



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“EFECTO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS
PRRS EN LA EXPRESIÓN DE TNF- α EN MACRÓFAGOS”**

TESIS QUE PRESENTA

JUAN MANUEL MORALES GACHUZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESORA-TUTORA:

D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

Morelia Michoacán., mayo del 2022

Agradecimientos.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Químico Farmacobiología por las facilidades y apoyo para la realización de los estudios de Licenciatura.

También a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, al Laboratorio, unidad de proteómica y bioingeniería celular por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la Dirección de la D.C. Rosa Elvira Núñez Anita.

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través del proyecto de Ciencia Básica (A1-S-43236), el cual incluyó la Beca CONACYT 2020-2021 otorgada a Juan Manuel Morales Gachuz, becario 30514, lo que permitió la realización del presente trabajo de tesis.

También, agradecemos el financiamiento parcial por la CIC-UMSNH 2020-2022.

Finalmente, agradecemos a CONACYT, por el financiamiento de Infraestructura (INFR 2015-255010) para la habilitación de la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular.

Agradecimientos personales.

Agradezco de manera especial a mi familia quienes siempre han creído en mí, por apoyarme y brindarme la oportunidad de ver de manera distinta la vida. A mis padres quienes siempre me motivaron a seguir adelante sin importar la adversidad, por enseñarme a no rendirme y a siempre luchar por mis sueños. A mi madre, quien siempre ha creído en mí y me ha apoyado a lo largo de toda mi vida; a mis abuelos quienes han sido como mis padres, me han guiado y enseñado el valor de la vida y a no desistir por mis sueños.

Agradezco a mi asesora la D.C. Rosa Elvira Núñez Anita por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su buen consejo, apoyo y comprensión. Por tenerme paciencia, y confiar en mí, por su ayuda para la comprensión y enfoque de mi trabajo.

Agradezco también a mis amigos y compañeros de laboratorio, Franc, Fer, Luis, Roberto, Miriam, Gaby, Guillermo, Sergio, quienes me apoyaron, enseñaron e ilustraron diferentes panoramas de la vida, por sus enseñanzas y apoyo durante mi estancia en el laboratorio por brindarme de su tiempo y su conocimiento.

Agradezco de manera especial a Adriana Itzel quien siempre ha sido mi inspiración para alcanzar mis metas en la vida. A mis amigos y amigas de la universidad que me han apoyado y confiado en mí, en los diversos momentos de la vida.

“Sigue tus sueños hasta alcanzarlos”

“ El conocimiento es navegar en un océano de incertidumbres a través de archipiélagos de certezas”
-Edgar Morin

INDICE

1.-Índice de figuras.....	1
2.-Índice de tablas.	1
3.-Lista de abreviaturas	2
4.-Resumen.....	3
5.-Abstract.....	4
6.-Introducción.....	5
6.1.-Antecedentes históricos de PRRSV.....	5
6.2.-Signos clínicos.	6
6.3.-Transmisión.....	7
6.4.-Patogenia.	8
6.5.-Etiología del virus.	9
6.6.-Internalización de PRRSV.	9
6.7.-Genoma viral de PRRSV.	12
6.8.-Inhibición de la respuesta inmunológica por PRRSV.	13
6.9.-Respuesta inmune a PRRSV.	14
6.10.-Respuesta humoral a PRRSV.	16
6.11.-Respuesta celular a PRRSV.....	17
6.12.-Células Blanco, Macrófagos.	17
7.-Antecedentes.	20
8.-Justificación	21
9.-Hipótesis	22
10.-Objetivo general.....	22
11.-Objetivos particulares.....	22
12.-Materiales.....	22
12.1.-Muestras biológicas sanguíneas.....	22
12.2.-Péptidos.	23
12.3.-Línea celular 3D4/31 (ATCC ® CRL-2844™).	23
12.4.-Estímulos.....	23
12.5.-Reactivos prueba de ELISA.	24

12.6.-Obtención de proteínas totales a partir de macrófagos (Método buffer RIPA).....	25
12.7.-Determinación de proteínas totales (Ensayos Bradford).	26
12.8.-EXTRACCIÓN DE RNA MÉTODO TRI reagent®	27
12.9.-RT-PCR	27
13.-Metodología.....	28
13.1.-Obtención de muestras sanguíneas.	28
13.2.-Extracción de RNA viral y RT-PCR.	28
13.3.-Síntesis química de péptidos.....	29
13.4.-Estimulación de PAM.....	29
13.5.-Extracción de proteínas totales de las células 3D4/31.	30
13.6.-Cuantificación de proteína total por método de Bradford.	30
13.7.-Determinación de la expresión de TNF- α	31
13.8.-Análisis estadístico	32
14.-Resultados.	33
15.-Discusión	37
16.-Conclusión.....	39
17.-Bibliografía.....	40
18.-Anexos	51
18.1.-Anexo I.	51
18.2.-Anexo II.	58
18.3.-Anexo III.	59
18.4.-Anexo IV.....	60
18.5.-Anexo V.....	61
18.6.-Anexo VI.....	62
18.7.-Anexo VII.....	63

1.-Índice de figuras.

Figura 1. Análisis de la Frecuencia filogenética de PRRSV de tipo salvaje en México.

Figura 2. Estructura del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.

Figura 3. Modelo del complejo proteico de envoltura del PRRSV e interacción con CD163.

Figura 4. Internalización viral de PRRSV

Figura 5. Genoma viral de una partícula del virus PRRS.

Figura 6. Análisis de TNF- α en sueros porcinos positivos y negativos a la infección por PRRSV.

Figura 7. Curva de calibración de albumina de suero bovino (BSA).

Figura 8. Curva de calibración del Estándar TNF- α .

Figura 9. Expresión de TNF- α en células 3D4/31.

2.-Índice de tablas.

Tabla 1. Fenotipo de macrófagos activados vía clásica y alternativa con subtipos

Tabla 2. Concentración usada para la estimulación de células 3D4/31

Tabla 3. Listado de reactivos para determinación de TNF- α

Tabla 4. Curva de calibración de Bradford con albumina de suero bovino (BS

3.-Lista de abreviaturas

Ab	Anticuerpo
APC	Células presentadoras de antígeno
DC	Célula dendrítica
DEXA	Dexametasona
GP	Glicoproteína
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
Nsps	Proteínas no estructurales
ORF	Marco de lectura abierto
PAM	Macrófago alveolar porcino
PBS	Buffer fosfato salino
PRRS	Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
PRRSV	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
RIPA	Ensayos de radioinmunoprecipitación
STAT	Proteínas de Traducción de Señales y Activador de la Transcripción
Th	Linfocito cooperador
TNF	Factor de necrosis tumoral

4.-Resumen.

El Virus que provoca el Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRSV) es un agente patógeno de fácil transmisión que afecta a los cerdos de todas las edades. Causa una alta mortalidad en varias etapas de la vida del cerdo, con una mayor incidencia entre las 12 a 18 semanas de vida. Está asociado a grandes pérdidas económicas a nivel mundial. El PRRSV provoca retraso en el crecimiento, problemas reproductivos y respiratorios. Las células blanco del PRRSV son los macrófagos alveolares (PAM), los cuales, al estar infectados altera sus funcionamiento. El PRRSV posee diversos mecanismos que le permiten evadir la respuesta del sistema inmune del hospedero. Se ha reportado que la infección por PRRSV modifica la expresión de citocinas, quimiocinas e interferones, los cuales son indispensable para una respuesta inmune protectora. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés), es una citocina que producen varias células del sistema inmune, principalmente en los Linfocitos T y los monocitos/macrófagos. Se ha descrito que TNF- α se reprime durante la infección por el PRRSV. De hecho, se conoce que la proteína Nsp1 de PRRSV es la responsable de la supresión a nivel del promotor de TNF- α y dicha supresión modula las actividades de los factores de transcripción NF- κ B y Sp1. En nuestro grupo de trabajo, hemos propuesto que subunidades de la proteína GP5, probables epítomos de reconocimiento de Linfocitos T, son suficientes para inducir la expresión de citocinas y quimiocinas, entre éstos el TNF- α . **Objetivo:** evaluar la expresión de la proteína TNF- α , después del tratamiento con tres péptidos sintéticos denominados GP5T1, GP5T2, GP5T3 derivados de la proteína GP5 del virus PRRSV, en macrófagos alveolares porcinos y contrastar los datos con la expresión de TNF- α en cerdos positivos a PRRSV. **Metodología:** se cultivaron macrófagos de cerdo (3D4/31, obtenidos de ATCC), durante ocho horas, con los siguientes estímulos de manera independiente: Control sin tratamiento, Dexametasona (Dexa), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Lipopolisacaridos (LPS), péptidos GP5T1, GP5T2, y GP5T3. Por otro lado, se analizó un total de ocho sueros de cerdo PRRSV+ (positivo) y ocho sueros PRRSV- (negativo). Seguimiento de la evaluación de la expresión de TNF α a través del método de ELISA. **Resultados:** Los datos mostraron que los péptidos GP5T1, GP5T2, y PG5T3 fueron capaces de activar la expresión de TNF- α en los macrófagos de cerdo, en el orden siguiente: GP5T3>GP5T2>GP5T1. En contraste con los datos obtenidos en animales positivos a PRRS, en los cuales, la secreción de TNF- α disminuyó. Lo anterior, fortalece la hipótesis de que dichos péptidos son capaces de activar una respuesta inflamatoria, lo cual sugiere su participación en el reconocimiento del patógeno y el despliegue de la respuesta inmune mediada por células. En contraste, se mostró que TNF- α se encuentra suprimido en animales positivos a PRRSV, en concordancia con los datos en la literatura. En conjunto, estos datos proporcionan evidencia para la toma de decisiones racionales en la prevención del PRRSV.

Palabras clave: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRSV), Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF- α), citocinas, interferones, Macrófago Alveolar Porcino (PAM), Linfocitos T cooperadores (Th).

5.-Abstract.

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) is an easily transmitted pathogen that affects pigs of all ages. It causes high mortality at various stages of the pig's life, with a higher incidence between 12 and 18 weeks of age. It is associated with large economic losses worldwide. PRRSV causes growth retardation, reproductive and respiratory problems. Target cells of PRRSV are the alveolar macrophages (PAM), which, exhibited dysfunction when are infected. PRRSV has several mechanisms that allow it to evade the response of the host's immune system. PRRSV infection modify the expression of cytokines, chemokines and interferons, which are essential for a protective immune response. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a cytokine produced by several cells of the immune system, mainly T lymphocytes and monocytes/macrophages. It has been reported that TNF α is repressed during PRRSV infection. In fact, it is known that the PRRSV protein Nsp1 is responsible for the suppression at the level of the TNF- α promoter and this suppression modulates the activities of the transcription factors NF- κ B and Sp1. In our work group, we have proposed that subunits of the GP5 protein, (epitopes of T lymphocytes), are sufficient to induce the expression of cytokines and chemokines, among them TNF α . **Objective:** Evaluation of the expression of the TNF- α protein, after treatment with three synthetic peptides GP5T1, GP5T2, GP5T3 derived from the GP5 protein of the PRRSV virus, in porcine alveolar macrophages and contrast the data with the expression of TNF- α in pigs PRRSV positive. **Methodology:** pig macrophages (3D4/31, obtained from ATCC) were cultured independently for eight hours with the following stimuli: Control without treatment, Dexamethasone (Dexa), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Lipopolysaccharides (LPS), peptides GP5T1, GP5T2, and GP5T3. On the other hand, a total of eight PRRSV+ and eight PRRSV- pig sera were analyzed. Followed by the evaluation of the expression of TNF α through the ELISA assay. **Results:** The data showed that the peptides GP5T1, GP5T2, and PG5T3 were able to activate the expression of TNF- α in pig macrophages, in the order GP5T3>GP5T2>GP5T1. In contrast to the data obtained in PRRS-positive animals, in which the expression of TNF- α was suppressed. These data reinforce the hypothesis that these peptides can activate an inflammatory response, exerting important actions for the recognition of the pathogen and the deployment of the cell-mediated immune response. In contrast, TNF- α was shown to be suppressed in PRRSV-positive animals, in agreement with data in the literature. Taken together, these data provide evidence for rational decision-making in PRRSV prevention.

Keywords: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), cytokines, interferons, Porcine Alveolar Macrophage (PAM), T helper cells (Th).

6.-Introducción.

6.1.-Antecedentes históricos de PRRSV.

La enfermedad viral del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS por sus siglas en inglés) fue descrita clínicamente por primera vez, en Estados Unidos de Norteamérica en 1987 (Keffaber 1989; Hill 1990), nombrándola una enfermedad misteriosa del cerdo o enfermedad de la oreja azul, posteriormente se reconoció en Canadá y en 1990 en países de Europa (OIE 1992).

El Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad distribuida en la mayoría de los países productores de carne de cerdo (Flores-Mendoza *et al.*, 2010).

En México el PRRS se describió clínicamente por primera vez en 1992, coincidiendo como enfermedad pandémica, aunque se sospecha pudo entrar a finales de la década de 1980 y confundirse con enfermedades como ojo azul e influenza porcina (**Figura 1**) (Morilla A *et al.*, 2003).

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino es responsable de enfermedades respiratorias en los cerdos en etapas de destete y en crecimiento, causando fallas reproductivas y del desarrollo. Esta enfermedad está considerada como la más importante en los porcinos a nivel mundial, con un impacto económico estimado en una pérdida de 664 millones de dólares cada año en EE.UU. para los productores de porcinos, representa un incremento de 18.5% en los últimos 8 años (Holtkamp DJ *et al.*, 2013; Neumann EJ *et al.*, 2005).

El PRRS es considerado una de las enfermedades con mayor repercusión económica para los porcicultores en todo el mundo (Kleiboeker SB *et al.*, 2005). Ocasiona pérdidas económicas significativas a la granja, independientemente de la patogenicidad de la cepa, ya que una primo infección puede ocasionar las pérdidas de un brote y a esto se suman las pérdidas por la permanencia de la enfermedad en forma endémica, con posibilidades de reemerger como brote agudo después de un largo período del último brote y los brotes que duran 2 a 3 meses en remitir (Benfield DA, *et al.*, 1999).



Figura 1. Análisis de la Frecuencia filogenética de PRRSV de tipo silvestre en México. La imagen muestra el análisis realizado en diferentes zonas de México, con un total de 8126 muestras de suero obtenidas de granjas tecnificadas y semi-tecnificadas de 30 de 32 estados de México, la detección se realizó mediante pruebas de ELISA y RT-PCR mostrando el nivel en la frecuencia de la región analizando los ORF 5 y 7 del virus PRRS. En verde con incidencia baja, amarillo para una incidencia media, violeta para una incidencia alta y negro para las zonas con mayor incidencia en el país. Modificado de Martínez-Bautista *et al.*, 2018.

6.2.-Signos clínicos.

Los dos grupos principales de signos clínicos que son asociados con la presencia de PRRS son el reproductivo y el respiratorio. El primero, incluye nacimientos prematuros, abortos de periodos retrasados, cerdos que nacen débiles y aumenta el número de lechones muertos en los nacimientos y momificados. En el segundo, las afecciones respiratorias, tienen gran importancia; sobre todo en cerdos neonatales, en los que existe disnea como mayor característica, es usualmente que ocurra en cerdos de 3 semanas de vida, pero también puede ocurrir en cualquier edad (SENASICA *et al.*, 2020).

Los signos clínicos de los cerdos infectados con PRRSV varía considerablemente, esto es debido a varias causas; incluyendo diferencias en los factores ambientales, el estado inmune del animal, la cepa del virus; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos. (SENASICA *et al.*, 2020)

Otros signos clínicos que presentan los cerdos afectados por PRRS son fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero, edema en párpados, conjuntivitis, depresión, anorexia y diarrea (Xiao S *et al.*, 2010), correspondientes a diferentes grados de neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis y linfadenopatías (Arias M *et al.*, 2003).

