutamato) y 4,2 (valina) (Torres y Hernández, 2014).

2.3. Afinidad a Linfocitos B

Para la obtención de epítopes con afinidad a linfocitos B se utilizó el programa en la red Inmuno Epitope Data Base (IEDB), en el cual se pueden predecir diferentes datos como afinidad a linfocitos T o linfocitos B, para el presente, era de interés la predicción de linfocitos B ya que son los encargados de producir anticuerpos. Así que en el programa, como dato de entrada se introdujeron las secuencias de aminoácidos de las proteínas E2NN y E2CN en código de una sola letra, estas fueron analizadas por separado para obtener el resultado de cada una de forma individual. El programa asignó valores a los diferentes aminoácidos en base a sus características fisicoquímicas para así identificar las secuencias con mayor afinidad a linfocitos B y arrojó los resultados en forma de tabla y gráfica.

2.4. Modelado de las proteínas

El modelado por semejanza u homología es el que da mejores resultados, porque consiste en usar la estructura de una proteína conocida, cuya secuencia está emparentada con la secuencia de la proteína que se desea modelar. De esta manera, los aminoácidos coincidentes en ambas secuencias se pueden superponer en la estructura conocida y la conformación de los restantes se resuelve buscándoles

acomodo en los espacios disponibles, usando como guía una función de energía (Rodríguez *et al.*, 2011).

Es por esto que para el modelado de las proteínas se utilizó el servidor libre Swiss Model (Swiss Instituten of Bioinformatics, vía the ExPASy web) debido a que las proteínas E2CN y E2NN son parte de la proteína E2 de PCV2 (Nuñez *et al.*, 2012) y está ya ha sido modelada (Khayat *et al.*, 2011).

De la misma forma que para los otros servidores, se utilizó la secuencia en código de una sola letra de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN, y elegimos la opción de construir modelo, el tiempo que este programa tarde depende de la longitud de la secuencia introducida y de la cantidad de modelos similares que encuentre. En este caso las proteínas son de menos de 200 aminoácidos y la secuencia es muy particular, así que el servidor tardo menos de 10 minutos buscando coincidencias y presentó en orden de porcentaje de identidad los posibles modelos de los cuales se eligió el de mayor identidad con la secuencia.

3. CULTIVO Y SELECCIÓN DE CLONAS PRODUCTORAS DE PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2

Una vez realizada la caracterización *in silico* de las proteínas E2NN y E2CN se tienen una idea más clara de la naturaleza de estas, así que se procedió a identificarlas y caracterizarlas por medio de técnicas moleculares para lo cual se hizo necesario la expresión de éstas *in vitro*, a través de la transfección de los plásmidos de expresión donde se encuentran clonadas, para lograr este propósito se emplearon células de ovario de Hamster (CHO).

3.1. Cultivo celular

Se descongelaron células de Ovario de Hámster Chino (CHO 3G Tet-ON). Las cuales fueron sembradas en caja para cultivo celular de 100 mm, con 6 ml de medio F12-K completo con suero fetal bovino (SFB) al 10%). Una vez que la caja se encontraba a una alta confluencia (80-100%), fueron contadas y sembradas en

placas independientes de 6 pozos (2.5×10^5 células por pozo), se les agregó 1.5 ml de medio F12-K completo y se incubaron en una estufa de cultivo en condiciones estándar: 5% de CO₂, a 37°C, por 24 horas. Seguido de un lavado con PBS, se les adicionó Optimem (medio de cultivo bajo en sales).

3.2. Transfección

Se procedió con la técnica de transfección con liposomas (Xtreme GENE HP DNA transfection reagent®). Brevemente, en tubos eppendorf de 1.5 ml se realizó la mezcla de reacción 2 tubos con 250 µl de Optimem y 12 µg de plásmido pTRE-E2NN y de igual forma para el plásmido pTRE-E2CN (tubos A), y a otros 4 tubos se les agregó 250µl de Optimem y 24 µl de lípidos (tubos B), para obtener una proporción de 2:1. Además se agregaron 2 tubos más (A y B) para usar de control de transfección el plásmido pRSV-βgal.

Se mezcló el contenido del tubo A con el contenido del tubo B y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de este tiempo se depositaron 250 µl de la mezcla gota a gota en cada uno de los pozos de la placa correspondiente. Como control se emplearon células sin transfectar. Seguido de incubación en condiciones estándar de cultivo.

3.3. Selección

Para la selección de las células transfectadas éstas, fueron transferidas de las placas de 6 pozos (donde se transfectaron) a cajas de 100 mm de diámetro, con 6 ml de medio F12K y se les agregó puromicina para seleccionar a una concentración de 5µg/ml. El plásmido transfectado en las células contiene la secuencia de resistencia a puromicina, por tanto las células que hayan integrado el inserto correctamente no morirán.

Cada tercer día se retiró el medio y se agregó medio fresco adicionado de puromicina hasta que todas las células no transfectadas (Control negativo) murieron (aprox. 7 a 10 días).

Las células que sobrevivieron y formaron colonias se crecieron y sembraron en placas de 12 pozos. Para después almacenarlas para pruebas posteriores.

3.4. Control de transfección

Para comprobar que el protocolo de transfección fue correcto y que los reactivos estaban funcionando debidamente fue necesario hacer una prueba de control de transfección. El control de la transfección en las células, se realizó mediante la transfección del plásmido pRSV- β gal y posterior tinción de las células con X-gal. Esto se realizó utilizando la tinción con X-gal para la cual se preparó el sustrato con 6.6 mg de $K_3Fe(CN)_6$ al 20 mM, 8.5 mg de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$ al 10 mM, 2 μ l de $MgCl_2$ al 2 mM, 1ml de PBS y 25 μ l de X-gal (1 mg/ml), para 1 ml. El proceso de tinción se efectuó de la siguiente manera: primeramente se le retiró el medio de cultivo a las células CHO 3G Tet-On y se lavaron una vez con PBS, a continuación se fijó con 1ml de paraformaldehído (al 2% en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces las células con PBS, y se adicionó la solución preparada con X-gal, se incubó en condiciones de cultivo durante toda la noche. Y se observó en el microscopio compuesto a objetivo de 4X y 10X para demostrar la eficiencia de transfección (células teñidas de azul). Se muestra una imagen representativa en la figura 8.

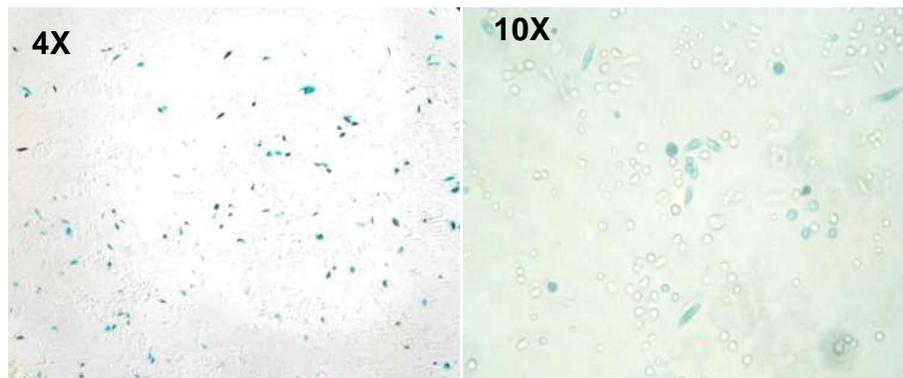


Figura 8 .-Células CHO 3G Tet On, transfectadas con el plásmido pRSV- β -gal y teñidas con Xgal. Control de la transfección con liposoma. Aprox. el 12% de células se transfectaron según conteo directo.

3.5. Viabilidad celular

Después de la selección con puromicina, las células fueron teñidas con cristal violeta. Brevemente, se retiró el medio de cultivo de las células y se les dio un lavado con PBS, a continuación se les adicionó cristal violeta hasta cubrir la superficie (3ml) y se dejó reposar por 30 minutos. Una vez pasado el tiempo se les retiró el colorante y se lavaron con agua destilada para retirar el exceso, hasta que el agua saliera sin colorante. De acuerdo a la Figura 9, se muestra que las células control no proliferaron, mientras que las transfectadas si en presencia del antibiótico de selección.

