



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
“PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS DE GALLINA ANTI-PROTEÍNA GP5 USANDO
PÉPTIDOS SINTÉTICOS Y BIBLIOTECAS DE CDNA DE LOS ANTICUERPOS (SCFV)”

TESIS QUE PRESENTA
Q.F.B. ALONDRA YAZMIN CASTRO ARRIAGA

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESOR:

D.C. MARCO CAJERO JUAREZ

CO-ASESOR

D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

Morelia, Michoacán a junio del 2023

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la tutoría del Dr. Marco Cajero Juárez y la co-tutoría por parte de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por las facilidades en las instalaciones y materiales para la realización de este trabajo.

Agradecimiento al apoyo por parte de CONACYT por el apoyo que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2020-2022 con No. 761931 de becario y número de CVU 1048597.

AGRADECIMIENTOS PARTICULARES

Al centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional.

A mi asesor de tesis, Dr. Marcos Cajero Juárez, a quien agradezco inmensamente por todo su apoyo y enseñanzas durante estos 5 años. Porque sin él, nada de esto hubiera sido posible, agradezco toda su confianza, paciencia, por sobre todo sus ganas de enseñarme y consejos. Gracias a su orientación durante mi formación académica logre llegar hasta aquí.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Alejandro Bravo, Dr. Javier Oviedo y Dra. Yunuen Quintero. Por sus aportaciones y seguimiento de este proyecto. Especiales agradecimientos a la Dra. Rosa Elvira Nuñez por sus consejos y aportaciones para el desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Víctor Baizabal, cuyos consejos siempre me ayudaron y motivaron a no darme por vencida.

A mis amigos y compañeros del CMEB, particularmente a Marco Romero e Isaías Gaytan por el apoyo y la amistad formada en este trayecto.

A todas aquellas personas que pasaron por el CMEB y que tuve la oportunidad de conocer y convivir durante su estadía por estas instalaciones.

A mis amigos, Lizbeth, Adriana, Anel, Alberto, y Carolina con quienes compartí largos días de trabajo.

A mi esposo Miguel Angel, por estar conmigo brindándome todo su apoyo en todo momento y alentándome en aquellos momentos en que sentí que no podría lograrlo.

A mi familia en especial a mis Padres que me han motivado y alentado durante toda mi formación académica.

Índice

Índice 4

Índice de figuras	6
Índice de tablas.....	7
Listado de abreviaturas.....	8
Resumen	10
1. Introducción	11
2. Marco teórico.....	12
2.1. Porcicultura.	12
2.2 Generalidades del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV).....	12
2.2.1. Antecedentes Históricos.....	12
2.2.2. Epidemiología	13
2.2.3. Impacto Económico provocado por el PRRSV	14
2.2.4. Agente etiológico	15
2.2.5. Proteína GP5.....	16
2.2.6. Cuadro Clínico de PRRS.	17
2.2.7. Trasmisión.	17
2.2.8. Replicación del virus.....	18
2.2.9. Variabilidad genética.....	19
2.2.10. Vacunas para PRRSV.....	20
2.3 Virus.	21
2.4 Genomas y clasificación viral.	21
2.5. Generalidades producción de Anticuerpos anti-PRRSV	22
2.5.1. Estructura general de los anticuerpos	22
2.5.2. Estructura molecular de la IgY	23
2.5.3. Anticuerpos monoclonales	24
2.5.4. Epítopes.....	24
2.5.5. Aplicaciones de tecnología de las inmunoglobulinas (IgY) de gallina.....	25
2.5.6. Ventajas del empleo de la IgY	25
2.5.7. IgY como método de diagnóstico	26
2.5.8. Abs disponibles para PRRSV	26
2.5.9. Tecnología de ADN recombinante	27
3. Justificación	27
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivo general.....	27
5.1. Objetivos específicos	28
6. Materiales y métodos	28

6.1. Material biológico	28
7. METODOLOGÍA.....	30
7.1. Diagrama de Flujo de la estrategia metodológica	30
7.2. Análisis Bioinformático de péptidos	30
7.3. Preparación de antígenos e inmunización animal.....	31
7.4. Unión covalente de péptidos mediante glutaraldehído.....	31
7.5. Inmunización	31
7.5.1. Esquema de inmunizaciones	32
7.6. Aislamiento de IgYs de gallina	32
7.7. Cuantificación de Proteína Total.....	33
7.8. Determinación de IgY's totales por ELISA.....	34
7.9. ELISA indirecta para la identificación de IgYs anti-GP5 h y selección de candidatos para producción de biblioteca de cDNA.	34
7.10. ELISA indirecta para la identificación de PRRSVV con IgYs obtenidas.....	34
7.11. ELISA indirecta para la identificación de PRRS silvestre.....	35
7.12. Ligación de Vector.....	35
7.13. Obtención de DNA genómico (Gene Clean)	35
8. RESULTADOS y DISCUSIÓN.	36
8.1. Concentración Abs obtenidos en yema y suero.	36
8.2. Identificación de integridad de IgYs.	37
8.3. Determinación de título de IgYs totales en yema y suero.....	38
8.4. Producción de anticuerpos	39
8.5. Evaluación de Abs monoclonales y policlona para reconocimiento a PRRSVv.	40
8.6. Reconocimiento del virus silvestre (nacional) por Abs monoclonales y policlona IgY.....	41
8.7. Producción de bibliotecas de cDNA.	43
8.8. Amplificación de cadena ligera scFV por PCR.....	44
8.9. Amplificación de cadena pesada scFV por PCR.....	44
8.10. PCR de fusión de cadena ligera y pesada scFV.....	46
8.11. Digestión del plásmido por restricción de enzimas.	48
8.12. Transformación bacterias E. coli 2738.	49
9. CONCLUSIONES	49
10. BIBLIOGRAFÍA.	50

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la distribución de PRRS en el mundo.....	14
Figura 2. Esquema de estructura viral y del genoma y ORF's de PRRSV.....	15
Figura 3. Proteína GP5 de PRRSV.	17
Figura 4. Replicación de PRRSV.	19
Figura 5. Clasificación viral de Baltimore	22
Figura 6. Estructura de una molécula de IgY.....	23
Figura 7. Diferencias y similitudes en estructura de IgY e IgE.	24
Figura 8. Diagrama de Flujo de la estrategia metodológica.	30
Figura 9. Grafica de Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteína IgY total utilizando el método Bradford.	33
Figura 10. Fotografía de Electroforesis IgY en gel de acrilamida 12.5%.....	38
Figura 11. Fotografía de electroforesis de RNA de gallina en gel de acrilamida 0.8 %. Carril	43
Figura 12. Fotografía de PCR de cadena ligera y pesada IgY en gel de agarosa al 1.5%	46
Figura 13. fotografía de gel de agarosa al 1.5% de fusión por PCR de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos de gallina.....	47
Figura 14. Fotografía de electroforesis de la digestión enzimática del vector pCom3X.....	49
Figura 15. fotografía de placas agar LB tetraciclina sembradas con bacteria trasformada con vector pCom3X.	49

Índice de tablas

Tabla 1. Abs anti-PRRSV disponibles para diagnóstico e investigación (Enjuares, 2001; Thermo Fisher, 2017).	26
Tabla 2. secuencia y características de los péptidos sintéticos de la proteína GP5 del PRRSV.	28
Tabla 4. Esquema de inmunización.....	32
Tabla 5. Concentración de IgY a partir de yema de huevo y suero determinada por espectrofotometría en el lector de placas iMark TMf6 Microplate Reader	36
Tabla 6. \bar{x} de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría. Control negativo (IgG)	39
Tabla 7. Evaluación de obtención de título de IgY de gallina en el día 0, 15 y 30. Pre- inmune (Control negativo).	40
Tabla 8. Evaluación de reconocimiento por parte de IgY de gallina a el virus vacunal. Control negativo (Pre- inmune).....	41
Tabla 9. Evaluación de reconocimiento a muestras de suero de cerdos enfermos por parte de Pre- inmune (Control negativo). (+):se logró detectar al virus silvestre nacional; (-): no se logró detectar al virus silvestre nacional.....	42
Tabla 10. Programa para PCR cadena ligera en termociclador.....	44
Tabla 11. Secuencia del par de oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena ligera scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.	44
Tabla 12. Programa para PCR cadena pesada en termociclador.....	45
Tabla 13. Secuencia de los 2 oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena pesada scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.	45
Tabla 14. Programa de temperaturas para el termociclador para fusión de cadenas.....	46
Tabla 15. Secuencia de los 2 oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena pesada scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.	47

Listado de abreviaturas

Abs	Anticuerpos
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Cdna	ADN Complementario
PRRSV	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino
HP-PRSRV	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino de alta patogenicidad
ScFV	Fragmento de cadena variable.
ORF	Marco de lectura abierta
GP5	Proteína estructural presente en la envoltura del PRRSV
KDa	Kilodalton
Ag	Antígeno
µg	Microgramos
µl	Microlitros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBST	Solución salina tamponada con fosfato Tween
T.A.	Temperatura ambiente
DNTs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
mM	Mili molar
pb	Pares de bases
b	Bases
Kb	Kilo bases
\bar{x}	Media
BSA	Albúmina de Suero Bovino

HRP	Peroxidasa de rábano picante
CD	Depende del complemento Ab
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
Fc	Fracción cristalizante
Fab	Fragmento de unión al antígeno
N	Proteína de nucleocápside (N)
Nsp	Proteínas no estructurales
UTR's	regiones no traducibles
Tn	Tonelada

Resumen

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), es una enfermedad causada por el virus PRRSV, este virus pertenece a la familia *arteriviridae*, con genoma de mRNA (+) monocatenario de aproximadamente 15 kb. Este virus codifica cinco glicoproteínas estructurales asociadas a la membrana viral (GP2, GP3, GP4, GP5 y GP5a). La glicoproteína GP5 del PRRSV participa en el reconocimiento del virus y la célula blanco. Actualmente se han descrito tres genotipos: el europeo, el americano y el de alta patogenicidad. El PRRSV afecta de manera negativa la industria porcina, ocasionando pérdidas millonarias en cada episodio infeccioso. Datos en la literatura indican que GP5 posee epítopes que inducen anticuerpos (Abs) neutralizantes, que pueden ser usados para diagnóstico. Para producir anticuerpos, anti proteína GP5, se adquirieron tres péptidos sintéticos derivados de la proteína GP5 (denominados GP51, GP52 y GP53). Dichos péptidos fueron inoculados de manera independiente en gallinas. Por otro lado, un segundo grupo de gallinas fueron inmunizadas con el virus vacuna (PRRSV_v). A partir de la yema de huevo, se obtuvieron las IgY's (inmunoglobulinas Y) de gallina a los 0, 15, 30 y 45 días pos-inmunización. Se llevó a cabo una prueba de ELISA indirecta usando un anti-IgY de gallina. Resultados: los péptidos GP51, GP52 y el PRRSV_v, indujeron IgY's específicas con un título máximo de 1:2000. Conclusión: los IgY's de gallina obtenidos después de la inmunización con péptidos GP51, GP52 y GP53, reconocieron a los antígenos específicos, más aún reconocieron al PRRSV_v y al virus PRRS silvestre de Michoacán. Con las IgY's anti-PRRSV obtenidas en este trabajo, se puede implementar el inmuno-diagnóstico (ELISA y Western blot) del PRRSV. Para lograr conservar todo el material biológico obtenido se realizó la técnica de phage display donde a partir del RNA total del bazo de las gallinas inmunes; se obtuvieron las secuencias genéticas de los scFV (anti-GP5 y anti-PRRSV_v), usando PCR, amplificando la cadena ligera de 350 pb, la cadena pesada de 400 pb y realizando la fusión de las mismas de 750 pb, una vez obtenidas pueden ser clonadas en el vector pCOMB3X para obtener una biblioteca de bacteriofagos recombinantes (tecnología de Phage-Display). Con estos bacteriófagos recombinantes nos permite conservar, obtener y purificar los scFV anti-PRRSV en gran concentración para determinar su afinidad. Esta metodología de IgY's de gallina y Phage-Display pueden ayudar en epidemias y/o pandemias de diferentes virus de humanos.

Palabras clave: PRRSV, anticuerpo, péptidos y Phage-Display

ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a disease caused by the PRRSV virus, this virus belongs to the arteriviridae family, with a single-stranded (+) mRNA genome of approximately 15 kb. This virus encodes five structural glycoproteins associated with the viral membrane (GP2, GP3, GP4, GP5 and GP5a). The PRRSV glycoprotein GP5 participates in the recognition of the virus and the target cell. Currently, three genotypes have been described: the European, the American and the highly pathogenic. PRRSV negatively affects the swine industry, causing millions in losses in each infectious episode. Data in the literature indicate that GP5 possesses epitopes that induce neutralizing antibodies (Abs), which can be used for diagnosis. To produce antibodies, anti-GP5 protein, three synthetic peptides derived from the GP5 protein (named GP51, GP52 and GP53) were purchased. Said peptides were inoculated independently in chickens. On the other hand, a second group of hens were immunized with the vaccine virus (PRRSVv). Chicken IgYs (immunoglobulins Y) were obtained from the egg yolk at 0, 15, 30 and 45 days post-immunization. An indirect ELISA test was carried out using a chicken anti-IgY. Results: the GP51, GP52 and PRRSVv peptides induced specific IgY's with a maximum titer of 1:2000. Conclusion: the chicken IgYs obtained after immunization with GP51, GP52 and GP53 peptides recognized the specific antigens, and even more so recognized PRRSVv and the wild type PRRS virus from Michoacán. With the anti-PRRSV IgYs obtained in this work, the immunodiagnosis (ELISA and Western blot) of PRRSV can be implemented. In order to preserve all the biological material obtained, the phage display technique was performed, where from the total RNA of the spleen of the immune hens; The genetic sequences of the scFVs (anti-GP5 and anti-PRRSVv) were obtained using PCR, amplifying the 350 bp light chain, the 400 bp past chain and fusing the 750 bp chain, once obtained they can be obtained. be cloned in the pCOMB3X vector to obtain a recombinant bacteriophage library (Phage-Display technology). Using these recombinant bacteriophages allows us to preserve, obtain and purify anti-PRRSV scFVs in high concentration to determine their affinity. This methodology of chicken IgY's and Page-Display can help in epidemics and/or pandemics of different human viruses.

Keywords: PRRSV, antibody, peptides and Phage-Display.

1. Introducción

El Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), es una enfermedad infecciosa de origen vírico y considerado en la actualidad como uno de los problemas más importantes de la porcicultura mundial. Las manifestaciones clínicas están relacionadas principalmente con trastornos reproductivos, causando aborto en cerdas gestantes, aumentando la mortalidad y problemas respiratorios en cerdos de todas las edades (lechones, recría y cebo), afectando de manera significativa la ganancia de peso (López-Heydeck *et al.*, 2015).

PRRSV es el virus más común asociado a el complejo de enfermedades respiratorias porcinas, donde la infección puede coexistir en presencia de otros tipos de patógenos, lo que resulta en síntomas clínicos y lesiones pulmonares más graves que por cualquiera de los patógenos de forma individual. Entre los miembros patógenos del complejo respiratorio porcino están: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, circovirus porcino, virus de influenza porcina y *Haemophilus parasuis* (Lunney *et al.* 2016).