6.3.-Transmisión.

La transmisión de PRRSV es por contacto directo con animales enfermos, o con material contaminado con saliva, orina, semen, secreciones mamarias, transplacentarias y excremento de cerdos enfermos. (Arias M. *et al.*, 2011). Algunos factores que destacan es el agua contaminada estática (Zimmerman JJ. 2008).

Se sabe que puede transmitirse por vía aérea hasta 2 km, sin embargo, experimentalmente resulta difícil contagiar animales tan próximos, si no tienen contacto físico, porque el virus es muy lábil (Benfield DA *et al.*, 1999; Callen A. 2006).

El virus puede entrar por vía oral y nasal, penetrando los epitelios nasales o tonsilares, llegando a su diana celular, el macrófago alveolar porcino (PAM) (Pileri y Mateu 2016).

La capacidad de inmunosupresión o inmunoregulación del virus le permite largos periodos de viremia variables en función de la edad de los animales, que promueve un mayor tiempo de transmisión, siendo de una a dos semanas en adultos y 10 a 12 semanas o hasta varios meses en lechones jóvenes (Thanawongnuwecha R y Suradhatb S. 2010).

El virus muestra alta capacidad de infección, la dosis infectante 50 (TCID 50) en lechones de 3 semanas de edad es de 2.0×10^5 partículas virales por vía oral y sólo una veintava parte de éste por vía intranasal. (Hermann JR *et al.*, 2005)

En hembras gestantes el virus puede atravesar la placenta y producir la muerte de los fetos especialmente cuando la infección sucede en el último tercio de la gestación. El virus es capaz de multiplicarse también en los fetos sin producir la muerte de los mismos. Durante el primer tercio aparecen repeticiones de celo y bajas tasas de concepción, lo cual indicaría que la infección transplacentar temprana es posible (Arias, M *et al.*, 2015).

El PRRS produce problemas reproductivos caracterizados por muerte embrionaria, abortos en la última fase de gestación, adelanto en los partos y aumento del número de lechones nacidos muertos o momificados, además incrementa la producción de lechones de bajo peso (Uladzimir y Hans J., 2013).

6.4.-Patogenia.

El virus entra por vía oronasal y genital; penetra a epitelios nasal y tonsilar, a macrófagos pulmonares y a endometrio uterino. Tiene un período de incubación de tres días a varias semanas, sumadas con etapas de latencia en casos endémicos, que varía según la edad de los animales, la dosis infectante y la inmunidad (Xiao S *et al.*, 2010).

La viremia provocada por PRRSV comienza a las 12 horas post-infección alcanzando su punto máximo de replicación a los 7 días pos-infección. La duración de la viremia según la cepa de PRRSV y la edad del animal afectado, en animales adultos dura de 9 a 15 días pos-infección y en animales jóvenes en un promedio de 28 a 35 días pos-infección. La fase de infección es seguida por un periodo de confinamiento de latencia en los tejidos linfoides secundarios y una menor replicación viral. La desaparición eventual del virus representa el final de la infección, no se conoce con exactitud cómo es que el virus desaparece, pero la replicación viral puede ser mantenida hasta por 250 días pos-infección establecido como un periodo largo de infección (Lunney *et al.*, 2016; Pileri and Mateu, 2016).

Existen consideraciones diferenciales y genéticas de la virulencia entre las cepas de PRRSV. Dependiendo de la cepa viral y el estado inmunológico del huésped, algunas granjas porcinas pueden tener cerdos infectados con PRRSV de manera subclínica, mientras que otros experimentan problemas reproductivos y graves enfermedades respiratorias. Desde su aparición, han evolucionado varias cepas de PRRSV altamente patógenas provocando numerosos brotes de la enfermedad aguda en diferentes países. En el año de 1990 es cuando surgió un PRRSV atípico provocando alta morbilidad y tormentas de abortos en estados unidos (Mengeling WL *et al.*, 1998).

Alcanza los tejidos linfoides regionales y posteriormente se distribuye a nivel sistémico por las vías sanguínea y linfoide, circulando libre o ligado a monocitos circulantes produciendo leucopenia. Las células en las que sucede la replicación del virus de PRRS se encuentran en diferentes órganos y tejidos, siendo los macrófagos alveolares el principal tipo celular en que se realiza su replicación y de importancia para su patogenia, así como en células dendríticas y monocitos (Flores-Mendoza L *et al.*, 2008).

6.5.-Etiología del virus.

El virus del PRRS (PRRSV) pertenece a la orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus*, siendo un virus pequeño envuelto de RNA de una cadena de sentido positivo con alrededor de 15 kb (**figura 2**) (Snijder EJ *et al.*, 2013).

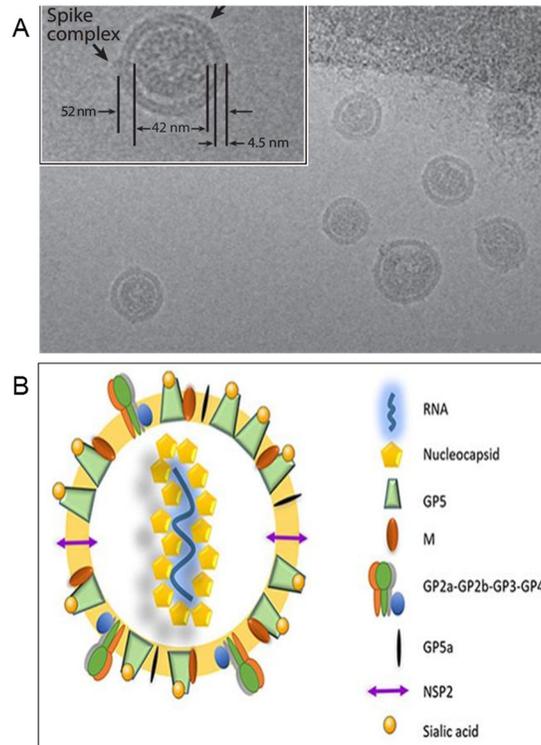


Figura 2. Estructura del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. **A** Microfotografía obtenida de Microscopio crioelectrónico del virión PRRSV. El virión de PRRS parece ser una partícula aproximadamente esférica u ovalada de 50 a 60 nm de diámetro con una apariencia externa relativamente suave. Tomado de Dokland T 2010. **B**, Modelo esquematizado de PRRSV. Partícula viral madura de PRRSV, compuesta por una bicapa lipídica envuelta con glicoproteínas o receptores virales implicadas en la infección y la internalización celular. El ARN positivo monocatenario está asociado con la proteína de la nucleocápside en la capa interna del virus. Tomado de Montaner-Tarbes *et al.*, 2019.

6.6.-Internalización de PRRSV.

El cerdo es el único huésped natural conocido de PRRSV; además, el virus tiene un tropismo muy restringido para las células del linaje monocítico. El macrófago alveolar porcino completamente diferenciado sirve como un objetivo celular primario para la infección por PRRSV (Duan X *et al.*, 1997).

Hasta la fecha, se ha determinado que CD163 es el principal receptor que media la internalización y el desmontaje viral (**Figura 3**) (Van Breedam W *et al.*, 2010). Mediante el cribado de una biblioteca de CDNA de macrófagos porcinos para determinar la función del receptor, se identificó el CD163, un miembro de la familia rica en cisteína del receptor eliminador, como un factor clave en el inicio de la infección por PRRSV (Calvert JG *et al.*, 2007).

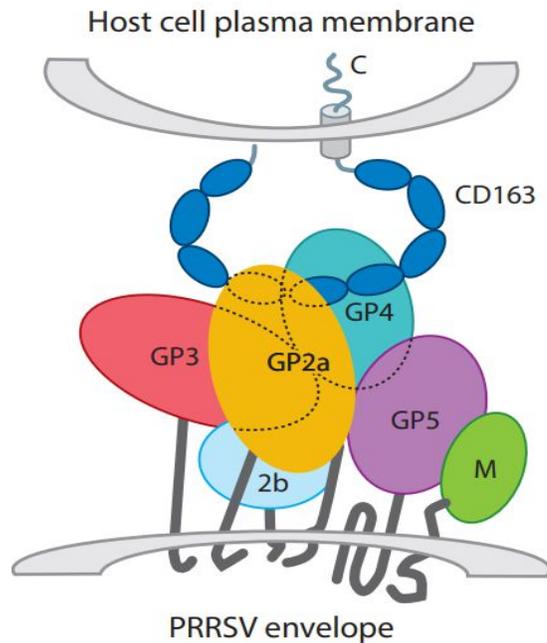


Figura 3. Modelo del complejo proteico de envoltura del PRRSV e interacción con CD163. Imagen esquematizada de un complejo proteico de envoltura y su interacción con CD163 en la membrana plasmática de la célula huésped. Das PB *et al.*, 2010.

Además, se informó que las células dendríticas pueden soportar la replicación del PRRSV (Loving CL *et al.*, 2007). El PRRSV ingresa a las células huésped a través de la endocitosis estándar mediada por clatrina. El genoma viral se libera en el citosol después de la acidificación del endosoma y la fusión de la membrana (Nauwynck HJ *et al.*, 1999).

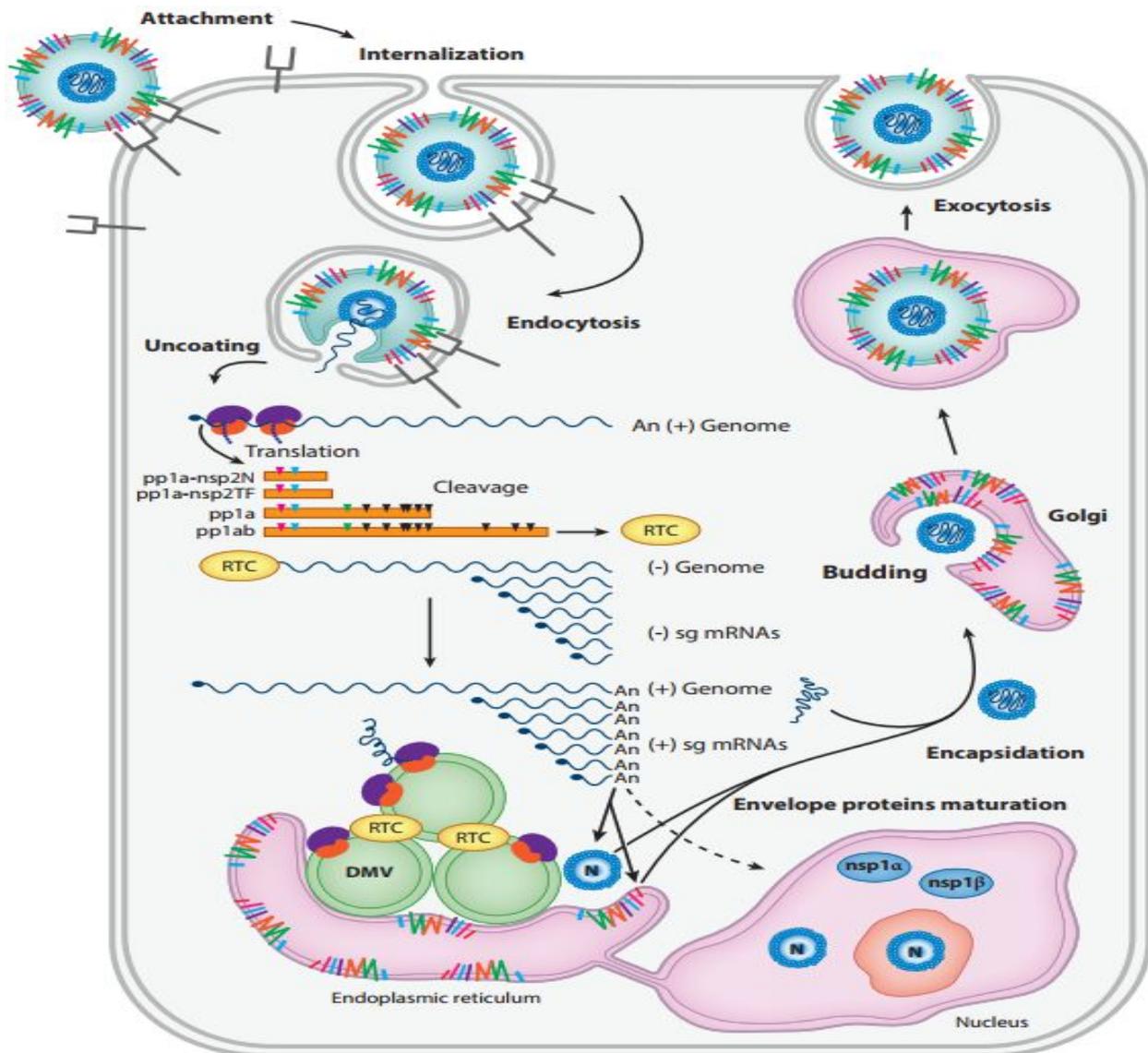


Figura 4. Internalización viral de PRRSV. El proceso de internalización de PRRSV inicia con la interacción entre las glucoproteínas y los receptores celulares de la célula hospedadora a través de ello comienza con el proceso de endocitosis estándar, esta es mediada por la proteína clatrina quien ayuda a la formación de vesículas intracelulares. Una vez internalizado el virus a la célula libera el material genético gracias a un fenómeno fisicoquímico conocido como “decapar”, de tal manera que influye en la acidificación del medio vesicular, ayudando así a la liberación del material genético, el PRRSV al ser un virus RNA de polaridad + puede actuar como RNAm iniciando los procesos de traducción a partir del genoma viral. De manera tal que genera 4 grandes proteínas que escinden en 14 proteínas no estructurales, quienes tienen diversas funciones en la modificación de los mecanismos celulares, ya que influye en la producción del material genético complementario, con ayuda de sg mRNA, de tal manera que multiplica el material genético viral. El genoma policistrónico viral afecta a distintos organelos para la producción de diversas proteínas de envoltura viral, una vez maduras estas proteínas son empaquetadas mediante el proceso de encapsidación, estas viajan al aparato de Golgi donde por último paso se unen las glucoproteínas de membrana, formando una nueva partícula viral, esta es liberada al medio por exocitosis, repitiendo este proceso intracelular hasta la apoptosis. Tomado de Lunney *et al* 2016.

6.7.-Genoma viral de PRRSV.

El genoma del PRRSV se compone en el extremo 5' de una región corta no traducida (UTR, por sus siglas en inglés, untranslated región) seguida de nueve marcos de lectura abierta (ORF) llamados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7 (**Figura 3**) (Moormann RJ. 1993; Wu wh *et al.*, 2001).

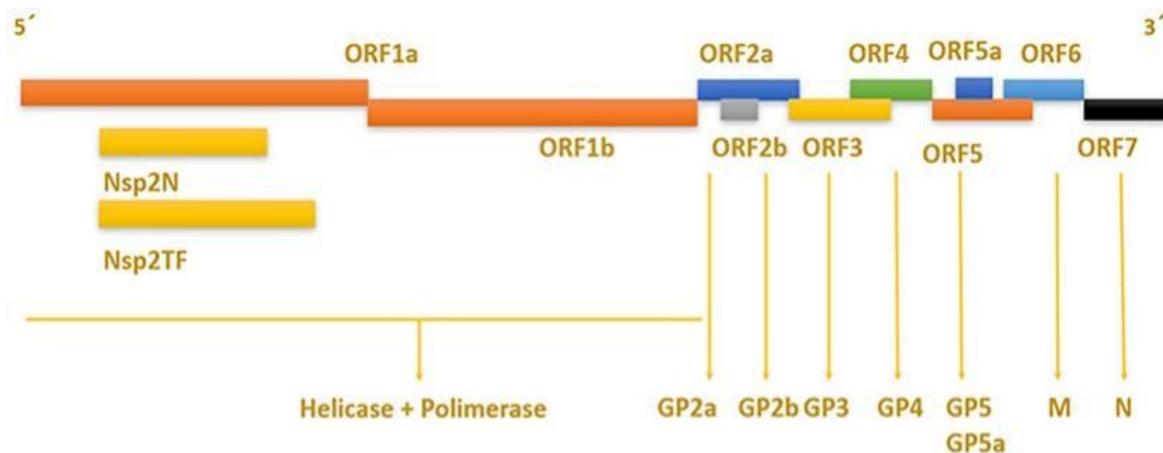


Figura 5. Genoma viral de una partícula del virus PRRS. Estructura del genoma y partícula viral madura del virus PRRSV. Las proteínas no estructurales se encuentran en el extremo 5' del genoma, que codifica dos poliproteínas diferentes pp1a y pp1ab que se escinden en al menos 14 nsps. Tomado de Montaner-Tarbes *et al.*, 2019.

