



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



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN  
DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO**

TESIS QUE PRESENTA

M.C. FRANCISCO PEREZ DURAN

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:  
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

DIRECTORA DE TESIS:  
D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
D.C. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE DE 2024

## **Dedicatoria**

A mi esposa e hija que juntos logramos este objetivo porque ustedes son los pilares y fortaleza de mi vida.

A mis papás y hermanos.

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la tutoría de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la co-tutoría del Dr. Alejandro Bravo Patiño a través del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología, por las facilidades para la realización de este trabajo. Además, agradecemos la financiación parcial por la CIC-UMSNH 2020-2023.

Agradecimiento al apoyo por parte de CONAHCYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONAHCYT Infraestructura (INFR 2015-255010) por el apoyo para la creación de la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular. Al financiamiento parcial para el Mantenimiento de equipo Científico y Tecnológico FCCHTI23\_ME-4.1.-0014 otorgado por el Instituto de Ciencia Tecnología e innovación del Estado de Michoacán

Agradecemos también, el apoyo a Francisco Perez Duran que consistió en la Beca Nacional CONACYT con No. de becario 804387 y número de CVU 804387.

## **Agradecimientos personales**

Al centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional y la oportunidad de conocer a tantas personas cuya mentalidad han cambiado mi forma de ver las cosas.

A la Dra. Rosa Elvira Núñez, a quien agradezco inmensamente por todo su apoyo y enseñanzas durante estos años. Porque sin ella, nada de esto hubiera sido posible, agradezco toda su confianza, paciencia y por sobre todo la amistad que me ha brindado. Su orientación durante mi formación académica ha sido lo que me ha permitido llegar hasta aquí.

Al Dr. Marcos Cajero por sus enseñanzas y apoyo brindado desde el primer día que llegué al CMEB.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Alejandro Bravo, Dra Zoraya, Dra Ricarda y Dra. Esperanza Meléndez. Por sus aportaciones y seguimiento de este proyecto.

Especiales agradecimientos a la Dra. Ilane Hernández por sus consejos y aportaciones para el desarrollo del presente proyecto. Su dedicación y transmisión del conocimiento fue ejemplar para mí.

A mis amigos y compañeros del CMEB, que directa e indirectamente formaron parte de este trabajo y de este camino. A todas aquellas personas que pasaron por el CMEB y que tuve la oportunidad de conocer y convivir durante su estadía por estas instalaciones.

A mis amigos, Mario Eduardo, Luis Enrique, Fernando, Sergio con quienes compartí largos días de trabajo.

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

A mis suegros y familia que me ha brindado su apoyo emocional y económico durante toda mi formación académica.

## ÍNDICE

1.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
2.	RESUMEN.....	8
3.	ABSTRACT .....	9
4.	INTRODUCCIÓN .....	11
4.1.	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS).....	11
4.2.	Distribución geográfica y prevalencia del PRRSV .....	11
4.3	Factores de riesgo asociados a la transmisión del PRRS .....	11
5.	Impacto económico y sanitario del PRRS .....	12
5.1	Pérdidas productivas y repercusiones en la industria porcina.....	12
5.2	Desafíos en el control y la erradicación del PRRS.....	12
6.	Estrategias de prevención y control del PRRS .....	13
6.1.	Vacunas comerciales disponibles y sus limitaciones.....	13
6.2	Desarrollo de nuevas estrategias vacunales.....	13
7.	Enfoques multiepitópicos en el diseño de vacunas .....	14
7.1.	formulación vacunal multiepitópica.....	14
7.2	Ventajas de las vacunas multiepitópicas frente a vacunas convencionales .....	14
8.	Tecnologías emergentes en el desarrollo de vacunas.....	15
8.1.	Sistemas de expresión en células procariontas y eucariotas .....	15
8.2.	Vectores virales y vacunas de ADN .....	15
9.	Adyuvantes y sistemas de liberación de antígenos.....	15
9.1.	Tipos de adyuvantes y sus mecanismos de acción.....	15
9.2.	Estrategias de formulación y administración de vacunas .....	16
10.	Evaluación de vacunas contra virus.....	16
10.1.	Modelos animales para la evaluación de vacunas .....	16
10.2.	Parámetros de eficacia y seguridad en estudios preclínicos.....	17
11.	JUSTIFICACIÓN .....	17
12.	HIPÓTESIS .....	18
13.	OBJETIVO GENERAL .....	18
14.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
15.	RESULTADOS.....	18
16.	Capítulo 1.....	18
17.	CAPÍTULO 2.....	36

18. Justificación .....	37
19. Materiales y métodos.....	37
Péptidos.....	37
19.1. Ratones.....	37
19.2. Inmunización y obtención de muestras .....	38
19.3. Detección de anticuerpos IgG .....	40
19.4. Obtención de células blancas en sangre total.....	40
19.5. Diseño de paneles para inmunotipificación de células T .....	41
19.6. Diseño de paneles para inmunotipificación de células B .....	42
19.7. Análisis estadístico .....	43
20. RESULTADOS.....	44
20.1. Seguimiento al peso corporal.....	44
20.2. Detección de anticuerpos IgG .....	45
20.3. Tetrapep-GO indujo linfocitos T cooperadores.....	47
21. DISCUSIÓN .....	49
22. DISCUSIÓN GENERAL.....	51
23. CONCLUSIÓN .....	53
24. PERSPECTIVAS .....	53
25. ANEXOS.....	54
26. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS.....	60

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

Ab- Anticuerpo

Ag- Antígeno

ARN- Ácido ribonucleico

BSA- Albúmina de suero bovino

CD- Clúster de diferenciación

dpi- Días posteriores a la inmunización

ELISA- Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

GP- Glicoproteína

h- Hora

IgG- Inmunoglobulina G

NSP- Proteína no estructural

ORF- Marco de lectura abierta

PRRS- Síndrome reproductivo y respiratorio porcino

PRRSV- Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

## 2. RESUMEN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), es una enfermedad que afecta a cerdos de todas las edades y es considerada la enfermedad de mayor impacto en la industria porcina alrededor del mundo. El agente causal de la enfermedad se encuentra de forma endémica en las grandes explotaciones porcinas generando brotes reincidentes, que ocasionan infecciones continuas con brotes ocasionales que llegan a ser más agresivos que los brotes originales. El agente causal es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), el cual se transmite rápidamente por contacto directo y a través de fluidos corporales de cerdos infectados a cerdos sanos. El método común para disminuir la transmisión de PRRSV es a través de la vacunación. Sin embargo, las vacunas comerciales que se administran actualmente no son capaces de brindar una protección fuerte y sostenida contra cepas silvestres circulantes. Actualmente existen dos tipos de vacunas que se comercializan basadas en virus completo, tal como, las vacunas que consisten en virus completo atenuado MLV, las cuales fueron asociadas a la reversión de la virulencia del virus vacunal. También, las vacunas de virus inactivo KV, las cuales presentan una débil estimulación de la respuesta una respuesta inmune del hospedero.

El objetivo de este trabajo fue analizar la inducción de la respuesta inmune humoral y celular contra péptidos sintéticos derivados de la secuencia peptídica de la Glicoproteína GP5 del virus PRRSV, en modelos *in vivo*. La proteína GP5 ha sido ampliamente estudiada como un buen candidato para el desarrollo de vacunas ya que presenta diversos epítomos B y T, los cuales participan en la respuesta inmune protectora en porcinos. Sin embargo, no se había estudiado la participación de cada uno de los principales epítomos de dicha proteína en el contexto de la inmunogenicidad. Se utilizaron dos modelos *in vivo*: lechones y ratones. Así mismo, se utilizaron dos péptidos que poseen epítomos B, denominados GP5-B o GP5-B3 y se inmunizaron lechones en grupos independientes. Con los datos recabados en el modelo de lechones, se realizaron pruebas piloto para conocer la respuesta inmune en un modelo murino contra una formulación multiepítópica denominada TetraPep-Go, la cual contenía los péptidos antes descritos, además de dos péptidos que contienen epítomos T. Los datos mostraron en ambos casos que, los animales no presentaron reacciones adversas a la vacunación en ninguno de los dos esquemas de inmunización. Por un lado,

los datos del modelo en lechones sugirieron que los péptidos GP5-B y GP5-B3 fueron inmunogénicos (42 dpi) de manera independiente y fueron inmunorreactivos contra cepas silvestres circulantes del PRRSV. Por otro lado, los datos del modelo murino sugirieron que la respuesta humoral contra TetraPep-Go se mantuvo a largo plazo (80 dpi), más aún, confirmaron la respuesta celular mediada por anticuerpos de tipo neutralizante y la participación de Linfocitos T y B. Considerando los datos en conjunto, se propone que el inmunógeno TetraPep-Go conformado por cuatro péptidos derivados de la proteína GP5, indujo una respuesta inmune sostenida, reconocida por cepas silvestres del virus y segura, debido a su naturaleza peptídica.

Palabras clave: Linfocitos B de memoria, vacuna, péptidos, protección.

### 3. ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a disease that affects pigs of all ages and is considered the disease with the greatest impact on the pig industry around the world. The causative agent of the disease is endemic in large pig farms, generating repeated outbreaks, which cause continuous infections with occasional outbreaks that become more aggressive than the original outbreaks. The causative agent is a virus of the same name (PRRSV), which is transmitted rapidly by direct contact and through body fluids from infected pigs to healthy pigs. The common method to decrease PRRSV transmission is through vaccination. However, the commercial vaccines currently being administered are not capable of providing a strong and sustained response against circulating wild strains. There are currently two types of vaccines that are marketed based on whole viruses, such as vaccines consisting of MLV whole attenuated virus, which were associated with the reversal of the virulence of the vaccine virus. Inactivated KV virus vaccines, which present a weak stimulation of the host's immune response.

The objective of this work was to analyze the induction of the humoral and cellular immune response against synthetic peptides derived from the peptide sequence of the GP5 glycoprotein of the PRRSV virus at *in vivo* models. The GP5 protein has been widely studied as a good candidate for vaccine development because include several B and T epitopes. But, the participation of each of the main epitopes of this protein in the context of immunogenicity

had not been studied until now. Two *in vivo* models were used, in piglets and in mice. On the one hand, two peptides that have B epitopes, called GP5-B or GP5-B3, were used and piglets were immunized in independent groups. On the other hand, with the data collected in the piglet model, pilot tests were carried out to determine the response of a murine model to a multiepitopic formulation called TetraPep-Go, which contained the peptides described above in addition to two peptides containing T epitopes. The data showed that, in both cases, animals did not present adverse reactions to vaccination with the formulations in either of the two immunization schedules. On the one hand, the piglet animal model suggested that GP5-B and GP5-B3 peptides were immunogenic (42 dpi) independently and were recognized by circulating wild strains of PRRSV. On the other hand, the data from the murine model suggested that the humoral response against TetraPep-Go was maintained in the long term (80 dpi), moreover, they confirmed the cellular response mediated by neutralizing antibodies involving T and B lymphocytes. Considering all the data from this work, it is proposed that the immunogen TetraPep-Go induces a sustained immune response, a protective response against circulating strains of the virus and safe, due to its peptide nature.

**Key words:** Memory B lymphocytes, vaccine, peptides, protection.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1. Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS)

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es causado por un virus ARN de cadena simple perteneciente al género *Arterivirus*. El virus del PRRS (PRRSV) se divide en dos principales genotipos, el europeo (Tipo 1) y el norteamericano (Tipo 2), los cuales presentan diferencias significativas en su estructura genómica y antigenicidad (López-Heydeck *et al*, 2015). Esta diversidad genética y antigénica es uno de los principales desafíos para el desarrollo de estrategias de control efectivas. El PRRSV se caracteriza por su alta tasa de mutación y recombinación, lo que le permite evadir la respuesta inmune del hospedero y adaptarse a nuevos entornos. Además, el virus tiene la capacidad de persistir en los animales infectados, lo que contribuye a la diseminación y el mantenimiento de la enfermedad en las poblaciones porcinas (Stoian *et al*, 2017).