Entre las características más importantes de esta enfermedad destaca su alta capacidad de infección y transmisión. En 1987 un síndrome hasta entonces desconocido, causó pérdidas productivas importantes en las explotaciones porcinas de los Estados Unidos. En los años siguientes este síndrome se extendió por las regiones de producción porcina más importantes de Norteamérica y Canadá. En Europa, una epidemia de las mismas características, durante el invierno de 1990/91 afectó a más de un millón de cerdos. Posteriormente se extendió por todo el mundo, convirtiéndose en una enfermedad endémica en la mayoría de los países con producción industrializada de ganado porcino. En 1991 una Comisión de Expertos sugiere como denominación más idónea, "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome", que ha sido adoptada internacionalmente (Palma & Real Ulloa, O. D. (2009).

En México, en 2017, SAGARPA publicó las principales demandas del sector agropecuario, una de ellas involucra la investigación y desarrollo de biológicos para la prevención y tratamiento de PRRSV. Es importante destacar que Michoacán es uno de los estados más importantes en la producción y el consumo porcícola, ocupando el séptimo lugar a nivel nacional (Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario, 2018).

A nivel mundial existe preocupación por la presencia de nuevas cepas del virus PRRSV, algunas de ellas denominadas de alta patogenicidad. Las vacunas actuales contra estas enfermedades como el PRRS no brindan una inmunidad potente y a largo plazo. Actualmente no se tiene identificado que cepas son las que afectan principalmente al territorio nacional, por lo que mediante la producción de Abs específicos para PRRSV utilizando la tecnología de las inmunoglobulinas (IgY) de gallina se puede diagnosticar y ayudar al aislamiento del virus, lo cual resultaría beneficioso para futuras investigaciones y avances en la prevención y tratamiento contra esta enfermedad.

2. Marco teórico

2.1. Porcicultura

La porcicultura es una actividad económica relevante en todo el mundo, ya que la carne de cerdo es la más consumida por encima de la carne de res y pollo. Los principales productores mundiales de carne de cerdo son China, Europa, Estados Unidos y Brasil. China es el mayor productor, generando más del doble que la unión europea, 5 veces más que Estados Unidos y casi 18 veces más que Brasil (Bobadilla *et al.*, 2010). Principalmente su importancia repercute en que del cerdo se ocupa prácticamente todo, principalmente la carne, piel, sangre y huesos; y aunque la mayoría es para consumo humano, también se llega a utilizar en la medicina, pues la piel debidamente asistida se emplea en el tratamiento de quemaduras en los humanos y en heridas de piel, esto debido a que fisiológicamente es muy semejante a la piel humana.

A nivel mundial, México se sitúa en el noveno lugar en producción de carne, en la actualidad la porcicultura se mantiene como una industria importante dentro de la actividad pecuaria en el territorio nacional, generando más de un millón de toneladas anualmente y con una marcada presencia en los estados de Jalisco, Michoacán, Sonora y Puebla que han llegado a representar hasta un 48% de la producción. Siendo Michoacán uno de los principales estados productores y consumidores de carne de cerdo, del cual la Piedad se mantiene como el municipio de Michoacán con mayor producción; con 18 mil 229 Tn, seguido por Zamora, con 7 mil 962 Tn, y Morelia con 7 mil 521 Tn, así mismo la porcicultura sirve como sustento económico de 24 mil 972 familias distribuidas en los 113 municipios de Michoacán (Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario, 2018). Los tipos de carne con mayor consumo en México son la carne de pollo, carne de cerdo y carne de res, el consumo *per cápita* de carne de cerdo en México se estima en 14 kg, para finalizar la población porcina en México en el 2011 se estima en 15,547,260 cabezas porcinas Las exportaciones de carne cerdo en México son de 36 mil toneladas, y las importaciones para abastecer el consumo nacional son del orden de 310 mil toneladas (FAO, 2010).

2.2 Generalidades del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV)

2.2.1. Antecedentes Históricos

El PRRS se describió por primera vez en los Estados Unidos de América (USA) a finales de los ochenta como enfermedad misteriosa del cerdo o enfermedad de oreja azul debido al desconocimiento de su etiología. (Arias *et al.*, 2011; Dortmans *et al.*, 2019). Este nombre fue cambiando en función de la importancia que se otorgaba a uno u otro signo clínico (Zimmerman *et al.*, 2003). En 1987 Carolina del Norte se caracterizó por presentar oleadas de abortos entre las cerdas, con un aumento tanto en el número de crías nacidas muertas, como en mortalidad neonatal. Posteriormente, también se observaron graves problemas respiratorios en cerdos destetados de cualquier edad (Hill, 1990). En 1991 en Central Veterinary Research Institute en Lelystad (Holanda) describió en Los Países Bajos al PRRS mediante el uso de cultivos de macrófagos

alveolares de porcino, en donde el virus fue aislado y caracterizado por primera vez, y ahora se le conoce como el genotipo europeo de PRRS (Arias *et al.*, 2011; Dortmans *et al.*, 2019). Un segundo aislamiento del PRRS ocurrió en 1991 en USA y se conoce como genotipo americano. Los aislados americano y europeo comparten una identidad genómica de hasta 60%, por lo que se dividieron en genotipo 1 o europeo y genotipo 2 o americano. A las variantes de cada genotipo se denominan subtipos (Meng *et al.*, 1995). (Figura 2). En 2006 se aisló un tercer genotipo altamente patógeno, denominado HP-PRRSV que surgió en China; el cual, mediante análisis filogenético, se asignó al genotipo 2 o americano. Sin embargo, el HP-PRRSV es clínicamente más agresivo que su homólogo americano y presenta una mayor mortalidad en lechones (Han *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2007). En México, el PRRS se reportó en 1992, aunque se sospecha que pudo aparecer en el país durante desde la década de los ochenta. (Morilla, 2003). El PRRSV se encuentra ampliamente distribuido en México, con reportes en Estado de México, Puebla, Sonora, Yucatán y Nuevo León (Batista *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2006; Martínez- Barroso *et al.*, 2002; Salinas-Meléndez *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen reportes exactos de su epidemiología ni de costos económicos de todo el país (López-Heydeck *et al.*, 2015). Estos genotipos presentan cierta regionalización, sin embargo, tanto el genotipo europeo, como el norteamericano se encuentran diseminados en la mayoría de los países productores porcícolas (Díaz, 2006).

2.2.2. Epidemiología

Desde la aparición del PRRSV a la fecha, los tres genotipos virales se han diseminado a todo el mundo. En Europa se pueden localizar el genotipo 1, 2 y HP siendo prevalente el genotipo 1. En Asia se pueden encontrar los genotipos 1, 2 y HP siendo de gran impacto el HP-PRRSV. Desde su primera aparición, el HP-PRRSV provocó severos signos clínicos en cerdos jóvenes y adultos, afectando a más de 2 millones de cerdos, según datos epidemiológicos reportados por el Centro de Control de Enfermedades de China (CACDC) (Tian *et al.*, 2007). En México, los datos de prevalencia son similares a los reportados en el resto del mundo, aunque el HP-PRRSV no se ha reportado en México. Según estudios retrospectivos, la prevalencia nacional va de 20 a 70 % (Macías *et al.*, 2005; Sierra *et al.*, 2000). Según datos epidemiológicos que identifican al virus en granjas con diferente grado de tecnificación, la prevalencia del virus varía de acuerdo con el periodo estacional en que se obtienen las muestras. En el periodo invernal se presenta el mayor número de incidencias. Algunos países con explotaciones porcinas se han reportado libres del síndrome: Australia, Suecia, Nueva Caledonia y gran parte de Sudamérica (Shi *et al.*, 2010).

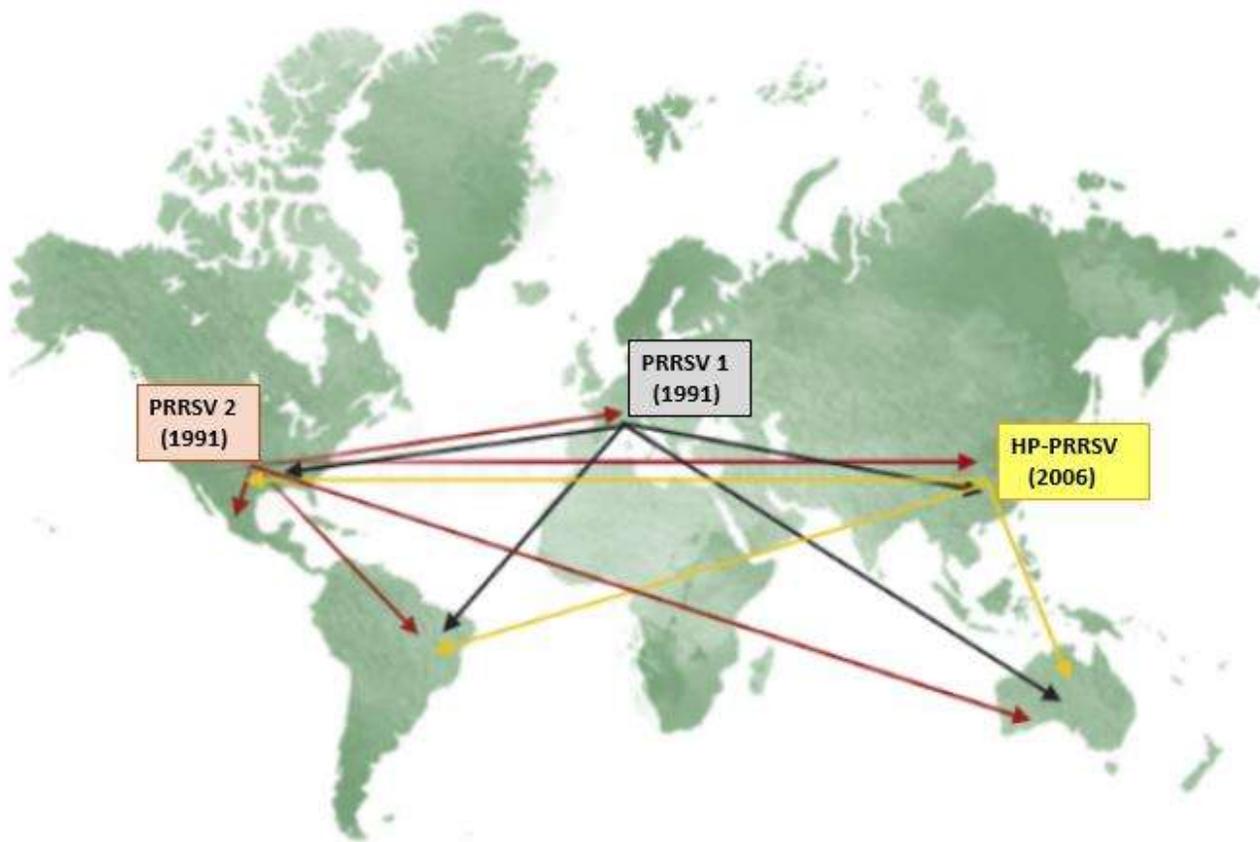


Figura 1. Mapa de la distribución de PRRS en el mundo. (Han *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2007).

2.2.3. Impacto Económico provocado por el PRRSV

Es una de las enfermedades de mayor importancia económica mundial, en la mayoría de los países de producción de porcinos, donde en gran parte de ellos permanece endémico (López-Heydeck *et al.*, 2015). Actualmente, afecta a la industria porcina en todo el mundo y ocasiona pérdidas económicas cuantiosas (Singleton *et al.*, 2016) En el año 2005 un estudio económico publicado por científicos y miembros de la industria del porcino en Norteamérica, indicaba que el costo que el PRRSV representaba para los productores porcinos estaría estimado en 560 millones de dólares anuales (Neumann, Kliebenstein *et al.*, 2005), el 45 % de esta pérdida sería causado directamente por la declinación en la ganancia diaria y baja eficiencia alimenticia en cerdos de engorde, 43 % resultaría de la mortalidad en cerdos en crecimiento, y 12% serían debidos a las fallas reproductivas. (Osorio, 2010). Por lo que la amenaza de las enfermedades emergentes se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los productores y autoridades sanitarias por sus efectos tan negativos, con el tiempo se ha observado que estas enfermedades provocan pérdidas económicas de gran importancia por la reducción en la producción, la pérdida del inventario por la despoblación y el menor consumo de los productos pecuarios debido a la imagen negativa de la enfermedad en el público, los mayores gastos que incurre el gobierno y los

particulares para controlar la enfermedad y la pérdida de mercados nacionales e internacionales de los animales, sus productos y subproductos. A estos efectos se suman las pérdidas indirectas como son los empleos y servicios asociados con la producción porcina (Morilla, 2003).

2.2.4. Agente etiológico

El PRRSV pertenece al Orden de los Nidovirales, de la Familia Arteriviridae. Es un virus con envoltura, de forma esférica con proyecciones y de un tamaño aproximado de hasta 60 nm de diámetro, se trata de un virus con genoma de RNA monocatenario de sentido positivo, el cual es de aproximadamente 15 Kb con regiones no traducibles (UTR's) en los extremos 5' y 3', manteniendo funciones como elementos regulatorios del genoma (López *et al.*, 2015). El genoma consiste en 10 marcos de lectura abiertos (ORF's) de los cuales el ORF 1a y 1b abarcan hasta un 75% del genoma y codifican para 2 polipéptidos que, al ser traducidos, sufren una autoproteólisis que puede dar como resultado hasta 16 proteínas no estructurales (Nsp). Las funciones principales de las Nsp son el dirigir la transcripción y replicación viral, anclando la maquinaria de síntesis a las membranas intracelulares modificadas, control de la síntesis de ARN subgenómicos y la evasión inmune innata. Los ORF2-ORF7 en el extremo 3' codifica para cinco glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2, GP3, GP4, GP5 y GP5a), dos proteínas de membrana no glicosiladas (E y M), y una proteína de nucleocápside (N) (Kappes, *et al.*, 2015). La proteína nucleocápside (N), codificada por el ORF7, es el principal elemento estructural dentro del virión y su función es empaquetar el ARN genómico viral (Montaner-Trarbes *et al.*, 2019). Las GP2, GP3 y GP4 son proteínas glicosiladas estructurales de envoltura que forman un complejo heterotrimérico expuesto sobre la superficie del virus (Wissink *et al.*, 2005). El cual está relacionado con la entrada viral y se encuentra fuertemente N-glucosilado. Las proteínas GP5 y M forman un heterodímero unido por puentes disulfuro y son el complejo principal en el virión. Se conoce que estas proteínas, de acuerdo a sus perfiles de hidrofobicidad, poseen gran capacidad antigénica (Wang, 2010). Por otra parte, N forma homodímeros unidos por puentes disulfuro que sirve para empaquetar el ARN genómico viral (Kappes *et al.*, 2015). La glicoproteína GP2 tiene 256 aminoácidos y contiene una péptido señal en la región N-terminal que la dirige y ancla a la membrana lipídica de la envoltura viral (López-Heydeck *et al.*, 2015).