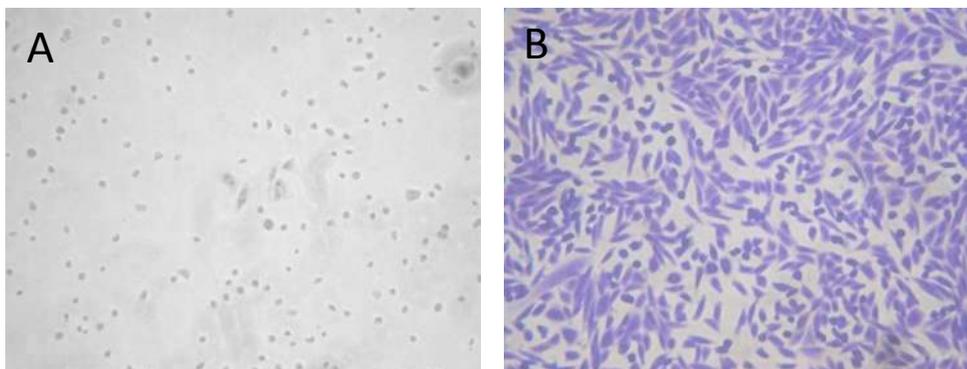


Figura 9.-Células teñidas con cristal violeta (Viabilidad). A, células CHO 3G Tet On no transfectadas. B, Células transfectadas con el plásmido que confiere resistencia a Puromicina.

4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2NN Y E2CN

4.1. Inmunodetección

La técnica de inmunofluorescencia es una técnica indirecta para detectar un antígeno por medio de anticuerpos afines a estos, esta técnica ha sido utilizada para la identificación de diferentes antígenos o péptidos candidatos vacunales, como lo son las proteínas E2NN y E2CN (Chen *et al.*, 2014).

De las células transfectadas en placa de 6 pozos se tomaron 2×10^5 células y se sembraron en cajas para inmunocitoquímica, se dejaron adherir durante 24 horas con medio F12-K completo. Al día siguiente se les retiró el medio y se lavaron con PBS. Se fijaron con 700 μ l de paraformaldehído al 2%, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente (TA), se lavaron 3 veces con PBS-Tritón al 0.03% y se les agregó solución bloqueadora (PBS-TRITÓN 0.3% al 10% con suero de ternera) dejándose incubar por 2 horas a TA y se lavaron 2 veces con PBS-Tritón. A continuación se adicionó el anticuerpo.

Para la identificación de las proteínas se utilizaron dos protocolos con anticuerpos diferentes, uno que identifica la etiqueta de histidinas, en el que se utilizó el anticuerpo primario Anti-His hecho en ratón (1:1000) y como anticuerpo secundario el Anti-ratón unido a FITC (1:1000). Estos fueron agregados y se dejaron por 3 horas en movimiento, en ausencia de luz, con tres lavados con PBS Tritón entre un anticuerpo y otro.

En el segundo protocolo se adicionó el Anticuerpo policlonal anti-PCV2 acoplado a FITC (50X) a una concentración de 1X (20 μ l en 1ml) en PBS-Tritón y en ausencia de luz reposó toda la noche.

Finalmente en los dos casos se dieron 3 lavados con PBS-Tritón y uno más con agua destilada para luego dejarse en glicerol al 40%. Se observó al microscopio con luz en fondo claro, con luz ultravioleta a objetivo de 10X a zoom de 4X

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS E2C-N Y E2N-N

1.1. Digestión enzimática de los plásmidos

Se llevó a cabo una digestión de los plásmidos pTREpur2 (plásmido vacío), pTRE-E2CN y pTRE-E2NN. De las tres digestiones que se llevaron a cabo, sólo la realizada con la enzima de restricción PvuII cortó los fragmentos de ADN esperados, éstos se pueden observar marcados con flechas amarillas en la figura 10.

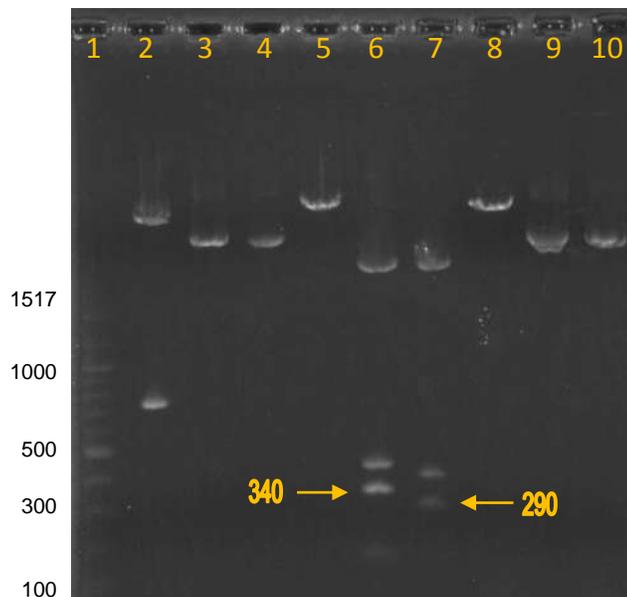


Figura 10.-- Gel de agarosa al 0.8% de la digestión enzimática de los plásmidos pTREpur, pTRE-E2CN y pTRE-E2NN, en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb, la digestión con EcoRI en los carriles 2,3 y 4 con los plásmidos antes mencionados, la digestión con PvuII en los carriles 5,6 y 7 y la digestión con BamHI y EcorV en los carriles 8,9 y 10. Se observan las franjas correspondientes al plásmido completo y sólo en el caso de las digestiones con PvuII se pueden observar los fragmentos esperados de los plásmidos pTRE-E2CN y pTRE-E2NN (flechas amarillas).

2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA *IN SÍLICO* DE LAS PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2

2.1. Frecuencia de Aminoácidos Peso molecular (PM), Punto isoeléctrico (PI), Índice Alifático (IA)

Para la predicción *in silico* de los parámetros bioquímicos se utilizó el programa CLC Main Workbench 7.5 y se obtuvieron los resultados de FA, L, PM, PI, IA de cada una de las proteínas recombinantes. La FA se muestra en la Tabla 3, en E2NN encontramos que los residuos más frecuentes (marcados en azul) son la arginina y la prolina, mientras que los menos frecuentes (marcados en naranja) son cisteína, alanina y metionina. En E2CN los residuos más frecuentes (marcados en azul) son la prolina, histidina y treonina, mientras que los menos frecuentes (en naranja) son triptófano, metionina y cisteína.

AMINOÁCIDOS	E2NN		E2CN	
	CANTIDAD	FRECUENCIA	CANTIDAD	FRECUENCIA
Alanina (A)	3	0.017	5	0.034
Cisteína (C)	1	0.006	0	0
Acido Aspártico (D)	7	0.04	8	0.055
Acido Glutámico (E)	4	0.023	5	0.034
Fenilalanina (F)	9	0.051	9	0.062
Glicina (G)	14	0.08	8	0.055
Histidina (H)	15	0.085	14	0.096
Isoleucina (I)	6	0.034	4	0.027
Lisina (K)	11	0.062	9	0.062
Leucina (L)	7	0.04	8	0.055
Metionina (M)	3	0.017	2	0.014
Asparagina (N)	7	0.04	10	0.068
Prolina (P)	17	0.097	14	0.096
Glutamina (Q)	2	0.011	6	0.041
Arginina (R)	28	0.159	8	0.055
Serina (S)	10	0.057	8	0.055
Treonina (T)	11	0.062	11	0.075
Valina (V)	11	0.062	7	0.048
Triptofano (W)	4	0.023	1	0.007
Tirosina (Y)	6	0.034	9	0.062

Tabla 3 .- Cantidad y frecuencia de residuos de aminoácidos, obtenidos en el programa de acuerdo con la secuencia de las proteínas recombinantes E2NN y E2CN

En cuanto a los parámetros bioquímicos para las proteínas recombinantes E2CN y E2NN se muestran en la Tabla 4.

Resultados bioquímicos		
Información	E2CN	E2NN
Tipo de Secuencia	Proteína	Proteína
Longitud	146 aa	176 aa
Organismo	Virus	Virus
Peso Molecular	17.091	20.988
Punto Isoeléctrico	9.33	11.72
Índice Alifático	49.384	48.636

Tabla 4.- Descripción de aspectos bioquímicos para las secuencias peptídicas de las proteínas recombinantes E2NN y E2CN.