### 4.2. Distribución geográfica y prevalencia del PRRSV

El PRRSV se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo endémico en muchas regiones productoras de cerdos. La prevalencia de la enfermedad varía considerablemente entre países y regiones, dependiendo de factores como la densidad de población porcina, las prácticas de bioseguridad implementadas y los programas de control y erradicación establecidos (Ko *et al*, 2015). En algunas áreas, la infección por el PRRSV se ha vuelto endémica, con brotes recurrentes que afectan a las granjas porcinas. Esto ha dificultado los esfuerzos para lograr la erradicación de la enfermedad a nivel regional o nacional. La vigilancia epidemiológica y el monitoreo continuo de la circulación del virus son fundamentales para comprender la dinámica de transmisión y tomar medidas de control apropiadas (Pileri & Matieu, 2016).

### 4.3 Factores de riesgo asociados a la transmisión del PRRS

La transmisión del PRRS puede ocurrir por diversas vías, incluyendo el contacto directo entre animales, la exposición a partículas virales suspendidas en el aire o en secreciones nasales, la contaminación de vehículos, personas y fómites, así como la introducción de animales infectados en las granjas (Lunney *et al*, 2016). Factores como la alta densidad de población porcina, las deficiencias en las prácticas de bioseguridad, el movimiento

frecuente de animales y personal, y las condiciones de estrés en los cerdos pueden aumentar significativamente el riesgo de transmisión y propagación del virus del PRRS (Angulo *et al*, 2023). Comprender y mitigar estos factores de riesgo es crucial para implementar medidas de control y prevención efectivas a nivel de granja y regional.

## 5. Impacto económico y sanitario del PRRS

### 5.1 Pérdidas productivas y repercusiones en la industria porcina

El PRRS es considerada una de las enfermedades que generan cuantiosas pérdidas económicas en la producción porcina a nivel mundial. Las pérdidas económicas atribuibles al PRRS se deben principalmente a la disminución en la tasa de crecimiento de los animales, el aumento de la mortalidad, los problemas reproductivos, como abortos y nacimientos de lechones débiles, y los mayores costos asociados al tratamiento y la vacunación (Holtkamp *et al*, 2013). Se estima que el PRRS genera pérdidas anuales de miles de millones de dólares para la industria porcina a nivel global. Además de las pérdidas productivas, el PRRS también tiene un impacto significativo en el bienestar animal y la salud de los cerdos, lo que afecta la sostenibilidad y la eficiencia de la producción porcina (Montaner-Tarbes *et al*, 2019).

### 5.2 Desafíos en el control y la erradicación del PRRS

El control y la erradicación del PRRS han sido un desafío considerable para la industria porcina debido a la complejidad de la enfermedad, la diversidad genética y antigénica del virus, la persistencia de la infección en los animales y la falta de vacunas completamente eficaces (Pileri & Mateu, 2016). Los esfuerzos de control se han centrado en la implementación de medidas de bioseguridad, programas de monitoreo y vacunación, pero aún se requieren mayores avances en el desarrollo de soluciones más efectivas (Angulo *et al*, 2023). La falta de una respuesta inmunitaria eficiente, la incapacidad de las vacunas actuales para prevenir la infección y la transmisión, y la dificultad para erradicar el virus en las poblaciones infectadas son algunos de los principales retos que enfrentan los productores y los investigadores (Zhang *et al*, 2023). La búsqueda de nuevas estrategias vacunales y enfoques complementarios de control integral de la enfermedad son fundamentales para lograr un mejor manejo y, eventualmente, la erradicación del PRRS.

## 6. Estrategias de prevención y control del PRRS

### 6.1. Vacunas comerciales disponibles y sus limitaciones

En la actualidad, existen algunas vacunas comerciales para el control del PRRSV, estas se basan en virus vivo modificado (atenuado) y de virus inactivado (Bai *et al*, 2016). Estas vacunas han demostrado tener una eficacia variable en la prevención y el control de la enfermedad (Yang *et al*, 2020, Gutierrez *et al*, 2012). Uno de los principales desafíos de las vacunas clásicas es su capacidad limitada para conferir una protección cruzada entre diferentes cepas del virus del PRRS. Debido a la elevada diversidad genética y antigénica del PRRSV, las vacunas basadas en cepas específicas a menudo no logran una protección eficaz frente a la amplia gama de variantes virales que circulan en el campo (Yu *et al*, 2015). Además, las vacunas de virus vivo modificado plantean preocupaciones en cuanto a su seguridad, ya que pueden revertir a formas más virulentas o recombinarse con cepas de campo, dando lugar a brotes infecciosos que son más severos que los brotes originales (Niederwerder *et al*, 2015). Por otro lado, las vacunas de virus inactivado generalmente inducen una respuesta inmunitaria débil y de corta duración, lo que limita su efectividad a largo plazo (Charentantanakul, 2012). Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de nuevas estrategias vacunales más eficaces y de amplio espectro.

### 6.2 Desarrollo de nuevas estrategias vacunales

Ante las limitaciones de las vacunas convencionales, se han explorado enfoques innovadores para el desarrollo de vacunas más efectivas contra el PRRS (Rose & Andraud, 2017). Esto incluye el uso de plataformas de expresión de antígenos alternativos, como sistemas bacterianos, virales o de células eucariotas, que permiten la producción de antígenos recombinantes con características mejoradas en términos de inmunogenicidad y eficacia (Tan *et al*, 2017). Además, se han investigado estrategias de formulación vacunal multiepitópica, en las que se seleccionan y combinan múltiples epítomos conservados y relevantes inmunológicamente, con el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria más amplia y eficaz (Nan *et al*, 2017). Estos enfoques buscan superar las limitaciones de las vacunas basadas en cepas específicas, al dirigir la respuesta inmune a determinantes antigénicos críticos para la protección

contra una mayor diversidad de variantes del PRRSV. Asimismo, la incorporación de adyuvantes mejorados y el desarrollo de sistemas de liberación control (Charerntantanakul 2020).

## 7. Enfoques multiepitópicos en el diseño de vacunas

### 7.1. formulación vacunal multiepitópica

Las vacunas multiepitópicas se basan en la selección y combinación de múltiples epítomos altamente conservados y relevantes inmunológicamente, es decir, epítomos conservados entre cepas y genotipos, además que sean altamente inmunogénicos, en uno o varios antígenos del patógeno de interés (Zhang *et al*, 2018). Este enfoque busca inducir una respuesta inmunitaria más amplia y efectiva, superando las limitaciones de las vacunas basadas en cepas específicas. Al centrarse en epítomos conservados entre diferentes variantes del virus, las vacunas multiepitópicas tienen el potencial de generar una mayor cobertura antigénica y protección cruzada (Zhao *et al*, 2012). Esto es particularmente relevante en el caso del PRRSV, donde la diversidad genética y antigénica del virus del PRRS representa un desafío significativo para el desarrollo de vacunas eficaces (Gao *et al*, 2022).

### 7.2 Ventajas de las vacunas multiepitópicas frente a vacunas convencionales

Las vacunas multiepitópicas ofrecen diversas ventajas potenciales en comparación con las vacunas convencionales. En primer lugar, al incorporar múltiples epítomos inmunogénicos, estas vacunas pueden inducir respuestas inmunitarias más amplias y robustas, lo que se traduce en una mayor capacidad de generar protección cruzada frente a diversas variantes del patógeno (Zhang, 2018). Además, al dirigirse a determinantes antigénicos conservados, las vacunas multiepitópicas pueden ser menos susceptibles a la variabilidad genética y antigénica del PRRSV, lo que les confiere una mayor durabilidad y estabilidad de la protección (Gao *et al*, 2022). Esto es especialmente relevante en el contexto del PRRSV, donde la evolución constante del virus dificulta el desarrollo de vacunas efectivas a largo plazo. Asimismo, las vacunas multiepitópicas pueden ser más flexibles en términos de su diseño y composición, lo que permite su adaptación y mejora continua a medida que surgen nuevas variantes del virus (Zhang, 2018; Nandi *et al*, 2023; Rowaive *et al*, 2023; Lim *et al*, 2021).

## 8. Tecnologías emergentes en el desarrollo de vacunas

### 8.1. Sistemas de expresión en células procariotas y eucariotas

En el desarrollo de vacunas contra el PRRS, se han explorado diversas plataformas de expresión de antígenos, tanto en sistemas procariotas como eucariotas. Los sistemas procariotas, como las bacterias *Escherichia coli*, ofrecen ventajas en términos de una producción rápida y económica de proteínas recombinantes (Zhang *et al*, 2015). Sin embargo, estas plataformas pueden presentar limitaciones en cuanto al plegamiento y las modificaciones postraduccionales de los antígenos de tipo proteico, lo que puede afectar su inmunogenicidad y estabilidad. Por otro lado, los sistemas eucariotas, como las células de mamífero, de insecto o de levadura, permiten una mejor reproducción de las características estructurales y funcionales de los antígenos virales, lo que puede mejorar su reconocimiento y presentación al sistema inmunitario (Roques *et al*, 2013). Estos sistemas eucariotas requieren mayores inversiones en infraestructura y recursos, pero ofrecen un mejor entorno para la expresión de proteínas complejas, como aquellas derivadas del PRRSV.

### 8.2. Vectores virales y vacunas de ADN

Además de las plataformas de expresión tradicionales, se han explorado enfoques alternativos basados en vectores virales y vacunas de ADN para la entrega de antígenos del PRRS (Chase- Topping *et al*, 2020). Los vectores virales, como los adenovirus, pueden utilizarse para transportar y expresar los antígenos del PRRSV en las células del hospedero, lo que puede inducir una respuesta inmunitaria más completa (Jiang *et al*, 2007). Por otro lado, las vacunas de ADN consisten en la entrega directa de genes codificantes para los antígenos, lo que permite que las células del hospedero expresen y presenten estos antígenos al sistema inmunitario (Du *et al*, 2017). Estos enfoques basados en vectores y vacunas de ADN tienen la ventaja de imitar más fielmente la presentación natural de los antígenos, lo que puede resultar en una mayor eficacia en la inducción de respuestas inmunitarias celulares y humorales.

## 9. Adyuvantes y sistemas de liberación de antígenos

### 9.1. Tipos de adyuvantes y sus mecanismos de acción

Los adyuvantes desempeñan un papel crucial en las formulaciones vacunales, al mejorar la inmunogenicidad y la eficacia de los antígenos (Charertantanakul, 2020). Se han estudiado diversos tipos de adyuvantes para el desarrollo de vacunas contra el PRRS, como compuestos a base de aluminio, emulsiones, saponinas y adyuvantes de nueva generación (Bakoyannakis *et al*, 1992). Cada uno de estos adyuvantes tiene mecanismos específicos de acción para potenciar la respuesta inmunitaria, ya sea mediante la estimulación de las células presentadoras de antígenos, la activación de vías inmunitarias innatas, la formación de depósitos de antígenos o la mejora de la respuesta humoral y celular (Charertantanakul, 2020; Pascale *et al*, 2015). La selección y la combinación adecuada de adyuvantes pueden ser fundamentales para optimizar la eficacia de las formulaciones vacunales contra patógenos.

## 9.2. Estrategias de formulación y administración de vacunas

Además de la selección de adyuvantes, la formulación y la vía de administración de las vacunas también son factores clave para mejorar la inmunogenicidad y la protección conferida. Se han explorado enfoques como la encapsulación de antígenos en sistemas de liberación controlada, la utilización de nanopartículas o micropartículas, y la administración por diferentes vías, como la subcutánea, intramuscular e intranasal. Estos sistemas de formulación y entrega de las vacunas pueden permitir una liberación sostenida de los antígenos, una mejor presentación al sistema inmunitario y la estimulación de respuestas inmunitarias más efectivas en las vías de infección de virus (Charertantanakul, 2012).

## 10. Evaluación de vacunas contra virus

### 10.1. Modelos animales para la evaluación de vacunas

Características y selección de modelos relevantes: La evaluación preclínica de vacunas contra el virus, requiere el uso de modelos animales adecuados que permitan evaluar la eficacia y la seguridad de los candidatos vacunales. En el caso de PRRSV, los cerdos domésticos son el principal modelo animal utilizado, ya que son hospederos naturales del virus del PRRS y presentan una respuesta inmunitaria y una progresión de la enfermedad similar a la observada en la infección natural (Choi *et al*, 2021). Otros modelos animales, como los ratones o los hámsteres, también se

han utilizado en estudios preliminares (Perez-Durán, 2020; Zamora-Avilés, 2022), pero tienen limitaciones en cuanto a la reproducción de la enfermedad y los parámetros de protección relevantes para el PRRSV. La selección de un modelo animal apropiado, con características como la susceptibilidad a diferentes cepas virales, la reproducción de los signos clínicos y la posibilidad de evaluar parámetros inmunológicos y de protección, es fundamental para la evaluación preclínica de las vacunas candidatas.