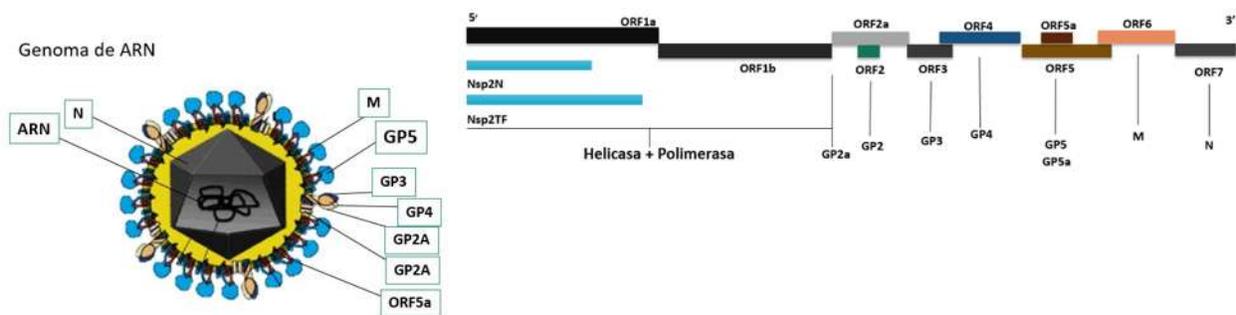


Figura 2. Esquema de estructura viral y del genoma y ORF's de PRRSV. Modificado de (Kappes, et al., 2015)

2.2.5. Proteína GP5

El ORF 5 codifica para la proteína glicosilada GP5 de 25 kDa que se compone de 200 aminoácidos (en el genotipo norteamericano 2). Contiene por un péptido señal conformado por 30 aminoácidos (1-30) en la región N-terminal, seguido de un ectodominio de aproximadamente 30 aminoácidos, que contiene varios sitios de N-glicosilación, dos de los cuales (N44 y N51) están altamente conservados entre las diferentes cepas. La región entre los residuos 63 a 135 es hidrófoba y se supone que atraviesa tres veces la envoltura viral. La región C-terminal (135–200) se encuentra en el interior del virus (Figura 4). Es de destacar que existe una región hipervariable entre el aminoácido 27 y 31. Dado que el ectodominio es una región rica en residuos de serina y asparagina, esto a menudo conduce a la adición o pérdida de sitios de N-glicosilación. (Thaa *et al.*, 2013), donde se encuentran sitios de glicosilación como: las Asparaginas 30 y 33 dentro de la región hipervariable y las Asparaginas 44 y 51 altamente conservadas entre cepas del virus, es entre la región hipervariable y la asparagina 44 donde se ha reportado el probable epítipo de neutralización que podría ser reconocido por linfocitos B (Popescu *et al.*, 2017; Thaa *et al.*, 2013). GP5 es una proteína muy antigénica y genéticamente variable, la diversidad genética y antigénica es un desafío importante para el control de PRRSV. En La GP5 de PRRSV tipo 2, se identificó un epítipo neutralizante "epítipo B" (aminoácidos 37-45), capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, considerados como un componente importante de la inmunidad protectora frente a PRRSV (López, 2015), además, se identificó un epítipo señuelo "epítipo A" en aminoácidos 25-31 (Thaa *et al.*, 2013). Y los sitios reportados para células T están ubicados principalmente en la región del endodominio en las posiciones de aminoácidos 117-131 y 149-169. Estos cobran importancia ya que juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa celular (Figura 4.) (Vashisht *et al.*, 2008). Por lo que no sorprende que sea una de las proteínas más estudiadas, ya que se ha demostrado que induce Abs neutralizantes y que es indispensable en la unión del virus ya que juega un papel importante en la entrada y la replicación viral (López *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Murthy *et al.*, 2015). Por lo anterior es considerada un blanco importante para la producción de Abs neutralizantes, los cuales aparecen de manera tardía en la infección (Popescu *et al.*, 2017).

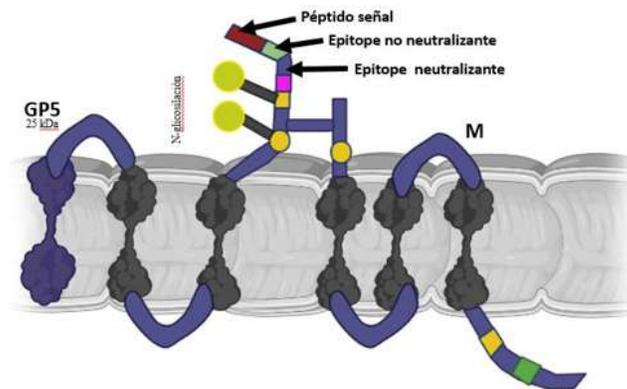


Figura 3. Proteína GP5 de PRRSV. Los residuos 63 a 135 atraviesan tres veces la envoltura viral, y la proteína GP5 posee un péptido señal (rojo), dos epítipes uno que produce anticuerpos no neutralizantes (verde) y otro capaz de reproducir anticuerpos neutralizantes (azul). Modificado de (Vashisht et al., 2008).

2.2.6. Cuadro Clínico de PRRS

PRRS es una enfermedad de origen viral que ocasiona fallas reproductivas severas en cerdas gestantes, provocando menor grado en la calidad en el semen en verracos y problemas respiratorios en cerdos de todas las edades, pero principalmente en lechones; así como complicaciones respiratorias severas en cerdos de diferentes edades; el virus tiene predilección por las células inmunitarias y causa la muerte de los macrófagos alveolares. El virus puede difundirse de los pulmones al resto del cuerpo; en la sangre, solamente en la asociación con los leucocitos o los monocitos que entonces migran a diversos tejidos finos para convertirse en macrófagos tisulares. Con esta difusión PRRS puede alcanzar el aparato reproductor, conduciendo al desarrollo de las muestras clínicas asociadas a la reproducción y que definitivamente alteran la fertilidad de los animales; también se asocia o incrementa la manifestación de otras enfermedades respiratorias, esta enfermedad, se caracteriza por una súbita aparición de fiebre en la primera fase de la etapa aguda, lo cual puede inducir el aborto, o incluso la muerte, en cerdas entre los 21 y los 109 días de gestación (Meulenberg, 2000). Además de que el virus muestra una capacidad de inmunosupresión e inmunoregulación que le permite, prolongar el tiempo de viremia en los animales enfermos, quienes eliminan el virus por saliva, secreciones transplacentarias, mamarias y muy posiblemente excremento, siendo la transmisión principal por contacto directo o por objetos contaminados; además presenta una posterior selectividad a pocos tejidos linfoides, que le permite permanecer inadvertido hasta que, en condiciones favorables, vuelve a manifestarse la enfermedad, ya sea como pequeños brotes, o como pandemia. (López-Heydeck *et al.*, 2015).

2.2.7. Trasmisión

El PRRSV infecta a cerdos en todas las etapas de desarrollo, desde lechones hasta cerdos en etapa final (López *et al.*, 2015), también se asocia o incrementa la manifestación de otras enfermedades respiratorias, esta enfermedad, se caracteriza por una súbita aparición de fiebre en la primera fase de la etapa aguda, lo cual puede inducir el aborto, o incluso la muerte, en cerdas entre los 21 y los 109 días de gestación (Meulenberg, 2000). Sin embargo, solamente es letal en lechones, aunque esto último depende tanto del estado de salud del animal, como de los factores ambientales (López *et al.*, 2015). La mayor parte de las pérdidas económicas se deben a que el virus afecta

principalmente a cerdas gestantes y lechones en crecimiento (Holtkamp *et al.*, 2013). El virus se puede transmitir tanto de manera vertical atravesando la barrera placentaria, como de manera horizontal por contacto directo. Por contacto directo, la exposición al virus ocurre por vías respiratoria, oral, percutánea y seminal. (Rathkjen, 2017).

2.2.8. Replicación del virus

Una vez que el virus es reconocido por los receptores de la célula hospedadora, este es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina. La replicación tiene 3 características: reordenamiento de las membranas del huésped para establecer complejos de replicación viral; síntesis y expresión de RNA genómico, transcripción de RNA subgenómico para la expresión eficiente de proteínas estructurales, la capacidad única de producir RNAs heteróclitos (Kappes *et al.*, 2015; Lunney *et al.*, 2016). Los complejos de replicación se forman dentro de vesículas perinucleares de doble membrana que derivan del Retículo Endoplásmico (Kappes *et al.*, 2015). La traducción del genoma produce poliproteínas de replicasa pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas son escindidas por proteasas virales internas para generar las 14 proteínas no estructurales, que se ensamblan en el complejo de replicación. El complejo de replicación primero se dedica a la síntesis de ARN de cadena negativa para producir ambas cadenas de longitud completa y ARN subgenómicos de longitud negativa. Posteriormente, los ARNm (RNA mensajero) subgenómicos sirven como plantillas para la síntesis del ARNm subgenómicos requeridas para expresar los genes de proteínas estructurales que residen en el extremo 3' del genoma. Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides, se envuelven de las proteínas estructurales brotando del Aparato de Golgi, así los nuevos viriones se liberan de la célula vía exocitosis (Lunney *et al.*, 2016)

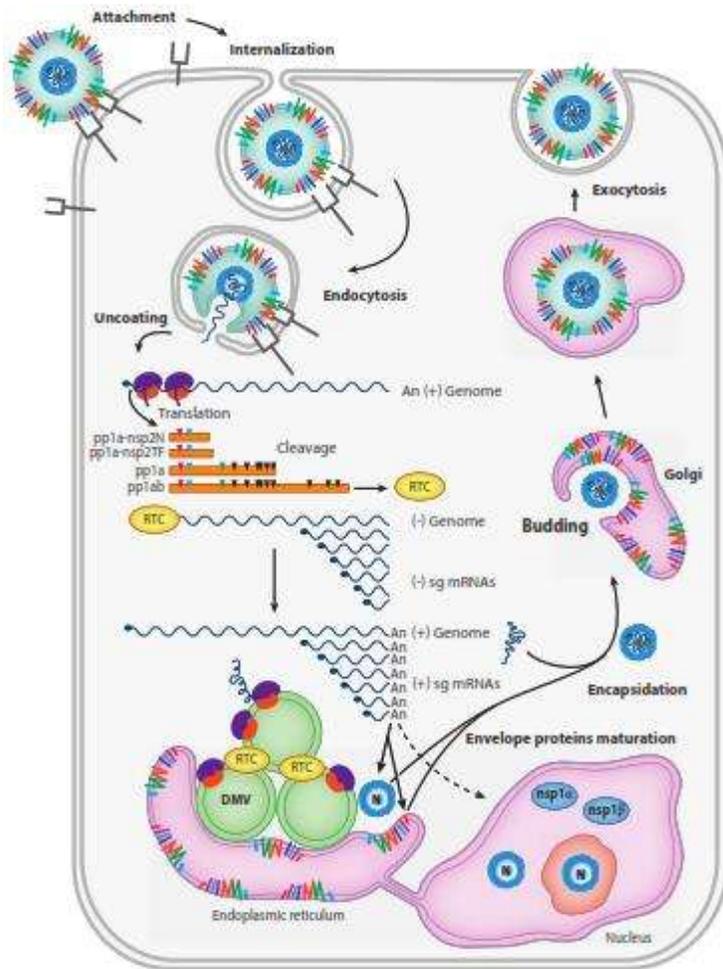


Figura 4. Replicación de PRRSV. Posterior a la interacción con proteínas de superficie de la célula blanco, el virus es internalizado a través de formación de endosomas por cambios en la clatrina de membrana. Una vez dentro el material genómico es liberado por acidificación de endosomas tempranos, y por medio de su gRNA comienza a transcribir poliproteínas de replicasa, las cuales son escindidas en 14 proteínas no estructurales las cuales forman los RTC. Encargados de la transcripción de gRNA y sgRNA de sentido negativo que servirán como molde para gRNA y sgRNA. (Tomado de Lunney *et al.*, 2016).

2.2.9. Variabilidad genética

PRRSV es un virus de RNA, presenta una alta tasa de mutación que va de $4.7-9.8 \times 10^{-2}$ sustituciones/sitio/año (Hanada *et al.*, 2005). En los genotipos 1 y genotipo 2 se ha podido constatar una gran variabilidad antigénica entre aislados. Se han descrito 4 grupos antigénicos diferentes dentro de este genotipo según su reactividad a anticuerpos monoclonales frente a la proteína N, y subdivisiones de estos grupos cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a la proteína GP3, M y GP5 (Yang *et al.*, 1999, 2000). Esto se debe a que dependiendo del ORF examinado, las homología pueden variar entre el 50% y 90%, y la similitud de aminoácidos varía del 55% a 80%. Los ORF's para proteínas estructurales 3, 4 y 5 mutan más que los ORF's 2, 6 y 7. Esto puede deberse a dos fenómenos: El primero es porque la RNA polimerasa no tiene la capacidad de corregir errores durante la duplicación de RNA; el segundo, se refiere a cierta

capacidad de recombinación entre las distintas cepas. La elevada variabilidad afecta negativamente en las respuestas inmunitarias cruzadas y con fenómenos de atenuación y adquisición de virulencia (Díaz, 2006). El virus vacunal atenuado, es el único comercialmente accesible para generar algún grado confiable de inmunidad y ha mostrado la capacidad de revertirse a patógeno, con replicabilidad y recombinación con virus de campo. Las vacunas sólo se utilizan para disminuir el grado de afección de la enfermedad (López-Heydeck *et al.*, 2015). Por todo lo anterior se ha sugerido que la alta variabilidad entre cepas del virus PRRSV dificulta que las vacunas comerciales brinden protección cruzada contra cepas silvestres heterólogas.

2.2.10. Vacunas para PRRSV

Además de las complejidades implícitas en montar una respuesta inmune de protección contra el PRRSV, el inconveniente más importante para vacunar con éxito contra el PRRSV es la gran variabilidad genética representada en las múltiples cepas circulantes de este virus en el campo. Tal variabilidad se traduce en la falla de las vacunas actuales en proveer un nivel homogéneo de protección. Si bien es cierto que la vacunación o infección con virus infeccioso confieren una inmunidad muy sólida (prácticamente del tipo “esterilizante”) contra reinfección homologa (es decir usando una cepa de desafío igual o muy semejante a la vacunante), la protección ha de resultar mediocre o insuficiente cuando el desafío envuelva una cepa heteróloga, genéticamente más distante de la vacunante (Osorio, 2010). Actualmente existen dos tipos de vacunas contra el PRRSV: una utiliza el virus atenuado y otra el virus inactivado. Existen en el mercado ambos tipos, tanto para cepas americanas como europeas. Aun cuando dichas vacunas disminuyen los síntomas de la enfermedad y la viremia, no evitan la infección y la protección cruzada es variable frente a virus heterólogos. Además, se ha informado que el virus vacunal puede diseminarse a otros animales susceptibles. Por esta razón muchos estudios se han orientado al desarrollo de nuevas vacunas que incluyen diferentes vectores para el desarrollo de vacunas de ADN evaluando varias proteínas estructurales. También se ha evaluado el empleo de clones infecciosos de PRRSV, así como la construcción de quimeras virales entre el virus vacunal y un virus altamente infeccioso. Todas estas estrategias no han logrado desarrollar una vacuna eficaz contra el PRRSV, por lo que dicho propósito sigue siendo un reto muy importante (Flores-Mendoza & Hernández, 2010).

Actualmente en el mercado se tiene acceso a varias vacunas como lo es el caso de la vacuna Ingelvac® PRRS MLV la cual confiere protección cruzada y probada contra la más amplia variedad de virus de PRRS tipo 2, la cual está conformada por virus vivo modificado cepa ATCC-VR-2332, del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) 10^{4.8}DICT 50%, propagado en cultivos celulares, es elaborada por Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. St. Joseph, Mo. U.S.A. (Boehringer Ingelheim, 2021). También se encuentra disponible la vacuna PRIME PAC® PRRS contiene virus vivo modificado de PRRS tipo 2, Cepa Nebraska esta es elaborada por Intervet International, B.V. Wim de Körverstraat 35, 830 AA, Boxmeer, Holan (Ferrari, 2010). Sin embargo, estas vacunas son producidas en otros países por lo cual la vacunación no logra alcanzar su máxima efectividad ya que no están especializadas para serotipos mexicanos.