Los ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente 75% del tamaño del genoma y codifican a una poliproteína con actividad de ARN polimerasa (Meulenbergh JJ. 2000). El ARN del genoma viral está empaquetado por proteínas de nucleocápside. Alrededor de la nucleocápside, las glicoproteínas de superficie (GP) y las proteínas de la membrana se insertan en la envoltura en la bicapa de lípidos para formar las partículas del virión (**Figura 2 B**). El ARN del genoma del PRRSV es una molécula poliadenilada en 3' de cadena positiva de aproximadamente 15 kb de longitud, que contiene 11 marcos de lectura abiertos conocidos (ORFS). El gen de la replicasa consta de los grandes ORFS, que están situados en las tres cuartas partes del extremo 5' proximal del genoma policistrónico (Fang Y. y Snijder EJ, 2010).

Después de su síntesis a partir de la plantilla de ARNm genómico, las poliproteínas replicasa se procesan en al menos 14 proteínas no estructurales (nsps), 4 proteínas son codificadas

en ORF1 y residen como nspl- α , nspl- β , nsp2 y nsp4. El extremo 3' del genoma viral contiene ocho genes relativamente pequeños los ORF4/ORF5 son genes que codifican cuatro glicoproteínas asociadas a membrana (GP2, GP3, GP4 y GP5) 3 proteínas no glicosiladas de membrana (E, ORF5a, y M), y una proteína de nucleocápside (M) (Snijder EJ *et al.*, 2013).

La glicoproteína 5 (GP5) es una proteína glicosilada transmembranal que se puede dividir en varios dominios: un péptido señal, un ectodominio (con un número variable de sitios potenciales de glicosilación), una región transmembranal y un endodominio. (Balasuriya UB y Maclachlan NJ. 2004; Meulenberg JJ *et al.*, 1995).

Se ha observado que la GP5 forma heterodímeros con la proteína M en las partículas virales (Mardassi H, 1996). Estos heterodímeros también se han relacionado con la infección celular en macrófagos, estos se unen a moléculas de heparán sulfato y sialoadhesina, (Vanderheijden N *et al.*, 2003; Delputte PL *et al.*, 2002).

6.8.-Inhibición de la respuesta inmunológica por PRRSV.

Dado que los macrófagos y las células dendríticas son los principales productores de citocinas defensivas innatas como el interferón-alfa (IFN- α) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) durante las infecciones, parece plausible que PRRSV pueda suprimir activamente su inducción con el fin de replicar en las células huésped durante múltiples rondas y cumplir el objetivo patogénico de establecer la persistencia en el huésped (Subramaniam, S. *et al.*, 2010).

Además, la defectuosa inducción del sistema inmunitario de defensa contra PRRSV puede contribuir al desarrollo tardío y débil de inmunidad adaptativa específica de antígeno, responsable de la defensa después y durante la infección por PRRSV (López y Osorio, 2004; Meier *et al.*, 2003)

Estudios recientes han demostrado que varias proteínas como Nsp1, Nsp2, Nsp4 y Nsp11 presentes en las células infectadas, principalmente macrófagos y células dendríticas son capaces de suprimir la activación del promotor de IFN- β tras el tratamiento con dsRNA (Beura *et al.*, 2009). Estas proteínas suprimen la inducción del INF del Tipo I y señalización mediante la inhibición de factores de transcripción, como factor regulador de interferón-3,

factor nuclear κ B, Proteínas de unión al factor de transcripción CREB y proteínas de Traducción de Señales y Activador de la Transcripción-1 (STAT-1) (Beura et al., 2009; Chen et al., 2009; Kim *et al.*, 2010).

Por su parte, TNF- α es una citocina de aparición temprana y es secretada en respuesta a varias infecciones virales por la activación de macrófagos, células dendríticas y células T. TNF- α tiene dos funciones biológicas: por un lado, induce la apoptosis en células infectadas por el virus, este efecto en las células infectadas aumenta sinérgicamente por la presencia de INF γ (Wong y Goeddel, 1986), por otro lado, promueve la inflamación en el sitio de la infección induciendo la producción de otras citocinas proinflamatorias durante la vacunación y la infección (Toews, 2001). Una de las funciones más relevantes de TNF α es su capacidad de inhibir directamente la replicación del DNA y del RNA virales *in vitro* (Cirino *et al.*, 1993; Heise and Virgin, 1995; Wong y Goeddel, 1986). De hecho, se identificó que la proteína viral Nsp1 media la supresión del nivel del promotor de TNF α . También, se encontró que las subunidades de la proteína Nsp1, tales como, Nsp1 α y Nsp1 β suprimen el promotor de TNF α , modulando así la activación de los factores de transcripción tales como, NF κ B y Sp1 (Subramaniam *et al.*, 2010).

En la literatura se ha reportado que el papel de TNF α de suprimir la expresión de DNA o RNA viral, también se ha observado en otros virus. En virus tales como el virus de la peste porcina africana (ASFV) y el virus simple del herpes (HSV-1) se inhibe directamente la inducción de TNF- α durante la infección (Granja *et al.*, 2006; Mogensen *et al.*, 2004).

6.9.-Respuesta inmune a PRRSV.

La respuesta inmune del cerdo frente al PRRSV es muy compleja y se deben considerar dos aspectos importantes que influyen en ella: alta variabilidad del virus y variabilidad en la respuesta de los cerdos infectados. Cuando estos últimos resultan con infección por el PRRSV inducen una inmunidad capaz de proteger en reinfecciones contra virus homólogos, no obstante, este patógeno induce viremias prolongadas e infecciones persistentes (Murtaugh MP *et al.*, 2002).

Estas características dan un panorama de la compleja interacción entre el PRRSV y la defensa de los cerdos al virus. El virus toma ventaja frente al cerdo al evadir en cierto grado la respuesta innata. Primeramente, el PRRSV infecta y se replica en algunas células que participan en la respuesta innata, como macrófagos y células dendríticas (DC), importantes en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada, tanto innata como adaptativa (Costers S *et al.*, 2006).

Otra característica importante del sistema innato frente a los virus es la producción de IFN tipo I (α/β), el cual induce la síntesis de una gran cantidad de proteínas antivirales, como es el caso de la proteína cinasa oligoadenilatosintetasa, la adenosina-desaminasa específica de ARN, y de la proteína de mixoma (MxGTPasa), que inhiben la replicación viral y síntesis de proteínas virales (Vicek J y Sen G 1996).

En lo que respecta al perfil de citocinas proinflamatorias, como el IFN- α , TNF- α e IL-1 β , que son importantes en el inicio de una respuesta inflamatoria, la infección por el PRRSV inhibe la expresión de ARNm de estas citocinas (Van Reeth K *et al.*, 1999; López-Fuertes L *et al.*, 2000).

En experimentos *in vitro* utilizando macrófagos alveolares estimulados con acetato de formol mirístico (PMA, por sus siglas en inglés) e infectados con PRRSV, se observó una disminución en la expresión de ARNm de TNF- α (López-Fuertes L *et al.*, 2000). Mientras que los experimentos *in vivo* no logran detectar esta citocina (TNF- α) en los fluidos obtenidos de lavados bronco-alveolares (Van Reeth K 1999).

Se ha demostrado que al infectar células mononucleares con el PRRSV se induce la expresión de IL-10 (Suradhat S *et al.*, 2003), la cual es una citocina antiinflamatoria que logra inhibir la expresión de la IL-1 y el TNF- α , y además participa en la diferenciación de células T reguladoras (Mcguirk P *et al.*, 2002). La falta de una respuesta inflamatoria y la débil o nula respuesta antiviral (inducida por los IFN tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa.

6.10.-Respuesta humoral a PRRSV.

La respuesta humoral frente al PRRSV se ha evaluado ampliamente. En suero de cerdos infectados se pueden encontrar anticuerpos IgM anti-PRRSV entre los días cinco y siete pos-infección (PI); sin embargo, después de dos o tres semanas son indetectables (Joo HS *et al.*, 1997; Yoon KJ *et al.*, 1995)

Posteriormente se detectan anticuerpos IgG entre los días siete y diez PI, con incremento entre la segunda y cuarta semanas (Loemba *et al.*, 1996; Yoon KJ *et al.*, 1995) Los niveles de estos anticuerpos son detectables hasta 300 días PI a niveles bajos (Nelson EA *et al.*, 1994)

Se ha informado que los Anticuerpos Neutralizantes (AN), aparecen a partir de la tercera semana PI (Albina E *et al.*, 1998) sin embargo, existen estudios que muestran la presencia de AN en la segunda semana PI (día 9) (Yoon KJ *et al.*, 1995).

A pesar de que existen anticuerpos no neutralizantes contra la GP5, también se pueden encontrar AN, éstos son los que se han relacionado principalmente con la neutralización del virus para ambos genotipos. Los AN pueden ser detectados en algunos casos de manera temprana a partir del día 9 PI, sin embargo, generalmente se presentan a partir del día 28 PI (Yoon KJ *et al.*, 1995).

La participación de los AN en la protección contra el PRRSV se ha evaluado ampliamente, y existe cierta controversia respecto de su participación en la protección contra el PRRSV. Hay grupos que describen que éstos no participan en el control del virus, debido a que en cerdos que presentan un título elevado de AN fue posible aislar el virus de sangre. En el caso contrario, con un título indetectable de AN se logró resolver la viremia (Vezina SA *et al.*, 1996). Sin embargo, otros grupos han demostrado que la transferencia pasiva de AN a cerdas gestantes infectadas con PRRSV es capaz de bloquear la infección trasplacentaria (Osorio FA *et al.*, 2002).

Por otro lado, los anticuerpos contra la proteína N del virus, en las primeras semanas PI no tienen un efecto neutralizante. Estos anticuerpos se han relacionado con la diseminación del PRRSV en macrófagos, a través de un fenómeno conocido como incremento de la infección

dependiente de anticuerpos (Antibody Dependent Enhancement, ADE por sus siglas en inglés) (Cancel-Tirado SM et al., 2004).

6.11.-Respuesta celular a PRRSV.

En la respuesta celular inducida por el PRRSV, la respuesta de células T específicas contra el PRRSV, son analizadas mediante la proliferación de células mononucleares, que aparece en la cuarta semana PI con un máximo a la semana siete y un declive entre las semanas 9 y 11 (Bautista EM y Molitor TW, 1997).

La variabilidad en la respuesta de los cerdos, permitió clasificar la respuesta en tres niveles: bajo, intermedio y alto. En ambos casos, el fenotipo de células T secretoras de IFN- γ en respuesta al PRRSV parece consistir de linfocitos CD4+, CD8+ de memoria y CD4+ cooperadoras (López Fuentes L. et al., 1997; Meier WA et al., 2003).

Al analizar las células productoras de IFN- γ específicas contra PRRSV (a través de ensayos de ELISpot) en sangre de cerdos infectados, se observó un número bajo de células productoras específicas, entre 50-100 células por cada 1×10^6 células en la primera semana PI. El papel de la inmunidad mediada por células en la eliminación del PRRSV no está totalmente definida; sin embargo, es importante en la eliminación completa del virus, pues la respuesta humoral sola no es capaz de eliminar a este último. (Meier W *et al.*, 2000).

6.12.-Células Blanco, Macrófagos.

Los macrófagos son células especializadas en la detección, fagocitosis y destrucción de microorganismos dañinos. Además, puede presentar antígenos a las células e inician el proceso inflamatorio mediante la liberación de citocinas que activan otras células. Los macrófagos pueden migrar y circular entre casi todos los tejidos, buscando la presencia de patógenos y eliminando células muertas. El macrófago alveolar se localiza en el pulmón, su función es la fagocitosis de partículas pequeñas, células muertas o microorganismos, inician y controlan la inmunidad frente a patógenos de las vías aéreas. Los macrófagos pueden

detectar productos bacterianos y otros microorganismos utilizando un sistema de receptores que se conoce como receptores de tipo Toll (TLRs) (Oviedo Javier, *et al.*, 2012).

Los macrófagos surgen de células precursoras que existen en la medula ósea; dirigidas por el Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF, por sus siglas en inglés). Posteriormente emigran a sangre periférica a los tejidos donde suceden las reacciones inflamatorias y se diferencian a macrófagos. En presencia de un estímulo mitogénico los macrófagos son capaces de proliferar, pero a diferencia de otras células inmunitarias, en presencia de agentes patógenos o citocinas, estos detienen dicha proliferación e inducen la activación del propio macrófago, que con una polarización o cambio de fenotipo realiza funciones efectoras específicas (Arpa, 2008; Liu y Yang, 2013)

Una de las funciones principales de los macrófagos es procesar el antígeno una vez que ha sido fagocitado. Las vías de procesamiento de antígeno convierten a los antígenos proteicos en péptidos que se asocian al MHC y estos, son presentados los Linfocitos T. En la vía de la clase I del MHC, los antígenos presentes en el citoplasma son degradados en proteosomas a péptidos, los cuales pasan del citosol al Retículo Endoplásmico por un transportador dependiente de ATP, para luego ser asociados y transportados con moléculas del MHC tipo I hasta la superficie celular donde se muestra y es reconocido por Linfocitos CD8+. Por otra parte, en la vía de la clase II del MHC, el antígeno es interiorizado por medio de vesículas o endosomas y es procesado dentro de ellos. Las moléculas de la clase II del MHC recién sintetizadas se transportan a los endosomas y ahí se asocian a los péptidos generados. El complejo formado se traslada a la superficie de la célula y se muestra para ser reconocido por Linfocitos T CD4+. Una vez que el complejo receptor del linfocito T (TCR) reconoce a los péptidos asociados al MHC en un macrófago, se movilizan varias proteínas de superficie y moléculas transmisoras de señales hasta la zona de contacto del Linfocito T y el macrófago (o la célula presentadora de antígeno), formando una estructura llamada sinapsis inmunitaria. Las moléculas del Linfocito T que se mueven son el complejo TCR, los correceptores CD4+ y CD8+, proteínas co-estimuladoras y activadoras. Permitiendo de esta manera la activación del Linfocito T, activando diferentes cinasas que a su vez activan diferentes factores de transcripción, generando linfocitos activos con funciones específicas (Abbas, 2015).

Las células del linaje monocito-macrófago se caracterizan por su diversidad y plasticidad. En los tejidos, los macrófagos responden a las señales extracelulares con la adquisición de fenotipos funcionales específicos; a esto se le conoce como polarización o activación de macrófagos (Mills *et al.*, 2000) propusieron la clasificación de macrófagos M1 (activación clásica) y M2 (activación alternativa) a partir del metabolismo de arginina en cada fenotipo (Lasswell *et al.*, 2017).

Los macrófagos M1 se inducen por la expresión de citocinas pro-inflamatorias como INF γ y productos microbianos, como lipopolisacáridos (LPS). En su mayoría estos expresan la mayoría de TLR, secretan IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-6. Además, expresan óxido nítrico sintasa inducible, por otra parte, aumentan la expresión de MHC II y el CD 86 potenciado su capacidad presentadora de antígeno, promoviendo la diferenciación de linfocitos Th1. En el contexto de la enfermedad este tipo de macrófagos está involucrado en iniciar y mantener la inflamación. Los macrófagos M2 liberan citocinas antiinflamatorias que ayudan a la proliferación celular y promueven la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Por otra parte, tienen una alta participación en la promoción de tumores y una actividad fagocítica eficiente. Los macrófagos M2 producen Arginasa 1 para metabolizar la L-arginina, expresan receptores como el de manosa, receptor falso de IL-1, varios receptores basurero y receptores de quimiocinas (**Tabla 1**) (Lasswell *et al.*, 2017).