## 10.2. Parámetros de eficacia y seguridad en estudios preclínicos

En los estudios preclínicos con modelos animales, se evalúan diversos parámetros para determinar la eficacia y la seguridad de las vacunas contra el PRRS (Chase-Topping *et al*, 2020). Estos incluyen la capacidad de las vacunas para reducir la viremia y la carga viral en los animales vacunados después del desafío, la disminución de los signos clínicos y lesiones patológicas, la mejora en los parámetros reproductivos y de crecimiento, y la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral y celular inducida por las vacunas (Duerlinger *et al*, 2022). Además, se analizan aspectos de seguridad, como la ausencia de efectos adversos, la estabilidad de las formulaciones y la posibilidad de revertir a formas más virulentas del virus. Estos datos preclínicos son fundamentales para seleccionar los candidatos vacunales más prometedores y avanzar hacia los ensayos clínicos en la especie porcina (Yu *et al*, 2015).

## 11. JUSTIFICACIÓN

El virus del PRSS es la enfermedad de mayor impacto económico en la industria porcícola a nivel mundial. Además, representa una preocupación debido a los patógenos emergentes zoonóticos por consumo de carne contaminada.

Las vacunas existentes contra PRRSV no son capaces de brindar protección contra cepas circulantes. Además, el virus vacunal puede retornar a un estado patógeno que ocasiona brotes agresivos.

GP5 es la proteína más antigénica del virus, sin embargo, su aplicación como modelo vacunal, ha presentado toxicidad en modelos animales.

Identificar epítomos en la proteína GP5 capaces activar linfocitos B secretores de anticuerpos neutralizantes y epítomos capaces de inducir una respuesta mediada por linfocitos T, nos permitirá tomar decisiones racionales para

la formulación de un candidato vacunal multiepitópico que pueda montar una respuesta inmune fuerte y sostenida capaz de proteger contra reinfecciones por cepas circulantes.

## 12. HIPÓTESIS

Péptidos sintéticos derivados de la proteína GP5 integrados en una formulación multiepitópica, inducirán una respuesta inmune mediada por anticuerpos y por linfocitos B.

## 13. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune antiviral inducida por una formulación vacunal multiepitópica contra el virus que produce el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.

## 14. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar *in vivo* la inducción de la respuesta humoral mediada por IgGs en respuesta a los péptidos GP5-B y GP5-B3.
- 2.-Evaluar *in vivo* la inducción de la respuesta humoral mediada por linfocitos B en respuesta a los péptidos GP5-B y GP5-B3.
- 3.-Evaluar *in vivo* la respuesta inmune inducida por la formulación multiepitópica.

## 15. RESULTADOS

### 16. Capítulo 1

Los datos presentados en el capítulo 1 corresponden a los objetivos 1 y 2 de este trabajo de tesis. Los resultados de ambos objetivos fueron publicados en la revista *Vaccines*, el título del artículo fue: “Synthetic peptides elicit humoral response against porcine reproductive and respiratory virus in swine”.

Los datos obtenidos en el presente estudio señalaron que los péptidos sintéticos derivados la proteína GP5 del PRRSV y que además contenían epítomos B, son inmunogénicos y son suficientes para inducir una respuesta inmune mediada por citocinas, anticuerpos y diferenciación de células B en los lechones inmunizados. En este capítulo, se muestra la evidencia experimental que señala como la inmunización con los péptidos GP5-B o GP5-B3 inducen una respuesta de citocinas proinflamatorias, las cuales están asociadas a la inmunidad celular innata y adaptativa. Además, GP5-B y GP5-B3 indujeron una respuesta humoral mediada por anticuerpos específicos anti-péptido, la cual se indujo significativamente a los 21 días después de la inmunización y se mantuvo hasta los 42 días. También, ambos péptidos tienen la capacidad de inducir la diferenciación de células B, como se pudo observar en su seguimiento desde células B naïve (CD2+/CD21+), células entrenadas (CD2-/CD21+) hasta células plasmáticas secretoras de anticuerpos (CD2+/CD21-). Finalmente, se muestra la reactividad cruzada en el reconocimiento de los péptidos por parte de anticuerpos presentes sueros de animales vacunados y animales naturalmente infectados en campo.

Article

# Synthetic Peptides Elicit Humoral Response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine

Francisco Perez-Duran <sup>1</sup>, Fernando Calderon-Rico <sup>1</sup>, Luis Enrique Franco-Correa <sup>1</sup>, Alicia Gabriela Zamora-Aviles <sup>1</sup>, Roberto Ortega-Flores <sup>1</sup>, Daniel Durand-Herrera <sup>1</sup>, Alejandro Bravo-Patiño <sup>1</sup>, Ricarda Cortes-Vieyra <sup>1</sup>, Ilane Hernandez-Morales <sup>2</sup> and Rosa Elvira Nuñez-Anita <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Km. 9.5 S/N carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarimbaro CP 58893, Mexico; 0618713g@umich.mx (F.P.-D.); 1028153g@umich.mx (F.C.-R.); 1837980k@umich.mx (L.E.F.-C.); 1106849e@umich.mx (A.G.Z.-A.); 0840020c@umich.mx (R.O.-F.); danieLdurand@umich.mx (D.D.-H.); alejandro.bravo@umich.mx (A.B.-P.); ricarda.cortes@umich.mx (R.C.-V.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Leon, Universidad Nacional Autónoma de México, Biv. UNAM No. 2011, Leon, Guanajuato CP 37684, Mexico; ihernandez@enes.unam.mx

\* Correspondence: rosa.anita@umich.mx; Tel.: +52-443-146-4030

**Citation:** Perez-Duran, F.; Calderon-Rico, F.; Franco-Correa, L.E.; Zamora-Aviles, A.G.; Ortega-Flores, R.; Durand-Herrera, D.; Bravo-Patiño, A.; Cortes-Vieyra, R.; Hernandez-Morales, I.; Nuñez-Anita, R.E. Synthetic Peptides Elicit Humoral Response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine. *Vaccines* **2024**, *12*, 652. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060652>

Academic Editor: Romain Pallot

Received: 7 May 2024

Revised: 6 June 2024

Accepted: 7 June 2024

Published: 11 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The aim of this study was to analyze the immunogenic response elicited in swine by two synthetic peptides derived from GP5 to understand the role of linear B epitopes in the humoral and B-cell-mediated response against the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). For inoculation, twenty-one-day-old pigs were allocated into six groups: control, vehicle, vaccinated (Ingelvac-PRRSV, MLV<sup>®</sup>), non-vaccinated and naturally infected, GP5-B and GP5-B3. At 2 days post-immunization (dpi), the GP5-B3 peptide increased the serum concentrations of cytokines associated with activate adaptive cellular immunity, IL-1 $\beta$  ( $1.15 \pm 1.15$  to  $10.17 \pm 0.94$  pg/mL) and IL-12 ( $323.8 \pm 23.3$  to  $778.5 \pm 58.11$  pg/mL), compared to the control group. The concentration of IgGs anti-GP5-B increased in both cases at 21 and 42 dpi compared to that at 0 days ( $128.3 \pm 8.34$  ng/mL to  $231.9 \pm 17.82$  and  $331 \pm 14.86$  ng/mL), while IgGs anti-GP5-B3 increased at 21 dpi ( $105.1 \pm 19.06$  to  $178 \pm 15.09$  ng/mL) and remained at the same level until 42 dpi. Also, antibody-forming/Plasma B cells (CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>) increased in both cases ( $9.85 \pm 0.7\%$  to  $13.67 \pm 0.44$  for GP5-B and  $15.72 \pm 1.27\%$  for GP5-B3). Furthermore, primed B cells (CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup>) from immunized pigs showed an increase in both cases ( $9.62 \pm 1.5\%$  to  $24.51 \pm 1.3$  for GP5-B and  $34 \pm 2.39\%$  for GP5-B3) at 42 dpi. Conversely the naïve B cells from immunized pigs decreased compared with the control group ( $8.84 \pm 0.63\%$  to  $6.25 \pm 0.66$  for GP5-B and  $5.78 \pm 0.48\%$  for GP5-B3). Importantly, both GP5-B and GP5-B3 peptides exhibited immunoreactivity against serum antibodies from the vaccinated group, as well as the non-vaccinated and naturally infected group. In conclusion, GP5-B and GP5-B3 peptides elicited immunogenicity mediated by antigen-specific IgGs and B cell activation.

**Keywords:** PRRS; B-cells; CD2<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, GP5

## 1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an endemic disease in all countries with large pig holdings, and it is likely the most economically significant disease for the global swine industry [1–4]. This disease affects pigs of all ages and is characterized by reproductive failures in sows during late-term gestation, including high rates of abortions, mummified fetuses, and post-weaning mortality due to the birth of weak piglets, with perinatal mortality reaching up to 70%. Additionally, it causes respiratory disease in both piglets and adult swine [3,5,6]. PRRSV has shown a high capacity for infection and transmission through the oronasal and reproductive routes [7].

The disease is caused by the similarly named Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), within the family *arteriviridae*, in the genus *Betaarterivirus*, order *Nidovirales* [3,8,9]. Two genotypes of PRRS virus have been reported: PRRSV type 1, or European; and PRRSV type 2, or American [10]. However, there is a significant genetic variability among different PRRSV isolates within each genotype [11]. PRRSV is an enveloped RNA virus, measuring 45–70 nm in diameter [12]. Its viral genome consists of a polyadenylated, single-stranded, non-segmented, positive-sense, polycistronic RNA molecule ranging from 15.1 to 15.5 kb in size and contains 11 open reading frames (ORFs), including ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3–7, ORF5a and ORF1aTF. Among them, ORF1a, ORF1b and ORF1aTF account for 80% of the viral genome. The translated polypeptides pp1a and pp1ab (encoded in ORF1a and ORF 1b) are cleaved into 15 Non-Structural Proteins (NSPs), including NSP1 $\alpha$ , NSP1 $\beta$ , NSP2-related proteins (NSP2N, NSP2TF, and NSP2), and NSP3–NSP12, which are involved in viral replication [13]. ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, and ORF5a encode six structural envelope-related proteins, namely, GP2a, GP2b, GP3, GP4, GP5, and GP5a, respectively [14–17]. Structural proteins are glycoproteins (GPs) embedded on the lipid envelope, forming protein complexes that provide stability to the viral particle and participate in the recognition and internalization of the virus to its target cell [15,18]. The nonglycosylated matrix (M) protein encoded by ORF6 and the nucleocapsid (N) protein encoded by ORF7 are dominant structural proteins with strong immunogenicity [19].

Vaccination is the main prevention method, and several vaccine formulations have been developed against PRRSV; some of these have shown low efficacy, while others are still in the experimental phase [15]. Current commercial vaccines against PRRSV include various types of single and combined modified live viruses (MLV) from PRRSV 1 to PRRSV 2, as well as inactivated viruses, primarily PRRSV 1 but also PRRSV 2 [20,21]. The commercially available MLVs vaccines fail to provide sufficient heterologous protection, as they typically induce weak innate and humoral responses, and inadequate T cell responses [22–26]. For instance, the antibody protection following vaccination is low and may result in antibody-dependent enhancement, facilitating virus entry [27]. Inactivated virus vaccines have shown poor efficacy, such as poor immune effects on heterologous strains, a lack of detectable PRRSV-specific antibody production, and an absence of a cell-mediated immune response [25,27–32]. The high genetic and antigenic diversity presents a significant impediment to developing an effective vaccine to control PRRS. In addition, it is known that, in some cases, attenuated vaccine viruses [21] are associated with the appearance of severe outbreaks due to the vaccine virus reverting to a pathogen status [33]. Therefore, research into safe and effective antigens is necessary to induce an effective immune response.