2.3 Virus

Etimológicamente, virus significa veneno en latín (Carballal & Oubiña, 2015), virólogos definen al virus como un programa, o un complejo informacional macromolecular, son agentes infecciosos submicroscópicos (Adamo, 2014) que llegan a ser potencialmente patógenos y se replican de manera intracelular para copiar su material genético (MacLachlan & Dubovi, 2016). Son heterogéneos, varían en tamaño, morfología, composición química, rango de hospedadores, etc (Roberto, 2019). Carecen de los sistemas enzimáticos productores de energía necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas; tienen un tipo de genoma de ADN o ARN en sus diferentes variantes. Los virus presentan una envoltura de proteína llamada cápside; otros presentan una membrana o envoltura derivada de la célula infectada. Debido a que carecen de la maquinaria necesaria para su replicación, han evolucionado para tomar la del hospedero (Sompayrac, 2002).

2.4 Genomas y clasificación viral

Los virus pueden ser divididos en grupos, cada uno de los cuales tienen su propio método de transmisión de la información genética de una generación a otra y su propio estilo de expresar su información. Existen siete grupos de genomas virales según la clasificación de D. Baltimore 1971 (Figura 1). La composición y las estructuras de estos siete tipos de genomas virales son más variadas que cualquier genoma en los superreinos procariota, archaea o eucariota (Flint *et al.*, 2004).

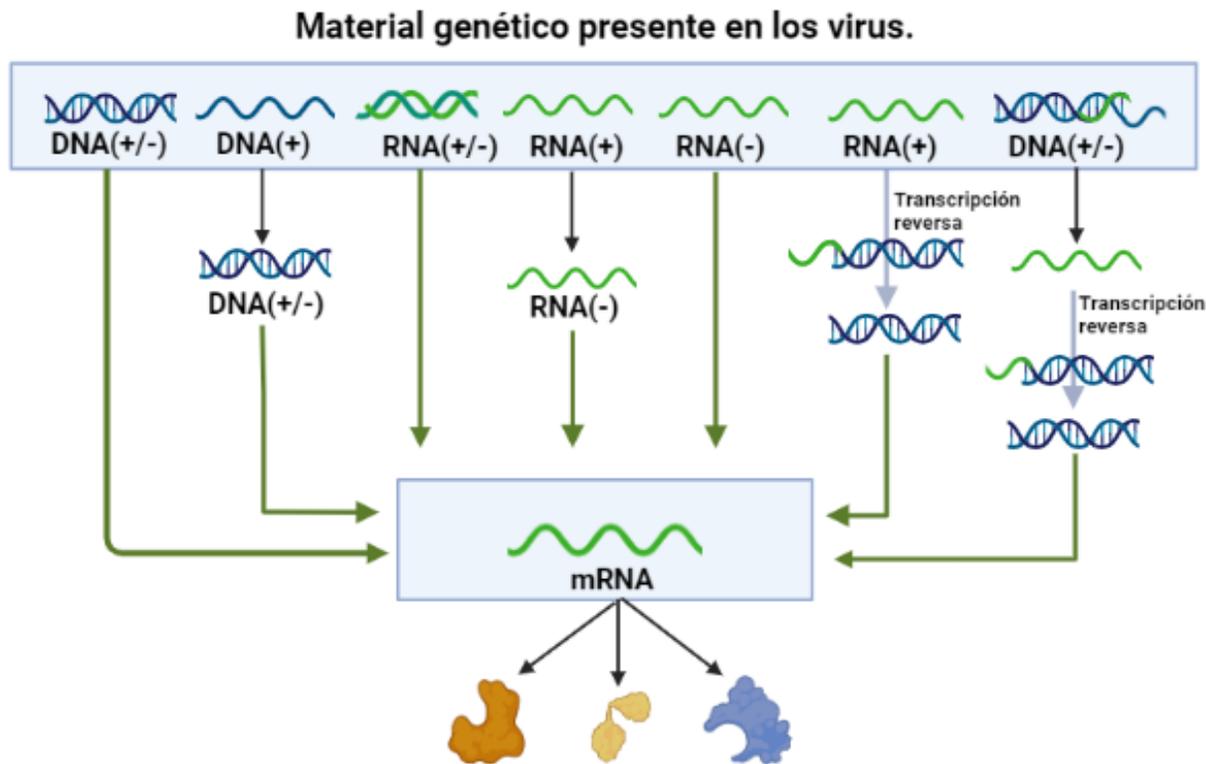


Figura 5. Clasificación viral de Baltimore. En particular el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino se encuentra en el Grupo IV como se muestra en el esquema, debido a que el genoma viral que posee es RNA polaridad positiva, tiene la misma polaridad que el RNAm no necesita ninguna conversión para generar las proteínas virales. Se generan RNA ss (-) que regulan la expresión génica y que servirán de molde para replicar el RNA ss (+). adaptado de (Peña & Faúndes, 2018)

2.5. Generalidades producción de Anticuerpos anti-PRRSV

2.5.1. Estructura general de los anticuerpos

Los anticuerpos (Abs) son proteínas cuaternarias de estructura bioquímica compleja demarcada por la unión de cuatro cadenas proteicas (Machado *et al.*, 2006), dos cadenas pesadas idénticas de 55 a 70 kDa, unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas livianas no glicosiladas de 24 kDa (Ayala, 2007) las cuales están unidas mediante puentes disulfuro (figura 6). Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab (fragmento de unión al antígeno, por sus siglas en inglés) que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristizable denominado Fc (fracción cristizable) (Ayala, 2007 & Machado *et al.*, 2006).

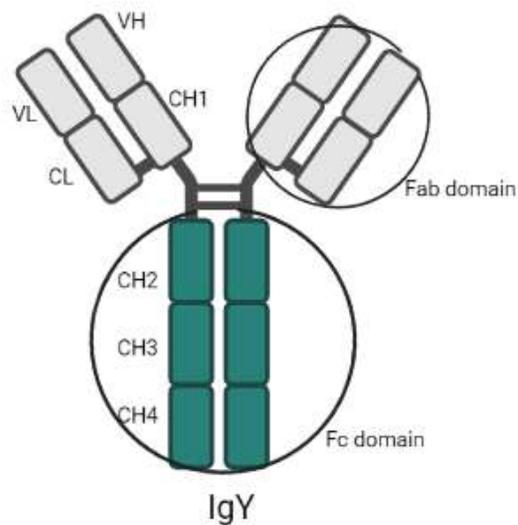


Figura 6. Estructura de una molécula de IgY. Dominios de la región constante de la cadena pesada; CL: dominio constante de la cadena liviana; COOH: extremo carboxiterminal; Fab y Fc: fragmentos resultantes de proteólisis; NH: extremo aminoterminal; VH: dominio variable de la cadena pesada; VL: dominio variable de la cadena liviana (Ayala, 2007 & Machado *et al.*, 2006).

2.5.2. Estructura molecular de la IgY

La estructura de la molécula de IgY es comparable a la de las inmunoglobulinas de los mamíferos. La IgY está formada por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, a diferencia de los tres dominios constantes de la cadena pesada de la IgG, la cadena pesada de la IgY contiene un dominio variable y cuatro dominios constantes. Mientras que el peso molecular (PM) de la IgG es de alrededor de 160.000 Daltons, según espectrofotometría de masas, el PM de la IgY es de aproximadamente 167.250 Daltons. La región bisagra de la IgY está poco desarrollada, la porción Fc de la IgY es el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en forma similar a lo que ocurre con la IgG. el fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una, la porción Fc de la IgY es el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en forma similar a lo que ocurre con la IgG. El fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una. (Sun *et al.*, 2001).

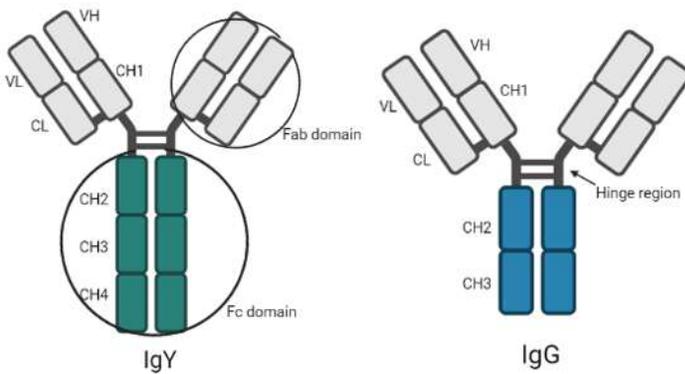


Figura 7. Diferencias y similitudes en estructura de IgY e IgE. Modificado de (Sun *et al.*, 2001).

2.5.3. Anticuerpos monoclonales

La propiedad de los Abs de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como herramientas esenciales en investigación biomédica y clínica, las cuales han probado ser invaluable para: 1. detectar y cuantificar niveles de expresión de genes; 2. determinar la localización de la expresión de genes a nivel celular, subcelular y en los tejidos; 3. identificar las interacciones moleculares con los productos de genes, por ejemplo, la inmuno-precipitación; 4. identificación de marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular particular; ésta es la base de la moderna clasificación de linfocitos y fagocitos monucleares; 5. inmunodiagnóstico: en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas al permitir la detección de antígenos y Abs específicos en la circulación o tejidos usando Abs monoclonales en inmunoensayos, y como marcadores específicos para el diagnóstico por imágenes; 6. diagnóstico y tratamiento de tumores específicos: los Abs monoclonales se usan en la detección de tumores mediante técnicas inmunológicas de diagnóstico y para la inmunoterapia de tumores in vivo; 7. análisis funcionales de moléculas de la superficie celular o de proteínas secretorias; 8. en la investigación inmunológica, los Abs monoclonales que se unen a las moléculas de la superficie celular que puedan estimular o inhibir funciones celulares particulares, son una herramienta invaluable para definir la función de moléculas, incluidos los receptores para antígenos; 9. en el estudio de los procesos de interacción hospedero-agente infeccioso, las aplicaciones de los Abs monoclonales son prácticamente ilimitadas no sólo en los estudios funcionales sino, también, en la selección de posibles blancos terapéuticos y de candidatos para vacunas o el desarrollo de Abs anti-anticuerpos (antiidiotipos) como vacunas. (Brüggemann *et al.*, 1989, Bona, 2019).

2.5.4. Epítopes

Un epítipo es la porción específica de un antígeno macromolecular al cual se une un Ab (Abbas, 2015). Las dimensiones de los epítipos pueden variar según una serie de factores complejos, pero una guía general considera de 6 a 12 aminoácidos (en las proteínas), y este puede ser presentado para que se generen Abs neutralizantes o no neutralizantes (Angeletti *et al.*, 2017). Algunos péptidos inmunogénicos, contienen epítipos dominantes que provocan respuestas más fuertes

(inmunodominantes), estos, son reconocidos por las poblaciones de células T y B afines más abundantes, otros péptidos inmunogénicos inducen respuestas más débiles y se denominan determinantes (subdominantes) los cuales son reconocidos por las poblaciones de células T y B menos abundantes (Yewdell, 2006). Existen varios factores que influyen en el dominio o subdominio de un péptido, incluyendo la afinidad de unión al complejo mayor de histocompatibilidad, la estabilidad del complejo histocompatibilidad -péptido, el procesamiento y la presentación de antígenos, y el repertorio de receptores de células T y B. A pesar de estas reglas, la jerarquía de epítomos ha resultado ser muy dinámica. El problema con PRRSV y en particular con la proteína GP5, es que posee epítomos capaces de inducir Abs neutralizantes y no neutralizantes. Los Abs no neutralizantes incluso pueden llegar a ser perjudiciales para el hospedero. Además, el conocimiento que se tiene de los epítomos inmunodominantes de GP5 es escaso, de ahí la importancia de estudiar la inmunodominancia de estos epítomos. Actualmente las vacunas existentes contra PRRSV han mostrado una capacidad limitada de protección.

2.5.5. Aplicaciones de tecnología de las inmunoglobulinas (IgY) de gallina

Así como los mamíferos transmiten a su descendencia Abs a través del calostro, la leche o la placenta, las aves transfieren los Abs a su progenie a través de la yema de los huevos. La IgA y la IgM son transferidas desde las células plasmáticas del oviducto hacia la clara (Lösch, *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1974). La IgY se transfiere exclusivamente a la yema por un proceso activo mediado por receptores (Morrison *et al.*, 2001). De este modo la IgY es la inmunoglobulina predominante en la yema mientras que la IgA y la IgM prevalecen en la clara del huevo. (Tizard, 1992). Es importante mencionar que las IgY's demoran aproximadamente unos 3 a 7 días (lo más común es 5 días) en aparecer en un huevo desde el momento en que es activamente transportada desde la circulación sanguínea al ovocito hasta que es puesto por la gallina (Woolley, 1995).

La cantidad de IgY transferida se relaciona directamente con su concentración en el suero sanguíneo de las gallinas, aunque diferido en el tiempo, pues es la concentración que había en el suero sanguíneo unos 3 a 7 días previos a la puesta del huevo. En la naturaleza la yema de los huevos está destinada a proporcionarle alimento y anticuerpos al pollito mediante la comunicación del saco vitelino con el intestino medio. Si bien la gallina ponedora produce huevos infértiles, cada huevo tiene su concentración de Abs específicos contra las enfermedades que ha tenido contacto o que se ha inmunizado la gallina (Morrison *et al.*, 2001).

2.5.6. Ventajas del empleo de la IgY

Desde el punto de vista económico, la tecnología IgY presenta ventajas incomparables. El costo de criar una gallina no es muy diferente al de un conejo, a pesar de que la producción de Abs de una gallina corresponde con la de un animal relativamente grande, como por ejemplo una oveja o una cabra, una sola gallina produce unos 50 a 100 mg de IgY por huevo. En un año de postura produce una cantidad formidable de Abs (aproximadamente entre 17 y 35 g de IgY/ave/año). Esta inmensa producción de Abs, obtenida con costos relativamente bajos, posibilita la aplicación de esta tecnología en nuevos campos, tales como la inmunoterapia y la inmunoprofilaxis de

infecciones virales y bacterianas, tanto en medicina humana como veterinaria. En cambio, los conejos, que se usan rutinariamente, deben sacrificarse y sólo producen en total unos 200 mg de IgG. Otra de las ventajas es el bienestar animal pues, como se menciona anteriormente, la recolección de huevos reemplaza al sangrado, el cual puede ser muy traumático. La distancia filogenética que existe entre las aves y los mamíferos ayuda a la eficiente reacción inmune y es otra de las ventajas para el uso de la IgY de las aves con respecto a la IgG de los mamíferos. (Chacana *et al.*, 2004, Schade *et al.*, 2007).

2.5.7. IgY como método de diagnóstico

Desde finales de los años 60 del siglo pasado, se vienen informando numerosas aplicaciones de la IgY, fundamentalmente en la terapéutica, la profilaxis y el inmunodiagnóstico (Alacron J *et al.*, 2000, Larsson A *et al.*, 2003). Estas potencialidades de aplicación de los anticuerpos IgY, vislumbran un futuro promisorio para la producción y utilización de los anticuerpos IgY, resulta interesante y estratégico para la industria biofarmacéutica el empleo de estos anticuerpos en sistemas de diagnóstico rápido de enfermedades, por la disminución de reacciones inespecíficas (Carmichael L, 2009). Tal es el caso de Jannet González-Figueredo cuyo trabajo tuvo como objetivo obtener anticuerpos policlonales IgY a partir de yema de huevo de gallina y evaluarlos mediante un sistema de látex-aglutinación, para su posible uso como terapia y principalmente en el diagnóstico. En dicho trabajo se obtuvo un título de IgY anti-PVC de 1:1,024, permitiendo así obtener un método de diagnóstico rápido donde las IgY anti-PVC aglutinaron con los reactivos preparados con 230 y 460 µg/mL de antígeno (González-Figueredo J *et al.*, 2015).