Tabla 1. Fenotipo de macrófagos activados vía clásica y alternativa con subtipos. Tomado y modificado de Lasswell *et al.*, 2017.

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Estimulación/ Activación	IFN- γ LPS GM-CSF	IL4 IL-13 Hongos y Helmintos	ICs IL-1R	IL-10 TGF- β GCs	IL-6 LIF Adenosina
Secreción de citocinas	TNF IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- α	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β
Secreción de quimiocinas	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL5 CXCL10 CXCL16

Los macrófagos de humanos, de ratón y de cerdo con un fenotipo M1 exhiben una forma alargada (fibroblastoídes) con un núcleo pequeño. Se sugiere que LPS / IFN- γ (M1) aumentan la elasticidad, así como la fagocitosis. Mientras que los M2 dan como resultado una forma más circular grande y condensada, sugestiva a daño celular y tienen una disminución en la viabilidad al ser tratados con estímulos como Dexametasona (DEXA) o IL-4. (Patel *et al.*, 2012; Porcheray *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2014; Longtao Wang *et al.*, 2017).

La vía de señalización del Factor Nuclear Kappa-B (NF- κ B) involucra la regulación de genes con la inmunidad, inflamación y supervivencia celular. Existen muchas rutas implicadas en la activación de NF- κ B. La vía canónica o vía que se sigue frecuentemente, es la estimulada por TNF- α , IL-1 o por componentes patógenos bacterianos o virales. NF- κ B activa la transcripción de genes como: IL-8, IL1 β , IL-6, IL-12, TNF- α (Kegg pathway, 2020).

7.-Antecedentes.

La activación de macrófagos se ve afectada durante la infección por PRRSV porque éste se replica dentro de estas células; lo que facilita la infección, distribución y latencia en el organismo. Se conoce que la respuesta inmune adaptativa celular es un factor imprescindible para eliminar la infección con PRRSV (Loving *et al.*, 2015; Pileri and Mateu, 2016).

Por otro lado, el PRRSV es un miembro de la familia *Arteriviridae* del género *Arterivirus*, otros miembros de este grupo incluyen el virus equino de la arteritis, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (Plageman *et al.*, 1992).

Particularmente, el dominio N-terminal de esta proteína evita la activación de macrófagos y se ha reportado que disminuye la expresión de IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL6 en macrófagos infectados (Xing *et al.*, 2015).

Por otro lado, al evaluar la activación de monocitos/macrófagos de ratón, en un modelo celular *in vitro*, utilizando la línea celular (RAW264.7) en respuesta al estímulo de tres péptidos sintéticos identificados en la proteína GP5 de PRRSV, los cuales se ha sugerido son probables epítomos T, denominados GP5T1, GP5T2 y GP5T3. A partir de los datos obtenidos se evaluó la expresión de citocinas y quimiocinas, 1 y 8 h después del tratamiento con los

tres péptidos de manera independiente. Los datos mostraron que el péptido **GP5T1** indujo la expresión significativa de INF- α 4 e IFN- β 1 después de 1h de tratamiento, y a las 8h posteriores expresó IL-1 β , IL-10 e IFN- β 1. Por su parte, el péptido **GP5T2** indujo la expresión de todas las citocinas evaluadas después de una hora de tratamiento y expresó IL-1 β , IL-10, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8h de tratamiento. Finalmente, el péptido **GP5T3**, de igual manera favoreció la expresión de todas la citocinas e interferones evaluados después de 1h de tratamiento con excepción de IL-10 e IL-12 y expresó IL-1 β , IL-10, IL-12, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8 h de tratamiento. Por otro lado, los datos mostraron que los tres péptidos indujeron el cambio morfológico de monocito a macrófago después de 1 y 8 h de tratamiento, de manera similar al comportamiento de los controles LPS, DEXA y TNF- α . Los péptidos GP5T2 y GP5T3 fueron capaces de activar al gen reportero, sugiriendo la participación de la vía de señalización NF- κ B. (Díaz Piña M. Tesis de Maestría, 2021).

En este trabajo estudiamos los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 de la proteína GP5 del PRRSV, de los cuales se ha sugerido son capaces de activar una respuesta inflamatoria que ayuda a que sean blanco de linfocitos T. Para lo cual, se analizó la expresión de la proteína TNF- α , por un lado, se determinó la expresión en un modelo *in vitro*, utilizando macrófagos de cerdo tratados con los péptidos virales y, por otro lado, se midió la expresión de TNF- α en suero de cerdos PRRSV+ y PRRSV-.

8.-Justificación

La incidencia del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino ha sido causante de grandes pérdidas de importancia a nivel económico a todo el sector productor de porcinos industrializado y no industrializado alrededor del mundo. Este virus afecta a cerdos de todas las edades, modulando la respuesta inmunológica de los animales infectados, teniendo largos periodos de latencia. Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria ya que regulan señales tanto autocrinas como paracrinas que afectan de manera directa los procesos inflamatorios y antivirales. Evaluar la respuesta humoral generada por los tres péptidos sintéticos derivados de la proteína GP5, generará conocimiento nuevo sobre su posible participación para la inducción de la respuesta inmune celular. Los epítomos de reconocimiento presentes en los complejos proteicos de envoltura viral, tales como la proteína GP5 del PRRSV, parecen ser suficientes para inducir una respuesta inmunológica,

sin embargo, no ha sido complemente descrita su participación en el contexto del modelo porcino.

9.-Hipótesis

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GPT3 derivados de la proteína GP5 del virus PRRS, son capaces de favorecer la expresión de la proteína TNF- α , en contraste con la inhibición de la expresión de TNF- α en cerdos infectados con PRRSV.

10.-Objetivo general

Evaluar la expresión de TNF- α en macrófagos tratados con péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV, en comparación con la expresión de TNF- α , en animales positivos a PRRSV.

11.-Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de TNF- α en macrófagos tratados con péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV.
2. Evaluar la expresión de TNF- α en sueros de cerdos negativos y positivos a PRRSV.

12.-Materiales.

12.1.-Muestras biológicas sanguíneas.

Se utilizaron 16 muestras sanguíneas de lechones de granjas tecnificadas, 8 de los lechones que mostraban los síntomas característicos del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, tales como anorexia, ictericia, diarrea, conjuntivitis, caquexia entre otros. Los otros 8 lechones eran animales sanos; se realizó una venopunción para la obtención de sangre total a través de la vena yugular ubicada a un costado de la tráquea del cerdo, finalmente por centrifugación se obtuvo el suero sanguíneo de los animales.

Todos los procesos de manejo y obtención de muestras para el trabajo fueron hechos bajo las normas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-056-ZOO-1995.

12.2.-Péptidos.

Se utilizaron tres péptidos generados a partir de la secuencia de la proteína GP5 del virus PRRSV, denominados GP5T1, GP5T2 y GP5T3; los cuales corresponden a epítomos de reconocimiento para linfocitos T, con un alto grado de conservación (por encima de 80% de homología) entre los diferentes genotipos reportados (Cui *et al.*, 2016).

Para el diseño y caracterización de los péptidos se utilizaron las bases de datos, Immune Epitope Database (IEDB) y CCL Main Workbench 20.0. Se eligieron aquellas secuencias que tenían un alto grado de conservación entre cepas del virus, con una longitud aproximada de 15-30 aminoácidos, que fueran epítomos de reconocimiento para linfocitos T, además se evaluó su antigenicidad, hidrofiliidad, carga, solubilidad y peso molecular. Los parámetros evaluados fueron la expresión de TNF- α y la capacidad de inducir la proliferación de Linfocitos T. Posteriormente, el diseño se realizó con base en las dos mejores secuencias reportadas (Díaz Piña M., Tesis de Maestría 2021).

12.3.-Línea celular 3D4/31 (ATCC ® CRL-2844™).

Las células 3D4/31 provienen del organismo vivo *sus scrofa*, (aislados de macrófagos alveolares del cerdo y que son células diana de PRRSV) el tipo de célula es macrófago alveolar, con una edad de 27 días, genero desconocido, con una morfología de macrófago, y posee propiedades de crecimiento adherentes, estas células necesitan medio completo: RPMI 1640 con 2mM de L-glutamina conteniendo 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 4.5 g/L de glucosa, 10 mM de HEPES, 1.0 mM piruvato de sodio suplementado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 90% de suero bobino fetal. (ATCC 2021). Se utilizaron células en el pase número: XX para los experimentos.

12.4.-Estímulos.

Los estímulos control utilizados en los experimentos fueron Lipopolisacáridos (LPS), Dexametasona (DEXA), Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF-a), donde las concentraciones se indican en la tabla 2 conforme a lo reportado por la literatura.

Tabla 2. Concentración usada para la estimulación de células 3D4/31

ESTÍMULO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
LPS	1µg/mL	(Tang <i>et al.</i> ,2018)
DEXA	1µg/mL	
TNF-A	50 ng/mL	(Mastropietro <i>et al.</i> , 2015)
GP5T1	5µg/mL	(Vashisht <i>et al.</i> , 2008)
GP5T2	5µg/mL	
GP5T3	5µg/mL	

12.5.-Reactivos prueba de ELISA.

Kit de ELISA contiene todos los componentes clave para la cuantificación cuantitativa de la natural o recombinante TNF- α Humana en un formato ELISA sándwich con un rango de detección de 23 a 3000 pg/ml. El kit consta de los siguientes elementos.

- Microplaca de ELISA
- Anticuerpo de captura
- Anticuerpo de detección
- Standard
- Conjugado de Avidina-HRP
- Sustrato liquido ABTS
- Buffer de Bloqueo
- Buffer de lavado
- Diluyente 20x

Tabla 3. Reactivos para determinación de TNF- α

<i>Reactivo</i>	<i>Descripción</i>	<i>Marca y No. Catalogo</i>
<i>Anticuerpo de captura</i>	Conejo anti-humano TNF- α 0.5mg D-manitol	PeptoTech; #500-P31A-EDK
<i>Anticuerpo de detección</i>	Conejo biotinilado anti-humano TNF- α + 0.5 mg D-manitol	PeptoTech; #300-01ABT-EDK
<i>Estándar</i>	TNF- α recombinante de humano + 2.2mg BSA + 11.0 mg D-manitol	PeptoTech; #300-01A-EDK
<i>Conjugado de Avidina HPR</i>	Avidina peroxidasa de rabano picante	PeptoTech; #AVIDIN-18UL
<i>Buffer de lavado</i>	PBS 20x	PeptoTech; Cat. #14200-075
<i>Buffer de bloqueo</i>	Buffer de bloqueo 20x	PeptoTech; Cat #P-7949
<i>Diluyente</i>	Diluyente 20x	PeptoTech; Cat #3590
<i>Sustrato liquido ABTS</i>	Sustrato ABTS	PeptoTech; Cat. # A3219

12.6.-Obtención de proteínas totales a partir de macrófagos (Método buffer RIPA)

El buffer RIPA, es un tampón de lisis utilizado para lisar las células y tejidos para ensayos de radio inmunoprecipitación (RIPA). Este buffer desnatura los compuestos celulares gracias a detergentes iónicos como componentes activos y es particularmente útil para la

interrupción de las membranas nucleares en la preparación de extractos nucleares, el buffer puede desnaturalizar las quinasas (Alcaraz C., *et al.*, 1990; Ngoka LC., 2000).

Composición del buffer RIPA.

- Tris al 50mM con un PH 7.4
- NP-40 al 0.5%
- NaCl al 100mM
- PMSF al 100mM
- Inhibidor de proteasas “complete mini” ROCHE

12.7.-Determinación de proteínas totales (Ensayos Bradford).

El ensayo de Bradford es un ensayo colorimétrico para determinación de proteínas. Este método se basa en el cambio de la absorbencia del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 que se une a las proteínas, en concreto a los residuos de aminoácidos y a sus bases aromáticas. El reactivo de Bradford actúa de manera no protonada, esta es detectada por la lectura de absorbancia a 595 nm por espectrofotometría a fin de cuantificar la concentración de proteínas. Las interacciones iónicas e hidróficas estabilizan la forma aniónica del colorante, causando un cambio visible del color (Mara M., 2018). El ensayo de Bradford consta de los siguientes reactivos.

- Albumina de suero bovino (BSA) presentación comercial BSA purificada, New England Biolabs 10mg/ml
- Microplaca de ELISA
- Reactivo de Bradford

12.8.-EXTRACCIÓN DE RNA MÉTODO TRI reagent®

La solución TRI Reagent® es un producto patentado por MRC para el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas. El reactivo es una versión mejorada del popular método single-step para el aislamiento de ARN total (Chomczynski et al 1994). Es una solución monofásica que contiene fenol con tiocianato de guanidina. TRI Reagent® proporciona un método confiable, rentable y eficiente de aislamiento de ARN.

Reactivos necesarios para la extracción de RNA por método TRI reagent®:

- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Agua ultrapura

12.9.-RT-PCR

La reacción de RT-PCR se estableció usando el kit RevertAid First Strand cDNA ThermoScientific (No.Cat. K1622) según especificaciones del proveedor. La reacción se incubó a 55 ° C durante 1 h para la síntesis del ADNc. Después de la síntesis de ADNc, el ADN diana se amplificó mediante PCR utilizando los tres pares de primers correspondientes a tres diferentes orfs de PRRSV.

Reactivos necesarios para RT-PCR:

- RNA templado
- Oligo (dT) primer
- Agua ultrapura
- Reaction buffer
- Ribolock RNase inhibitor (20 u/ ml)
- 10mM dNTP Mix
- RevertAid M-MuLV RT (200 u/ ml)

13.-Metodología.

13.1.-Obtención de muestras sanguíneas.

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de lechones de entre 3 a 9 semanas a través de punción venosa, se realizó la toma de muestra de sangre periférica, en dos granjas porcícolas. Siguiendo protocolos estandarizados (**anexo I**), las muestras fueron tomadas a partir de 16 lechones, 8 de ellos poseían signos y síntomas característicos del PRRS y 8 de ellos no presentaban ningún signo clínico referente al PRRS. Para confirmar la presencia de PRRSV se realizó una amplificación de 3 distintos ORF's que indican una presencia de latencia generada por el patógeno PRRSV obtenidos por RT-PCR (**anexo II**). Las muestras positivas a la infección fueron rectificadas por un tercero para la confirmación de la presencia de los patógenos en las muestras (**Anexo III**). Las muestras negativas a PRRSV fueron tomadas a partir de 8 animales sanos que no poseían signos ni síntomas de enfermedad, proveniente de una granja con certificado Libre de ciertos patógenos, entre ellos PRRSV, PCV2 e Influenza porcina evaluado a través de por PCR, con certificado vigente de buenas prácticas emitido por la Organización Mexicana de Certificación Ganadera y Alimentaria A.C (OMECEGA). Dicha granja está localizada en Dolores Hidalgo, Guanajuato. La colecta de sangre se realizó conforme a lo establecido en las normas oficiales mexicanas vigentes: NOM-062-ZOO-1999 y NOM-056-ZOO-1995. Finalmente, por centrifugación se separó el paquete celular del suero y se almacenó a -80°C hasta su uso.

13.2.-Extracción de RNA viral y RT-PCR.

Una vez obtenidos los sueros de los animales con los signos clínicos característicos de PRRS se tomó una alícuota de suero, se realizó la extracción de RNA siguiendo el protocolo de extracción de RNA TRI reagent ® (**anexo IV**). Posteriormente se tomó una alícuota y se cuantifico en el equipo nanoDrop, se verifico que la pureza de esta se encontrara en un rango de 1.8-2.0 en relación a el campo de luz visible de 260/280 nm.