Structural glycoprotein GP5 has been reported as a promising candidate for vaccine development as it is the main target of neutralizing antibodies due to the presence of epitopes recognized by B cells. Moreover, GP5 is highly immunogenic, making it significant in the diagnosis, prevention, and control of PRRSV [16,34–39]. Effective anti-PRRSV immunity may be attained by exposing immunogenic epitopes to induce efficient innate and adaptive immune responses mediated by specific antibodies, cytokines, and T-cell responses [17,40]. Compared to commercial vaccines, peptide vaccines do not contain nucleic acid substances; therefore, they are considered safer [41]. Peptides contain only B or T epitopes that induce a specific response [27,41]. Likewise, adjuvants can enhance T or B cells' responses by enhancing phagocytosing activity and secreting a variety of cytokines that boost the specific immune response to the vaccine [32,42,43]. The goal of this work was to determine the immunogenic response elicited in swine by two synthetic peptides derived from the GP5 of PRRSV to understand the role of B epitopes in the immune response against PRRSV and to support the further development of these peptides as vaccine candidates.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Peptides

The GP5-B and GP5-B3 peptides contain epitopes that match the peptide sequence within the ectodomain of the GP5 protein (residues 30 to 62) from PRRSV type 2 (Sequence ID: UTS56108.1). Our research group has previously studied the GP5-B peptide, while the GP5-B3 peptide encompasses two epitopes previously reported by Vashit et al., 2008 [44]. Both peptides demonstrated high antigenicity *in silico*, according to the ImmunoEpitope DataBase IEDB and CCL Main Workbench 20.0 (unpublished data).

The peptides were chemically synthesized through solid-phase synthesis by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The GP5-B peptide sequence, ASNDSSSHLQLIYNLT-LCELNGTDWLANKF (30 aa), and the GP5-B3 peptide sequence, SSSNLQLIYNLTTPVTRVSAEQWGRPC (27 aa), exhibited 95% and 98% purity, respectively. The GP5-B3 peptide was modified by adding a cysteine at the terminal carboxyl end to facilitate binding with a carrier protein. Both peptides were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) and adjusted to a stock solution concentration of 1 mg/mL.

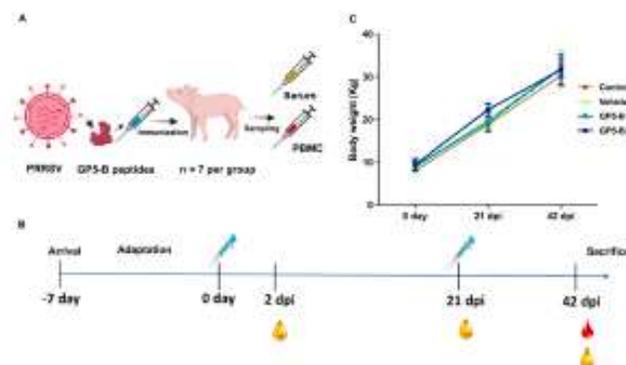
The sequences of the GP5-B and GP5-B3 peptides were compared with those reported for PRRSV types 1 and 2, as well as high pathogenic strains, using the Protein BLAST program. The results revealed query coverage for GP5-B of 93–100% for PRRSV type 1, 96–100% for PRRSV type 2, and 94–100% for HP-PRRSV. For GP5-B3, the query coverage was 77–96% for PRRSV type 1, 92–96% for PRRSV type 2, and 90–96% for HP-PRRSV.

### 2.2. Experimental Design, Animals, and Housing

This research was conducted on piglets procured from a certified farm (El Dapo farm, which conducts Good Livestock Practices under the Mexican official norm which NOM-033-ZOO-1995), where periodic testing ensured a negative status for PCV2 and PRRSV. Piglets, 21 days old, weaned, of indistinct sex, and interbreed large white x pietrain, were selected randomly from six different litters. All piglets received iron supplementation and vaccines as described previously [45].

Twenty-eight piglets were moved to alternative experimental stockyards larger than 33.6 m<sup>2</sup> in “La carreta” farm. Each pig was ear-tagged and distributed randomly across two stockyards. Using the GraphPad-Random number tool, each animal was randomly allocated to one of four treatment groups, with each group comprising seven individuals.

Controls in the study: animals, samples, materials, and procedures are described in Table 1 and Figure 1. Pigs were visually monitored daily and weighed every 21 days and maintained as previously described, following the applicable guidelines under the approved study protocol CICUM5NH-A101-FMVZ [45].



**Figure 1.** Experimental design and body weight of piglets after immunization. (A) Schematic representation of the experimental design; piglets were immunized with GP5-B or GP5-B3 peptides and

serum and blood samples were collected. In addition, two control groups ( $N = 7$ ) were established: a control group and a vehicle group. (B) The timeline of the experiment shows the immunization at days 0 and 21, as well as serum sampling at 2 dpi, 21 dpi and 42 dpi. Finally, blood sampling was conducted at 42 dpi. (C) Body weight monitoring of piglets in the four groups. ( $N = 7$  per group). The mean weights for the seven pigs in each group are depicted by colored lines, and the interquartile ranges are shown by the error bars. A two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was employed to assess statistical significance. The analysis revealed no significant differences in weight between the groups.

**Table 1.** Vaccination groups and formulations. The table shows the volumes and concentrations of the components for each formulation applied to each experimental group.

Origin	Farm	Group ( $N = 7$ )	Formulation				Commercial Vaccine 104.9DICC50
			PBS ( $\mu\text{L}$ )	Carrier Maleimide BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Adjuvant Aluminum Hydroxide ( $\mu\text{L}$ )	GP5-B Peptide ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	
El Dapo	La Carreta	Control	800				
		Vehicle	200	200	400		
		GP5-B		200	400	200	
		GP5-B3		200	400		200
El Limon	El Limon	Vaccinated					2000
El Limon	El Limon	Natural infection					

Additionally, an immunoreactivity assay was performed using sera from two groups: naturally infected pigs and vaccinated pigs (Table 1). The sera from seven naturally infected pigs ( $N = 7$ ), without prior PRRSV vaccination, were collected from "El Limon" farm. The sera from seven ( $N = 7$ ) vaccinated pigs were collected from "El Dapo" farm. The piglets were immunized intramuscularly by restraining their legs (day 0) with a 2 mL/piglet single dose of the Ingelvac-PRRSV, MLV<sup>®</sup> (containing virus ATOC VR 2332 to a concentration of 104.9 DICCs).

### 2.3. Blood and Serum Sampling and Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

At 2 and 42 days post immunization (dpi), 15 mL blood samples were drawn via the jugular vein, with and without EDTA (Vacutainer, BD, NJ, USA) from the control, vehicle, GP5-B, and GP5-B3 peptide groups at 'El Dapo farm'. The samples were used no later than 3 h after collection. The protocol to isolate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) was carried out as described previously [45].

Serum samples from eighty-day-old vaccinated pigs were collected at 42 dpi, while the serum samples from naturally infected pigs were obtained at 16 weeks of age in July 2023.

### 2.4. Quantification of Cytokine Concentrations in Serum and Antibody Detection

The cytokine concentration in the serum was determined as described before [45]; the pre-configured cytokine panel included IFN alpha, IFN gamma, IL-1 beta, IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-4, IL-6, IL-8 (CXCL8), and TNF alpha.

Peptide-specific antibody analysis was performed using an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to quantify immunoglobulins G (IgGs) against each of the GP5-B and GP5-B3 peptides. The commercial Peptide Coating Kit (Takara, Shiga, Japan) was used for the ELISA test. Following the manufacturer's protocol, the 96-well plate was coated with each peptide at a concentration of 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 2 h at room temperature (RT), and then the plate was blocked with a block solution for 2 h (solution provided in the kit) at RT. The plates were washed three times with distilled water. Then, serum samples from

piglets were diluted 1:100 in phosphate-buffered saline-T (PBS containing Tween-20 at 0.05%) containing 0.3% gelatin, and added to the plate. After incubating overnight at 4 °C, three washes were performed and the plates were incubated with the goat anti-porcine-IgG (H+L)-HRP antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) in dilution 1:1000 for 2 h at RT. The plate was washed three times with PBS-T, after which the substrate was added, and the plate was read at 15 min. The reading was carried out at OD<sub>450</sub> in a plate microreader (Bio-Rad iMARK microplate reader). The results are shown in [ng/mL] according to the IgG's calibration curve.

### 2.5. Immunoreactivity of Peptides against Serum Antibodies

The immunoreactivity assay was performed using an indirect ELISA with the Peptide Coating Kit, as described above. Immunoreactivity was assessed in serum samples from both the vaccinated group and the naturally infected (non-vaccinated) group. The results are presented in [ng/mL], based on the IgG's calibration curve.

### 2.6. Flow Cytometry

Cytometry was performed with approximately  $1 \times 10^6$  cells/mL of PBS per sample, which was evaluated in the flow cytometer (Attune NxT acoustic focusing cytometer, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). The cytometer was equipped with a violet laser (405 nm) and a blue laser (488 nm). The cells were stained with antibodies coupled to fluorochromes to detect specific surface markers of antibody-secreting B cells. The analysis targeted three subpopulations of B cells: IgM<sup>+</sup>/CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup> (naive); CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup> (plasmacytes) and CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup> (primed). Surface markers were used for triple staining, enabling primary antibodies to form combinations of goat-anti-pig IgM-FitC (MBS224956, MyBioSource, San Diego, CA, USA) with anti-pig-CD2-PECy7 (RFA-2.10, eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-pig-CD21-PE (BB6-11C9.6, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

For the analysis, 10,000 individual event packages were captured within the singlets gate, and a dot plot contrasting forward scatter-A with forward scatter-H was generated to exclude doubles. Additionally, a linear dot plot comparing side scatter to linear forward scatter was utilized to delineate the lymphocytes among the singlets. Another panel from the lymphocytes compared BL1-IgM<sup>+</sup> cells against the linear scatter side. Finally, a quadrant panel analysis of IgM<sup>+</sup> identified four subpopulations of IgM<sup>+</sup> B cells containing CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup> (Q1), CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup> (Q2), CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup> (Q3) and double-negative CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>-</sup> cells (Q4), CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup> and CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>. The quadrant panel was delimited from Fluorescent Minus One (FMO) controls. The results from the subpopulations are presented as the percentage of cells that tested positive.

### 2.7. Statistical Analysis

The data represent three different measurements for each animal and are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between groups were estimated using a one-way ANOVA test with Tukey's pos hoc analysis. A *p*-value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The GraphPad Prism software (version 9.1.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used. Flow cytometry data were analyzed using the FlowJo V. X software (BD<sup>®</sup>).

## 3. Results

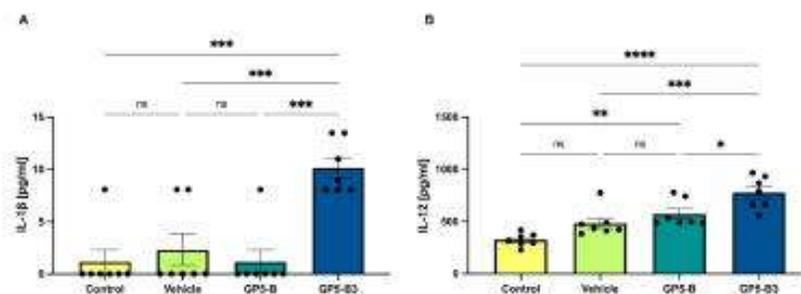
### 3.1. Body Weight Monitoring after Immunization

Body weight was monitored from day 0 to day 42. All animals maintained a constant body condition and gained weight throughout the study (Figure 1). There are non-significant differences between the control and peptide-immunized groups. Furthermore, no adverse reactions to immunization were observed in any of the four groups.

### 3.2. GP5-B3 Peptide Increased the Serum Concentration of Proinflammatory Cytokines

Cytokine concentrations were quantified in serum samples collected at 2 dpi to determine the proinflammatory state. Pigs immunized with GP5-B3 exhibited significantly higher serum concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-12; IL-1 $\beta$  from  $1.15 \pm 1.15$  to  $10.17 \pm 0.94$  pg/mL with respect to the control group and from  $2.31 \pm 1.49$  to  $10.17 \pm 0.94$  pg/mL with respect to the vehicle group. IL-12 increased from  $323.8 \pm 23.3$  to  $778.5 \pm 58.11$  pg/mL with respect to the control group and from  $483.2 \pm 50.56$  to  $778.5 \pm 58.11$  pg/mL with respect to the vehicle group (Figure 2A,B).