2.5.8. Abs disponibles para PRRSV

En la actualidad se encuentran disponibles Abs anti-PRRSV, sin embargo, estos tienen un costo elevado y su producción no es sencilla, lo que más sorprende es que no se encuentran Abs aviares producidos en gallinas, al obtenerlos esto brinda varias ventajas como la reducción de la intervención animal, obteniendo además una gran cantidad de anticuerpos. Por otra parte, las aves presentan mayor distancia filogenética entre sus antígenos y los de mamíferos, ofreciendo altos porcentajes de anticuerpos específicos (Pinto J *et al.*, 2005).

Tabla 1. Abs anti-PRRSV disponibles para diagnóstico e investigación (Enjuares, 2001; Thermo Fisher, 2017).

Modelo biológico utilizado	Fluoróforo o etiqueta	Tipo	Aplicación.
Hámster armenio	Inconjugado	Monoclonal	Diagnostico.
Conejo	ATM KLH	Policlonal	Diagnostico e investigación.
Cerdo	IFI	Monoclonal	Diagnostico

2.5.9. Tecnología de ADN recombinante

Los fagos o bacteriófagos son virus que infectan bacterias, introduciendo su material genético en el genoma bacteriano. Emplean las funciones vitales de la bacteria para la producción de más unidades virales (Gutierrez, 2016). Consisten fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de ADN o ARN, el cual puede ser de cadena doble o sencilla (Segundo-Arizemndi, *et al.*, 2015). Un ejemplo claro de esta tecnología es el uso del fago M13 es un tipo de bacteriófago ampliamente empleado para la producción de Abs monoclonales. Este infecta las bacterias de *Escherichia coli*, insertando su genoma y empleando las funciones de la bacteria para reproducirse y producir más copias del virus. Mediante técnicas de Ingeniería Genética, es posible manipular su material genético e insertar una secuencia externa de ADN. Estos fagos recombinantes consiguen expresar en su superficie o en su cubierta la proteína codificada por el ADN insertado. Cuando uno de estos portadores de ADN codificante para un Ab e infecta una bacteria, se producen nuevos fagos que expresan en su superficie los Abs de interés unidos a sus proteínas. Por tanto, son capaces de unirse al antígeno, para posteriormente ser seleccionados y empleados nuevamente para infectar bacterias, produciendo (amplificando) nuevos virus seleccionados portadores de Abs (Smith 2005, Aranda & Sabalette, 2019).

3. Justificación

En México se tiene una diversidad de serotipos del virus PRRS que afectan a las granjas en diferentes estados de la República Mexicana; resultando una tarea difícil la prevención por la amplia diversidad genética viral, debido a esto se presentan limitaciones para el desarrollo de una vacuna, terapias efectivas y un método de diagnóstico. Por lo que la producción de Abs anti-PRRSV resultaría de importancia clínica, ya que pueden ser utilizados como método de diagnóstico para identificación del virus PRRS y así permitir futuros avances en este campo, en el cual actualmente se desconoce cuáles serotipos de PRRSV afectan al territorio de México. Para posteriormente permitir el aislamiento y el cultivo viral, de los serotipos y poder lograr la elaboración de vacunas propias para los serotipos nacionales

4. Hipótesis

Péptidos sintéticos virales son efectivos para la inmunización humoral de gallinas.

5. Objetivo general

Producir anticuerpos-anti GP5 monoclonales y policlonales en gallina contra el virus PRRS.

5.1. Objetivos específicos

- 1.-Inmunizar gallinas con antígenos GP5 sintéticos (GP51, GP52 Y GP53).
- 2.- Identificar IgY's anti-GP5 del virus PRRS.
- 3.- Elaborar bibliotecas de cDNA de los anticuerpos anti-PRRSV del vaso de gallinas inmunes.

6. Materiales y métodos

6.1. Material biológico

Péptidos

Las subunidades de GP51 [1 mg/ml], GP52 [1 mg/ml] y GP53 [1 mg/ml] fueron obtenidas por síntesis química en la empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). Se diseñaron a partir de un análisis in silico utilizando los protocolos B Cell Epitope Prediction Tools y T Cell Epitope Prediction Tools de la Immune Epitope Data Base IEDB.

EL péptido GP51 cuenta con un peso molecular de 3.36 KDa y un tamaño de 30 aa, el péptido GP52 tiene un tamaño de 30 aa y un peso molecular de 3.64 KDa y por último el péptido GP53 tiene un tamaño de 20 aa y un peso molecular de 2.49 KDa (Pérez Durán, F. 2020).

Tabla 2. secuencia y características de los péptidos sintéticos de la proteína GP5 del PRRSV.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Longitud P.M.	
GP51	ASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKF	30 aa	3,36 kDa
GP52	RLYRWRSPVIGHLIDLKRVVRSVAEQWGRP	30 aa	3,64 kDa
GP53	NGTDWLANKFRLYRWRSPVI	20 aa	2,493 kDa

BSA

Albúmina de Suero Bovino la cual fue utilizada en el acoplamiento de los péptidos ya que es una proteína transportadora soluble que posee 59 lisinas, de las cuales 30 a 35 están disponibles para acople. El acople del péptido sintético a la albúmina se realizó con glutaraldehído, reactivo de acople bifuncional que une dos compuestos a través de sus grupos amino. Siguiendo la metodología de Ausabel (1992).

Imject® Freund's Adjuvants

Los adyuvantes son estimuladores no específicos usados para aumentar la respuesta inmune al estar conjugados con un antígeno, estos son mezclados e inyectados con el antígeno para prevenir su catabolismo y ayudar a incrementar la respuesta inmune.

Los adyuvantes de Freund (Thermo Scientific) producen una fuerte, larga y estable respuesta inmunogénica, la versión completa del adyuvante contiene células muertas de *Mycobacterium butyricum* para potenciar la respuesta inmune, mientras que la versión incompleta no contiene dichas células. El adyuvante completo (Thermo Scientific Imject Freund's Complete Adjuvant) se usó solo en la inyección inicial y el incompleto (Thermo Scientific Imject Freund's Incomplete Adjuvant) en la reinmunización.

Vacuna PRRS

Vacuna de virus inactivado PRRSV (serotipo americano). Ingelvac PRRS MLV número de registro: B-6407-152. Contiene virus vivo modificado cepa ATCC-VR-2332, del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) 10^{4.8}DICT 50%, propagado en cultivos celulares, es elaborada por Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. St. Joseph, Mo. U.S.A. (Boehringer Ingelheim, 2021).

Gallinas

White Leghorn de postura, se mantuvieron a temperatura ambiente, alimentación ponedora y agua. Todos los procedimientos siguieron el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, USA) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999. Todos los procedimientos de inyección sin anestesia. Se utilizaron animales de 6-8 meses de edad, se separaron de manera aleatoria a los cuales se les inyectaron los péptidos acoplados a la proteína BSA.

Huevos de Gallina pre inmunes e inmunes

Huevos de gallina

Se realizó la recolección de 3 huevos de cada gallina antes de la inmunización, y posteriormente se recolectó un huevo de cada gallina tras cada inmunización.

Anticuerpos

Goat anti-chicken IgY F(ab)₂ – HRP es un anticuerpo secundario creado en cabra, el cual reacciona contra la IgY de gallina y está acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) fue obtenido en SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC

Muestras de suero positivas a virus PRRS silvestre de Michoacán
Proporcionado por el CMEB.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diagrama de Flujo de la estrategia metodológica

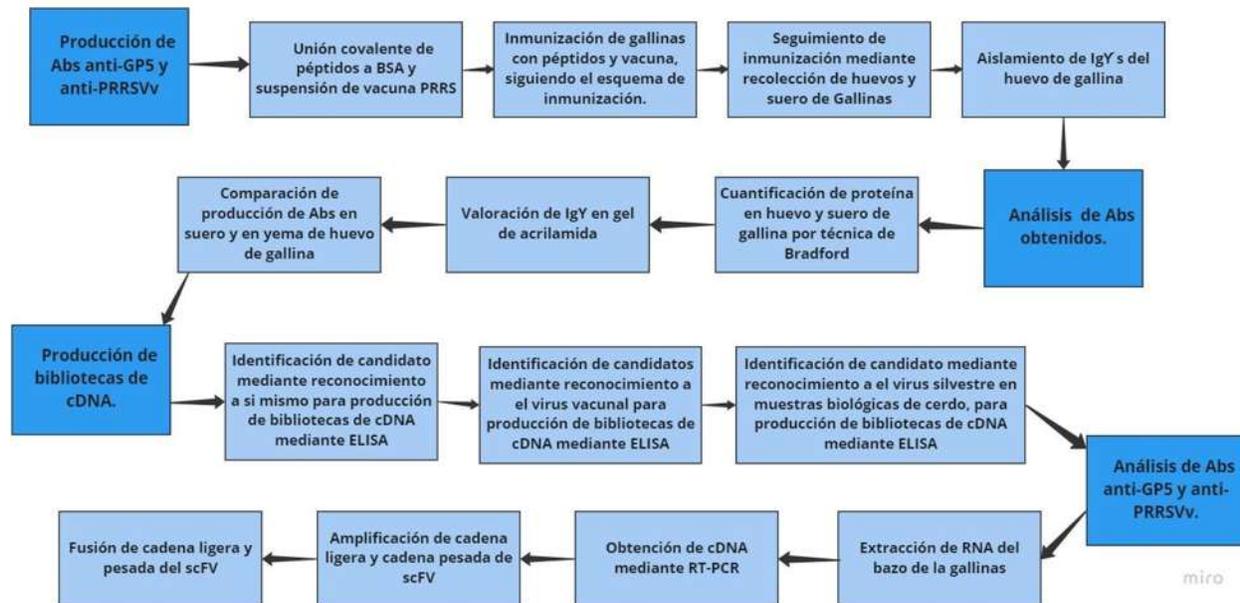


Figura 8. Diagrama de Flujo de la estrategia metodológica.

7.2. Análisis Bioinformático de péptidos

Se realizó un análisis in silico de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV tipo II ID: ACB56974.1, de la cual se obtuvieron secuencias reportadas como altamente inmunogénicas en la Immuno Epitope Data Base (IEDB) tabla 3. A partir de estas secuencias obtenidas se diseñaron los péptidos del presente trabajo.

Tabla 3. Secuencias antigénicas obtenidas del análisis in silico en Immuno Epitope Data Base.

Epítipo de reconocimiento	Secuencia de aminoácidos
Linfocito B	LIYNLTLC
	NDSSSHLQ
	NDSSSHLQLIYNLTLC
Linfocito T	KGRLYRWRSPVII
	RLYRWRSPVI

7.3. Preparación de antígenos e inmunización animal

Los péptidos de GP5 inmunogénicos (GP51; GP52 y GP53) son reconstituidos en solución de PBS a una concentración final de 1 µg/□l. La vacuna Indelvac PRRS MLV se reconstituyo en 25 ml de diluyente estéril número de registro: B-6407-152.

7.4. Unión covalente de péptidos mediante glutaraldehído

Se realizó la activación de BSA de la siguiente manera: se llevó acabo con 1mg de BSA en 200 □l de H₂O, se adiciono 0.15% de glutaraldehído y se incubó en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos para finalmente adicionar 300 □l de agua. Para la conjugación del péptido a la BSA activada, se tomaron 100 □l de la solución anterior (aprox. 1 mg de BSA) en un tubo y adicionaron 20 µg de péptido, se aforó a 200 □l con PBS e incubo en agitación por 2 horas a temperatura ambiente (La cantidad de péptido que debe adicionar es por la relación que obtuvimos del número de Lisinas que tiene la BSA, la relación es 1 Mol de péptido por 50 Moles de lisinas). Para inactivar el glutaraldehído se adicionó ácido ascórbico a una concentración final de 5 mM (debe notarse un cambio de color, de amarillo a transparente) se dejó dializar toda la noche en PBS (Ausabel, 1992).

7.5. Inmunización

La inmunización en gallinas de 6 meses de edad, se realizó vía intramuscular, las gallinas fueron sujetadas para realizar la punción en la pechuga con agujas de 0.80 mm de diámetro estériles con 200 µg (Ag-BSA) y 200 µl adyuvante de Freund, con un ángulo de inclinación de 45 grados. Previo a la primera inmunización se recolecto 1 huevo de gallina para obtener IgYs preinmunes.

Posteriormente se realizó el seguimiento de las gallinas respetando el esquema de inmunización, con recolección de huevos o sangre, cada 15 días durante un total de 45 días.

7.5.1. Esquema de inmunizaciones

Día 0. Se obtuvo huevo preinmune (control) y se realizó la primera inmunización con adyuvante completo de Freund en un volumen igual al de cada péptido acoplado al acarreador.

Día 15. Se obtuvo huevo pre-inmunización y se sustituyó el adyuvante completo de Freund con adyuvante incompleto de Freund en la segunda inmunización con los péptidos acoplados al acarreador. Día 30. Se obtuvo huevo de la 2da. Inmunización y se inmunizó nuevamente con adyuvante incompleto de Freund y los péptidos acoplados al acarreador.

Tabla 4. Esquema de inmunización (Barbas *et al.* 2001).

Inmunización	Día	Fecha	Antígeno	Adyuvante
Etapa 1	0	22-07-2020	200ug de Antígeno-BSA.	200 <u>ug</u> de Adyuvante completo de Freund.
Etapa 2	15	07-07-2020	200ug de Antígeno-BSA.	200 <u>ug</u> de Adyuvante incompleto de Freund.
Etapa 3	30	22-07-2020	200ug de Antígeno-BSA.	200 <u>ug</u> de Adyuvante incompleto de Freund.

7.6. Aislamiento de IgYs de gallina

Se recolecto 5 ml de yema de huevo, se agregaron cinco volúmenes de solución de delipidación (0,06% de karragenan; 0,182% pectina y CaCl_2 10 μM) y se mezcló por 2 h a 4°C. La muestra se centrifuga durante 20 min a 5,000 g y recupera el sobrenadante en tubo nuevo. Se ajustó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, incubado por 1 hora a 4°C. se pasó a centrifugar durante 20 min a 5,000 g y la

pastilla se re suspendió en 1 ml de solución PBS. Ajustar nuevamente al 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se incubado por 1 hora a 4 °C y se pasó a centrifugo durante 20 min a 5,000 g. Finalmente, la pastilla se re suspende en 1-3 ml PBS y se almacena a 4°C hasta su uso.

7.7. Cuantificación de Proteína Total

Para la cuantificación proteínica se utilizó el método Bradford, utilizando como estándar de referencia la Albúmina de Suero Bovino (BSA). Se prepararon distintas concentraciones: 0.5; 1; 2; 3 y 10 μg en 100 μl de agua. Reactivo de Bradford (Azul de Coomassie G-250 5 mg, Etanol 2.5 ml, Ácido Fosfórico 5 ml/50 ml de H_2O).

El análisis se llevó a cabo en una placa de 96 pozos, en cada pozo de colocaron 1 μl de muestra problema (concentrado obtenido de la yema de huevo de gallina) y 99 μl de H_2O , más 100 μl del reactivo de Bradford por triplicado, se incubó por 5 min y se realizó la lectura a 590 nm en el microlector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader), Posteriormente se realizó el análisis y el cálculo que nos dio como resultado 2.48 μl de proteína.