2.2. Hidrofobicidad

Valores de cada aminoácido				
Alan: 1.800	Cys: 2.500	His: -3.200	Met: 1.900	Tre: -0.700
Arg: -4.500	Gln: -3.500	Ile: 4.500	Fen: 2.800	Tri: -0.900
Asn: -3.500	Gli: -0.400	Leu: 3.800	Pro: -1.600	Tir: -1.300
Asp: -3.500	Glu: -3.500	Lis: -3.900	Ser: -0.800	

Tabla 4.- Valores asignados en la escala de Kytte y Doolittle para la hidrofiliidad. Los datos con signos negativos son carácter hidrofóbicos y los positivos hidrofílicos.

Los resultados son mostrados en forma de gráficas donde el eje de las abscisas designa la posición de los aminoácidos y el de las ordenadas la puntuación asignada para cada tipo de aminoácido. En la tabla 5 se muestra el valor dado para cada aminoácido), reflejando en este caso su carácter hidrofílico.

Los residuos con más alta puntuación hidrofílica en la proteína E2CN, están entre las regiones 36-40, 52-59, 67-75, 82-90, siendo el pico más alto este último. Con respecto a E2NN los residuos con más alta puntuación hidrofílica se encuentran entre las regiones 49-53, 68-76, 108-111 y 122-129, siendo el pico más alto éste último. Estos sitios hidrofílicos tienen alta probabilidad de encontrarse en la superficie de la proteína (Torres, 2009). Se muestra el perfil hidrofílico en la Figura 11; la figura 11A, corresponde a la proteína E2CN y 11B, a la proteína E2NN.

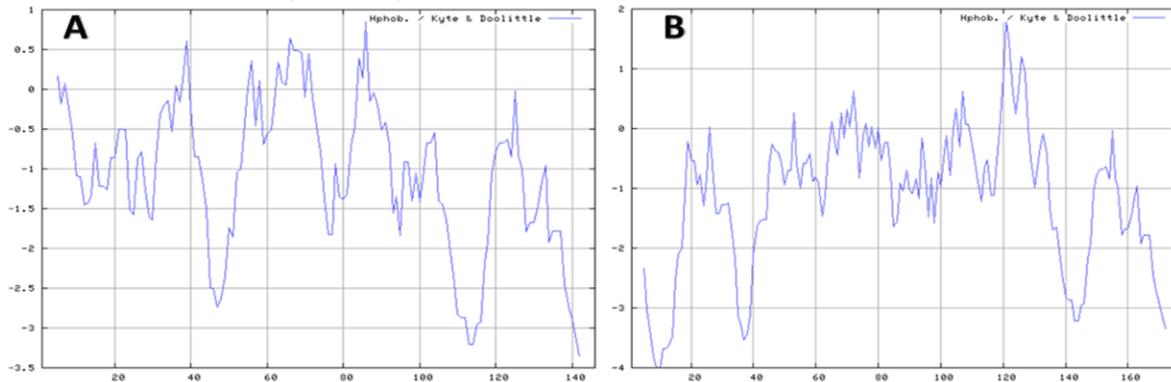


Figura 11 .- A, Análisis del perfil hidrofílico de E2CN (escala de -3.5 a 1) y B, E2NN (escala de -4 a 2) generados con el algoritmo de Kyte y Doolittle. Escala en el eje de las ordenadas y posición de los aminoácidos en el eje de las abscisas.

2.3. Afinidad a Linfocitos B

PROTEÍNA E2CN				
N°	Principio	Fin	Péptido	Longitud
1	10	14	YVNYS	5
2	16	20	RHTIT	5
3	24	24	S	1
4	30	31	FT	2
5	33	37	KPVLD	5
6	41	49	DYFQPNNKR	9
7	59	62	AGNV	4
8	75	77	IYD	3
9	95	140	FKDPPLNPGGGGPGKKNKKKSPEKPHFPLATEDDVRHHFTSPRHH	46

Tabla 6.- Péptidos con afinidad a linfocitos B en la secuencia de la Proteína Recombinante E2CN

En el programa Inmuno Epitope Data Base (IEDB), se obtuvo la predicción lineal de afinidad con epítopes de linfocitos B. Se encontraron 9 péptidos con afinidad (Tabla 6), en la secuencia de la proteína recombinante E2CN, de los cuales el mayor es de 46 aa que va en la secuencia del aa 95 al 140, el cual corresponde a la proteína N de

PRSS y a una porción de secuencia de la cola de histidinas. El que le sigue en tamaño contiene 9 aa y se encuentra entre la posición 41 y 49 de la secuencia ubicándose en la porción de la secuencia de la proteína (Figura 12).



Figura 12.- Afinidad de epítopes con Linfocitos B en E2CN (escala de -1.5 a 3.0). La escala en el eje de las ordenadas y posición de los aminoácidos en el eje de las abscisas, se observa con una flecha roja la porción correspondiente a la porción de E2N-N, en azul la porción de la proteína N de PRRS y en morado la cola de histidinas.

En la secuencia de la proteína recombinante E2NN se encontraron 7 péptidos con afinidad a linfocitos B (Tabla 7), de los cuales el mayor es de 41 aa que va en la secuencia del aa 130 al 170, el cual corresponde a la proteína N de PRRS y a una porción de secuencia de la cola de histidinas. El que le sigue en tamaño contiene 14 aa y se encuentra entre la posición 79 y 92 de la secuencia ubicándose en la porción de la secuencia de la proteína (Figura 13).

E2NN				
N°	Principio	Fin	Péptido	Longitud
1	2	3	TY	2
2	6	6	R	1
3	12	17	RHRPRS	6
4	60	67	TTVRTPSW	8
5	79	92	FLPPGGGSNPRSVP	14
6	109	119	SPITQGDRGVG	11
7	130	170	VTKGGGGPGKKNKKKSPEKPHFPLATEDDVRHHFTSPRHH	41

Tabla 5.- Péptidos con afinidad a linfocitos B en la secuencia de la Proteína Recombinante E2NN

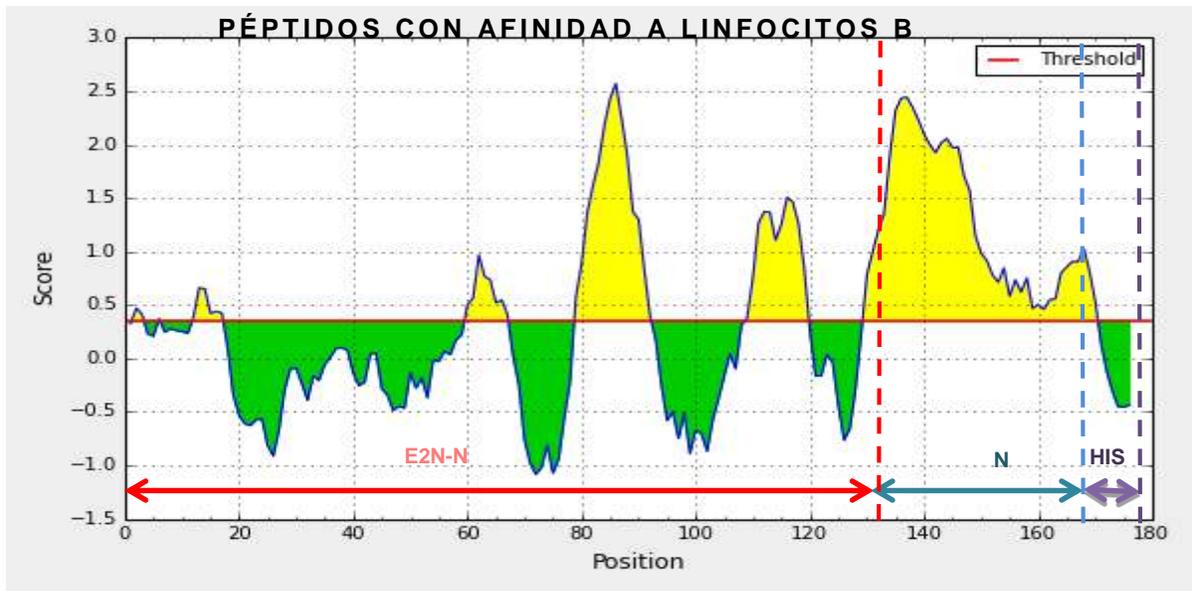


Figura 13.- Afinidad de péptidos con Linfocitos B en E2NN (escala de -1.5 a 3.0). La escala en el eje de las ordenadas y posición de los aminoácidos en el eje de las abscisas, se observa con una flecha roja la porción correspondiente a la porción de E2NN, en azul la porción de la proteína N de PRRS y en morado la cola de histidinas.