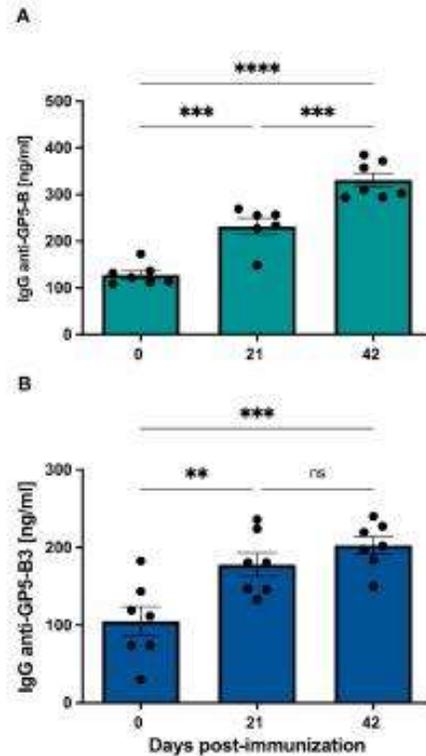
There were no significant differences in cytokine serum concentrations between the GP5-B group and the control group. This observation implies that the GP5-B3 peptide might trigger a proinflammatory response following immunization. To assess the immunomodulatory effects at the onset of antigen processing and presentation, cytokine levels were measured two days post-immunization.



**Figure 2.** Quantification of IL-1 $\beta$  and IL-12 in pig sera. Sera from piglets were collected at 2 dpi. Cytokines were measured using a multiplex Luminex-based cytokine immunoassay. (A) IL-1 $\beta$ . \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns = not significant. (B) IL-12. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns = non-significant. Data were presented as means  $\pm$  SEM. Differences between groups were estimated using one-way ANOVA test with Tukey's HSD pos hoc.

### 3.3. GP5-B and GP5-B3 Induce Specific IgG-Mediated Response upon Immunization

The group immunized with the GP5-B peptide showed a significant increase in anti-GP5-B IgGs at 21 and 42 dpi compared to day 0 (pre-immune) from  $128.3 \pm 8.34$  to  $231.9 \pm 17.82$  and  $331 \pm 14.86$  ng/mL, respectively. Additionally, a significant increase was observed at 42 dpi ( $331 \pm 17.86$  ng/mL) compared to 21 dpi ( $231.9 \pm 17.82$  ng/mL). In the case of the GP5-B group, a sustained increase in IgGs concentration was observed (Figure 3A). Conversely, in the group immunized with the GP5-B3 peptide, a significant induction of anti-GP5-B3 IgGs was observed only at 21 dpi relative to day 0 from  $105.1 \pm 19.06$  to  $178 \pm 15.09$  ng/mL. No induction of IgGs was observed at 42 dpi; thus, the IgGs' increase observed at 21 dpi remained at the same concentration until 42 dpi (Figure 3B). The data demonstrate a clear IgG-mediated response following immunization with the peptides GP5-B or GP5-B3.



**Figure 3.** Humoral response mediated by specific anti-peptide IgGs antibodies induced by peptide immunization in piglets. Piglets were immunized intramuscularly (IM) with a peptide coupled to a BSA carrier in each group + adjuvant alhydrogel<sup>®</sup> (AlOH 2%). The animals were sampled and immunized two times at 21-day intervals. The concentration of IgGs was evaluated at 0, 21 and 42 days dpi through ELISA assay. (A) Specific anti-GP5-B IgG. \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (B) Specific anti-GP5-B3 IgG. \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns = non-significant, each group. Data were presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Differences between groups were estimated using one-way ANOVA test with Tukey's HSD post hoc.

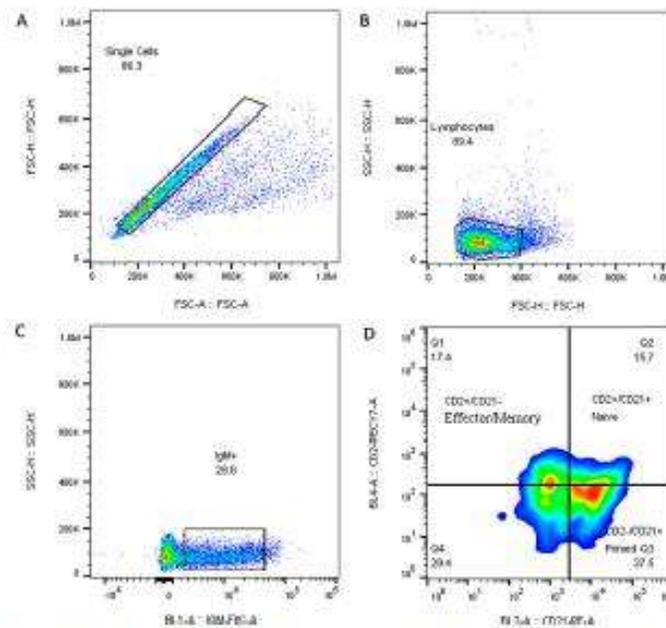
#### 3.4. Peptides Prime B Cells and Induce the Generation of Antibody-Secreting Cells

Immunotyping of B cells was performed at 42 dpi, and percentages of IgM cells and subpopulations (CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>; CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup>; CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>+</sup>) were evaluated for four experimental groups: the control, vehicle, GP5-B and GP5-B3 groups. Figure 4 shows the strategy route to analyze B cell subpopulations. The results showed that, in the case of B cells, the groups immunized with GP5-B or GP5-B3 peptides increased the percentage of antibody-forming/plasma B cells (CD2<sup>+</sup>/CD21<sup>-</sup>) compared to the control group from  $9.85 \pm 0.7\%$  to  $13.67 \pm 0.44$  and  $15.72 \pm 1.27\%$ , respectively, and that of the vehicle group from  $10.25 \pm 0.4$  to  $13.67 \pm 0.44$  and  $15.72 \pm 1.27\%$ , respectively; however, no differences were observed between the two peptide-immunized groups (Figure 5A). This suggests that the peptides GP5-B and GP5-B3 induce the generation of antibody-secreting cells.

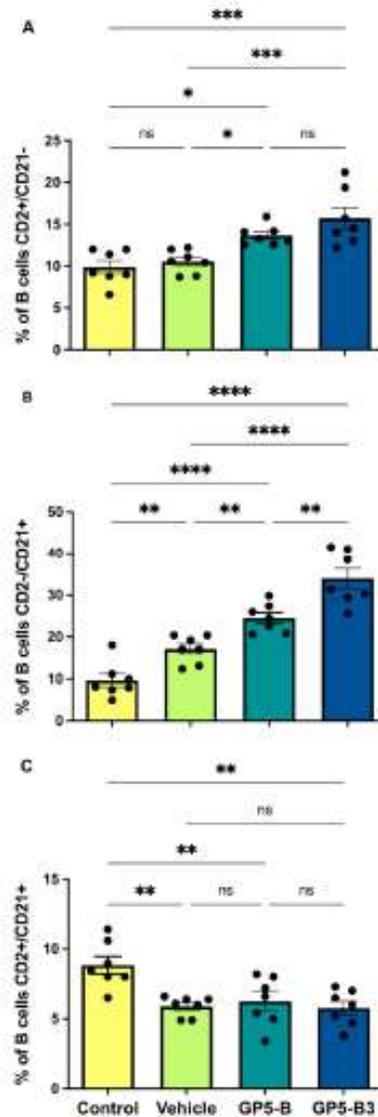
On the other hand, the primed B cells' subpopulation CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup> showed a statistically significant increase in the groups immunized with the peptides GP5-B or GP5-B3 compared to the control from  $9.62 \pm 1.5\%$  to  $24.51 \pm 1.3$  and  $34 \pm 2.39\%$ , respectively, and vehicle groups from  $17.1 \pm 1.23$  to  $24.51 \pm 1.3$  and  $34 \pm 2.39$ , respectively. Additionally, in the case of the GP5-B3 group, there was a statistically significant increase compared to the

group immunized with the GP5-B peptide from  $24.51 \pm 1.3$  to  $34 \pm 2.39\%$  (Figure 5B), indicating that the GP5-B3 peptide was the most effective inducer of primed B cells.

Finally, the evaluation of naïve B cells (CD2+/CD21+) showed a statistically significant reduction across all experimental groups compared to the control group. However, no differences were observed in the percentage of these cells among the three groups (Figure 5C). This suggests that, in response to peptide immunization, the naïve cell subpopulation was reduced, but this reduction was also seen in response to the BSA carrier in equal proportions from  $8.84 \pm 0.63\%$  to  $5.8 \pm 0.4\%$ .



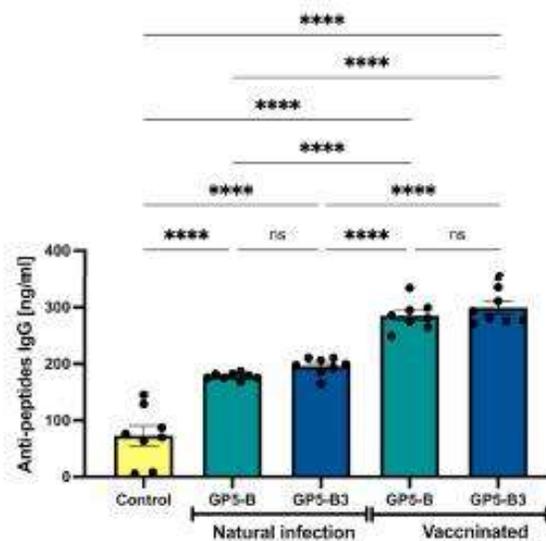
**Figure 4.** Panel for analysis of B cell subpopulations. Humoral immune response was induced in B cell subpopulations of piglets immunized with synthetic peptides. The cells were recovered at day 42 dpi. The marking was made with anti-CD2 and anti-CD21 markers. (A) gating used to select single cells. In (B) lymphocyte populations are gated, and B cells were selected by IgM+ marker (C). (D) the quadrant panel shows the selection strategy for analyzing CD2+/CD21+, CD2-/CD21+ and CD2+/CD21- B cells. The colors represent the population density; blue color shows low density; red color represents the highest cell population density.



**Figure 5.** Humoral response mediated by B cell subpopulations in peripheral blood of immunized piglets (MI). Total peripheral blood was recovered through the jugular vein of immunized piglets to isolate mononuclear cells (PBMCs). PBMC isolated from total blood in piglets at 42 dpi, through density gradient with Lymphoprep. A total of 10,000 events were analyzed through flow cytometry by anti-CD2-PECy7, anti-IgM-FITC and anti-CD21-PE. (A) Antibody-producing/Memory B cells (CD2+/CD21-) monoclonal antibodies. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; ns = not significant. (B) Primed B cells (CD2-/CD21+). \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (C) Naïve cells (CD2+/CD21+). \*\*  $p < 0.01$ . Data were presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Differences between groups were estimated using one-way ANOVA test with Tukey's HSD post hoc.

### 3.5. GP5 Epitopes Elicit In Vitro Immunoreactivity in Sera from Naturally Infected and Vaccinated Pigs

Our next question was whether the B epitopes contained in GP5-B or GP5-B3 peptides could be conserved epitopes capable of inducing antibodies during natural infection with PRRSV or after MLV vaccination. Figure 6 illustrates the immunoreactivity of both GP5-B and GP5-B3 peptides against serum antibodies from naturally infected and MLV vaccinated animals. The response against the two peptides was significantly higher in the group of vaccinated animals than in those naturally infected. However, the naturally infected group also exhibited significant immunoreactivity against the two peptides compared to the immunized control group. Interestingly, this indicates that the B epitopes in GP5-B or GP5-B3 are conserved in circulating wild viruses.



**Figure 6.** Immunoreactivity between GP5-B and GP5-B3 peptides against the vaccine virus (attenuated INGELVAC-PRRS MLV virus) and circulating field strains. IgG against GP5-B and GP5-B3 were determined in serum of naturally infected animals and in serums of vaccinated IM with a single dose at 0 days. The concentration of IgGs was evaluated at 42 dpi. Anti-peptide antibodies were determined by ELISA assays. The graph shows the recognition of the peptides by IgG antibodies present in the sera of vaccinated animals. Data were presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). Differences between groups were estimated using one-way ANOVA test with Tukey's HSD post hoc. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns = not significant.