Posteriormente se realizó la RT-PCR utilizando la enzima (RevertAid H Minis Reverse Transcriptase/ Thermo Fisher Scientific ®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el material genético retrotranscrito o cDNA. se realiza una electroforesis para observar los amplicones generados, a través de un gel de agarosa, las bandas

amplificadas nos muestran la presencia o ausencia de los ORF's esto gracias a los cebadores específicos a PRRSV (**anexo II**).

13.3.-Síntesis química de péptidos.

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 se sintetizaron químicamente a través de un proveedor externo GenScript. Ellos utilizaron la técnica de Síntesis de Fase Sólida. La cuál consiste en fijar el primer aminoácido a un soporte sólido (suele ser de un polímero sintético) y por medio un proceso cíclico se incorporan los aminoácidos de la secuencia establecida. La síntesis ocurre en la dirección del grupo carboxilo (C) al amino terminal (N), donde se unirá el otro aminoácido mediante un enlace peptídico. Este proceso se repite hasta que las cadenas de péptidos son ensambladas.

Al finalizar la síntesis el péptido es purificado por medio de Cromatografía Líquida de Alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) de fase reversa. Posteriormente, la caracterización del péptido se hace por Espectrometría de Masas (MS, siglas en inglés). La prueba de Solubilidad se realiza diluyendo el péptido sintetizado ya se en agua grado molecular o DMSO, y se define como insoluble cuando se ha disuelto menos de 0.1 mg/mL (Díaz Piña M. 2021).

13.4.-Estimulación de PAM.

A partir de células provenientes de cultivo celular en la línea 3D4/31 (PAM) se cuantifico la cantidad de células con la cámara de Neubauer y el microscopio de lente focal invertido, para determinar la concentración de células y así poder realizar una disolución y obtener una concentración de 1×10^5 células. Se sembraron 24h previas a la estimulación en una placa de cultivo celular (Corning TM) de 24 pozos con 500 μ l de medio completo: Medio RPMI-1640 (Sigma, # Cat. R5158) con 10% SFB. Para realizar la estimulación en el medio RPMI se realizaron las disoluciones necesarias para adicionar cada estímulo (DEXA, TNF- α , LPS, T1 [GP5T1], T2 [GP5T2] y T3 [GP5T3]) en las concentraciones indicadas (**Tabla 2**). Una vez conocida la cantidad de estímulo que se adiciona por pozo, se realiza un triplicado de cada muestra incubándose por 8h en la incubadora a una atmosfera de aire de 37°C y 5% de CO_2 .

13.5.-Extracción de proteínas totales de las células 3D4/31.

Para la extracción de proteínas totales se utilizó el buffer RIPA a una concentración de 1mM con inhibidores de proteasa (PMSF y complete mini) partiendo de un stock de 100mM de tal manera que lise a las células, pero no a las proteínas presentes. Se utilizó este buffer para despegar las células de una placa de cultivo celular de 24 pozos, con la finalidad de obtener el lisado celular, a cada pozo se le agrego 100 µl de inhibidores de proteasas, una vez recuperando el lisado en tubos Eppendorf de 0.6 ml se almacenaron por 24h en ultracongelación (-80°C). Posteriormente se realizó una centrifugación de cada muestra a 1 min por 12000 rpm. Recuperando el sobrenadante que contiene la proteína total soluble y desechando la pastilla celular. La forma correcta de almacenado del sobrenadante es en ultracongelación.

13.6.-Cuantificación de proteína total por método de Bradford.

Los ensayos de Bradford consisten en métodos colorimétricos de proteínas totales, se realiza una dilución de albumina de suero bovino (BSA) a partir de la presentación comercial de BSA New England Biolabs 10mg/ml a una concentración stock de 100 µg/ml para realizar una curva de calibración. Se prepara la curva de calibración y las muestras por duplicado en placa de 96 pozos (Plate 96-well Sarstedt).

Tabla 4. Curva de calibración de Bradford con albumina de suero bovino (BSA)

µg de BSA	µl de BSA [100 µg/ml]	µl de agua destilada	µl de reactivo de Bradford	Volumen final por pozo
CURVA PATRÓN				
0	0	100	100	200
1	10	90	100	200
2	20	80	100	200
4	40	60	100	200
6	60	40	100	200
8	80	20	100	200
MUESTRAS 1µ		99	100	200

Posteriormente se le agrego 1 μ l de cada muestra a analizar de las extracciones de proteína con los diferentes estímulos para determinar la cantidad de proteína presente por μ g de BSA.

13.7.-Determinación de la expresión de TNF- α .

Para la determinación de TNF- α se realizaron Ensayos Inmuno Absorbentes Ligados a Enzimas (ELISA) tipo sándwich. El kit de ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de proteínas secretadas como citocinas y quimiocinas, también como proteínas intracelulares señalizadoras. El kit de Human TNF- α Mini ABTS ELISA contiene los componentes clave requeridos para la cuantificación de la natural y recombinante Human TNF- α en un formato ELISA sándwich. Siguiendo las recomendaciones del proveedor, se realizó la preparación de la placa de ELISA de 96 pozos, fijando el anticuerpo de captura, se incubó por al menos 12h a una temperatura ambiente, fijando así el anticuerpo al pozo. Posteriormente, se añade un buffer de bloqueo evitando así las uniones inespecíficas con otras proteínas, este se incubó por 1h a temperatura ambiente.

Para la preparación de la curva del estándar se realiza una dilución seriada partiendo de 3000pg/ml hasta cero en diluyente, realizando un triplicado por cada muestra estándar. Para las muestras previamente se realizó la cuantificación de proteína total, con la finalidad de añadir la misma cantidad de proteína a cada pozo (**tabla 4**) una vez añadida la muestra se incubó por 2h a temperatura ambiente. De los datos obtenidos se agregaron 10ul para la evaluación del kit.

La curva de calibración se preparó mediante diluciones el anticuerpo de captura en una concentración 1.0 μ g/ml. Adicionando 100 μ l por cada pozo en la microplaca de ELISA, esta se fija a la placa por alrededor de 12h. Una vez fijado el anticuerpo de captura se lava por pozo utilizando el buffer de lavado. Una vez lavada la placa se añade 300 μ l de buffer de bloqueo a cada pozo, evitando así las uniones inespecíficas, este buffer se dejó incubando por 1h. el proceso de lavado se repite una vez más. A partir del “Standard” se realizó una disolución de 3000 pg/ml hasta cero en diluyente.

Para la detección de TNF α , se utilizó un anticuerpo de detección en diluyente a una concentración de 0.50 $\mu\text{g/ml}$. Añadiendo a cada pozo 100 μl por pozo, dejando incubar por 2h a temperatura ambiente, de tal manera que el anticuerpo ya fijado a la placa sufra una biotinización esta se deja incubar por 2h. Posteriormente se realizó un lavado y se adicionó una disolución del conjugado Avidin HRP en una concentración 1:2000 en diluyente hasta un volumen de 11ml, se añade 100 μl por pozo y se incubó por 30 minutos. Posteriormente se repitió el proceso de lavado, y se añadió el sustrato líquido ABTS a 100 μl por pozo, y se dejó incubar unos minutos a temperatura ambiente, comenzando a mostrar un cambio de color, la lectura fue realizada a través de un microlector de placas de ELISA con una longitud de onda de 405 nm con una corrección a 650 nm, las curvas del standard fueron obtenidas gracias a la densidad óptica (D.O.) y las muestras a analizar fueron leídas por 30 minutos, en intervalos de 5 minutos.

13.8.-Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism, V6, este software fue utilizado para el procesamiento de datos, análisis estadísticos, y producción de gráficas de resultados obtenidos.

Para el modelo *in vivo* se utilizó el análisis estadístico, ANOVA de una vía, el análisis pos-hoc con prueba de T-student. El * indica diferencia significativa, con valor de $P \leq 0.05$

Para el modelo *in vitro*. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron en dos experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba pos hoc de Tukey. El * en las gráficas indica diferencia significativa, con valor de $P \leq 0.05$; ** indican una $P \leq 0.001$. y *** indican $P \leq 0.0001$.

14.-Resultados.

Se utilizó el modelo *in vivo* en porcinos. Para la evaluación de la citocina, TNF- α se realizó un ensayo tipo ELISA sándwich en el cual se analizaron 16 muestras de animales, 8 animales positivos a la infección por PRRSV y 8 muestras negativas a la infección por PRRSV. Los datos de las pruebas de diagnóstico se encuentran en los anexos I y II. La prueba de ELISA tiene un rango de detección de esta citocina de 23 hasta 3000 pg/ml de la proteína. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado siguiendo las recomendaciones de la norma ISO10993-5 (Figura 6).

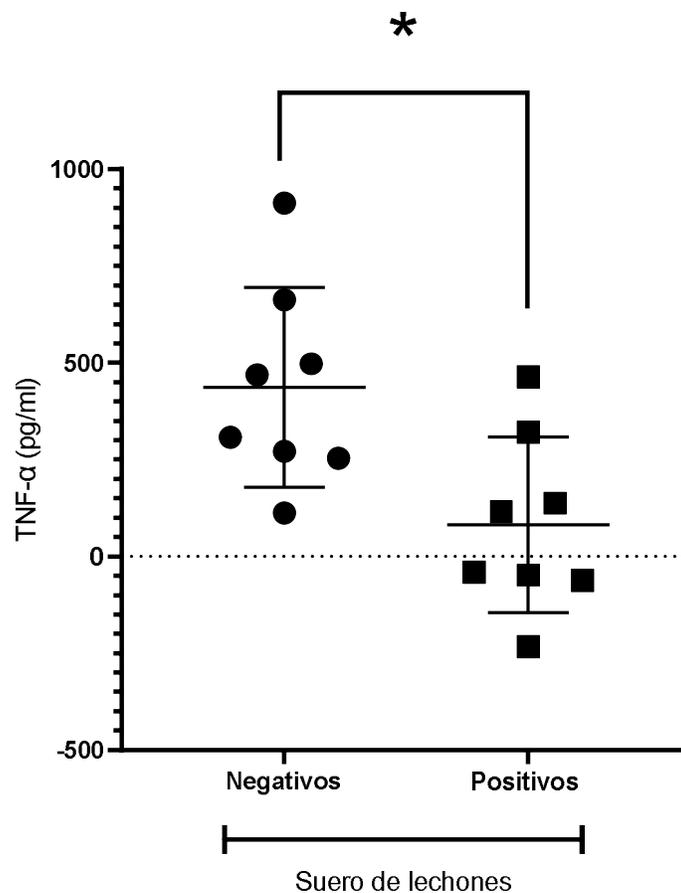


Figura 6. Análisis de TNF- α en sueros porcinos positivos y negativos a la infección por PRRSV. A partir de los sueros positivos y negativos a la infección por PRRSV se realizó el análisis de TNF- α . Se observó una disminución significativa de la expresión de TNF α en los cerdos positivos a PRRSV. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía, el análisis pos-hoc con prueba de T-student. El * representa un valor de $P \leq 0.05$ con respecto a los sueros de lechones negativos. N=8

De los análisis obtenidos se observó que la expresión de TNF- α , fue menor en los animales infectados, en comparación con los animales sanos. Este dato corresponde a lo que se ha mostrado anteriormente en la literatura, en relación con la capacidad de los virus de inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias y con funciones antivirales tal como lo es TNF α . Modulando así la expresión de los procesos inmunitarios en las células encargadas de la respuesta inmunitaria en este contexto, actualmente se llevan a cabo estudios para determinar si las vías de señalización tales como NFAT, CREB y el factor nuclear NF κ - β , podrían estar involucradas (Beura et al., 2009; Chen et al., 2009; Kim *et al.*, 2010).

Por otro lado, para el modelo *in vitro*, se utilizaron macrófagos alveolares de cerdo. Las células fueron tratadas con diversos estímulos individualmente, realizado este proceso por triplicado en tres experimentos independientes. Los estímulos utilizados fueron: Control; células sin tratamiento, Dexametasona (DEXA); células tratadas con un fármaco anti-inflamatorio, Lipopolisacáridos (LPS); células fueron tratadas con restos bacterianos precursores de la inflamación, TNF- α ; células tratadas con la citocina proinflamatoria caquectina, GP5T1, GP5T2 y GP5T3; células tratadas con 3 péptidos diseñados a partir de la proteína GP5 del virus PRRSV. Una vez pasadas 8 horas de tratamiento a los PAM con los diversos estímulos, se realizó la extracción de proteínas totales con ayuda del Buffer de lisis (RIPA + inhibidores de proteasas), una vez obtenida las muestras lisadas se almacenan en ultracongelación. Cabe destacar que las concentraciones de los tratamientos utilizadas fueron descritas con anterioridad en (Piña- Díaz *et al.*, Tesis de Maestría 2021), quien realizó un análisis dosis-dependiente, para optimizar el uso de estos.

Para la cuantificación del lisado celular, provenientes de cultivo celular, se realizó la cuantificación de proteínas totales en cada muestra, a través de método de Bradford. Se determinó la concentración de proteínas totales en relación con una curva de calibración elaborada mediante software estadísticos, utilizando una proteína conocida como lo es la BSA contra la cantidad de proteína desconocida. La concentración de proteínas en el lisado celular se utilizó como factor de corrección de carga (**Figura 7**).

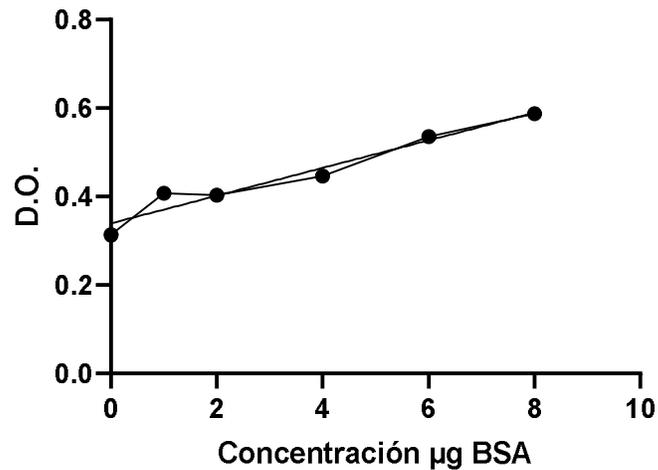


Figura 7. Curva de calibración de albumina de suero bovino (BSA). Curva de calibración de concentración conocida de 10 µg de proteína (BSA), esta se interpola contra la concentración desconocida obtenida de proteína total de células provenientes de cultivo celular, con la finalidad de determinar la cantidad de proteína total presente, obtenida de lisado celular de PAM. Se calculó realizando una regresión lineal; R^2 0.95. La interpolación fue realizada mediante la ecuación $Y = 0.03128 * X + 0.3398$.

Para la evaluación de TNF- α se utilizó el kit comercial Human TNF- α Mini ABTS ELISA Development. La curva de calibración se preparó mediante diluciones el anticuerpo descritas en la metodología.

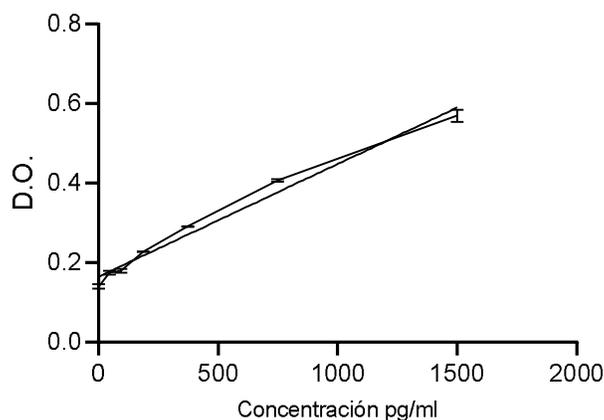


Figura 8. Curva de calibración del Estándar TNF- α . Curva de calibración de concentración de Standard conocida de 3000 pg/ml hasta cero, esta se interpola contra la concentración desconocida de las muestras a analizar provenientes de lisado de cultivo celular obtenida de proteína total de células provenientes de cultivo celular, con la finalidad de determinar la cantidad de la citocina TNF- α presente. Se calculó realizando una regresión lineal; $R^2 = 0.98$. La interpolación fue realizada mediante la ecuación $Y = 0.0002836 * X + 0.1646$.