2.4. Modelado de las proteínas

La predicción de la estructura terciaria se obtuvo a partir de los alineamientos para detectar fragmentos homólogos, que fueron unidos empleando el programa Swiss model. Se obtuvieron las proteínas modeladas en 3D (Figura 14), la estructura terciaria de E2CN obtenida presenta una identidad del 98.98% con la secuencia de la proteína completa E2 y el modelo de la estructura terciaria de la proteína E2NN comparte identidades de 97.78%.

El reconocimiento de la estructura tridimensional de una proteína es útil para predecir su funcionamiento en el caso de las proteínas E2CN y E2NN, se requiere que sean funcionales como antígenos vacunales, de esta manera se observa que tienen terminaciones expuestas lo cual le beneficia para ser reconocida por el sistema inmune (Torres, 2014).

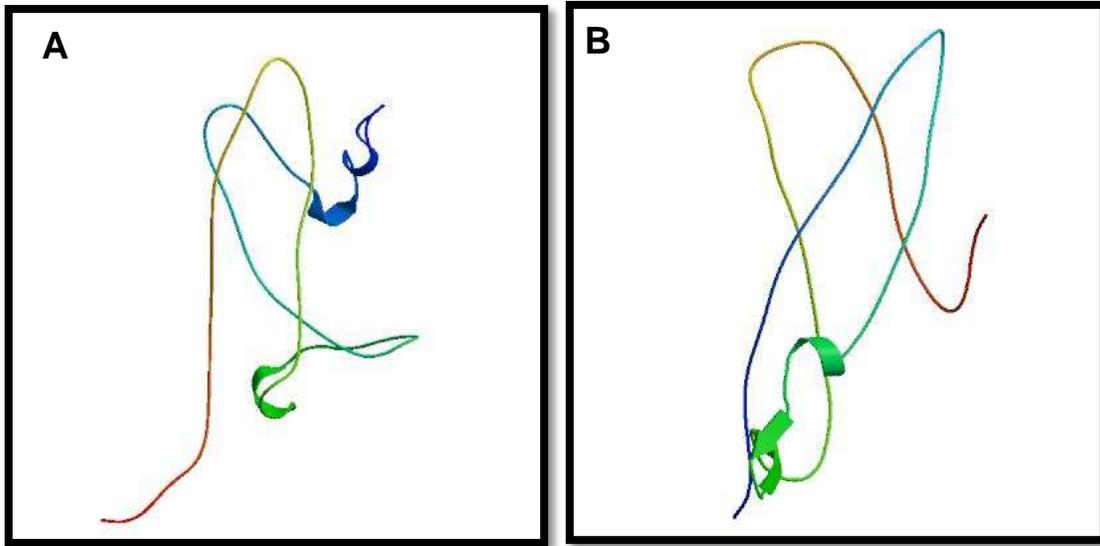


Figura 14 . Estructura tridimensional de las proteínas recombinantes. A, E2CN y B, E2NN. Resultados del modelado por homología, 98.98% de identidad y 2.35 Å de resolución, para la proteína E2CN y 97.78%. de identidad y una resolución de 2.35 Å, para la proteína E2NN.

3. CULTIVO Y SELECCIÓN DE CLONAS PRODUCTORAS DE PROTEÍNAS E2CN Y E2NN DE PCV2

Se transfectaron las células CHO 3G Tet On con los plásmidos pTRE-E2CN y pTRE-E2NN, se seleccionaron con puromicina y se obtuvieron clonas únicamente de las células transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína E2NN, las células transfectadas con el plásmido que codifica para E2CN, no clonaron debido a que no se obtuvieron colonias resistentes a puromicina. Se mantienen en criopreservación un total de 25 clonas denominadas CHO-TRE-E2NN que en estudios posteriores serán analizadas para conocer la calidad y cantidad de proteína que expresan. En la figura 15, se muestran microfotografías representativas de las líneas celulares seleccionadas obtenidas a partir de una sola célula.



Figura 15.-Clonas obtenidas con la transfección del plásmido que codifica para la proteína E2NN. Las imágenes muestran tres colonias representativas, cada una originada a partir de una sola célula.

4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E2NN Y E2CN

4.1. Inmunodetección

Para identificar que los plásmidos pTRE-E2CN y pTRE- E2NN se transfectaron en forma transitoria, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia en células CHO-Tet On. Para identificar la expresión se emplearon dos anticuerpos, el primero identifica la etiqueta de histidinas presentes en la proteína y el segundo es un anticuerpo policlonal empleado para la identificación del virus que potencialmente reconoce varios epítopes de la proteína E2 (Figuras 16 y 17). Se encontró que en las células transfectadas con el plásmido pTRE-E2CN con el anticuerpo Anti-His, aproximadamente el 18% expresaba la proteína, esto de acuerdo con el canal para FITC (marcas verdes). En cuanto al plásmido pTRE- E2NN, con el Anti-His se encontró aprox. 16% y con Anti-PCV2 el 10%.