## 4. Discussion

PRRSV-specific IgG neutralizing antibodies are produced 3–4 weeks after infection [46], which is too late to stop the acute phase of viremia [46]. The use of epitopes that are potential inducers of neutralizing antibodies is a topic of great importance in the research of safe and effective vaccines [46]. However, beyond the monitoring of the antibody response, it has become evident that an understanding of B cell behavior, that is, the cellular biology underlying the antibody response, is crucial for understanding how the immune response functions in the context of vaccination [47]. Consequently, the aim of this study was to analyze the immunogenic response elicited in swine by two synthetic peptides derived from GP5 to understand the role of lineal B epitopes in the humoral and B-cell-mediated response and to support the further development of these peptides as vaccine candidates.

The humoral immune response to PRRSV infection has been frequently studied, especially the one directed to different envelope proteins (GP3, GP4, GP5 or M) or linear epitopes from these proteins [16,24,43,48]. The present study evaluated immunogenic epitopes within the GP5 protein using GP5-B and GP5-B3 synthetic peptides derived from PRRSV-2 that contain linear epitopes recognized by B cells.

Previous studies demonstrate that synthetic peptides containing B cell epitopes induce a specific GP5 specific humoral response and proinflammatory cytokines [34]. This observation is confirmed in the present study, where immunization of piglets with the GP5-B and GP5-B3 peptides showed a significant increase in the concentration of specific IgGs after 21 days after primary immunization in both cases. However, only the GP5-B group showed a statistically significant increase after secondary immunization, suggesting a strong and sustained response, indicating the presence of active antibody producing cells. Conversely, the GP5-B3 group did not show a specific increase in IgGs after secondary immunization; nevertheless, its IgG levels remained elevated until 42 dpi, indicating the presence of antibody-forming/Plasma B cells [49].

The presence of memory B cells allows antigen-specific antibodies to be rapidly generated when the antigen that induced them comes into contact with these cells a second time, resulting in a faster and stronger humoral response [50]. Pre-immune animals exhibited a basal concentration of specific antibodies against GP5-B peptide. This could be explained by nonspecific binding of antibodies to the ELISA plate or a cross-reaction with the assay's microarrangement [51,52]. Another potential explanation for these readings at day 0 is the presence of maternal antibodies, which were likely transferred from the mother to the piglets via colostrum. According to Guzman-Bautista et al., 2013 [53], maternal antibodies in pigs can provide protection against respiratory infections through IgG, the predominant isotype in pig breast milk. These maternal antibodies also provide protection through the neutralization of pathogens and the recruitment of innate immunity effector molecules through the Fc domain of antibodies [54]. Thus, it is plausible that maternal antibodies could recognize the epitopes of both peptides given that the mothers of the piglets had been vaccinated.

The activation of B cells correlates with the induction of an antibody-mediated humoral response [55]. The humoral response mediated by B cells was also evaluated through three subpopulations: (i) antibody-forming/plasma B cells (CD2+/CD21<sup>-</sup>), which are B cells that correspond to B cells circulating within the peripheral blood with the function of secreting antibodies that can potentially recognize the specific antigen (anti-peptide antibody) that stimulated the cell [56,57]. (ii) Primed B cells (CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup>), which present their B receptors (BCR) charged with the antigen and remain in circulation waiting to contact with T cells that provide the activation signal [58]. (iii) Naïve B cells (CD2+/CD21<sup>+</sup>), which circulate through the peripheral blood and have not been exposed to an antigen [56,59]. Thus, this work evaluated the induction of subpopulations of B cells as follows: plasmatic cells (CD2+/CD21<sup>-</sup>), trained cells (CD2<sup>-</sup>/CD21<sup>+</sup>), and naïve cells (CD2+/CD21<sup>+</sup>). All these subpopulations were analyzed based on the selection of B cells with reduced IgM expression (IgM low).

Natural infection with PRRSV primes B cells and triggers antibody production and memory B cells [60]. Moreover, the expression of PRRSV epitopes through DNA vaccination can also prime B cells, eliciting a detectable, GP5-specific, humoral immune response [61]. The data obtained showed that both peptides can induce antibody-secreting B cells, which directly correlate with the increase in anti-peptide specific antibodies observed in the IgG evaluation. Surprisingly, the results of primed B cells showed that the group immunized with the peptide GP5-B3 induced a significant increase in primed B cells, greater than that of the group immunized with GP5-B peptide. This could explain why the same level of anti-GP5-B3 IgGs did not change from 21 to 42 dpi. Although these B cells contain the charged antigen in their BCR, they are not activated and therefore have not differentiated into secreting or memory B cells. On the other hand, the group immunized with GP5-B peptide also showed a significant increase compared to the vehicle and control groups,

indicating that there are also antigen-charged cells waiting to be activated to differentiate into plasmatic cells or memory cells.

Finally, the evaluation of the subpopulation of naïve B cells showed a decrease in these cells in the groups immunized with peptides, which agrees with the literature. It has been reported that naïve cells are cells that have not been stimulated or come into contact with an antigen; thus, these cells circulate in the bloodstream and lymph nodes waiting to come into contact with an antigen. When naïve B cells encounter an antigen, this subpopulation of B cells diminishes as they differentiate into trained B cells, antibody secretory, or memory cells [62]. Together, these data indicate that the peptides GP5-B and GP5-B3 can stimulate naïve B cells to differentiate into trained cells that will later become antibody-specific secretory B cells or CD2+/CD21− memory B cells.

The PRRSV exhibits significant genetic variability, which influences its interaction with the host's immune system and the antigenic properties of viral proteins [63]. This virus has a significant capacity to evade the immune response through various mechanisms, including internalization into cells [64]. In contrast, the host response includes neutralizing antibodies against B epitopes in the protein complex involved in the virus's interaction with the CD163 receptor, which the virus uses to infect [15,64,65].

PRRSV glycoprotein GP5 has been widely studied as a highly antigenic protein and is also the main target of neutralizing antibodies [66]. In fact, the main neutralization epitope is located in a hypervariable region of the ectodomain from the GP5 protein [67]. Thus, vaccines probably have low efficiency in providing protection against homologous wild strains. Other researchers have studied B epitopes from GP5 protein and found that they induce a humoral immune response [16,37,68].

Peptides GP5-B and GP5-B3 were immunoreactive against the sera of vaccinated animals with a commercial vaccine and against sera of animals naturally infected by wild strains, which are largely dominated by genotype 2 strains. However, as the Ministry of Agriculture and Rural Development reported in 2017, circulating strains of PRRSV-1 were also present; so, cross-immunoreactivity against heterologous strains is not ruled out. This can be attributed to the fact that the epitopes contained in the peptides are short sequences that were selected because they were conserved across different *in silico* reference strains, which was experimentally tested in this immunoreactivity test.

## 5. Conclusions

In conclusion, the data obtained in the present study show that immunization with GP5-B or GP5-B3 peptides induces a sustained humoral response of peptide-specific IgG antibodies. In addition, both peptides induced B cell activation and their differentiation into peptide-specific IgG antibody-forming/plasma B cells. The two peptides, both GP5-B and GP5-B3, were immunoreactive with the sera of animals vaccinated with the commercial vaccine and with the sera from animals naturally infected by circulating strains of PRRSV. These data suggest that B epitopes contained in peptides GP5-B and GP5-B3 are conserved across various strains of PRRSV. This work provides evidence of the capacity of B epitopes in the synthetic peptides GP5-B and GP5-B3 to induce a humoral response. Additionally, it was experimentally demonstrated that these are epitopes preserved in circulating wild strains, which could be included in the future development of a safe and effective vaccine model to prevent PRRSV infection.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.F.-D., R.E.N.-A., F.C.-R., I.H.-M., R.C.-V. and A.B.-P.; methodology, F.F.-D., R.E.N.-A., F.C.-R., I.H.-M., R.O.-F., D.D.-H. and R.C.-V.; formal analysis, F.F.-D., R.E.N.-A. and F.C.-R.; investigation, F.F.-D., R.E.N.-A., F.C.-R., I.H.-M., R.C.-V., R.O.-F., D.D.-H., L.E.F.-C. and A.G.Z.-A.; resources, R.E.N.-A., A.B.-P. and I.H.-M.; writing—original draft preparation, F.F.-D., I.H.-M., R.C.-V. and R.E.N.-A.; writing—review and editing, F.F.-D., I.H.-M., R.C.-V., A.B.-P. and R.E.N.-A.; visualization, F.F.-D.; supervision, R.E.N.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded and supported by grant CONAHCYT, grant number A1-S-43236. We thank CIC-UMSNH funding (2021–2023), which made part of this research possible. We thank PAPIIT-UNAM IA206322 for partial funding. We thank the Proteomic and Cellular Bioengineering Unit, INFR-2015-01 255010 (CONAHCYT). We thank ICTI Michoacán project FCCHT23\_ME-4.1-0014 for partial funding. We also express thanks for the grant from CONAHCYT, “FOMENTO A LA INFRAESTRUCTURA CIENTÍFICA” 2021, project No. 317139. F.P.-D. received a fellowship from B04387 CONAHCYT.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Animal Research and Ethics Committee of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (protocol code: CI-CUMSNH-A101-FMVZ and approval of 1 September 2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within this article.

**Acknowledgments:** The authors give thanks to “El Dapo farm” and “El Limón farm” for donation of serum samples, vaccinated (Ingelvac-PFRSV, MLV®), non-vaccinated and naturally infected groups. We thank the technical support of Freddy García Luna D.V.M.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Nieuwenhuis, N.; Duinhof, T.F.; van Nes, A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet. Res.* **2012**, *170*, 225. <https://doi.org/10.1136/vr.100101>
2. Chase-Topping, M.; Xie, J.; Pooley, C.; Truss, L.; Bondraert, C.; Rediger, K.; Bailey, R.I.; Brown, H.; Bitsouri, V.; Barria, M.B.; et al. New insights about vaccine effectiveness: Impact of attenuated PFRSV-strain vaccination on heterologous strain transmission. *Vaccine* **2020**, *38*, 3050–3061. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.02.015>
3. Ruedas-Torres, I.; Rodríguez-Gómez, I.M.; Sánchez-Carvajal, J.M.; Lavenas-Munoz, F.; Fallares, F.J.; Carrasco, L.; Gómez-Laguna, J. The jigsaw of PFRSV virulence. *Vet. Microbiol.* **2021**, *260*, 109168. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109168>
4. Angulo, J.; Yang, M.; Kovics, A.; Davies, P.R.; Tourenoull, M. Infection dynamics and incidence of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus in growing pig herds in the U.S. Midwest. *Prev. Vet. Med.* **2023**, *217*, 105976. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105976>
5. Li, R.; Qian, S.; Zhang, G. Reappraising host cellular factors involved in attachment and entry to develop antiviral strategies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 975610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.975610>
6. López-Heydeck, S.M.; Alonso-Morales, R.A.; Mendieta-Zerón, H.; Vázquez-Chagoyán, J.C. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PFRS). *Revisión. Rev. Mex. De Cienc. Pecu.* **2015**, *6*, 69–89.
7. Filizi, E.; Mabeu, E. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 106. <https://doi.org/10.1136/s13567-016-0391-4>
8. Larnney, J.K.; Fang, Y.; Ladirig, A.; Chen, N.; Li, Y.; Rowland, B.; Renukaradhya, G.J. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PFRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Asian. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
9. Sun, Q.; Xu, H.; An, T.; Cai, X.; Tian, Z.; Zhang, H. Recent Progress in Studies of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 in China. *Viruses* **2023**, *15*, 1528. <https://doi.org/10.3390/v15071528>
10. Mardassi, H.; Mouric, S.; Dea, S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75 Pt. 3*, 681–685. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-3-681>
11. Dieringer, S.; Knecht, C.; Sawyer, S.; Balke, G.; Zaruba, M.; Ruemenapf, T.; Kraft, C.; Raffliger, P.H.; Ladirig, A. Efficacy of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PFRSV-1) Vaccine against Experimental Infection with PFRSV AUT15-33 in Weaned Piglets. *Vaccines* **2022**, *10*, 934. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060934>
12. Meng, X.J.; Paul, P.S.; Halbur, P.G.; Lum, M.A. Characterization of a high-virulence US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATOC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1996**, *8*, 374–381. <https://doi.org/10.1177/104063879600800317>
13. Fang, Y.; Saizides, E.J. The PFRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Viruses* **2010**, *254*, 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.030>
14. Ko, J.H.; Nguyen, P.-L.; Ahn, J.-Y.; Yoon, H.; Min, J.; Lee, L.; Cho, S.-J.; Sekhon, S.S.; Kim, Y.-H. The global research trend of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PFRSV): A mini review. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2015**, *7*, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s13530-015-0254-9>