Tal como se indica en la curva de calibración, las condiciones de la muestra fueron adecuadas para su posterior evaluación. Para la detección de TNF α , se siguieron las indicaciones del fabricante del Kit de ELISA, los resultados de muestran en la **(Figura 9)**.

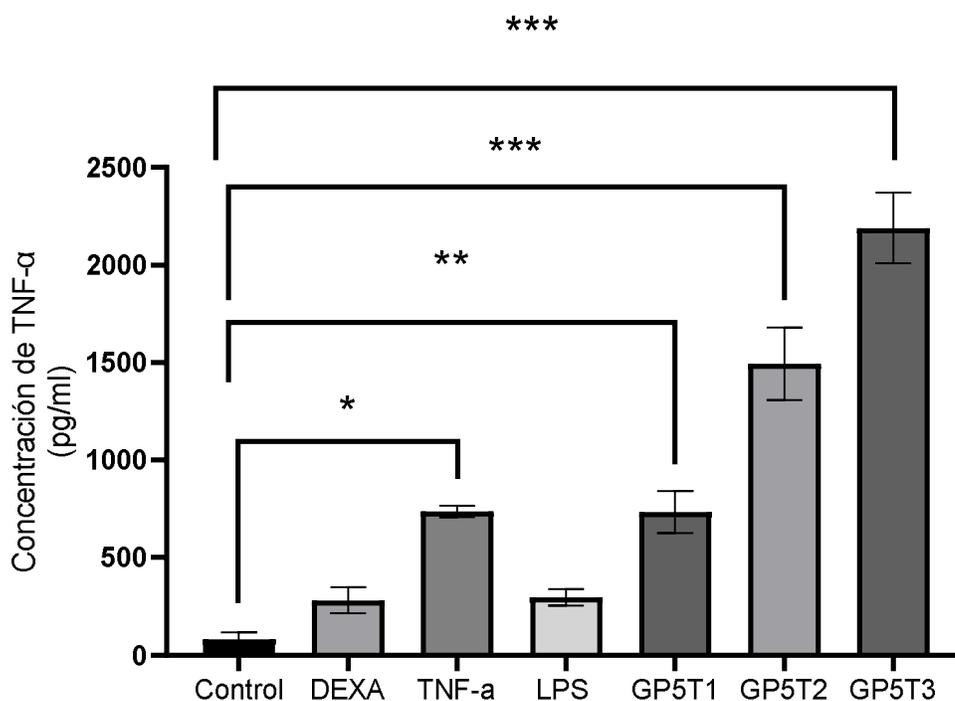


Figura 9. Expresión de TNF- α en células 3D4/31. Las células 3D4/31 fueron tratadas con diferentes estímulos. Los estímulos utilizados fueron; Control (sin estímulo); DEXA (1 μ g/ml); TNF- α (50 μ g/ml); LPS (1 μ g/ml); Péptidos: GP5T1 (1 μ g/ml); GP5T2 (1 μ g/ml); GP5T3 (1 μ g/ml). Los tratamientos se realizaron por triplicado y se analizaron en dos experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba pos hoc de Tukey. El * indica diferencia significativa, con valor de $P \leq 0.05$; ** indican una $P \leq 0.001$. y *** indican $P \leq 0.0001$.

Todos los estímulos presentados ante los PAM tuvieron una activación de la citocina TNF- α , de acuerdo con los análisis estadísticos por medio de la prueba de Tukey. De tal manera, que en comparación al Control (células sin estímulo) DEXA no es significativo de control; Las células control comparadas con TNF- α si presentaron un valor significativo en presencia de TNF- α ; Las células control contra los Lipopolisacaridos no mostraron un valor significativo en comparativa a las células sin estímulo; Las células control en comparativa con las células estimuladas con los péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS mostraron una significancia alta en comparativa a las células control, en el orden

GP5T3>GP5T2>GP5T1. La determinación de esta se realizó siguiendo las recomendaciones de la norma ISO-10993-5. Los péptidos sintéticos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 mostraron una inducción de la expresión de TNF- α .

15.-Discusión

El virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino es un patógeno que afecta a los porcinos en diferentes etapas de la vida, este patógeno cobra importancia, porque genera cuantiosas pérdidas a los productores de porcinos. La mortalidad en lechones asociada a la presencia del PRRSV llega a ser hasta del 100%. Por otro lado, los animales infectados por PRRSV que sobreviven, muestran retraso en el crecimiento, mientras que las cerdas reproductoras gestan cerdos momificados, mortinatos y nacidos débiles. La prevención de este virus patógeno es primordial para todo productor porcino a nivel mundial. El método más empleado para la prevención de enfermedades virales es la vacunación, partiendo de modelos vacúnales clásicos que constan de virus atenuados o inactivados (Montaner-Trarbes *et al.*, 2019). En el mundo se cuenta con vacunas que contienen el PRRSV atenuado. Sin embargo, no son utilizadas ampliamente porque se ha descrito que el virus vacunal puede recuperar la virulencia, el cual llega a ser más agresivo que las cepas silvestres (Zhou *et al.*, 2018).

En años recientes se han realizado investigaciones para dilucidar la participación de epítomos de reconocimiento de Linfocitos T, presentes en la proteína GP5 del virus PRRSV, sin embargo, a la fecha, poco se conoce sobre su participación en la modulación de la respuesta del macrófago.

En trabajos previos en el grupo de trabajo, se identificaron y se sintetizaron químicamente tres péptidos derivados de la proteína GP5, denominados GP5T1, GP5T2 y GP5T3, los cuales de acuerdo con análisis *in silico* mostraron ser probables epítomos de reconocimiento de linfocitos T. Dos de los tres péptidos evaluados en este trabajo (GP5T1 y GP5T2), fueron diseñados partiendo de fragmentos virales que ayudan al reconocimiento para linfocitos T y seleccionados de un conjunto de 96 pentadecapeptidos extraídos a partir de la proteína GP5 del virus PRRSV (Vashisht y colaboradores 2008). Por su parte GP5T3, este compuesto por los péptidos GP5T1 y GP5T2 (Piña-Díaz, *et al.*, Tesis de Maestría 2021). En el trabajo

realizado previamente por Diaz-Piña., *et al* (2021), se evaluó la capacidad de los tres péptidos mencionados, de modular la expresión del ARNm de macrófagos de ratón y de inducir la polarización de éstos mismos. Los datos sugirieron que los tres péptidos fueron capaces de inducir la activación de macrófagos alveolares de ratón hacia el fenotipo M1, de manera similar al estímulo con TNF- α . Sugiriendo que la inducción del ambiente proinflamatorio favorece la polarización al fenotipo M1 de macrófagos.

Los datos descritos en macrófagos de ratón, dieron la pauta para la investigación en el modelo porcino, por tanto, resultó interesante comparar la expresión de TNF α tanto en los macrófagos porcinos tratados con péptidos virales que mostraron ser suficientes para desencadenar la expresión de citocinas pro-inflamatorias y contrastar con la expresión del mismo marcador en animales infectados.

Las pruebas fueron realizadas mediante detección del ensayo de ELISA. Una de las dificultades que se encontraron es que los proveedores de anticuerpos y métodos de inmunodetección para muestras de cerdos son escasos. Por tanto, previo a la experimentación se realizó un análisis de homología entre la secuenciación nucleotídica de TNF- α de *sus scrofa* descrita en Genbank (anexo 5), *versus* TNF α humano, provisto en el de Kit Human TNF- α Mini ABTS ELISA Development Kit (anexo 6). Los datos mostraron un valor del 81%, superando la homología mínima requerida para la inmunodetección, ver anexo 7.

Los datos mostraron que los péptidos GP5T1, GP5T2, y PG5T3 fueron capaces de activar la expresión de TNF- α en los macrófagos de cerdo, en el orden GP5T3>GP5T2>GP5T1. Lo cual robustece la hipótesis de que dichos péptidos son capaces de activar una respuesta inflamatoria y sugiere su participación en el reconocimiento del patógeno y el despliegue de la respuesta inmune mediada por células. El péptido GP5T3 favoreció una mayor expresión de TNF- α , superando a la expresión producida por el mismo TNF- α , sugiriendo un efecto sinérgico cuando se utilizan ambos epítomos.

Por otro lado, en porcinos naturalmente infectados por el virus PRRSV, se mostró que TNF- α se encuentra suprimido en animales positivos a PRRSV, en concordancia con los datos de la literatura. Los animales positivos a PRRSV, en comparación, con los animales control, mostraron una disminución estadísticamente significativa de TNF- α , ver figura 6. Sugiriendo

que la expresión de factor de TNF- α se ve comprometida durante la infección por PRRSV. Esta desregulación en la expresión de TNF- α , podría condicionar para la respuesta eficiente de Interferón gamma (INF- γ), el cual constituye una de las más importantes moléculas antivirales. De hecho, se ha descrito que la expresión de INF- γ es estimulada por IL-12 y TNF- α (Gómez-Laguna *et al.*, 2010), en consecuencia, se podrían ver afectadas las funciones de los Linfocitos T y B.

El TNF- α posee funciones quimio tácticas que pueden ayudar a la activación tanto autocrina como paracrina de las células y la producción de diversas quimiocinas y citocinas, de tal manera que podría desencadenar una respuesta inmunológica antiviral especializada a células T. El estudio cobra gran relevancia al realizarse en las células diana del patógeno, respondiendo de manera positiva a la inducción del factor de necrosis tumoral, ya que, en comparativa con la activación de las células con los diversos estímulos, mostró el aumento en la expresión de TNF α , favorecida por la presencia de péptidos derivados de una de las proteínas virales que conforma el complejo proteico a través del cual el virus se une al receptor CD163 del macrófago. Tomando en consideración estos datos en conjunto, estos datos podrían contribuir para el desarrollo de inmunógenos que ayuden a la prevención de la infección de este patógeno.

16.-Conclusión

Los animales infectados con PRRSV generalmente sufren daños de carácter respiratorio y reproductivo, debido a la capacidad del virus de evadir la respuesta del sistema inmunológico del hospedero. Por primera vez, se mostró evidencia que indica que los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 derivados de la proteína GP5 del PRRSV, son suficientes para favorecer la expresión de TNF- α . Por otro lado, resulta interesante que, en animales naturalmente infectados por el PRRSV, la expresión de TNF- α , se encuentra suprimida, en concordancia con la literatura en la que se ha mostrado que la proteína Nsp1 del PRRSV es la responsable de dicha supresión. Se requerirán estudios adicionales para investigar si la inmunización de porcinos con los péptidos aquí descritos, solos o en conjunto con otros epítomos, son capaces de favorecer la expresión de TNF- α y citocinas proinflamatorias en porcinos y si dicha regulación despliega la respuesta inmune antiviral fuerte y sostenida.

17.-Bibliografía

1. Abbas, Abul k. (2015). "Inmunología Celular y Molecular." In España: Elsevier Inc.
2. ALBINA E, PIRIOU L, HUTET E, CARIOLET R, L'HOSPITALIER R. (1998). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61:49-66.
3. Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM. (1990). "Comparación de un ensayo de radioinmunoprecipitación inmunoblotting y ELISA para la detección de anticuerpos al virus de la peste porcina africana". *J. vet. Diagn. Invertir.* 2 (3): 191-6. doi:10.1177/104063879000200307. PMID2094444.
4. Arias M, Barceló J, Muñoz A, Sánchez-Vizcaíno JM. (2003). "Síndrome respiratorio reproductivo porcino. Sánchez-Vizcaíno JM editor. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas"
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>. Consultado 29 Nov.
5. Arpa, Luis. (2008). "Mecanismos Moleculares Que Regulan La Activación Clásica y Alternativa En Los Macrófagos." : 151.
6. ATCC, (2005). 3D4/31, CRL-2844 *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 5–24.
7. BALASURIYA UB, MACLACHLAN NJ. (2004). "The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses." *Vet Immunol Immunopathol*;102:107-129.
8. BAUTISTA EM, MOLITOR TW. (1997). "Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine" *Viral Immunol* 1997;10:83-94.
9. Benfield DA, Collins JE, Dee SA, Halbur PG, Joo HS, Lager KM, et al. (1999) "Porcine reproductive and respiratory syndrome". In: Straw B, et al editors. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press:201- 232.

10. Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattanaik, A.K., Osorio, F.A., (2009) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation". *J. Virol.* 84 (3) 1574-1584.
11. Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. (2002). "Porcine respiratory disease complex" In *Polymicrobial Diseases*, ed. KA Brogden, JM Guthmiller, pp. 231–58. Washington, DC: ASM Press
12. Callen A. (2006). "La problemática del control del PRRS en granjas de reproducción" http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=388. consultado el 29 de Nov 2021.
13. Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, et al. (2007). "CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses" *J. Virol.* 81:7371–79.
14. CANCEL-TIRADO SM, EVANS RB, YOON KJ. (2004). "Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection" *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:249-262.
15. Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y., (2009). "Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist" *Virology* 398 (1), 87-97.
16. Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples" *BioTechniques.* 15: 532-537.
17. Chomczynski, P., Bowser-Finn, R. and Sabatini, L. (1994). "A reagent for the single-step isolation of viral RNA from human serum and biopsy samples" *J. NIH Res.* 6:83. 1994.
18. Cirino, N.M. Panuska, JR., Villani, A., Taraf, H., Rebert, N.A., Merolla, R., Tsivitse, P., Gilbert, I.A. (1993). "Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages" *J. Gen. Virol* 74.(Pt 8). 1527-1537.
19. Conditions, S., & Use, I. (n.d.). *3d4/31*. 1–7.

20. COSTERS S, DELPUTTE PL, NAUWYNCK HJ. (2006). “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis” *J Gen Virol* 2006;87:2341-2351.
21. Cui, J. et al. (2016). “A GP5 Mosaic T-Cell Vaccine for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Is Immunogenic and Confers Partial Protection to Pigs” *Vaccine Reports* 6: 77–85
22. Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA, Pattnaik AK. (2010). “The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163” *J. Virol.* 84:1731–40
23. DELPUTTE PL, VANDERHEIJDEN N, NAUWYNCK HJ, PENZAERT MB. (2002). “Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages” *J Virol* 2002;76:4312-4320.
24. Diaz Piña M. (2021). “Estudio de la respuesta inmune adaptativa celular a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino” Pag 1- 76.
25. Dokland T. (2010). “The structural biology of PRRSV” *Virus Res.* 154:86–97
26. Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. (1997) “Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)” *Arch. Virol.* 142:2483–97
27. Fang Y, Snijder EJ. (2010). “The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins” *Virus Res.* 154:61–76
28. Flores-Mendoza, Lilián Hernández, Jesús H. (2010). “Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia *Veterinaria México*” vol. 41, núm. 2, pp. 139-159 Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México.
29. Flores-Mendoza L, Silva-Campa E, Reséndiz M, Osorio FA, Hernández J.(2008); Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:720-725.