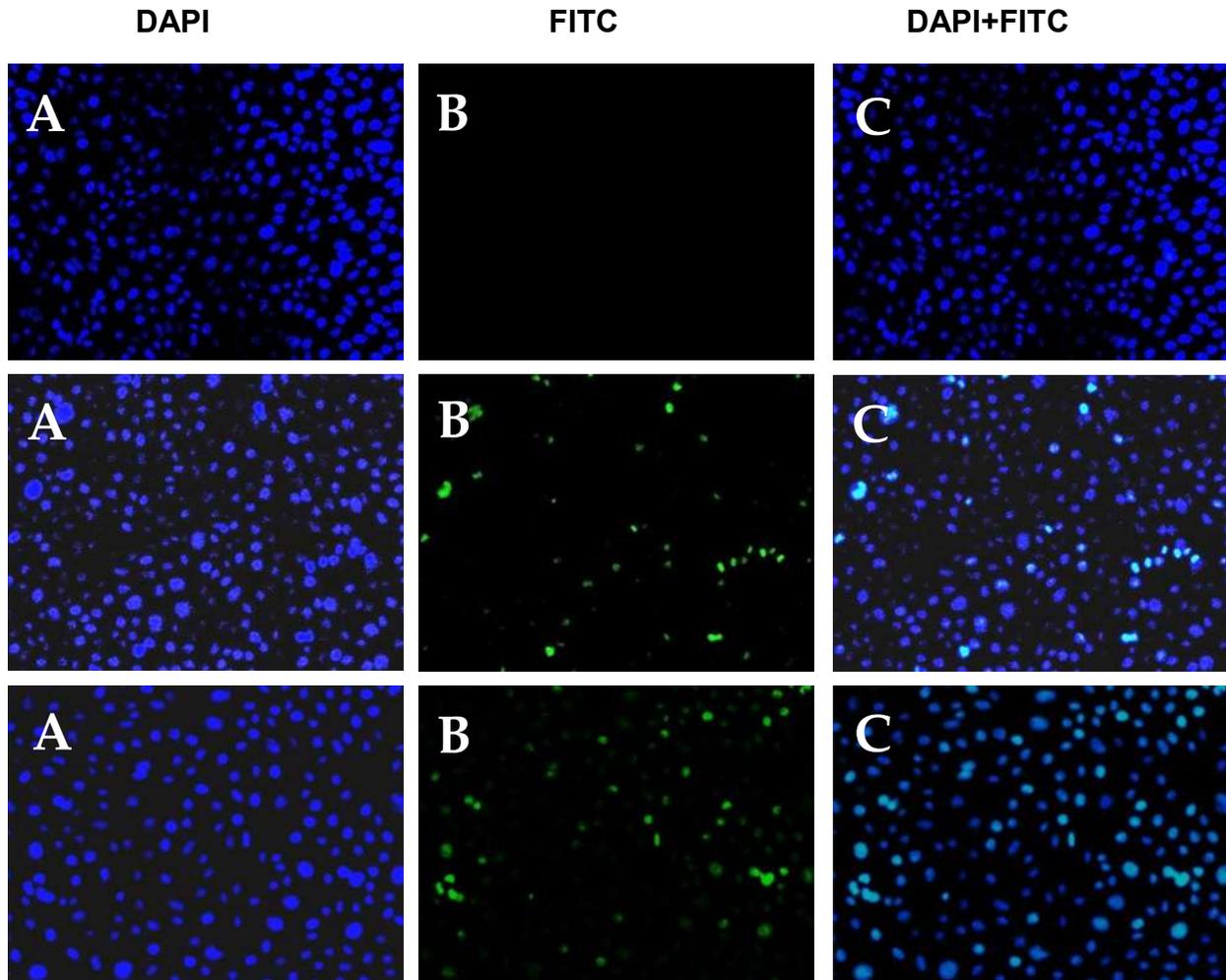


Figura 16.- Inmunofluorescencia de células CHO 3G Tet On, se empleó como primer anticuerpo el Ab anti-His hecho en ratón y como segundo anticuerpo el Ab anti-ratón unido a FITC. Panel superior, células control; panel intermedio células transfectadas con el plásmido pTRE-E2CN y panel inferior células transfectadas con el plásmido pTRE-E2NN. 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, imágenes A y B sobrepuestas, la señal verde coincide con el núcleo. Microscopio confocal Olympus, objetivo 10X y enfoque 4X.

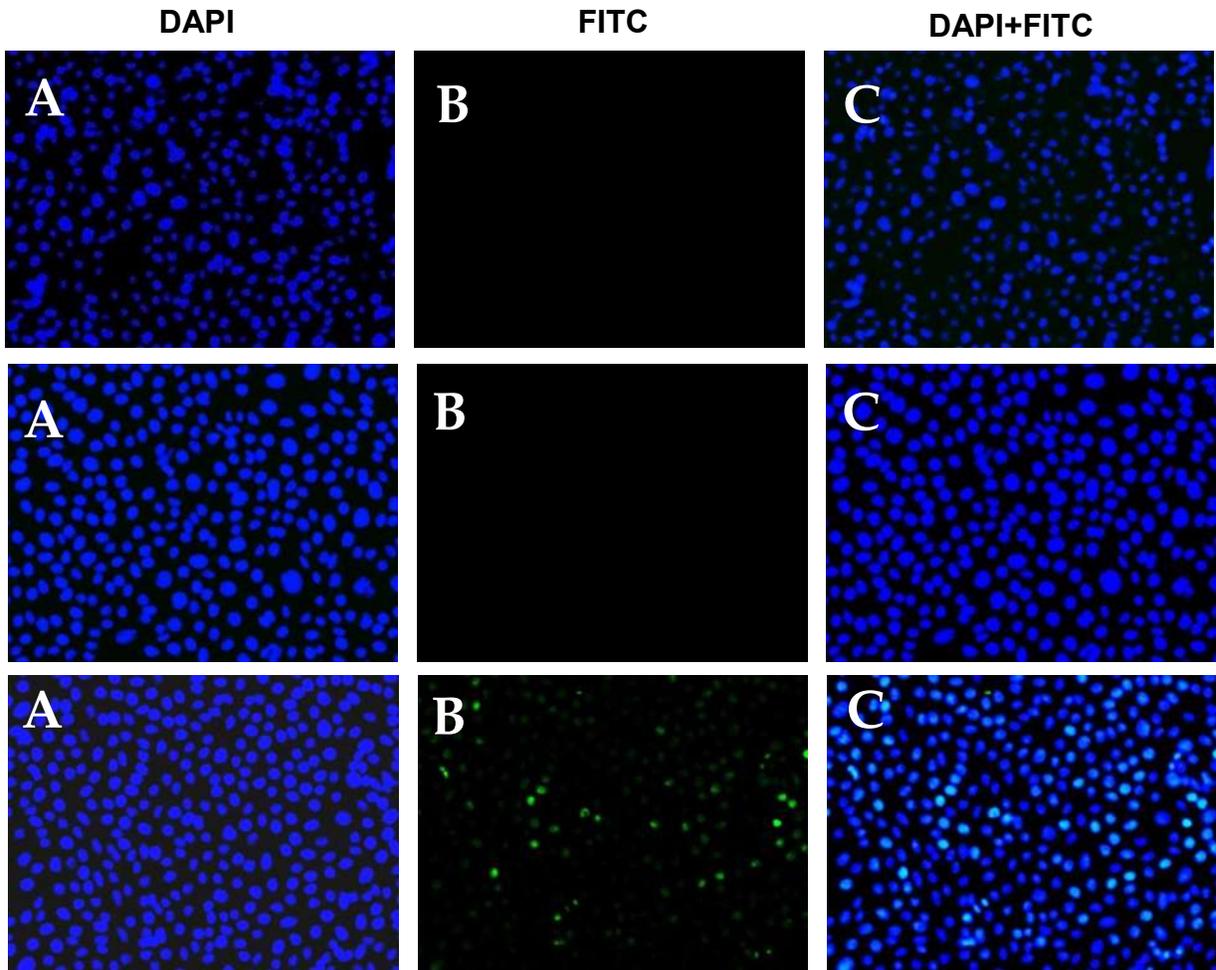


Figura 17.- Inmunofluorescencia de células CHO 3G Tet On, se empleó el anticuerpo Anti-PCV2 unido a FITC. El panel superior presenta las células control, el panel intermedio las transfectadas con el plásmido pTRE-E2CN y el panel inferior transfectadas con el plásmido pTRE-E2NN. A, células vistas con el canal para DAPI, los núcleos celulares teñidos de azul. B, canal FITC, las células positivas de color verde. C, imágenes A y B sobrepuestas, las marcas positivas coinciden con el núcleo celular. Microscopio confocal Olympus, objetivo 10X y enfoque 4X.

DISCUSIÓN

La proteína *cap*, también llamada E2 ha demostrado ser un antígeno importante para el desarrollo de vacunas contra PCV2 (Chen *et al.*, 2014). Previamente, en nuestro grupo de trabajo se clonaron en un plásmido de expresión (pTRE2Pur), dos secuencias que codifican para péptidos conservados de la proteína E2: el primero denominado E2CN que corresponde a la región carboxilo terminal, con una longitud de 438 pb y que codifica para un polipéptido de 146 aminoácidos; el segundo denominado E2NN que corresponde a la región amino terminal con una longitud de 528 pb y codifica para un polipéptido de 176 aminoácidos, ambos fusionados a un péptido de la proteína de nucleocápside N del virus que produce el Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV). El diseño de los plásmidos incluye la secuencia para selección con el antibiótico de resistencia de células eucariotas a puromicina y una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal para su identificación.

Se realizó el análisis de los plásmidos a través de cortes con enzimas de restricción de acuerdo al mapa de la construcción genética que contiene cada una de las secuencias codificantes. Se utilizaron las enzimas PvuII; EcoRI; y BamHI con EcoRV para caracterizar los plásmidos. El resultado de las tres digestiones mostró que sólo la que se efectuó con PvuII cortó los fragmentos esperados: Para el plásmido pTRE-E2CN un segmento de 290pb para el plásmido pTRE-E2NN un segmento de 340pb. No se obtuvieron los cortes con las enzimas EcoRI y BamHI con EcoRV esperados, esto posiblemente debido a que dichos sitios son susceptibles de metilación tal como lo reporta la literatura.

Como parte de la caracterización de las secuencias proteicas se analizó el peso molecular, según se ha reportado, las moléculas con pesos moleculares que van de varios miles a millones de daltons se llaman polipéptidos ó proteínas y aquellas con pesos moleculares bajos, se llaman péptidos. Las proteínas E2CN y E2NN presentan un PM de 17'091 y 20'988 Da, respectivamente, este dato incluye la secuencia que codifica para la proteína N del virus PRSSV y la etiqueta de histidinas (Jaimes,

2012). Se ha demostrado que moléculas de entre 10'000 y 100'000 Da, son eficaces para desencadenar la respuesta inmune (Torres, 2014).