15. Striun, A.M.M.; Rowland, R.R.R. Challenges for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Vaccine Design: Reviewing Virus Glycoprotein Interactions with CD163 and Targets of Virus Neutralization. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 9. <https://doi.org/10.3390/vetsci6010009>.
16. Montaner-Tarbes, S.; Del Portillo, H.A.; Montoya, M.; Fraile, L. Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 38. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>.
17. Gao, C.; Lin, X. Editorial: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus—Animal virology, immunology, and pathogenesis. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1194386. <https://doi.org/10.3389/fimm.2023.1194386>.
18. Garcia Duran, M.; Costa, S.; Samazeta, J.; de la Roja, N.; Garcia, J.; Garcia, I.; Rodriguez, M.J. Generation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-like-particles (VLPs) with different protein composition. *J. Virol. Methods* **2016**, *236*, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jviro.2016.03.021>.
19. Wiersink, E.H.; Kroeze, M.V.; van Wijk, H.A.; Rijsewijk, F.A.; Meulenber, J.J.; Rottier, P.J. Envelope protein requirements for the assembly of infectious viruses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* **2006**, *79*, 12495–12506. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12495-12506.2005>.
20. Ramakrishna, G.J.; Meng, X.J.; Calvert, J.G.; Roof, M.; Lager, K.M. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. *Vaccine* **2015**, *33*, 4069–4080. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.092>.
21. Nan, Y.; Wu, C.; Gu, G.; Sun, W.; Zhang, Y.J.; Zhou, E.M. Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01635>.
22. Cao, Q.M.; Ni, Y.Y.; Cao, D.; Tian, D.; Yugo, D.M.; Heffron, C.L.; Overend, C.; Subramaniam, S.; Rogers, A.J.; Calzavara, N.; et al. Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Expressing Membrane-Bound Interleukin-15 as an Immunomodulatory Adjuvant Enhances NK and gamma/delta T Cell Responses and Confers Heterologous Protection. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00007-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00007-18>.
23. Madapong, A.; Saeng-Chai, K.; Boonsongnorn, A.; Tantitavanont, A.; Nihubol, D. Cell-mediated immune response and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified-live vaccines against co-challenge with PRRSV-1 and PRRSV-2. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1649. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58626-y>.
24. Cui, J.; O'Connell, C.M.; Costa, A.; Pan, Y.; Soryth, J.A.; Verardi, P.H.; Burgess, D.J.; Van Kruiningen, H.J.; Garmendia, A.E. A PRRSV GP5-Mosaic vaccine: Protection of pigs from challenge and ex vivo detection of IFN $\gamma$  responses against several genotype 2 strains. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0206801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206801>.
25. Kiek, A.R.; Amaral, A.F.; Friaiz-De-Diego, A.; Cortes, L.M.; Fogle, J.E.; Orsini, E.; Almond, G.W.; Kaser, T. The Local and Systemic Humoral Immune Response Against Homologous and Heterologous Strains of the Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 637613. <https://doi.org/10.3389/fimm.2021.637613>.
26. Choi, K.; Park, C.; Jeong, J.; Kang, I.; Park, S.J.; Chae, C. Comparison of commercial type 1 and type 2 PRRSV vaccines against heterologous dual challenge. *Vet. Rec.* **2016**, *178*, 291. <https://doi.org/10.1136/vr.103529>.
27. Zhang, H.; Luo, Q.; He, Y.; Zheng, Y.; Sha, H.; Li, G.; Kong, W.; Lian, J.; Zhao, M. Research Progress on the Development of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccines. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 491. <https://doi.org/10.3390/vetsci10060491>.
28. Scarth, M.; Prieto, C.; Alvarez, E.; Simarro, I.; Castro, J.M. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* **2007**, *161*, 809–813.
29. Kim, H.; Kim, H.K.; Jung, J.H.; Choi, Y.J.; Kim, J.; Uhn, C.G.; Hyun, S.B.; Shin, S.; Lee, B.; Jang, G.; et al. The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Viral J.* **2011**, *8*, 323. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-323>.
30. Chanzerdantakul, W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World J. Virol.* **2012**, *1*, 23–30. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1i1.23>.
31. Jeong, J.; Park, C.; Oh, T.; Park, K.H.; Yang, S.; Kang, I.; Park, S.J.; Chae, C. Cross-protection of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 vaccine against a heterologous PRRSV-1 challenge in late-term pregnancy gilts. *Vet. Microbiol.* **2013**, *223*, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.008>.
32. Vennart, S.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Popina-de Graaf, D.J.; Savellkoul, H.F.J.; Barrier-Quer, C.; Collin, N.; Collins, D.; McDaid, D.; Moore, A.C.; Rebel, J.M.J. Immune responses induced by inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in neonatal pigs using different adjuvants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2021**, *232*, 110170. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110170>.
33. Du, T.; Nan, Y.; Xiao, S.; Zhao, Q.; Zhou, E.M. Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 968–979. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.001>.
34. Chen, C.; Li, J.; Bi, Y.; Yang, L.; Meng, S.; Zhou, Y.; Jia, X.; Meng, S.; Sun, L.; Liu, W. Synthetic B- and T-cell epitope peptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with Gp96 as adjuvant induced humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* **2013**, *31*, 1838–1847. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.049>.
35. Popescu, L.N.; Tibble, B.R.; Chen, N.; Rowland, R.R.R. GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Vet. Microbiol.* **2017**, *209*, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>.
36. Murthy, A.M.V.; Ni, Y.; Meng, X.; Zhang, C. Production and Evaluation of Virus-Like Particles Displaying Immunogenic Epitopes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 8382–8396.

37. Ostrowski, M.; Galeota, J.A.; Jar, A.M.; Platt, K.B.; Osmio, F.A.; Lopez, O.J. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4241–4250. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4241-4250.2002>
38. Zhao, G.; Zhang, J.; Sun, W.; Xie, C.; Zhang, H.; Gao, Y.; Wen, S.; Ha, Z.; Niu, F.; Zhu, X.; et al. Immunological evaluation of recombinant PRRSV GP3 and GP5 DNA vaccines in vivo. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1016897. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1016897>
39. Luo, Q.; Zheng, Y.; Zhang, H.; Yang, Z.; Sha, H.; Kong, W.; Zhao, M.; Wang, N. Research Progress on Glycoprotein 5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Animals* **2023**, *13*, 813. <https://doi.org/10.3390/ani13050813>
40. Liu, D.; Chen, Y. Epitope screening and vaccine molecule design of PRRSV GP3 and GP5 protein based on immunoinformatics. *J. Cell Mol. Med.* **2024**, *28*, e18103. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18103>
41. Foxell, A.W.; McCluskey, J.; Rosojahn, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 404–414. <https://doi.org/10.1038/nrd2224>
42. Chanzertantakul, W.; Platt, R.; Johnson, W.; Roof, M.; Vaughn, E.; Roth, J.A. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *109*, 99–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.026>
43. Chanzertantakul, W. Adjuvants for swine vaccines: Mechanisms of actions and adjuvant effects. *Vaccine* **2020**, *38*, 6659–6661. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.054>
44. Vachisri, K.; Goldberg, T.L.; Huzmar, R.J.; Schützelein, W.; Zuckerman, F.A. Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **2008**, *26*, 4747–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
45. Calderon-Rico, F.; Bravo-Patiño, A.; Mendieta, I.; Perez-Duran, F.; Zamora-Aviles, A.G.; Franco-Correa, L.E.; Ortega-Flores, R.; Hernandez-Morales, I.; Nuñez-Ariza, R.E. Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses* **2023**, *16*, 14. <https://doi.org/10.3390/v16010014>
46. Lopez, O.J.; Osmio, F.A. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2004**, *102*, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>
47. Pettini, E.; Medaglini, D.; Ciabattini, A. Profiling the B cell immune response elicited by vaccination against the respiratory virus SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1068748. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1068748>
48. Opriessnig, T.; Matti, A.A.; Karuppanan, A.K.; Halbur, P.G. Future perspectives on swine viral vaccines: Where are we headed? *Proc. Health Manag.* **2021**, *7*, 1. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00179-7>
49. Rahe, M.C.; Dvorak, C.M.T.; Patterson, A.; Roof, M.; Murtaugh, M.P. The PRRSV-Specific Memory B Cell Response Is Long-Lived in Blood and Is Boosted During Live Virus Re-exposure. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 247. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00247>
50. Baum, R.O.; Fythian, S.; Summerfield, A. Porcine B Cell Subset Responses to Toll-like Receptor Ligands. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01044>
51. Jiang, X.; Wu, M.; Albo, J.; Rao, Q. Non-Specific Binding and Cross-Reaction of ELISA: A Case Study of Porcine Hemoglobin Detection.  *Foods* **2021**, *10*, 1708. <https://doi.org/10.3390/foods10081708>
52. Engvall, E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Chin. Chem.* **2010**, *56*, 319–320. <https://doi.org/10.1373/jclinchem.2009.127803>
53. Guzman-Bautista, E.R.; Garcia-Ruiz, C.E.; Gama-Espinosa, A.; Ramirez-Estabillo, C.; Rojas-Gomez, O.L.; Vega-Lopez, M.A. Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology* **2014**, *141*, 609–616. <https://doi.org/10.1111/imm.12222>
54. Pandyal, B.; Mwangi, W.; Rijal, P.; Schwartz, J.C.; Noble, A.; Shaw, A.; Sealy, J.E.; Borner-Di Flacido, M.; Graham, S.P.; Townsend, A.; et al. Fc-Mediated Functions of Porcine IgG Subclasses. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 903755. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.903755>
55. Boenmann, A.; Boens, K.; Römmermann, D.; Flieg-Flück, A.; Schwinzer, E. B cell activation and induced antibody responses to porcine antigen can be diminished by PD-L1-mediated triggering of PD-1.  *Xenotransplantation* **2014**, *21*, 192. [https://doi.org/10.1111/xen.12083\\_18](https://doi.org/10.1111/xen.12083_18)
56. Sinkora, M.; Boller, J.E.; Lager, K.M.; Potockova, H.; Sinkorova, J. The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 91. <https://doi.org/10.1186/s12567-014-0091-x>
57. Sinkora, M.; Sinkorova, J. B cell lymphogenesis in swine is located in the bone marrow. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 5023–5032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401152>
58. Turner, J.S.; Marthi, M.; Benet, Z.L.; Grigorova, I. Transiently antigen-paired B cells return to naive-like state in absence of T-cell help. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15072. <https://doi.org/10.1038/ncomms15072>
59. Kierulder, A.-K.; Eibel, H. Human B Cell Development and Tolerance. In *Encyclopedia of Immunobiology*; Ratcliffe, M.J.H., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 2016; pp. 105–121.
60. Mahupani, P.; Zimmerman, J.J.; Huzmar, J.; Johnson, C.R.; Cano, J.P.; Yu, W.; Dee, S.A.; Murtaugh, M.P. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol.* **2008**, *82*, 358–370. <https://doi.org/10.1128/JVI.01023-07>

61. Ren, J.; Lu, H.; Wen, S.; Sun, W.; Yan, F.; Chen, X.; Jing, J.; Liu, H.; Liu, C.; Xue, F.; et al. Enhanced immune responses in pigs by DNA vaccine coexpressing GP3 and GP5 of European type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* **2014**, *206*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.05.021>.
62. Thorarinnsson, K.; Campanozzi, A.; Cavallini, N.; Grimsholm, O.; Jacobsson, L.; Gjertsson, I.; Mårtensson, I.L. CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin. Exp. Immunol.* **2016**, *185*, 252–262. <https://doi.org/10.1111/cei.12795>.
63. Vanhee, M.; Van Breedam, W.; Costers, S.; Geldhof, M.; Noppé, Y.; Nawyryck, H. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine* **2011**, *29*, 4794–4804. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.071>.
64. Su, C.M.; Rowland, R.R.R.; Yoo, D. Recent Advances in PRRS Virus Receptors and the Targeting of Receptor-Ligand for Control. *Vaccines* **2021**, *9*, 354. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040354>.
65. An, T.Q.; Li, J.N.; Su, C.M.; Yoo, D. Molecular and Cellular Mechanisms for PRRSV Pathogenesis and Host Response to Infection. *Virus Res.* **2020**, *286*, 197990. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197990>.
66. Young, J.E.; Devrak, C.M.T.; Graham, S.P.; Murtough, M.P. Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5-Specific, Neutralizing Monoclonal Antibodies From Hyperimmune Sows. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 638493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638493>.
67. Thaa, B.; Srinadri, B.C.; Tielisch, C.; Krause, E.; Veit, M. Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: A minor fraction of molecules retains the decay epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065548>.
68. Hou, Y.H.; Chen, J.; Tong, G.Z.; Tian, Z.J.; Zhou, Y.J.; Li, G.X.; Li, X.; Peng, J.M.; An, T.Q.; Yang, H.C. A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine* **2008**, *26*, 1438–1449. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.057>.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 17. CAPÍTULO 2

Los datos presentados en el capítulo 2 corresponden al objetivo 3 de este trabajo de tesis. Los resultados obtenidos forman parte de un trabajo que continúa en proceso para poder dar una respuesta amplia a la pregunta de investigación, una vez que se concluyan los experimentos enfocados en la contraparte de la respuesta celular que no se contempló para este trabajo de tesis, se podrá obtener un manuscrito original que permita hacer una contribución en el área de vacunas para porcinos contra el virus PRRSV.