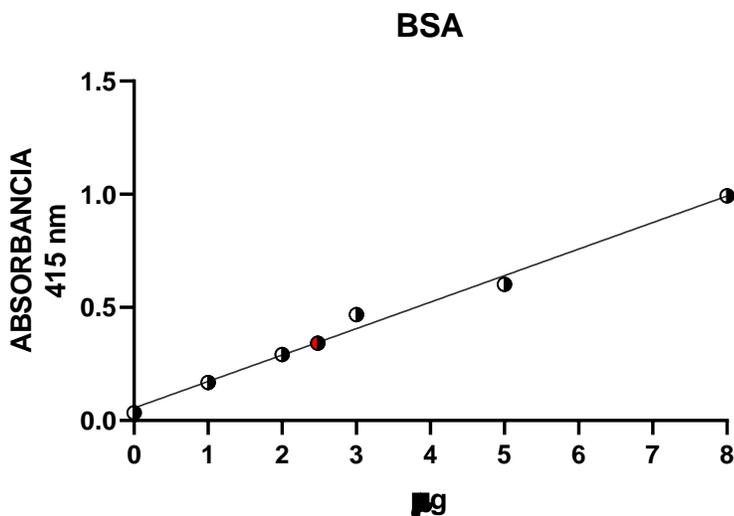


Figura 9. Grafica de Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteína IgY total utilizando el método Bradford. Muestra de yema de huevo: círculo rojo; Muestras de BSA en gradiente creciente; 1 μg , 2 μg , 3 μg , 5 μg , 8 μg : círculo negro. $R^2=0.98$.

7.8. Determinación de IgY's totales por ELISA

En placa de 96 pozos se colocaron 50 µl de las IgYs en 100 µl de buffer de carbonatos [0.1 M pH 9.6] por triplicado, se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fue bloqueada la placa con 5% de leche descremada (Bio-Rad) durante 1 hora a T.A. Se lavaron los pozos 5 veces con 100 µl de PBS-Tween 0.5% (PBST), para adicionar el anticuerpo goat anti-chicken IgY-HRP (Santa Cruz BIOTECH), diluido 1/2,000 en PBST durante 2 h a T.A. Transcurrido el tiempo se lavó nuevamente los pozos con 100 µl PBST y se adiciono 50 µl en cada pozo de ABTS [2,2- Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid)]. Se incubó por 5 minutos a T.A. y se detuvo la reacción con 20 µl de ácido sulfúrico 2 N, para leer a una densidad óptica se lee a 415 nm en el lector de placas iMark^{TMf6} Microplate Reader (Bio-Rad). Tabla 3.

7.9. ELISA indirecta para la identificación de IgYs anti-GP5 h y selección de candidatos para producción de biblioteca de cDNA

Se pegaron la Ag GP51, GP52, GP53 y PRRSV vacunal (PRRSVv), a una concentración de 150 ng/pozo en placa de 96 pozos utilizando 90 µl de buffer de carbonatos e incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa 5 veces con PBST, posteriormente se pasó a bloquear la placa con 3% de leche descremada (Bio-Rad) en PBST durante 2 h a T.A. Para nuevamente lavar 5 veces los pozos con PBST, adicionar la dilución 1:2,000 de la IgY obtenidas a los 15 y 30 días pos inmunización e incubar por 2 h a T.A. al transcurrir este tiempo se lavó 5 veces los pozos con PBST, para adicionar el anticuerpo goat anti-chicken IgY-HRP (1:2,000) e incubar a T.A. por 1 h. La placa se lavó por última vez 5 veces con PBST y se adicionan 50 µl de la solución sustrato ABTS (Sigma Aldrich) y leer a una densidad óptica de 415 nm usando microplater reader (Bio-Rad). Los resultados obtenidos se pueden observaren los siguientes graficados para observar la afinidad de las IgY's anti-GP5.

7.10. ELISA indirecta para la identificación de PRRSVV con IgYs obtenidas

Se pegaron la Ag PRRSV vacunal (PRRSVV), 10 µl en placa de 96 pozos utilizando 90 µl de buffer de carbonatos e incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa 5 veces con PBST, posteriormente se pasó a bloquear la placa con 3% de leche descremada (Bio-Rad) en PBST durante 2 h a T.A. Para nuevamente lavar 5 veces los pozos con PBST, adicionar la dilución 1:1,000 de la IgY's obtenidas, anti-GP51, anti-GP53 y anti-PRRSVV e incubar por 2 h a T.A. al

trascorrir este tiempo se lavó 5 veces los pozos con PBST, para adicionar el anticuerpo goat anti-chicken IgY-HRP (1:2,000) e incubar a T.A. por 1 h. La placa se lavó por última vez 5 veces con PBST y se adicionan 50 µl de la solución sustrato ABTS (Sigma Aldrich) y leer a una densidad óptica de 415 nm usando microplater reader (Bio-Rad).

7.11. ELISA indirecta para la identificación de PRRS silvestre

Se pegaron a la placa de 96 pozos 5 µl 3 de muestras de suero total de cerdo positivas a PRRSV (analizadas por dos laboratorios externos), muestra 2, 8 y 10, de cada uno respectivamente en un pozo por triplicado con 90 µl de buffer de carbonatos e incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa 5 veces con PBST, posteriormente se pasó a bloquear la placa con 3% de leche descremada (Bio-Rad) en PBST durante 2 h a T.A. Para nuevamente lavar 5 veces los pozos con PBST, adicionar la dilución 1:500 de las IgY's anti-GP51, anti-GP52, anti-PRRSVv e IgY's pre-inmunización (Control), después incubar por 2 h a T.A. al trascorrir este tiempo se lavó 5 veces los pozos con PBST, para adicionar el anticuerpo goat anti-chicken IgY-HRP (1:2,000) e incubar a T.A. por 1 h. La placa se lavó por última vez 5 veces con PBST y se adicionan 50 µl de la solución sustrato ABTS (Sigma Aldrich) y leer a una densidad óptica de 415 nm usando microplater reader (Bio-Rad). Los resultados obtenidos se pueden observaren en la gráfica, donde se logra observar la afinidad de las IgYs con respecto a las muestras de suero de cerdos enfermos.

7.12. Ligación de Vector

Se recortó el fragmento del gel y se realizó la técnica de gene clean para limpiar el vector, y realizar la ligación con ligasa a temperatura ambiente por 2 horas para posteriormente utilizarlo para la transformación bacteriana.

7.13. Obtención de DNA genómico (Gene Clean)

Una vez que se recortaron las bandas seleccionadas del gel de agarosa se adicionó 300 µl de NaI (6M) para cada banda, se agitó en vortex y se incubó 5 minutos a 55°C para posteriormente centrifugarlo a 5,000 rpm por 15 segundos, se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 40 µl de microsilica (gene clean), se mezcló y se incubó 15 minutos en hielo mezclando cada minuto por inversión, para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm por 30 segundos, se decantó el sobrenadante para re suspender el precipitado obtenido en 300 µl de solución de lavado New wash

(50 ml de etanol, 50 ml de agua conteniendo: 20 mM de Tris, Ph 7.4; 1 mM de EDTA; 0.1 M de NaCl), para centrifugar a 12,000 rpm por 30 segundos, para resuspender el precipitado en 20 µl de agua e incubar por 5 minutos a 55°C, para después centrifugar a 12,000 rpm por un minuto y recuperar el sobrenadante el cual contiene el DNA, nuevamente se re suspendió el precipitado en 20 µl de agua se encubó por 5 min a 55°C y se recuperó el sobrenadante para juntarlo con el recuperado anteriormente una vez obtenido el DNA de interés se procedió a realizar la ligación.

8. RESULTADOS y DISCUSIÓN

8.1. Concentración Abs obtenidos en yema y suero

Se recolectaron huevos y sangre total preimmune de las gallinas, se separó el suero de la sangre total y se purificó IgY de la yema de huevo utilizando solución de delipidación, para posteriormente determinar la concentración de IgY en ambas muestras utilizando el método de Bradford e intrapolando las absorbancias obtenidas en la curva de BSA para calcular las concentraciones de proteína total en ambas muestras. Se pueden observar en la siguiente tabla que la concentración de Abs (IgY) en el aislamiento de yema es mayor a la obtenida en suero.

Tabla 5. Concentración de IgY a partir de yema de huevo y suero determinada por espectrofotometría en el lector de placas iMark TMf6 Microplate Reader (Bio-Rad).

Comparativa de obtención de Abs en gallina				
	IgY suero		IgY yema	
µg/µl	1.62	0.79	2.48	1.33

Los Abs obtenidos por precipitación con sulfato de amonio al 50% y 30% de saturación, no proporcionan Abs completamente puros, sin embargo, la cantidad obtenida es de 49.6 mg/ml (realizando la conversión) es inferior a la obtenida por el Kit comercial IgY Purification, el cual resulta ser un método relativamente costoso pero eficiente y ventajoso al reducir el tiempo de extracción, ya que utilizando este producto se puede llegar a obtener de 80-120 mg/ml como lo

indica en la información disponible en su página (Thermo Fisher Scientific Inc. 2022). Sin embargo, comparando el rendimiento obtenido es superior a los publicados en estudios similares como lo es el de J. Pinto que logro obtener anticuerpos policlonales IgY anti-parvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina utilizando método delipidación, logró en sus resultados alcanzar un rendimiento de 21.7 mg/ml, determinada por el método de Bradford (Pinto, 2005). Esto también nos permite comprobar lo publicado en el artículo de Tressler, ya que afirma que se pueden obtener más de 100 mg de IgY purificada de un solo huevo (Tressler y Roth, 1987). Lo cual nos indica que los Abs IgY tienen como ventaja sobre los Abs IgM una producción mayor, de alto rendimiento, fácil de conservar, un método económico y se evita el sangrado constante de los animales.

8.2. Identificación de integridad de IgYs

Para determinar la integridad de la proteína extraída del huevo y analizar si en su mayoría es IgY, se empleó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5% según la metodología descrita por Laemmli (1970). Se colocaron 5, 3 y 1 μ l (cantidades según el Bradford) del concentrado obtenido de proteína total de yema respectivamente en cada pozo, con buffer de carga 1X reductor, y como control se usó BSA. La electroforesis fue hecha en una cámara Hoefer a 100 V, por una hora a 22°C; finalmente, las proteínas fueron reveladas por tinción del gel con Coomassie blue R-250 de SIGMA®.

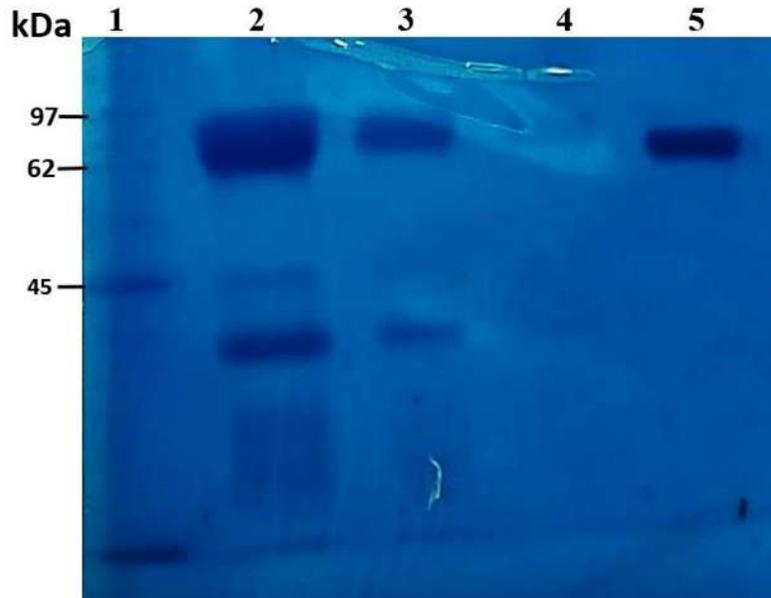


Figura 10. Fotografía de Electroforesis IgY en gel de acrilamida 12.5%. 1: Marcador de peso molecular; 2: Cadena ligera 25 kDa y pesada 77 kDa en 5 µl de concentrado obtenido por método de delipidación; 3: Cadena ligera 25 kDa y pesada 77 kDa en 3µl de concentrado obtenido por método de delipidación; 4: Cadena ligera 25 kDa y pesada 77 kDa en 1 µl de concentrado obtenido por método delipidacion; 5: 2 µl BSA.

Se observan dos bandas características a una altura aproximada de 77 y 25 kDa que corresponderían con las cadenas pesada y ligera de la IgY, como también se indica en la literatura (Gregory *et al.*, 1995), obteniendo así un precipitado limpio del resto de las proteínas solubles casi en su totalidad.

8.3. Determinación de título de IgYs totales en yema y suero

Una vez obtenidos los Abs por separado en suero y yema, para cada gallina inmunizada, se pegó a la placa de 96 pozos por triplicado, diluciones 1:1,000 y 1:2,000 de cada muestra, se realizaron los lavados correspondientes y se agregó goat anti-chicken IgY-HRP (1:2,000), se incubo a T.A. por 1 h. La placa se lavó 5 veces con PBST y se adicionan 50 µl de la solución sustrato ABTS (Sigma Aldrich) y leer a una densidad óptica de 415 nm usando microplater reader (Bio-Rad), para determinar por ELISA el título al que se obtienen los Abs.

Tabla 6. \bar{x} de las absorbancias obtenidas por espectrofotometría. Control negativo (IgG)

Absorbancias obtenidas de IgYs totales en yema y suero	
Muestra	\bar{x} Absorbancias obtenidas
Control negativo	0.057
IgY de suero dilución 1:1,000	0.372
IgY de yema dilución 1:1,000	0.921
IgY de suero dilución 1:2,000	0.231
IgY de yema dilución 1:2,000	0.523

El método de delipidación aplicado a la yema de huevo en este trabajo resultó eficiente y no produjo daño alguno sobre la proteína de interés ya que logra ser reconocida por el Abs secundario, teniendo así la ventaja de no requerir ambientes exigentes, proporcionando un método que puede ser ocasionalmente utilizado en casos de no requerirse una alta pureza de la proteína sustituyendo así el Kit comercial EGGstract IgY, También se puede observar que el título obtenido de los Abs 1:2,000 utilizando este método, logra ser mayor que los publicados en la literatura como es el caso de Pinto que mediante su método logró obtener un título de IgY anti-CPV de 1:1,024, medido por el método de inhibición de la hemoaglutinación (IH) y cabe resaltar que esta concentración le permitió llegar a resultados satisfactorios en su trabajo (Pinto, 2005.)

8.4. Producción de anticuerpos

Producción de IgY anti-GP51, anti-GP52, Anti-GP53 y anti-PRRSVv, si bien el objetivo del presente trabajo es la producción de Abs de los epitopes encontrados en GP5, se decidió producir IgY anti-PRRSVv esperando la producción de Abs policlonal; Para cada antígeno se inoculo una gallina (raza Leghorn), sanas y libres de Abs de reconocimiento a GP5. Por cada evento de inmunización se inoculó un volumen final de 400 μ l (200 μ g) de inmunógeno con adyuvantede Freund, se dió seguimiento a la producción de Abs mediante recolección de huevo para su posterior aislamiento de IgY. Una vez obtenidos los Abs por separado para cada gallina inmunizada, se pegó a la placa de 96 pozos el péptido utilizado en la inmunización respectivamente para evaluar si los Abs lograban el reconocimiento al péptido o virus respectivamente y así poder determinar el título serológico máximo de reconocimiento para IgY anti-GP51, anti-GP52, anti-GP53 y anti-PRRSVv esto se determinó por ELISA (por triplicado).