30. Gómez-Laguna, J., Salguero, F. J., Barranco, I., Pallarés, F. J., Rodríguez-Gómez, I. M., Bernabé, A., & Carrasco, L. (2010). "Cytokine Expression by Macrophages in the Lung of Pigs Infected with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus" *Journal of Comparative Pathology*, 142(1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.07.004>
31. Granja, A.G., Nogal, M.L, Hurtado, C., Del Aguila, C., Carrascosa, A.L, Salas, M.L., Fresno,M., Revilla, Y., (2006). "The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway" *J. Immunol.* 176 (1), 451-462.
32. Heise, M.T., Virgin, H.W.T., (1995). "The T-Cell-independent role of gamma interferón and tumor necrosis factor alpha in macrophage activation durinf murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections" *J. Virol.* 69 (2), 904-909.
33. Hermann JR, Muñoz-Zanzi CA, et al. (2005). "Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose" *Vet Microbiol*;110(1-2):7-16.
34. Hill H. (1990). "Overview and history of mystery swine disease (swine infertility respiratory syndrome)" In: *Proc Mystery Swine Disease Committee Meet 1990, Denver, CO.* Livestock Conservation Institute, Madison, WI. :29-31.
35. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, et al. (2013). "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers" *J Swine Heal Prod.* 21:72–84. Available online at: <https://www.aasv.org/shap/issues/v21n2/>
36. JOO HS, PARK BK, DEE SA, PIJOAN C. (1997). "Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus" *Vet Microbiol* 1997;55:303-307.
37. Keffaber KK. (1989) "Reproductive failure of unknown etiology" *Am Assoc Swine Pract Newsl*; 1:1-19.
38. KEGG PATHWAY Database. (2020). KEGG PATHWAY Database. Obtenido de KEGG PATHWAY Database: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04064 consultado el 13 de enero 2020.
39. Kim, O., Sun, Y., Lai, F.W., Song, C., Yoo, D., (2010). "Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1

in MARC-145 and HeLa cells” *Virology*.

40. Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee S-M; Watkins S, Chittick W, Polson D. (2005). “Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase–PCR” *Brief communication. J Vet Diagn Invest* 17:165-170.
41. Lasswell, Harold D., Abraham Kaplan, and Ronald D. Brunner. (2017). “Macrophage Polarization Mini Review.” *Power and Society: A Framework for Political Inquiry* 2: 1–295
42. Leucocitos.org. (2012). Macrófagos. *Leucocitos.Org*.
<http://leucocitos.org/macrofagos> consultado el 20 de Nov 2021
43. Liu, Guangwei, and Hui Yang. (2013). “Modulation of Macrophage Activation and Programming in Immunity” *Journal of Cellular Physiology* 228(3): 502–12.
44. LOEMBA HD, MOUNIR S, MARDASSI H, ARCHAMBAULT D, DEA S. (1996). “Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus” *Arch Virol* 1996;141:751-761.
45. LOPEZ FUERTES L, DOMENECH N, ALVAREZ B, EZQUERRA A, DOMINGUEZ J, CASTRO JM et al. (1999). “Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive síndrome infection” *Virus Res* 1999;64:33-42.
46. Lopez, O.J., Osorio, F.A., (2004). “Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity” *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102 (3), 155-163.
47. LOPEZ-FUERTES L, CAMPOS E, DOMENECH N, EZQUERRA A, CASTRO JM, DOMINGUEZ J et al. (2000). “Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages” *Virus Res* 2000; 69:41-46
48. López-Heydeck, S. M, et al., (2015). “Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)”. Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1)
49. Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. (2007). “Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus” *Immunology* 120:217–29

50. Loving, Crystal L, Fernando A Osorio, Michael P Murtaugh, and Federico A Zuckermann. (2015). “Veterinary Immunology and Immunopathology Innate and Adaptive Immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 167(1–2): 1–14.
51. 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
52. Mara Marques (2018), “Concepto de Ensayo de Bradford” *Ciencias de la tierra y de la vida, Biología*, Knoow.net obtenido de: <https://knoow.net/es/ciencias-tierra-vida/biologia-es/ensayo-de-bradford/> consultado el 12 de Dic. 2021.
53. MARDASSI H, MASSIE B, DEA S. (1996). “Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory síndrome virus” *Virology* 1996;221:98-112.
54. Martínez-Bautista, N. R., Sciutto-Conde, E., Cervantes-Torres, J., Segura-Velázquez, R., Mercado García, M. C., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo Ortega, M. E., Delgadillo Alvarez, J., Castillo-Juárez, H., & Sanchez-Betancourt, J. I. (2018). “Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México” *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(4), 993–1008.
55. Mastropietro, Giuliana..(2015). “HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation.” *Mediators of Inflammation* 2015
56. MCGUIRK P, MCCANN C, MILLS KH. (2002). “Pathogenspecific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis” *J Exp Med* 2002;195:221-231.
57. MEIER W, WHEELER J, HUSMANN RJ. (2000) “Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus” *Vet Res* 2000;31:41.
58. MEIER WA, GALEOTA J, OSORIO FA, HUSMANN RJ, SCHNITZLEIN WM, ZUCKERMANN FA. (2003). “Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory síndrome virus infection or vaccination” *Virology* 2003;309:18-31

59. Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J. Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., (2003). “Gradual Development of the interferón-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory síndrome virus infection or vaccination” *Virology* 209 (1), 18-31.
60. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. (1998). “Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of “atypical” PRRS ” *Am. J. Vet. Res.* 59:1540–44
61. MEULENBERG JJ, PETERSEN-DEN BESTEN A, DE KLUYVER EP, MOORMANN RJ, SCHAAPER WM, WENSVOORT G. (1995). “Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus”. *Virology* 1995;206:155-163.
62. Mogensen, T.H., Melchjorsen, J., Malmgaard, L., Casola, A., Paludan, S.R., (2004). “Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1” *J. Virol.* 78 (11), 5883-5890.
63. Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). “Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV)” *Frontiers in Veterinary Science*, 6(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
64. MOORMANN RJ. (1993). “Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence” *J. Gen Virol.* 74:1697-1701.
65. Morilla A, González-Vega D, Diosdado F, Estrada E. (2003) “Seroepidemiology of PRRS in México”. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Rome:59.
66. MURTAUGH MP, XIAO Z, ZUCKERMANN F. (2002). “Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection” *Viral Immunol* 2002;15:533-547
67. Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. (1999). “Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis” *J. Gen. Virol.* 80:297–305
68. NELSON EA, CHRISTOPHER-HENNINGS J, BENFIELD DA. (1994). “Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus” *J Vet Diagn Invest* 1994;6:410-15.

69. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, 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.* 227:385–92. doi:10.2460/javma.2005.227.385
70. Ngoka LC (2008). "Preparación para proteómica del cáncer de mama de la muestra: proteómica y gene ontology revelan dramáticas diferencias en preferencias de solubilización de proteínas de búferes de lisis urea y ensayo de radioinmunoprecipitación". *Proteoma Sci* 6 (1): 30. doi:10.1186/1477-5956-6-30. PMC2600628. PMID18950484.
71. OIE. (1992) "Office International des Épizooties" World Animal Health 1991. Animal health status and disease control methods (Part one: Reports); 7(2):126.
72. OSORIO FA, GALEOTA JA, NELSON E, BRODERSEN B, DOSTER A, WILLS R et al. (2002). "Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity" *Virology* 2002;302:9-20
73. Patel, Naimish R. et al., (2012). "Cell Elasticity Determines Macrophage Function" *Plos ONE* 7(9): 1–10.
74. Pileri, Emanuela, and Enric Mateu. (2016). "Review on the Transmission Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus between Pigs and Farms and Impact on Vaccination." *Veterinary Research* 47(1): 1–13.
75. Plageman PGW, Moenning V. (1992). "Lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhage fever virus: anew group of positive strand RNA viruses" *Adv. Virus Res.* 41:90-102.
76. Porcheray, F. et al., (2005). "Macrophage Activation Switching: An Asset for the Resolution of Inflammation" *Clinical and Experimental Immunology* 142(3): 481–89.
77. Porcino, R. (n.d.). *Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios.*
78. Rosa, D., & Nuñez, E. (2020). " *Análisis de la respuesta de los linfocitos T a la infección por Circovirus porcino tipo 2* " Tesis que presenta : Fernando Calderón Rico Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas Directora de tesis : Co-director :

79. Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. (2013). “Arterivirus molecular biology and pathogenesis” *J. Gen. Virol.* 94:2141–63
80. Standard, I. (2009). *INTERNATIONAL STANDARD*. ISO-10993-5.
81. Subramaniam, S., Kwon, B., Beura, L. K., Kuszynski, C. A., Pattnaik, A. K., & Osorio, F. A. (2010). “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor- α promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp1” *Virology*, 406(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.016>
82. Subramaniam, S., Kwon, B., Beura, L. K., Kuszynski, C. A., Pattnaik, A. K., & Osorio, F. A. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor- α promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp1. *Virology*, 406(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.016>
83. SURADHAT S, THANAWONGNUWECH R, POOVORAWAN Y. (2003). “Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus” *J Gen Virol* 2003;84:453-459.
84. Tang, Chao et al., (2018). “Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from Purple Sweet Potato on Lipopolysaccharide Treated RAW 264.7 Macrophages.” *Journal of Food Biochemistry* 42(3): 1–11.
85. Thanawongnuwecha R, Suradhatb S. (2010). “Progress in porcine respiratory and reproductive syndrome virus biology and control” *Virus Res*;154(1-2):133-140.
86. Toews, G.B. (2001). “Cytokines and the lung”. *Eur. Respir. J. Suppl.* 34, 3s-17s.
87. Toews, G.B., (2001). “Cytokines and the lung”. *Eur. Respir. J. Suppl.* 34, 35-17s.
88. Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. (2010). “The M/GP (5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner”. *PLOS Pathog.* 6: e1000730
89. VAN REETH K, LABARQUE G, NAUWYNCK H, PENZAERT M. (1999). “Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity”. *Res Vet Sci* 1999;67:47-52

90. VANDERHEIJDEN N, DELPUTTE PL, FAVOREEL HW, VANDEKERCKHOVE J, VAN DAMME J, VAN WOENSEL PA et al. (2003). "Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages". *J Virol* 2003;77:8207-8215.
91. VEZINA SA, LOEMBA H, FOURNIER M, DEA S, ARCHAMBAULT D. (1996). "Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus" *Can J Vet Res* 1996;60:94-99
92. VICEK J, SEN G. (1996). "Interferons and other cytokines" In: FIELDS B, KNIPE D, HOWLEY P, editors. *Fields' Virology*. 3rd ed. Vol. 13. Philadelphia: LippincottRaven Publishers, 1996:375-400.
93. Vogel, Daphne Y.S. et al., (2014). "Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared." *Immunobiology* 219(9): 695–703.
94. Wong, G.H., Goeddel, D.V, (1986). "Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons". *Nature* 323 (6091), 819-822.
95. Wong, G.H., Goeddel, D.V., (1986). "Tumor necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 323 (6091), 819-822.
96. WU WH, FANG Y, FARWELL R, STEFFEN-BIEN M, ROWLAND RR, CHRISTOPHER-HENNINGS J et al. (2001). "A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b" *Virology*. 287:183-191.
97. WU WH, FANG Y, ROWLAND RR, LAWSON SR, CHRISTOPHER-HENNINGS J, YOON KJ et al. (2005). "The 2b protein as a minor structural component of PRRSV". *Virus Res* 2005;114:177-181.
98. Xiao S, Jia J, Mo D, Wang Q, Qin L, He Z, et al. (2010). "Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing" *PLoS One*;5(6): e11377.
99. Xing, Junji, Zheng Chai, Hinh Ly, and Yuying Liang. 2015. "Differential Inhibition of Macrophage Activation by Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Pichinde Virus Is Mediated by the Z Protein N-Terminal Domain" *Journal of virology* 89(24): 12513–17

100. YOON KJ, ZIMMERMAN JJ, SWENSON SL, MCGINLEY MJ, EERNISSE KA, BREVIK A et al. (1995). "Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection" *J Vet Diagn Invest* 1995;7:305-312.
101. Zimmerman JJ. (2008). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: epidemiology" In: Morilla A, et al editors. *Trends in emerging viral infections of swine*. 1st ed. Iowa State Press, USA: Wiley J & Sons;331-338.
102. Zhou, L., Kang, R., Zhang, Y., Ding, M., Xie, B., Tian, Y., Wang, H. (2018). Whole genome analysis of two novel type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with complex genome recombination between lineage 8, 3, and 1 strains identified in Southwestern China. *Viruses*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/v10060328>

18.-Anexos

18.1.-Anexo I.

Protocolo de muestra para cerdos y encuesta aplicada a la granja PRRSV +

PROCOLO: Toma de muestra en cerdos.

Se muestra la metodología necesaria para la extracción sanguínea (flebotomía) en cerdos.

Usar equipo de protección personal contra riesgos biológicos (EPP).

Material:

Cofia, careta, cubrebocas, traje overol, guantes, cubre calzado.

Aguja rosa (18G) y verde, jeringa de 20 ml, EDTA, tubos falcón de 50 ml, hielera.

PROCEDIMIENTO.

1. Inmovilizar al cerdo utilizando un lazatrampas o inmovilizar sus patas.
2. Limpiar el área del cuello.
3. Observar y palpar el área para la toma de muestra.

La **vena yugular** del cerdo se ubica entre la base del cuello a lado del hombro ubicado en escisión y recorriendo hasta la mitad de la tráquea, se ubica al lado, ahí se realizará la toma de muestra.

4. Proceder a la punción venosa, con un ángulo de 90°.
5. Limpiar perfectamente el área de punción posterior a la toma de muestra.
6. Colectar la sangre y depositarla en los tubos falcón por la pared.
7. Transporte de las muestras en hielera a 4° C (1).
8. Separar el suero por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos.
9. Alicuotar el suero en tubos de criopreservación (2 ml) y mantener en congelación.

1.-Van Alstine, W.G., Kanitz, C.L., & Stevenson, G.W. (1993). Time and temperatura survivability of PRRS virus in serum and tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(4), 621-622. <https://doi.org/10.1177/104063879300500421>

22 días destete

No. de animal: 1 Edad: 19/02/21 Etapa de desarrollo: Fecha: 26-02/2021

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
- Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
- Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado.

ml de sangre agranel: 7.5ml

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 2 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
- Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
- Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: _____

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 3 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión

Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias

Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 4 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión

Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias

Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 5 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha: 27-05-21

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:



No. de animal: 6 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 7 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha: 29-02-21

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: dermatitis rónchas - en ojos

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 8 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha: 29-02-21

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: muy pálido

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 9 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 10 Edad: Etapa de desarrollo: Fecha:

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: _____

MI de suero recolectado:

Presencia de hemólisis:

No. de animal: 11 Edad: _____ Etapa de desarrollo: _____ Fecha: 22-10-21

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

Otros: delgado

MI de suero recolectado: _____

Presencia de hemólisis: _____

No. de animal: 12 Edad: _____ Etapa de desarrollo: _____ Fecha: _____

Signos clínicos:

- Anorexia Ictericia Palidez Fiebre Diarrea Depresión
Dificultad respiratoria Secreción nasal Petequias
Cianosis en orejas Retraso del crecimiento Inflamación de linfonodos o tonsilas

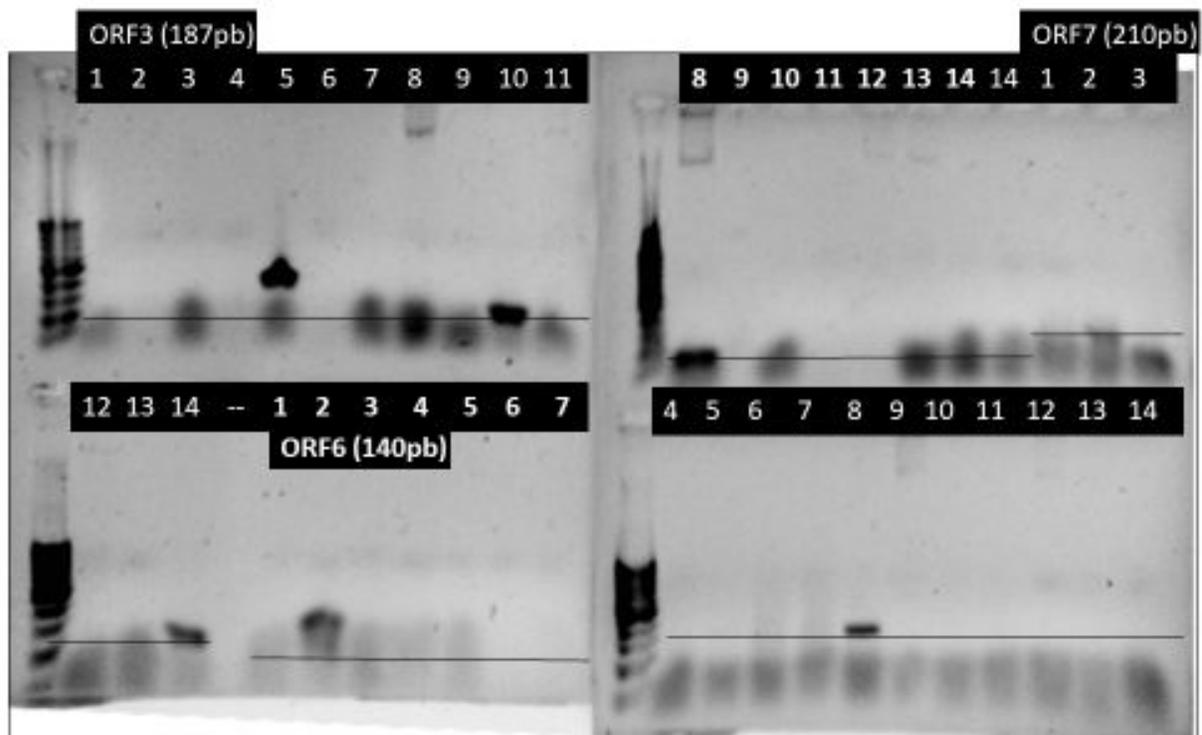
Otros: _____

MI de suero recolectado: _____

Presencia de hemólisis: _____

18.2.-Anexo II.