El índice alifático (IA), define el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina y leucina), condición que se relaciona con una alta termoestabilidad (Jaimes, 2012; Torres, 2014). Los resultados muestran que las proteínas recombinantes E2CN y E2NN contienen bajas cantidades de estos aminoácidos lo que sugiere una termoestabilidad media o baja, teniendo un IA de 49.384 y 48.636 respectivamente. Este dato indica que será necesario mantener las proteínas sin cambios bruscos en la temperatura para evitar su degradación.

La carga neta de una proteína está determinada por la composición de sus aminoácidos, mismos que determinan el punto isoeléctrico (PI) (Jaimes, 2012). Según el análisis el PI de E2CN Y E2NN es alcalino, 9.33 y 11.72 respectivamente.

Las interacciones entre proteínas son una de las áreas de la bioquímica más difíciles de estudiar. Muchos investigadores se han dado a la tarea de investigar que parámetros determinan estas interacciones, los tipos de enlaces que se forman en las interfaces de dos proteínas que interactúan y las características de los residuos que se encuentran en ellas, así como el pH y la temperatura del medio. Uno de los parámetros más importantes que deben cumplirse dentro de las interacciones proteína- proteína es que las superficies que van a interactuar estén expuestas, es decir, que se encuentren localizadas en la superficie de la proteína. En estas regiones se pueden encontrar residuos hidrofílicos como serina, glutamina y lisina. Otros residuos involucrados en las interacciones proteína-proteína de tipo aromáticos como el triptófano y la fenilalanina (Torres, 2009). En contraparte, los residuos hidrofóbicos estarán más internos.

Empleando herramientas bioinformáticas de libre acceso, se realizó una búsqueda de regiones hidrofílicas de las proteínas E2CN y E2NN para determinar porciones que están expuestas y también se buscaron regiones antigénicas las cuales además están asociadas con interacciones antígeno-anticuerpo. Las regiones más hidrofílicas para E2CN corresponden a los residuos 36-40, 52-59, 67-75 y 82-90. Por otro lado,

los sitios de reconocimiento de linfocitos B fueron los residuos 10-14, 16-20, 24, 30-31, 33-37, 41-49, 59-62, 75-77 y 95-140.

Para la proteína E2NN, los residuos hidrofílicos fueron 49-53, 68-76, 108-111 y 122-129. Mientras que los sitios de reconocimiento de linfocitos B fueron 2-3, 6, 12-17, 60-67, 79-92, 109-119 y 130-170.

Los programas para la predicción de reconocimiento a linfocitos B, también llamados epítopos B se basan en propiedades físico-químicas de las proteínas y en el uso de redes neuronales. La predicción de epítopos B facilita el trabajo experimental en la búsqueda de candidatos vacunales (Amin *et al.*, 2013). Además los epítopos B proporcionan información sobre zonas antigénicas de utilidad en corto plazo para la síntesis de péptidos útiles en la producción de anticuerpos para realizar ensayos de inmunodetección y cuantificación de la proteína estudiada (Torres, 2014).

Se realizó un modelaje *in silico* de la estructura tridimensional de las proteínas recombinantes E2CN y E2NN. Se sabe que para la determinación experimental de la estructura tridimensional de una proteína es un proceso laborioso y complicado, que a veces, no se logra. Sin embargo, es una pieza de conocimiento esencial para entender la función de las proteínas. Es por esto que se han diseñado programas para la estimación de las estructuras en 3D con diferentes estrategias dependiendo de cada situación. Entre las estrategias disponibles, el modelado de la estructura de proteínas por homología es la de mayor éxito predictivo y es sencilla de aplicar, ya que existen servidores de internet que hacen este trabajo de modo automático. Las mejoras recientes de los métodos de modelado y validación de modelos estructurales de las proteínas, cada vez son más precisos y confiables (Rodríguez *et al.*, 2011).

La predicción de la estructura terciaria de las proteínas se obtuvo a partir de los alineamientos para detectar fragmentos homólogos, que fueron unidos empleando el programa Swiss Model, este servidor utiliza el modelaje por homología. Las proteínas E2CN y E2NN fueron comparadas con la proteína E2 de PCV2, encontrando el 98.98% y 97.78% de identidad. Según la conformación tridimensional se observan porciones expuestas en la estructura, que aparentemente coinciden con los resultados de epítopos afines a linfocitos B.

A través de inmunofluorescencia se identificaron las células transfectadas con los plásmidos pTRE-E2CN y pTRE-E2NN, que expresan las proteínas E2CN y E2NN respectivamente. Para esto se utilizaron dos estrategias diferentes anticuerpos, la primera empleando el anticuerpos que identifica la etiqueta de histidinas. De acuerdo a los resultados ambas proteínas se expresan en las células CHO. En la segunda se empleó el anticuerpo anti-PCV2 que corresponde a un anticuerpo policlonal. Según los resultados dicho anticuerpo detecto únicamente la expresión de la proteína E2NN. Esto sugiere que la proteína E2CN no contiene ningún epítoto que pueda ser identificado con dicho anticuerpo. Es decir, aparentemente la proteína E2NN en estas condiciones fue la más inmunoreactiva.

Las vacunas basadas en la utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos presentan una serie de ventajas adicionales a las compartidas con otras vacunas de subunidades; son fáciles de almacenar, transportar y distribuir, ya que se pueden conservar liofilizadas, sin necesidad de mantener una cadena de frío para su conservación (Barreto *et al.*, 2012). Se encuentran en proceso los análisis para determinar la cantidad y calidad de proteína que puede ser expresada en las clonas CHO-E2NN de manera estable. Dichas proteínas serán retadas *in vitro* para determinar si efectivamente son capaces de bloquear la entrada del virus silvestre a las células del hospedero.

CONCLUSIONES

- 1.-Se cuenta con un banco de 25 clonas CHO-E2NN criopreservadas cuya expresión será analizada en estudios posteriores.
- 2.-Se determinó que las características predichas de la proteína E2CN son: 146 aa de longitud, un peso molecular de 17.09 kD, un punto Isoeléctrico de 9.33 y un índice alifático de 49.38. Se encontraron 4 picos de hidrofiliidad y 9 de afinidad con linfocitos B, y se modelo la estructura tridimensional a una resolución de 2.35Å con un 98.98% de identidad.
- 3.-Las características de la proteína E2NN son: 176 aa de longitud, un peso molecular de 20.988kD, un punto isoeléctrico de 11.72 y un índice alifático de 48.636, y se predijó la estructura tridimensional a una resolución de 2.35 Å con un 97.78% de identidad.
- 4.-Se determinó que las células CHO expresan las proteínas E2CN y E2NN, y que pueden ser monitoreadas con anticuerpos específicos.
- 5.-Estas características sugieren que las proteínas E2CN y E2NN son potenciales candidatos vacunales contra el virus PCV2.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, S.D.; Ángeles, S.I.; Trujillo, R.M.A. y Valdez, C.N.A. 2012. Biología sintética: diseñando sistemas biológicos con piezas genéticas. *BioTecnología*. 16 (1):11-18
2. Agramonte, D.A.; Pajón, F.P. and Alexander, P.J. 2006. *In silico* prediction of escape mutants of the HIV-1 protease. Universidad de las Ciencias Informáticas, Ciudad Habana, Cuba. 1-10
3. Agredo, S. M. R. 2006. Aislamiento y caracterización inicial de proteínas nucleares que reconocen elementos discretos en el promotor del gen *Cs-mnp2B* de *Ceriporiopsis subvermispora*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas Y Farmacéuticas. Chile.
4. Amin, N.; Reyes, F.; Calero, R.; Camacho, F. y Acosta A. 2013. Predicción de epítomos T y B de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3. *VacciMonitor*. 22(3):14-21
5. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201
6. Barreto L.V.; Barreto, G.E.; Morales, L.; Acevedo, O.E. y González, S.J. 2012. Proteína LIC10494 de *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*: modelo estructural y regiones funcionales asociadas. *Universitas Scientiarum*. 17(1): 16-27.
7. Boisséson, C.; Béven, V.; Bigarré, L.; Thiéry, R.; Rose, N.; Eveno, E.; Madec, F. and Jestin, A. 2004. Molecular Characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology*. Francia. 85: 293–304
8. Bucarey, S.A.; Pujol, M.; Poblete, J.; Nuñez, I.; Tapia, C.V.; Neira, A.; Martinez, J. and Bassa, O. 2014. Chitosan microparticles loaded with yeast-derived PCV2 virus-like particles elicit antigen-specific cellular