Tabla 7. Evaluación de obtención de título de IgY de gallina en el día 0, 15 y 30. Pre- inmune (Control negativo).

Evaluación de reconocimiento al antígeno utilizado en inmunización				
	Titulo máximo de Abs para reconocimiento de antígeno inmunizador			
Abs	GP51	GP52	GP53	PRRSVv
Pre-inmune	0	0	0	0
Día 0	0	0	0	0
Día 15	1:500	1:500	1:200	1:500
Día 30	1:2000	1:1000	1:200	1:2000
Día 45	1:1000	1:500	0	1:2000

Se observa en los resultados de la producción de Abs que los péptidos GP51 y GP52, mostraron un aumento significativo de los Abs totales a los 15 días pos-inmunización, después a los 30 días se presentó un aumento en los títulos de IgY, esto coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos (Chacana, 2004). Particularmente se observa mejor reconocimiento por parte de anti-GP51, anti-GP52 y anti-PRRSVv, dando altos títulos de anticuerpos en yema de huevo (1:2,000), que logran el reconociendo al antígeno utilizado en la inmunización respectivamente, lo cual no sucede en el caso de los anti-GP53, Además los resultados nos indican que los péptidos GP51 y GP52 son inmunogénicos e inducen la producción de Abs específicos en gallina partir del día 30 post-inmunización, esto concuerda con estudios previos en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología donde se evaluó la inducción de Abs contra estos epítomos en ratones, y se logró observar una respuesta específica de Abs al péptido GP51 (GP5-B) Y GP52 (GP5-T), a partir del día 30 y 45 post inmunización en ratones (Pérez Durán, F. 2020; datos no publicados).

8.5. Evaluación de Abs monoclonales y policlona para reconocimiento a PRRSVv

Para determinar la capacidad de reconocimiento al virus vacunal por parte de los Abs anti-G51, anti-GP52 y anti-PRRSVv se utilizó el método de ELISA donde se probaron varios títulos de Abs y se reportó el título mayor con el cual se lograba reconocer al virus vacunal.

Tabla 8. Evaluación de reconocimiento por parte de IgY de gallina a el virus vacunal. Control negativo (Pre-inmune).

Evaluación de reconocimiento al virus vacunal.	
Abs	Título Abs máximo de reconocimiento.
tAbs GP51	1:1000
Abs GP52	1:500
Abs GP53	0
Abs PRRSVv	1:1000
Control (IgY pre-inmunización)	0

Los resultados obtenidos muestran que anti-GP51, anti-GP52 y anti-PRRSVv logran un mayor reconocimiento que anti-GP53, también se observa que anti-GP51 y anti-PRRSVv logran un mayor reconocimiento que anti-GP52, por parte de anti-PRRSVv esto no sorprende debido a que este posee la proteína GP51 en su cápside, sin embargo, lo que sorprende es que anti-GP51 logra igualar el resultado lo cual resulta interesante que a pesar de que solo están sintetizados de una fracción de la proteína GP5, logre el reconocimiento de la proteína GP5 y del virus completo, siendo así GP51 un péptido más inmunogénico. Los resultados muestran que de manera específica podemos predecir a través de bioinformática ciertas secuencias de aminoácidos que nos permitan inducir una respuesta mediada por células o por anticuerpos.

8.6. Reconocimiento del virus silvestre (nacional) por Abs monoclonales y policlonales IgY

Para determinar la capacidad de reconocimiento al virus silvestre se utilizaron 3 muestras proporcionadas por Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita, recolectadas de una granja cercana al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, las cuales fueron analizadas por el mismo equipo de trabajo y dos laboratorios externos, que dictaminaron que las muestras son positivas a PRRSV. Para el análisis se utilizaron estas muestras en dilución 1:500 y los Abs anti-G51, anti-GP52, Anti-

GP53 y anti-PRRSVv en título 1:500, se evaluó por método de ELISA donde se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 9. Evaluación de reconocimiento a muestras de suero de cerdos enfermos por parte de Pre- inmune (Control negativo). (+):se logró detectar al virus silvestre nacional; (-): no se logró detectar al virus silvestre nacional.

Evaluación de reconocimiento al virus silvestre.			
Suero de animal enfermo	Muestra 2	Muestra 8	Muestra 10
Abs GP51	+	+	+
Abs GP52	+	+	+
Abs Gp53	-	-	-
Abs PRRSVv	+	+	+
Control (IgY pre-inmunización)	-	-	-

Se observa que los Abs anti-G51, anti-GP52 y anti-PRRSVv logran el reconocimiento del virus silvestre, lo cual indica que estos podrían ayudar en el diagnóstico del mismo, Se requieren experimentos adicionales para comprobar especificidad, afinidad y capacidad neutralizante de los anticuerpos a través de ensayos de microneutralización. Los resultados obtenidos aportan conocimiento nuevo que puede favorecer el desarrollo y optimización de modelos vacúnales, así como el estudio de proyectos biológicos dirigidos selectivamente contra un epítipo en un agente viral. De tal manera que se pueda avanzar en la formulación de vacunas mejoradas y especializadas, así logrando superar a las vacunas clásicas que funcionan con modelos de virus o bacterias completos. Cabe destacar que en algunas vacunas de virus atenuados se ha reportado que los virus se pueden remontar al patógenos en estado silvestre. En el caso de las partículas como las proteínas de PRRSV, no son capaces por si solas de inducir cierta inmunosupresión sobre el animal según lo reportado por Prieto y colaboradores en 2011. Como se mencionó anteriormente con estos últimos resultados de los Abs obtenidos se refuerza que podemos predecir a través de bioinformática ciertas secuencias de aminoácidos que nos permitan inducir una respuesta mediada por células o por anticuerpos. Estos resultados nos proporcionan información valiosa sobre la

relación entre la inmunodominancia de péptidos de GP5 y la respuesta inmune antiviral para guiar el desarrollo de vacunas o terapias contra el PRRSV.

8.7. Producción de bibliotecas de cDNA

Al analizar los resultados se confirmó que los mejores candidatos para la producción de bibliotecas de cDNA, son anti-GP51, anti-GP52 y anti-PRRSVv. Para la construcción de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), se partió del aislamiento del ARN total del bazo de una gallina, una vez obtenido se analizó la integridad del mismo en gel de agarosa al 0.8%.

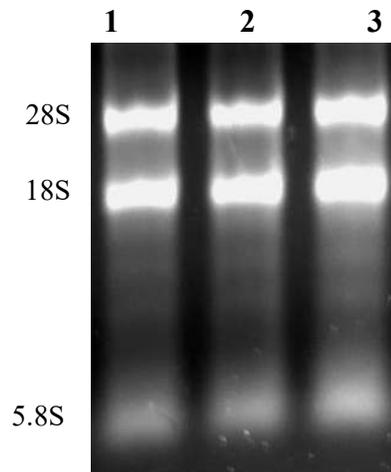


Figura 11. Fotografía de electroforesis de RNA de gallina en gel de acrilamida 0.8 %. Carril 1: RNA obtenido de gallina inmunizada con GP51; 2: RNA obtenido de gallina inmunizada con GP52; 3 RNA obtenido de gallina inmunizada con PRRSVv.

Seleccionamos el bazo como nuestro material de partida para la extracción, así mismo se realizó en otros trabajos como es el caso de Saggy donde realizó la misma técnica obteniendo un buen resultado en su extracción (Saggy et al. 2012), procediendo al análisis de la integridad, en el cual se lograron observar las 3 bandas esperadas, una vez comprobada la integridad del RNA, se procedió a sintetizar el cDNA de cadena sencilla para generar una biblioteca con fragmentos de ADN codificantes de scFv en el vector fagémido pComb3X.

8.8. Amplificación de cadena ligera scFV por PCR

A partir del cDNA se amplificaron los genes de las cadenas ligeras por PCR (Invitrogen). Las concentraciones óptimas de reactivos para la reacción de PCR fueron las siguientes: Buffer 1X; MgCl₂ 1.5 mM; dNTPs 0.2 mM; Taq polimerasa Puf (Invitrogen); oligonucleótidos 1 µl de cada uno; templado 0.5 µl cADN, completando con agua bidestilada para un volumen final de 50 µl, el programa fue el siguiente:

Tabla 10. Programa para PCR cadena ligera en termociclador.

Temperatura	Tiempo
94°C	1 minuto
94°C	30 segundos
56°C	30 segundos
72°C	50 segundos
72°C	10 minutos
6°C	∞

} 45 ciclos

Tabla 11. Secuencia del par de oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena ligera scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.

Oligo	Secuencia
CSCVK	GTGGCCCAGGCGGCCCTGACTCCGTCCTCGGTGTC
CKJo-B	GGAAGATCTAGAGGACTGACCTAGGACGGTCAGG

8.9. Amplificación de cadena pesada scFV por PCR

A partir del cDNA se amplificaron los genes de las cadenas pesadas por PCR (Invitrogen). Las concentraciones óptimas de reactivos para la reacción de PCR fueron las siguientes: Buffer 1X; MgCl₂ 2.0 mM; dNTPs 0.2 mM; Taq polimerasa Puf (Invitrogen); oligonucleótidos 1 µl de cada uno; templado 0.5 µl cADN, completando con agua bidestilada para un volumen final de 50 µl, el programa fue el siguiente:

Tabla 12. Programa para PCR cadena pesada en termociclador

Temperatura	Tiempo	
94°C	1 minuto	
94°C	30 segundos	} 45 ciclos
56°C	30 segundos	
72°C	50 segundos	
72°C	10 minutos	
6°C	∞	

Tabla 13. Secuencia de los 2 oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena pesada scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.

Oligo	Secuencia
CSCVHo-F	GGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAG
CSCG-B	CTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGGAGACGATGACTTCGGTCC

A partir de cDNA, se obtuvieron los fragmentos correspondientes al tamaño esperado de 350 pb para el fragmento cadena ligera, y 400pb para el fragmento correspondiente a la cadena pesada.

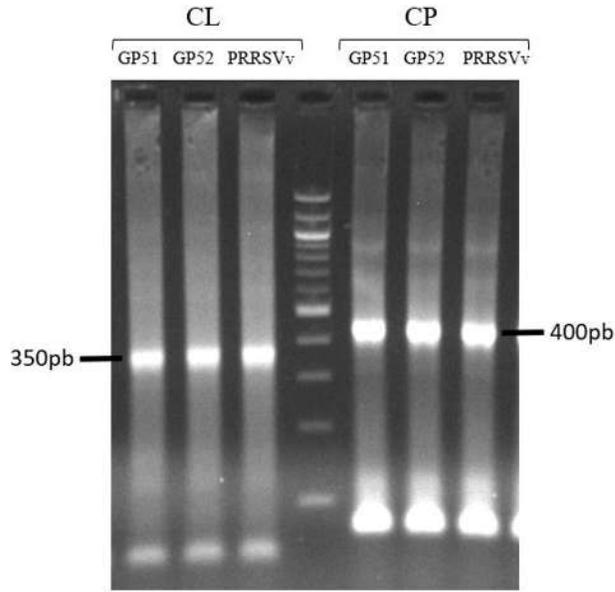


Figura 12. Fotografía de PCR de cadena ligera y pesada IgY en gel de agarosa al 1.5% (1.5mM MgCl) con Taq phusion utilizando cDNA para Amplificación de cadena ligera 350pb y cadena pesada 400pb. Carril 1, 2 ,3: Cadena ligera respectivamente; 4: M 100pb; 5,6,7: Cadena pesada respectivamente.

8.10. PCR de fusión de cadena ligera y pesada scFV

Una vez que se corroboraron los tamaños de los fragmentos, se realizó el solapamiento de ambos fragmentos, para generar un solo fragmento mediante una reacción de PCR (Invitrogen). Se utilizó el siguiente programa:

Tabla 14. Programa de temperaturas para el termociclador para fusión de cadenas.

Temperatura	Tiempo
94°C	5 minutos
94°C	15 segundos
56°C	15 segundos
72°C	2 minutos
72°C	10 minutos
6°C	∞

} 35 ciclos

Secuencia de oligo primer utilizados en PCR de fusión.

Tabla 15. Secuencia de los 2 oligos primer utilizados en la amplificación de la cadena pesada scFV para la producción de las bibliotecas de cDNA.

Oligo	Secuencia
CSC-F	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCCCTGACTCAG
CSC-B	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGG

Se generó el fragmento scFv de 750 pb, lo cual coincide con lo descrito en manual de Carlos Barbas (Barbar, 2001).

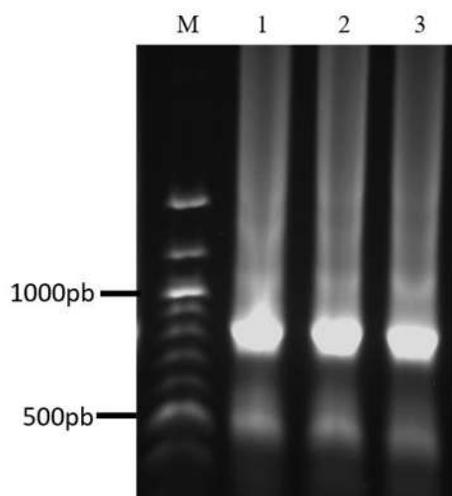


Figura 13. fotografía de gel de agarosa al 1.5% de fusión por PCR de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos de gallina. Carril 1: Marcador; 2: fusión GP51; 3: fusión GP52; 4: fusión PRRSVv.

Se aprecia en la imagen la obtención de scFv de 750 pb. El resultado de este experimento en particular es poder conservar y utilizar los Abs en estudios futuros sin necesidad de volver a inmunizar a las gallinas, por lo que se realizó la producción de las bibliotecas de cDNA. Lo cual queda demostrado con estos resultados es posible como indica Carlos Barbas en su libro los genes variables codifican los anticuerpos y es posible obtener esta información extrayendo el bazo, (Barbas, 2001). Y se puede concluir tras la experimentación, la obtención de las 3 bibliotecas de cDNA propuestas al inicio de esta investigación, proporcionando este material para futuras investigaciones.

8.11. Digestión del plásmido por restricción de enzimas

La digestión del vector pComb3X y de los scFv's se realizó con una mezcla de reactivos para la digestión con la enzima *SfiI*, la cual reconoce la secuencia de 8 pares de bases GGCCNNNNNGGCC, cortando en el sitio de restricción. La utilización de sitios palindromes imperfectos 5'(GGCCCAGG ↓ CGGCC) y 3'(GGCCAGGC ↓ CGGCC) únicos para *SfiI*, permite la correcta orientación. Condiciones para la amplificación del overlap de los fragmentos, para la construcción de la biblioteca scFv de gallina (Barbar, 2001). Para clonar los genes del fragmento scFv en el vector pComb3X, se realizó 1 reacciones de digestiones con la enzima *SfiI* para el vector pComb3x, a las condiciones de 50°C por 4 horas, siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante. Los fragmentos esperados se corroboraron por medio de un gel de electroforesis, obteniendo tres fragmentos en lugar de solo dos como nos indica la técnica esto debido al mal rendimiento de la enzima *SfiI* dejando gran parte del vector sin cortar, es necesario utilizar esta enzima a pesar de su mal rendimiento ya que el sistema funciona solo con el corte generado por la misma, una vez analizado esto se recortó del gel el fragmento de 3,500 pb para realizar la transformación bacteriana.