Sueros positivos a PRRSV detección por RT-PCR y Electroforesis



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ORF 3								*		*				*
ORF 6								*		*			*	*
ORF 7		*						*						

18.3.-Anexo III.

Resultados de los análisis enviados a laboratorio de un tercero para la identificación de microorganismos del CRP presentes en la granja experimental (Calderón Rico, F., 2021).

FP-DRZC-MV-06-16 Rev 5



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Reporte de caso MZC: 20-006
Fecha de ingreso: 14.01.2020
Identificación:

Especie: Porcino
Muestra: 12 sueros

Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Procedencia: Tarímbaro, Michoacán
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Lote: BIONOTE 4404PO077

Prueba de ELISA para PRRS

Identificación	M/P	Interpretación
1 Sem 4	0.294403893	Negativo
2 Sem 4	0.318734793	Negativo
3 Sem 4	1.316301703	Positivo
4 Sem 4	1.218976102	Positivo
5 Sem 8	2.250608273	Positivo
6 Sem 8	1.99756691	Positivo
7 Sem 8	0.571776156	Positivo
8 Sem 8	1.401459854	Positivo
9 Sem 14	1.895377129	Positivo
10 Sem 14	2.394180584	Positivo
11 Sem 14	2.479318735	Positivo
12 Sem 14	2.858880779	Positivo

Muestras < 0.4 Negativas
Muestras > 0.4 Positivas

ATENTAMENTE

Vo.Bo.

MC. Rosalba C. [Redacted]
Responsable

MCV. Gerardo [Redacted]
Jefe de Departamento

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento. Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcaldía Coyacán, Cd. Méx., CP 04510.
Tel: 01 (55) 5622 5869 al 71.

18.4.-Anexo IV.

- Protocolo de extracción de RNA por método TRI reagent ®

EXTRACCIÓN DE RNA MÉTODO TRI reagent®

→ *Antes de iniciar encender la centrifuga refrigerada 4°C y baño maría a 65°C*

1. Preparar solución de células $1-10 \times 10^6$
2. Obtener pellet, centrifugar 5min/2000rpm.
3. Adicionar 600µl de **Trizol**, disgregar el pellet con pipeta.
4. -----REVCO (- 80°C) ----- reposar 30 min. (mezcla estable hasta 1 mes).
5. Descongelar rápido y vortex

Vortex hasta disolver todo

6. Adicionar 200µl de **Cloroformo** (al 99%).
7. Tapar y mezclar por inversión vigorosamente 15 seg.
8. Reposar 3 min. a T° ambiente
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min. a 4°C
10. Transferir la fase acuosa (Parte de arriba del tubo) a un **Tubo nuevo.** (Evitar tocar la interface)
OJO: transferir 2/3 de la fase acuosa, porque si se intenta pasar toda la fase baja la pureza del RNA.
11. Adicionar un volumen de 200 - 300µl de **Isopropanol** (al 99%), (volumen igual al recuperado en la fase acuosa)
12. Tapar y mezclar por inversión vigorosamente (*precipitara el RNA*).
13. Reposar 4 min. a T ambiente
14. Centrifugar a 12,000 rpm por 20 min. a 4°C (*el botón contiene el RNA*).
15. Desechar el sobrenadante cuidadosamente (*cuidado, pellet trae el RNA*).
16. Adicionar 1ml. de **Etanol (al 70%) frío.** Por la pared
17. Dar vueltas al tubo para lavarlo (*cuidado*)
18. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min. a 4°C
19. Desechar el sobrenadante *cuidadosamente (cuidado, pellet trae el RNA)*.
20. ----Dejar secar 20 minutos. -----(no dejar que seque totalmente)
21. Agregar **agua** 10 - 30µl (10-pellet pequeño ó 30- pellet grande)
22. Vortex ligero

18.5.-Anexo V.

Secuenciación genética del factor de necrosis tumoral alphan; NCBI Reference Sequence: NM_214022.1 obtenido de GenBank

Secuenciación nucleotídica del Factor de necrosis tumoral de *Sus Scrofa* (mRNA) obtenido de GenBank; Reference Sequence: NM_212022.1

```
CCCAGAGTGAGGACACCAGGGGACCAGCCAGGAGAGAGACAAGCCATCTCCAGGACCCCCCTAGAAATAAC
CTCTCAGAAGACACACCCCCGAACAGGCAGCCGGACGACTCTCTCCCTCTCACACGCTGCCCGGGGCGC
CACCATCTCCCAGCTGGACCTGAGCCCCTCTGAAAAAGACACCATGAGCACTGAGAGCATGATCCGAGAC
GTGGAGCTGGCGGAGGAGGCGCTCGCCAAGAAGGCCGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGAGGTGCCTGTGCC
TCAGCCTCTTCTCCTTCCCTCCTGGTTCGAGGAGCCACCACGCTCTTCTGCCTACTGCACTTCGAGGTTAT
CGGCCCCCAGAAGGAAGAGTTTCCAGCTGGCCCCCTTGGCATCAACCCTCTGGCCCAAGGACTCAGATCA
TCGTCTCAAACCTCAGATAAGCCCGTCGCCCACGTTGTAGCCAATGTCAAAGCCGAGGGACAGCTCCAAT
GGCAGAGTGGGTATGCCAATGCCCTCCTGGCCAACGGCGTGAAGCTGAAAGACAACCAGCTGGTGGTGGC
GACAGATGGGCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAGGGGCCAAGGCTGCCCTTCCACCAACGTT
TTCCTCACTCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCA
AGAGCCCTTGCCAGAGGGAGACCCCCGAGGGGGCCGAGGCCAAGCCCTGGTACGAACCCATCTACCTGGG
AGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGATGATCGACTCAGTGCCGAGATCAACCTGCCCGACTATCTGGACTTT
GCTGAATCTGGGCAGGTCTATTTTGGGATCATTGCCCTGTGAGGGGGCAGGACATCCGTTCCCTCCCCTG
TCCATCCCTTTATTATTTTACTCCTTCCAGACCCCTCACGTCTTCTGGTTTGTAGAAAGAGAATGAGGGGC
TGGGGACTGGGCTCCAAGCTTAAACTTTAAACAACAACAGCAACACTTAGAAATCAGGGATTCAGGGAT
GTGTGGCCTGGACAACCAGGCACTGACCACCACCAAGAATTGGAACCTGGGGCTTCCAGACTCGCTGGGGT
CCTTGGGTTTGGATTCCCTGGATGCAACCTGGGACATCTGGAATGTGGCTGCCAGGGAAGCTTGGGTTCCA
ATCGGAATACTTCAGAACATTCCCTTGAGAAGATTTACCTCAATCTTGATGACTTTTTTAGGCTTCCCTTT
CTTCCAATTTTCCAGACTTCCCTGGGATGGGGAGCCCAGCCCCAACCCACAGGCCAGCTCCCTCTTAT
TTATATTTGCACCTGGCATTATTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTACTAGTGAATGTATTTATTC
AGGAGGGCGAGGTGTCTGGGAGACCCAGCATAAGGGCTGCCTTGGTTCAGATGTGTTTTCTGTGAAAAC
GGAGCTGAACTGTAGGTTGCTCCACCTGGCCTCCTAGCCTCTGTGCCTCCTTTTGCTTATGTTTTTAAA
AACAAATATTTATCTGATCGAGTTGTCTAAATAATGCTGATTTGGTGACTAACTTGTGCTACATCGCTG
AACCTCTGCTCCCCAGGGGAGTTGTGTCTGTAACCGCCCTACTGGTCAGTGGCGAG
```

18.6.-Anexo VI

Secuenciación genética de *Homo sapiens* de cromosoma 6, GRCh38 de primer ensamble ID del gen: 7124 (peprotech). NCBI Reference Sequence: NC_000006.12 obtenido de Genbank.

Secuenciación nucleotídica de cromosoma recombinante utilizado en la proteína TNF- α de humano utilizada por Preprotech.

```
AGCAGACGCTCCCTCAGCAAGGACAGCAGAGGACCAGCTAAGAGGGAGAGAAGCAACTACAGACCCCCC
TGAAAACAACCCTCAGACGCCACATCCCCTGACAAGCTGCCAGGCAGGTTCTTCTCCTCTCACATACTGA
CCCACGGCTCCACCCTCTCTCCCCTGGAAAGGACACCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAG
CTGGCCGAGGAGGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCCTCAGCC
TCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACCTTGGAGTGATCGGCC
CCAGAGGGAAGAGGTGAGTGCCTGGCCAGCCTTCATCCACTCTCCACCCAAGGGGAAATGGAGACGCAA
GAGAGGGAGAGAGATGGGATGGGTGAAAGATGTGCGCTGATAGGGAGGGATGGAGAGAAAAAACGTGGA
GAAAGACGGGGATGCAGAAAGAGATGTGGCAAGAGATGGGGAAGAGAGAGAGAGAAAGATGGAGAGACAG
GATGTCTGGCACATGGAAGGTGCTCACTAAGTGTGTATGGAGTGAATGAATGAATGAATGAATGAACAAG
CAGATATATAAATAAGATATGGAGACAGATGTGGGGTGTGAGAAGAGAGATGGGGGAAGAAACAAGTGAT
ATGAATAAAGATGGTGAGACAGAAAGAGCGGGAAATATGACAGCTAAGGAGAGAGATGGGGGAGATAAGG
AGAGAAGAAGATAGGGTGTCTGGCACACAGAAGACACTCAGGGAAAGAGCTGTTGAATGCCTGGAAGGTG
AATACACAGATGAATGGAGAGAGAAAACCAGACACCTCAGGGCTAAGAGCGCAGGCCAGACAGGCAGCCA
GCTGTTCCCTCCTTTAAGGGTGACTCCCTCGATGTTAACCATTTCTCCTTCTCCCCAACAGTTCCCCAGGGA
CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGTAAGTGTCTCCAAACCTCTTTCTAATTCTGGGT
TTGGGTTTGGGGGTAGGGTTAGTACCGGTATGGAAGCAGTGGGGGAAATTTAAAGTTTTGGTCTTGGGGG
AGGATGGATGGAGGTGAAAGTAGGGGGTATTTTCTAGGAAGTTTAAAGGTCTCAGCTTTTTTCTTTTCTC
TCTCCTCTTCAGGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGGTAAGAGCTC
TGAGGATGTGTCTTGGAACTTGGAGGGCTAGGATTTGGGGATTGAAGCCCGGTGATGGTAGGCAGAACT
TGGAGACAATGTGAGAAGGACTCGCTGAGCTCAAGGGAAGGGTGGAGGAACAGCACAGGCCTTAGTGGGG
TACTCAGAACGTATGGCCAGGTGGGATGTGGGATGACAGACAGAGAGGACAGGAACCGGATGTGGGGTG
GCAGAGACTCGAGGGCCAGGATGTGGAGAGTGAACCGACATGGCCACACTGACTCTCCTCTCCCTCTCTC
CCTCCCTCCAGCAAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCAATGCCCTCCTG
GCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCC
AGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACACCCATCAGCCGCATCGC
CGTCTCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAG
GGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACC
GACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGAT
CATTGCCCTGTGAGGAGGACGAACATCCAACCTTCCCCAACGCCTCCCCTGCCCAATCCCTTTATTACC
CCCTCCTTCAGACACCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTGGGGGCTTAGGGTCGGAACCCAAG
CTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACACTTCGAAACCTGGGATTCAGGAATGTGTGGCCTGCACAGTGA
AGTGCTGGCAACCACTAAGAATTCAAACTGGGGCCTCCAGAACTCACTGGGGCCTACAGCTTTGATCCCT
GACATCTGGAATCTGGAGACCAGGGAGCCTTTGGTTCTGGCCAGAATGCTGCAGGACTTGAGAAGACCTC
ACCTAGAAATTGACACAAGTGGACCTTAGGCCTTCCCTCTCTCCAGATGTTTCCAGACTTCCCTTGAGACAC
GGAGCCCAGCCCTCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTTATGTTTGCACCTTGTGATTATTTATTATTTAT
TTATTATTTATTTATTTACAGATGAATGTATTTATTTGGGAGACCGGGGTATCCTGGGGGACCCAATGTA
GGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAAAACGGAGCTGAACAATAGGCTGTTCCCATGTAGCCC
CCTGGCCTCTGTGCCTTCTTTTGATTATGTTTTTAAATATTTATCTGATTAAGTTGTCTAAACAATGC
TGATTTGGTGACCAACTGTCACTCATTGCTGAGCCTCTGCTCCCCAGGGGAGTTGTGTCTGTAATCGCCC
TACTATTTCAGTGGCGAGAAATAAAGTTTGCTTAGAAAAGAAA
```



```

Query 1404 AGGGCGAGGTGTCCTGGGAGACCCAGCATAAGGGCTGCCTTGGTTCAGATGTGTTTTCTG 1463
          ||  ||  |||  |||||  |||||  ||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  ||
Sbjct 2491 AGACCGGGGTATCCTGGGGGACCCAATGTAGGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCG 2550

Query 1464 TGAAAACGGAGCTGAACTGTAGGTGCTCCACCTGGCCTCCTAGCCTCTGTGCCTCCT 1523
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2551 TGAAAACGGAGCTGAACAATAGGCTGTTCCCATGTAGCCCCCTGGCCTCTGTGCCTCCT 2610

Query 1524 TTGCTTATGTTTTTAAAAACAAATATTTATCTGATCGAGTTGTCTAAATAATGCTGATTT 1583
          |||  |||||  |||||  |  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2611 TTGATTATGTTTTTA---AAATATTTATCTGATTAAGTTGTCTAAACAATGCTGATTT 2666

Query 1584 GGTGACTAACTGTGCTACATCGCTGAACCTCTGCTCCCCAGGGGAGTTGTGCTGTAA 1643
          |||||  |||||  |||  ||  |||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2667 GGTGACCAACT-GTCACT-CATTGCTGAGCCTCTGCTCCCCAGGGGAGTTGTGCTGTAA 2724

Query 1644 CCGCCCTACTGGTCAGTGGCGAG 1666
          |||||  |||||  |||||
Sbjct 2725 TCGCCCTACTATTCAGTGGCGAG 2747

```