- immune response in mice after oral administration. *Virology Journal*. 20; (11):149.
9. Bustos, G. J. R. I. 2009. Aumento en la transfección genética de la línea celular PC-12 mediada por fármacos que aumentan la fusión celular e inhiben la función lisosomal (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México.
 10. Carvajal, V.M.A. 2012. Enfermedad asociada al circovirus porcino. *Porcicultura.com*.
 11. Cavagnari, B.M. 2010. Transgenic animals generation. Regulation of gene expression. *Archive Argentin Pediatrics*. 108 (5):438-444.
 12. Chen, F.; Yang, X.; Pang, D.; Peng, Z.; Dong, M.; Liu, X.; Ouyang, H. and Ren, L. 2014. Expression, purification and antibody preparation using different constructs of PCV2 capsid protein. *International Journal of Biological Macromolecules*. 67: 289–294
 13. Coll, M. T. 2010. Eficacia de la vacunación frente a Circovirus Porcino Tipo 2. ¿Nos debe preocupar la inmunidad materna? *Servicio Técnico Porcino Boehringer Ingelheim España*. 1-7
 14. Crisci, E., Bárcena, J., Montoya, M., 2012. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148, 211-225.
 15. Farreres J. y Puig, D. 2008. Seguridad y eficacia de la vacunación combinada frente a Circovirus Porcino Tipo 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Cooperativa de Bellcaire, Lleida*. 1-5
 16. Fenau, M.; Opriessnig, T.; Halbur, P. G. and Meng X. J. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) and Nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *Journal of Virology*. 77 (20): 11232–11243
 17. Fenau (a), M.; Opriessnig, T.; Halbur, P.G.; Elvinger, F. and Meng, X.J. 2004. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic

- backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 78 (12): 6297–6303.
18. Fenaux (b), M; Opriessnig T.; Halbur, P. G.; Elvinger, F. and Meng X. J. 2004. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *Journal of Virology*. 78 (24): 13440–13446
 19. Fenaux (c), M.; Opriessnig, T.; Halbur, P.G.; Xu, Y.; Potts, B. and Meng, X.J. 2004. Detection and *in vitro* and *in vivo* characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. *Journal of Virology*. 85: 3377–3382
 20. Ferrari, L.; Borghetti, P.; Angelis, E. and Martelli, P. 2014. Memory T cell proliferative responses and IFN- γ productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Veterinary Research*. 45:44
 21. Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Racaniello, V.R. and Skalka A. M. 2004. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. (2° edición). Ed. ASM PRESS. Washinton D.C., USA. p. 18-23
 22. Gao, Z.; Dong, Q.; Jiang, Y.; Opriessnig, T.; Wang, J.; Quan, Y. and Yang, Z. 2014. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs *in vitro*. *Virus Research*. 183:56-62.
 23. Guevara, H.E.; López, Z.A.A.; Jiménez, G.L.R. and Sótelo, M.R.R. 2013. Current perspectives on the use of recombinant proteins and their importance in scientific and industrial research. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. (3): 8-17
 24. Guerrero, O.M.; Cab, B.F.; Galán, W.L.J. and Viader, S.J.M. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México. 16-19 de Noviembre del 2004. 418-440

25. Guo, L.J.; Lu, Y.H.; Wei, Y.W.; Huang, L.P. and Liu, Ch.M. 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal*. 7:273
26. Guillermo, C. J. L. y Torres, L. M. A. 2009. Epidemiología del circovirus porcino tipo 2. *Bioagrocencias*. 2 (2):4-13.
27. Halami, M.Y.; Freick, M.; Shehata, A.A.; Müller, H. and Vahlenkamp, T.W. 2014. Susceptibility of calves to porcine circovirus-2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*. 173(1-2):125-31.
28. Hamel, A.L.; Lin, L.L.; Sachvie, C.; Grudeski, E. and Nayar, G.P. 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Canadian Journal Veterinary Research*. 64(1):44-52.
29. Hernández, J. Actualización sobre circovirus porcino tipo 2 (PCV2). 2011. *Revista Porcicultura Iberoamericana*. 1:5
30. Hooda, V. 2011. Physicochemical, Functional and structural characterization of wheat germin using *in silico* methods. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 3(1): 35-41.
31. Jaimes M.M. 2012. Predicción *in-silico* de la estructura y función de la proteína hipotética p284 de *Trypanosoma cruzi* (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carrera de Biología. Bogota..
32. Karuppanan, A.K.; Ramesh, A.; Reddy, Y.K.; Ramesh, S.; Mahaprabhu, R.; Jaisree, S.; Roy, P.; Sridhar, R.; Pazhanivel, N.; Sakthivelan, S.M.; Sreekumar, C.; Murugan, M.; Jaishankar, S.; Gopi, H.; Purushothaman, V.; Kumanan, K. and Babu M. 2014. Emergence of porcine circovirus 2 associated reproductive failure in Southern india. PubMed.
33. Khayat, R.; Brunn, N.; Speir, J.A; Hardham, J.M. and Ankenbauer, R.G. 2011. Angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology*. 85 (15): 7856–7862.
34. Krakowka, S.; Ellis, J.; Mcneilly, F.; Meehan, B.; Oglesbee, M.; Alldinger, S. And G. Allan. 2004. Features of Cell Degeneration and Death in Hepatic

- Failure and Systemic Lymphoid Depletion Characteristic of Porcine Circovirus-2-associated Postweaning Multisystemic Wasting Disease. *Veterinary Pathology*. 41:471–481.
35. Lázaro L. E. y Escarmís H. C. 2002. Virus emergentes: la amenaza oculta. Ed. Equipo Sirius. Madrid, España. p. 144
36. Larochelle, R.; D'allaire, S. and Magar, R. 2003. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Quebec. *Virus Res*, 96, 3-14.
37. Lee, D.; Han D.; Song, J.Y.; Lee, Y.S.; Kang, K.S. and Yoon, S. 2010. Genomic expression profiling in lymphnodes with lymphoid depletion from porcine circovirus 2-infected pigs. 2010. *Journal of General Virology*. 91: 2585–2591.
38. Li, B.; Fang, L.; Guo, X.; Gao, J.; Song, T.; Bi, J.; He, K.; Chen, H. and Xiao, S. 2011. Epidemiology and evolutionary characteristics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2006 and 2010. *Clinical Microbiology*. 49: 3175-83.
39. Li, J.; Xu, Sh.; Yuan, X.; Wang, G.; Shi, J.; Wu, J.; Cong, X.; Sun, W.; Du, Y. and Wang, J. 2012. Complete genome sequence of recombinant porcine circovirus type 2 strain sd-3. *Journal Virology*. 86(24):13870
40. Lin, H.X.; Ma, Z.; Yang, X.Q.; Fan, H.J. and Lu, C.P. 2014. A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) co-infection. *Veterinary Microbiology*. 171(1-2):198-205.
41. Lodish; Berk; Matsudaira; Kaiser; Krieger; Scott; Zipursky and Darnell. 2004. Molecular cell biology. (5ta Edición). Ed. Freeman. New York, EUA. P. 191-204.
42. Lodish; Berk; Zipursky; Matsudaira; Baltimore and Darnell. 2003. Molecular cell biology. (4ta Edición). Ed. Freeman. New York, EUA. p. 6, 137-142.