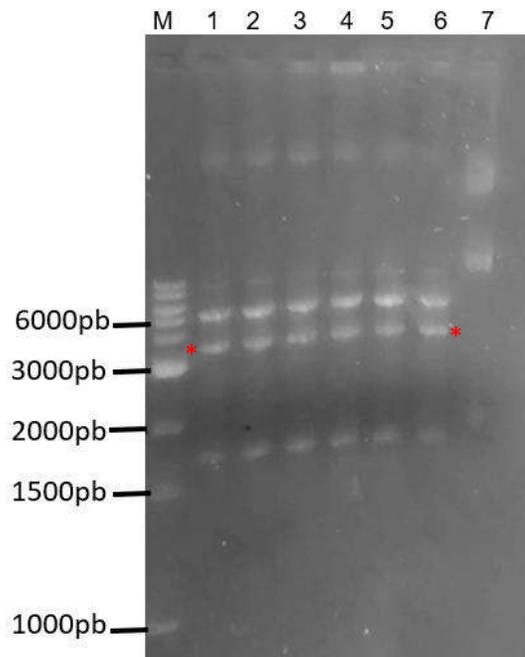


Figura 14. Fotografía de electroforesis de la digestión enzimática del vector pCom3X. Carril 1 marcador 1kb, carril 1, 2, 3, 4, 5 y 6 digestión de pCOMB3X utilizando enzima *Sfi*I y carril 7 pCom3X sin cortar. En gel de agarosa 0.8 %.

8.12. Transformación bacterias *E. coli* 2738

la transformación bacteriana se realizó por electroporación, utilizando un pulso y un voltaje de 1,010 V y dejando toda una noche crecer las bacterias en medio con tetraciclina, al obtener 147 colonias se demostró que efectivamente el fragmento de 3,500 pb nos permite transformar las bacterias y que estas adquieran la resistencia a tetraciclina, dejando así todo el material biológico listo para producir las bibliotecas de Abs scFv que se expresaran como fusiones con la proteína de la cubierta del gen III (pIII) de la superficie del fago, como se describió por primera vez por Smith (1985).

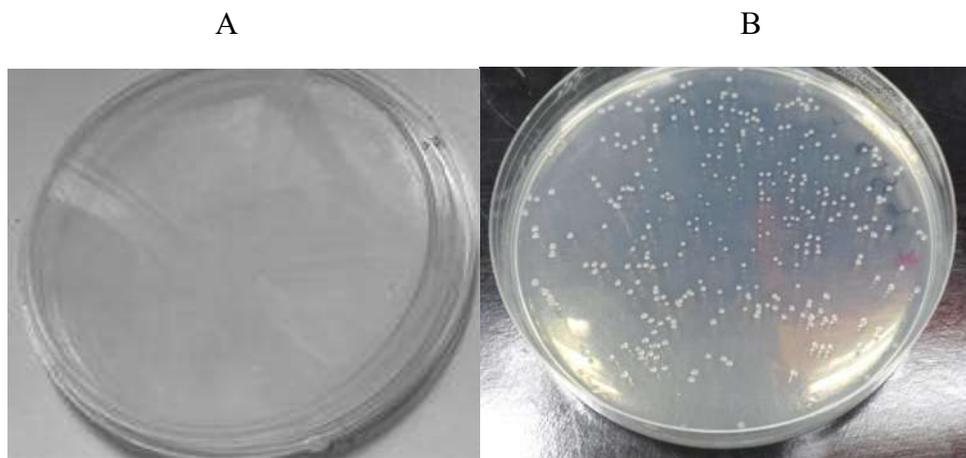


Figura 15. fotografía de placas agar LB tetraciclina sembradas con bacteria transformada con vector pCom3X. A: Control negativo; B: Placa LB tetraciclina con 147 colonias de *E. coli* 2738 transformadas con pCom3X.

9. CONCLUSIONES

1. En el presente proyecto la metodología empleada para la producción de Abs IgY contra PRRSV es eficiente y económica.
2. Los péptidos diseñados a partir de predicciones *in silico* de epítomos lograron inducir la respuesta inmune.
3. Las gallinas inmunizadas con GP51, GP52 y PRRSVv generaron Abs específicos, alcanzando títulos significativos a los 30 días post-inmunización.
4. Los Abs generados logran el reconocimiento de la molécula utilizada en la inmunización.

5. Los Abs generados logran el reconocimiento del virus vacunal y silvestre.
6. Los Abs se indujeron de manera más exacerbada contra el péptido GP51 y PRRSVv, lo cual sugiere que estos podrían ser inmunodominante.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamo, M. (2014). *Virología Médica In Vivo*. Primera edición. 434-436.
2. Alarcón C, Hurtado H, Castellanos J (2000). Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica* 338-43.
3. Aranda, M. B., & Sabalette, K. B. (2019). Terapias biológicas del cáncer: un enfoque a favor de la accesibilidad. *Revista de Salud Pública*, 1-7.
4. Arias M, Barceló J, Muñoz A, Sánchez-Vizcaíno JM. (2011) Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino. Sánchez-Vizcaíno JM editor. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas [en línea]. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>
5. Ausubel, F. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology*. Second Edition. New York: Green Publishing Associates Ed
6. Ayala, V. S., & Piedra, A. L. (2007). Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. *Médicas UIS*, 20(1).
7. Barbas C., (2001). *Phage Display: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York 9.9-9.11.
8. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. (2004). Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *Journal of Swine Health and Production*, 12,170-174.
9. Berger, M., Shankar, V., & Vafai, A. (2002). Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *The American journal of the medical sciences*, 324(1), 14-30.
10. Bobadilla Soto, E. E., Espinoza Ortega, A., & Martínez Castañeda, F. E. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(3), 251-268.
11. Bona, C. A., & Bonilla, F. A. (2019). *Textbook of immunology*. CRC press.
12. Brüggemann, M., Caskey, H. M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G. T., Surani, M. A., & Neuberger, M. S. (1989). A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (17), 6709-6713.
13. Carballal, G., & Oubiña, J. (2015). *Virología Médica*. Cuarta edición. 7-90.
14. Carmichael L. (2009). *Recent advances in canine infectious diseases*. New York: Ed. Ithaca, 88-97.
15. Carvajal, K. B., Carrillo, G. H., Mata, R. M., Mora, K. R., Sánchez, B. Y. A., & Román, J. J. M. (2019). Anticuerpos monoclonales biespecíficos: desarrollo, producción y uso como terapia a anticancerígena. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 13(1), 19-19.

16. Chacana PA, Terzolo HR, Gutiérrez Calzado E, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Revista de medicina veterinaria*, 85: 179-189 (2004).
17. Chacana, P. A.; Terzolo, H. R.; Gutiérrez Calzado, E.; Schade, R. (2004). Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Revista de Medicina Veterinaria* 85 (5): 179-189.
18. Conservation Institute, Madison, WI. 1990, 29-31.
19. Díaz, I. (2006). Caracterización de la respuesta inmune de lechones durante la infección y tras la vacunación con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. *May*, 121.
20. Dortmans JCFM, ButerGJ, Dijkman R, Houben M, & Duinhof TF. (2019). Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016. *PLOS ONE*, 14(6).
21. Enjuanes, (2017). Anticuerpo monoclonal de PRRSV EU GP5, Centro Nacional de Biotecnología. CSIC M.J. Rodríguez et al. *J. Gen.* Vol. 82 no. 5 995-999
22. FAO, (2010). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Base de datos estadísticos 2000-2008. [En Línea] México. Disponible en: www.fao.org.
23. Ferrari, L. (2010). Evaluation of the immune response induced by intradermal vaccination. *Research in Veterinary Science*, 1-8.
24. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR and Skalka AM. (2004). Principles of virology Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. ASM Press, Washington , DC, USA.
25. Flores-Mendoza, Hernández, J. (2010). Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Veterinaria México*, 41(2), 139-159.
26. Flores-Mendoza, L., & Hernández, J. (2010). Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Veterinaria México*, 41(2), 139-159.
27. González-Figueredo J, Rajme-Manzur D, Negrin-Thomson G, et al. (2015). Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino y evaluación en un sistema de aglutinación con látex. *VacciMonitor* 98-104.
28. Gutiérrez Rodríguez, N. (2016). La inmunoterapia con anticuerpos monoclonales y sus derivados.
29. Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, Hirose O, & Gojobori T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 22(4), 1024–1031.
30. Hill H. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility respiratory
31. INEGI, /2011). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo Agrícola, Ganadero . [En Línea] México. Disponible en: www.inegi.org.mx.
32. Kappes, Matthew A., and Kay S. Faaberg. (2015). “PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity.” *Virology* 479–480

33. Larsson A, Bålöw RM, Lindahl T, Forsberg PO. (2003). Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry Science*; 1807-12.
34. López, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 155-163.
35. López-Heydeck SM, Alonso-Morales RA, Mendieta-Zerón H, & VázquezChagoyán JC. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1).
36. Lösch, U.; Schraner, I.; Wanke, R.; Jürgens, L. (1986). The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B* 33: 609-619.
37. Lunney, Joan K. Et al. (2016). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System." *Annual Review of Animal Biosciences* 4(1), 129–54.
38. Machado, N. P., Tellez, G. A., & CASTAÑO, J. C. (2006). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. *Infectio*, 10(3), 186-197.
39. Macías MJ, Plascencia G, Osorio F, Saavedra A, Reyes J, & Hernández J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). *Veterinaria México*, 37(2), 197–208.
40. MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2016). *Fenner's Veterinary Virology*. 5.
41. Martínez-Barroso G, Williams JJ, Anzina-López A. (2002) Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino dentro de granjas porcinas del estado de Yucatán, México. *Veterinaria México*, 33(4), 1-11.
42. Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, & Lum MA. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Archives of Virology*, 140(4), 745–755.
43. Mohammed, S.M.; Morrison, S.; Wims, L.; Trinh, K.R.; Wildeman, A.G.; Bonselaar, J.; Etches, R.J. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4, 115-125.
44. Morilla, A. (2003). Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencias Veterinarias*, 197–227.
45. Morrison SL; Mohammed SM; Wims, L.A.; Trinh, R.; Etches, R., (2001). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.* 38, 619-625.
46. Murthy AMV, Ni Y, Meng X, & Zhang C. (2015). Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8382–8396.
47. Neumann, E. J., J. B. Kliebenstein, et al. (2005). "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States." *J Am Vet Med Assoc* 227(3): 385-92.
48. Osorio, F. A. (2010). Principales Enfermedades Virales Porcinas Emergentes y Reemergentes a Nivel Mundial: Estatus.

49. Palma García, A. F., & Real Ulloa, O. D. (2009). Seroprevalencia del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en cerdos de tres granjas de la ciudad de León en el año 2008. 3-10.
50. Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology*, 11(1), 331-360.
51. Pérez Durán, F. (2020). Evaluación de la respuesta inmune contra subunidades proteicas del virus PRRS en un modelo murino (Tesis posgrado). Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo
52. Peña, C., & Faúndes, N. (2018). Introducción a la Virología I. *Boletín Micológico*, 33(2), 10-16.
53. Pinto, J., Barco, M., Afanador, M. C., Merchán, A. M., Montañez, M. F., Andrade, F., & Torres, O. (2005). Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 37-44.
54. Popescu LN, Tribble BR, Chen N, & Rowland RRR. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology*, 209, 90-96. Rivera, C. M. P. (2014). Importancia de *Mycoplasma hyopneumoniae* como potenciador de la acción de otros patógenos implicados en el Complejo Respiratorio Porcino. 1–98.
55. Roberto, C. P. (2019). La Virología y sus grandes acontecimientos. *Espirales Revista Multidisciplinaria de investigación*, 3(28), 201-210.
56. Salinas-Meléndez JA, Lara-Arias J, Flores-Andrade H, Ávalos-Ramírez R, Zárate-Ramos JJ, Riojas-Valdés V, Segura-Correa JC. (2008). Presencia de animales seropositivos al síndrome reproductivo y respiratorio porcino en Nuevo León. *Veterinaria México*, 39(2), 215-221.
57. Schade R.; Zhang, X. & Terzolo H.R. (2007). Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: *Bioactive Egg Compounds*. R. Huopalahti, R. Lopez-Fandiño, M. Anton & R. Schade (Eds.). Springer, Germany. ISBN 978-3-540-37883. Chapter 23, 213-222.
58. Schade, R.; Behn, I.; Erhard, M.; Hlinak, A.; Staak, C. (2000). *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application. IgY-Technology*. (Ed) Springer, Lab Manuals, Berlin Heidelberg, New York pp. 255.
59. Schade, R.; Gutierrez Calzado, Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and in human and veterinary medicine. *ATLA* 33 (2): 129-154.
60. Secretaria de Desarrollo Rural y Agroalimentario. Coordinación General de Comunicación Social. Obtenido de Coordinación General de Comunicación Social: <http://sedrua.michoacan.gob.mx/destaca-sedrua-importancia-de-la-porcicultura-para-el-desarrollo-de-michoacan/>).
61. Segundo-Arizmendi, N., Hernández-Baltazar, E., Villegas, O., & Torres-Angeles, O. (2015). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia).

62. Shi M, Lam TTY, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RKH, Leung FCC. (2010). Phylogeny-Based Evolutionary, Demographical, and Geographical Dissection of North American Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Journal of Virology*, 84(17), 8700–8711.
63. Sierra N, Ramírez R, & Mota D. (2000). Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 3(5), 1–6.
64. Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–15.
65. Smith, J., Kontermann, R. E., Embleton, J., & Kumar, S. (2005). Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *The FASEB journal*, 19(3), 331-341.
66. Sompayrac, L. (2002). *Cómo funcionan los virus patógenos*. Jones y Bartlett Learning.
67. Sun, S.; Mo, W.; Ji, Y.; Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 708-712.
68. syndrome). In: *Proc Mystery Swine Disease Committee Meet 1990*, Denver, CO. Livestock
69. Thaa, B., Sinhadri, B. C., Tiesch, C., Krause, E., & Veit, M. (2013). Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PLoS one*, 8(6).
70. Thermo Fisher, (2017). PrioCHECK™ Porcine PRRSV Ab Strip Kit, N.º de Pub. MAN0013936.
71. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF. (2007) Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE* 2(6).
72. Vashisht, Kapil et al. (2008). “Identification of Immunodominant T-Cell Epitopes Present in Glycoprotein 5 of the North American Genotype of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Vaccine* 26(36): 4747–53.
73. Wang PP, Dong JG, Zhang LY, Liang PS, Liu YL, Wang L, Song CX. (2016). Sequence and Phylogenetic Analyses of the Nsp2 and ORF5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boars from South China in 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–12.
74. Wang, C. et. al. (2010). Phylogenetic analysis and molecular characterization of seven variants Chinese field isolates of PRRSV. *BMC Microbiology*. 10: 146.
75. Wissink EHJ, Kroese MV, van Wijk HAR, Rijsewijk FAM, Meulenberg JJM, & Rottier PJM. (2005). Envelope Protein Requirements for the Assembly of Infectious Virions of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, 79(19), 12495–12506.
76. Woolley, J.A.; Landon, J. (1995). Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J. Immunol. Meth.* 178: 253-265.
77. Yang, Yulin et al. (2015). “Induction of ROS Generation and NF- κ B Activation in MARC-145 Cells by a Novel Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Southwest of China Isolate.” *BMC Veterinary Research*: 1–10.

78. Zimmerman, J., Benfield, DA, Murtaugh, MP, Osorio, F., Stevenson, GW y Torremorell, M. (2013). Virus (Arterivirus Porcino). Enfermedades de los cerdos, 387.