43. Madison, D.M. and Opriessnig, T. 2011 Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Animal Health Research Revision*. 12: 47-65.
44. Mankertz, A. 2012. Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. *Virus Research*. 164 (1-2): 54-60.
45. McKeown, N. E.; Opriessnig, T.; Thomas, P.; Guenette, D. K.; Elvinger, F.; Fenaux, M.; Halbur, P. G. and Meng, X. J. 2005. Effects of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Maternal Antibodies on Experimental Infection of Piglets with PCV2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12 (11): 1347–1351.
46. Mueller, P.P.; Wirth, D.; Unsinger, J. and Hauser, H. 2003. Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial, and Plant Cells. Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA. p. 536
47. Muñoz, F.I. 2005. Introducción de la tecnología de transferencia génica en lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad De Valencia. Valencia. España.
48. Navarro, P. J.; Sandoval, R. A. S y Armendáriz, B. J. 2008. Biología molecular en medicina. *Mensaje Bioquímico*. 32: (163-174).
49. Noriega, J.; Reyes, P. y Bucarey, S. 2007. Circovirus Porcino: Un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22: 62-71.
50. Nuñez, A.R.E.; Valdez, A.J.J.; Bravo, P.A. y Cajero, J.M. 2012. Diseño y caracterización de inmunógenos contra virus patógenos de porcinos. XXXIII encuentro de investigación veterinaria y producción animal. Morelia Mich. México. p.299-306.
51. Olvera, A.; Cortey, M. and Segalés, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 357: 175–185
52. Opriessnig, T.; McKeown, N. E.; Zhou, E. M.; Meng X. J. and Halbur P. G. 2006. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions

- provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 87: 2923–2932
53. Palomares, L.A.; Valdez, C.N.A. y Ramírez, O.T. 2007. Superando los retos del cultivo de células animales a través de la bioingeniería. *Biotecnología*. 14: 385-398
54. Paniagua, R.; Nisal, M.; Sesma, P.; Álvarez, M; Fraile, B.; Anadón, R.; Sáez, F. y Pazo de Miguel M. Biología Celular. Ed. Interamericana. Madrid, España. 2003. p. 15-18
55. Poutou, P.R.A.; Martínez, E.A. y Frontela, M.C. 1994. Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada*. 11(1): 51-62
56. Prats, G. 2006. Microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 366 pp.
57. Quereda, T.J.J. 2009. Expresión Génica de las interleucinas 4,5 y 13 en el cerdo tras la vacunación frente a Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2). Departamento de producción animal, Universidad de Murcia. 49-58.
58. Ramírez, R.R.Y. 2014. Bioinformática aplicada a la obtención de una vacuna contra la malaria. Editorial académica española. 65.
59. Ramírez, M.; Martínez, C.; Mercado, C.; Castillo, J.; Hernández, J. and Segalés, J. 2007. Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from Mexico City. *Research in Veterinary Science* 83: 130–132.
60. Remujo, 2005. Circovirosis Porcina: Síndrome Multisistémico de Desmedro Postdestete (SMDP). 1-8.
61. Rincón, M.M.A.; Ramírez, N.G.C.; Vera, V.J.; Correa, J.J. and Mogollón, G.J.D. 2014. Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with porcine circovirus associated diseases in Colombia. *Virology Journal*. 11(1):143
62. Riveros, B.N. 2009. Eficacia de una vacuna autógena de circovirosis porcina (PCV2) en una granja porcina en Venezuela (Tesis de

- licenciatura). Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias Programa de Medicina Veterinaria. Bogotá D.C., Colombia.
63. Roca, M.; Balasch, M.; Segalés, J.; Calsamiglia, M.; Viaplana, E.; Urniza, A.; Hattermann, K.; Mankertz, A.; Plana D. J. and Domingo, M. 2004. In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. *Journal of General Virology*. 85: 1259–1266
64. Rodríguez, G.I.M. y Díaz, I. 2012. Inmunología y vacunas frente al PRRSV y al PCV2. CReSA. 1-4
65. Rodríguez MA. 2009. Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum* (Tesis de doctorado). Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Cáceres, España.
66. Rodríguez, S.R.; Gaytán, M.S.A.; Hernández, D.E.E. y Valencia, T.L.G. 2011. Estructuras tridimensionales *in silico*, a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿cómo saber que el modelo es realista? *Mensaje Bioquímica*. 35:14
67. Rose, N.; Opriessnig, T.; Grasland, B. and Jestin, A. 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Reserch*. 164: 78-89.
68. Segalés, J.; Casamiglia, M. y Domingo, M. 2006. Epidemiología de la infección por Circovirus Porcino tipo 2. *Porcicultura.com*. 1- 4
69. Segalés, J. 2007. Circovirosis porcina. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 1-26
70. Segalés, J. 2011a. Los anticuerpos maternos en el momento de la vacunación contra pcv2: ¿Importan? Barcelona, España. 2
71. Segalés, J. 2011b. La importancia de la infección subclínica por circovirus porcino tipo 2 (PCV2). CreSA, España.. www.produccion-animal.com.ar
72. Segalés, J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Veterinary Microbiology*. 164:10-19.

73. Segalés, J; Kekarainen T and Cortey M. 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Veterinary Microbiology*. 165: 13–20
74. Sguazza, G.H. 2003. Producción de Vacunas de 2º Generación a partir de Proteínas Recombinantes. Cátedra De Virología. Facultad De Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1-5
75. Shin, M.K.; Yoon, S.H.; Kim, M.H.; Lyoo, Y.S.; Suh, S.W. and Yoo, H.S. 2014. Assessing PCV2 antibodies in field pigs vaccinated with different porcine circovirus 2 vaccines using two commercial ELISA systems. *Journal Veterinary Science*.
76. Shors, T. 2009. Understanding viruses. Ed. Jones and Bartlett Publishers. Madrid, España. p. 10-16
77. Shors, T. 2013. Understanding viruses. (2º edición). Ed. Jones and Bartlett Publishers. Madrid, España. p. 2-6
78. Silva, J.G.; Coimbra, E.C; Jesús, A.L.; Mariz, F.C.; Silva, K.M.; Lobato, Z.I.; Campos, A.C.; Coutinho, L.C.; Castro, R.S. and Freitas, A.C. 2014. Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Journal Virology Methods*. 58(7):398-408.
79. Solis, C.C. 2005. Modelaje de Proteínas de Mycobacterium tuberculosis relacionadas a su defensa frente al estrés oxidativo. *Ciencia e investigación*. 8 (1): 33-39
80. Sylla, S.; Cong, Y. L.; Sun, Y. X.; Yang, G. L.; Ding, X. M.; Yang, Z. Q. y Ding, Z. 2014. Protective immunity conferred by porcine circovirus 2 ORF2-based DNA vaccine in mice. *Microbiology and immunology*, 58(7), 398-408.
81. Tavira, M.C.A.; Ortega, G.A; Dávila, G.I.; Estrada, M.S. y Meneses, A.A. 2009. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40 (4): 35-46.
82. Thacker, B. 2010. Entendiendo la patogenia de PCV2. *MSD Salud animal*. 1-4.

83. Torres, C.E. y Hernández, F. J. 2014. Caracterización *in silico* de las proteínas del choque térmico Hsp70 y Hsp90 de Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) y su posible actividad adaptativa. Revista Mutis 4(1): 40-50.
84. Torres, F.J.M. 2009. Diseño de un péptido sintético capaz de bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México, D.F.
85. Tribble, B.R. and Rowland, R.R.R. 2011. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. Virus Research. 10:1016.
86. Venzano, A.J.; Bratanich, A; Maislin, R.; Funes, D.V. y Ruiz, ML. 2004. Hallazgos Clínico anatomopatológicos en cerdos positivos mediante la técnica de PCR a Circovirus tipo 2 IV Reunión Argentina de Patología Veterinaria. La Plata. 1-6.
87. Villa, M.A.; Huerta, C.R.; Córdova, I.A.; Ortega, V.S. y Trejo, C.A. 2013. Efecto de la vacunación de cerdas y lechones contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad en México. Archivos de Medicina Veterinaria. 45: 145-149.
88. Walia, R.; Dardari, R.; Chaiyakul, M. and Czub, M. 2013. Porcine circovirus-2 capsid protein induces cell death in PK15 cells. Virus Research. 173(2):270-9.
89. Yero, C.D. 2006. De la secuencia de un genoma bacteriano a la identificación de candidatos vacunales. Vacci Monitor. 15 (1):1-7
90. Zhang, M.; Xie, Z.; Xie, L.; Deng, X.; Xie, Z.; Luo, S; Huang, L.; Huang, J. and Zeng, T. 2014. Two subgroups of porcine circovirus 2 appearing among pigs in southern China. Genome. 2(5):1-2.