En el capítulo uno, se expuso evidencia que muestra que la inmunización con los péptidos GP5-B o GP5-B3 exhibieron de manera distintiva la respuesta inmune adaptativa humoral en lechones. En la que se puede observar el estadio de maduración de las subpoblaciones de células B durante el desarrollo de la respuesta humoral, así como la aparición de anticuerpos específicos. En el presente capítulo, se consideraron los datos publicados por Calderón-Rico *et al*, 2023, en los cuales se demostró que dos péptidos derivados de la proteína GP5, los cuales contenían epítomos T, fueron capaces de inducir una distintiva respuesta adaptativa celular en lechones. De acuerdo con la literatura son pocas las vacunas basadas en péptidos que se encuentran en investigación. La propuesta de este trabajo consiste en elucidar las cualidades de un candidato a vacuna denominado TetraPep-Go, que consistió en cuatro péptidos acoplados a una proteína acarreadora BSA, dos de los cuales correspondían a epítomos B y dos a epítomos T, adicionada de los adyuvantes, hidróxido de aluminio (Alhydrogel® 2%) y adyuvante basado en oligonucleótidos (ODN 1018 VacciGrade). El objetivo fue, establecer una formulación multiepitópica basada en péptidos que corresponden a epítomos inmunodominantes de la proteína GP5, así como evaluar la respuesta inmune antiviral protectora ante PRRSV, usando adyuvantes capaces de potenciar la respuesta mediada por IgGs y la respuesta de células T, tanto cooperadoras como citotóxicas. De manera que, la formulación sea capaz de inducir una respuesta inmune adaptativa completa. Por tanto, en este trabajo se analizó la respuesta inmune humoral y celular en un modelo de ratón, mediante la inmunización subcutánea de TetraPep-Go.

## 18. Justificación

La vacunación es el mejor método para prevenir infecciones virales, sin embargo, las vacunas que se comercializan contra PRRSV son vacunas clásicas, las cuales contienen el virus atenuado o virus inactivado completo. Dichas vacunas presentan baja protección, también, se asocian a la aparición de brotes severos debido al retorno del virus vacunal a un estado de patógeno (Du *et al.*, 2017). Por lo anterior, es necesaria la investigación en antígenos seguros y eficaces, es decir, que desplieguen una respuesta inmune protectora y sostenida a través del tiempo.

Se han desarrollado diversas vacunas contra PRRSV, las cuales, han presentado baja eficacia en la protección contra virus circulantes, o dichos modelos vacunales se encuentran en fase de experimentación (Stoian & Rowland, 2019).

No se tiene vacunas registradas para PRRSV que estén conformadas por péptidos.

## 19. Materiales y métodos

### Péptidos

Los péptidos empleados en esta fase de la experimentación fueron descritos anteriormente por (Perez-Durán, 2024) y Calderón-Rico, 2023). Los péptidos fueron resuspendidos en Dimethyl sulfoxide (DMSO) a una concentración de 4µg/µl previo a su uso.

### 19.1. Ratones

Ratones de sexo indistinto Balb/C de 7 semanas de edad se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada ( $22 \pm 1$  ° C) a una humedad del 50% en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h y alimentación *ad libitum* (Purina Certified Rodent Chow) y agua. Todos los procedimientos siguieron el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, EE. UU.) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999, fueron sometidos a aprobación por el Comité local de Cuidado de los animales de experimentación de la FMVZ. Todos los procedimientos de inyección se realizaron con ayuda de un dispositivo de inmovilización y sin anestesia.

21 ratones se separaron en 3 grupos de manera aleatoria: i) Control, el cual sirvió como control negativo sin inmunizar, ii) vehículo, que consistió en la inmunización con una proteína acarreadora BSA más dos adyuvantes, iii) grupo TetraPep-Go, que consistió de los 4 péptidos acoplados a BSA más los dos adyuvantes del grupo vehículo. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea, control, vehículo o TetraPep-Go, las cuales contenían en cada grupo, adyuvante alhydrogel (AlOH 2%), adyuvante ODN 1018 (Invivogen) y la proteína acarreadora maleimida-BSA acoplada a la mezcla de los cuatro péptidos (TetraPep-GO). En el caso de la formulación vehículo, esta consistió de adyuvante alhydrogel (AlOH 2%), adyuvante ODN 1018 y la proteína acarreadora BSA maleimide. Los animales fueron muestreados e inmunizados a intervalos de 21 días.

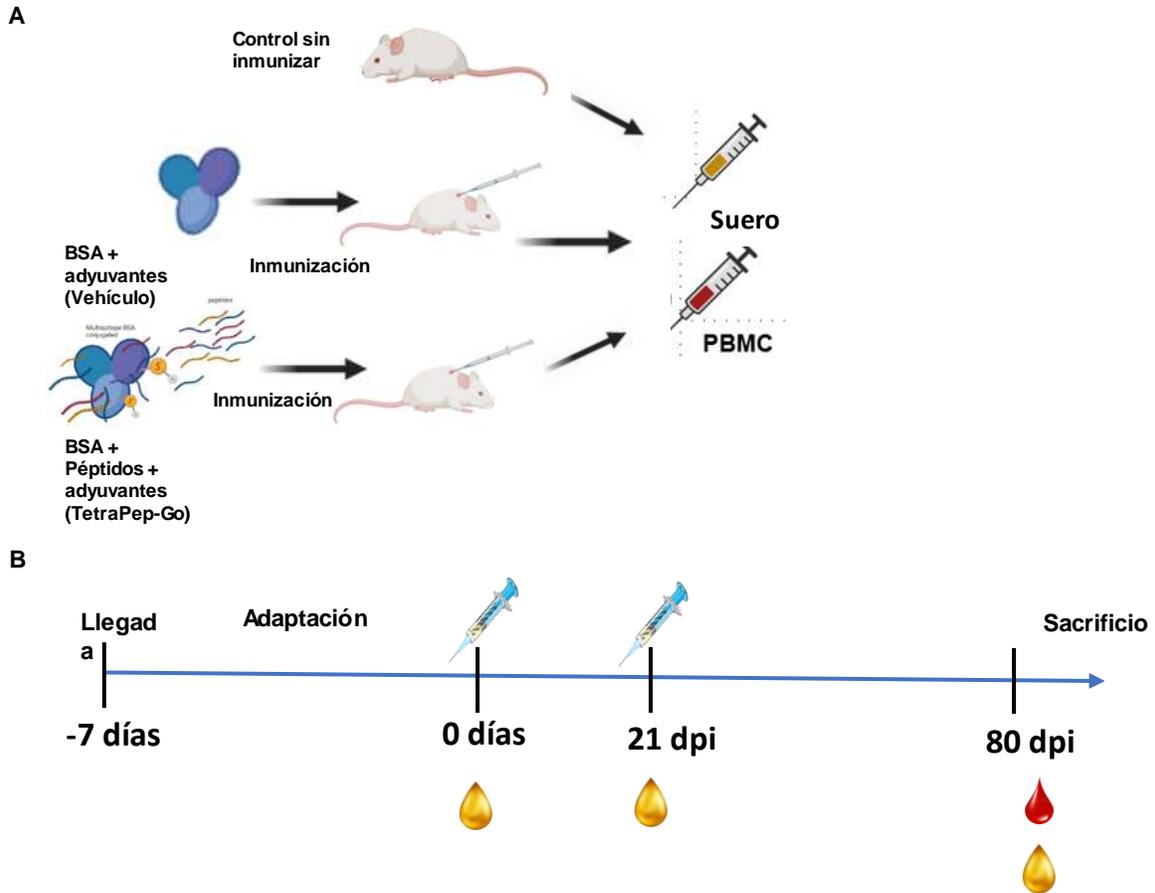
## 19.2. Inmunización y obtención de muestras

Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea, por un lado, un volumen de 197  $\mu$ l para cada animal, en el caso del grupo control BSA, de la mezcla total fueron: 32  $\mu$ l de DMSO (vehículo), 64  $\mu$ l maleimida [1 mg/ml] (inject Maleide Activated BSA, de Thermofisher) conjugado según especificaciones del fabricante, 96  $\mu$ l de adyuvante aluminum hydroxide (Alhydrogel® 2%) y 5  $\mu$ l de adyuvante ODN 1018. Por otro lado, un volumen de 197  $\mu$ l para cada animal, en el caso del grupo experimental, de la mezcla total fueron: 32  $\mu$ g de cada péptido [4 $\mu$ g/ $\mu$ L], 64  $\mu$ l de maleimida [1 mg/ml] (inject Maleide Activated BSA, de Thermofisher) conjugado según especificaciones del fabricante y 96  $\mu$ l de adyuvante aluminum hydroxide (Alhydrogel® 2%) y 5  $\mu$ l de adyuvante ODN 1018 (Tabla 1). Posteriormente se realizó el seguimiento de los ratones a través del tiempo, con periódicas tomas de muestra sanguínea a los 0, 21, 42 y 80 días post-inmunización dpi. Los ratones se sacrificaron por decapitación al día 80 y la sangre se recogió en tubos estériles con EDTA al final del experimento (Figura 1).

**Tabla 1.** Grupos inmunizados y formulaciones. La tabla muestra los volúmenes y concentraciones de los componentes de cada formulación

Grupo (N=7)	Formulation								Volumen total formulación (μL)
	Carrier Maleimide BSA (μg/μL)	Adjuvante ODN 1018 (μL)	Adjuvante aluminum hydroxide (μL)	GP5-B peptide (4μg/μL)	GP5-B3 peptide (4μg/μL)	Péptido GP5-T (4μg/μL)	Péptido GP5-T3 (4μg/μL)	DMSO (μL)	
Control									
Vehículo	64	5	96					32	197
TetraPep	64	5	96	8	8	8	8		197

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de los ratones antes de inmunizar a través de punción de la vena lateral de la cola, la punción se realizó con agujas de 0.80 mm de diámetro, los ratones fueron sujetos en un dispositivo de inmovilización. La sangre completa se recolectó con pipetas Pasteur humedecidas con EDTA [500 mM] pH 8, con las que se obtuvo la sangre por capilaridad. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos para obtener suero control y experimental, mismos que se preservaron en ultracongelación a -80 °C.



**Figura 1.** Diseño experimental. A) representación esquemática del diseño experimental, donde los ratone fueron inmunizados con las formulaciones vehículo o TetraPep-GO y las muestras de suero y sangre fueron colectadas. B) Línea del tiempo de los experimentos donde se muestra la inmunización al día 0 y refuerzo al día 21, así como los muestreos de suero a los días 0,21 42 y 80. Además el sacrificio al día 80, así como la muestra de sangre total.

### 19.3. Detección de anticuerpos IgG

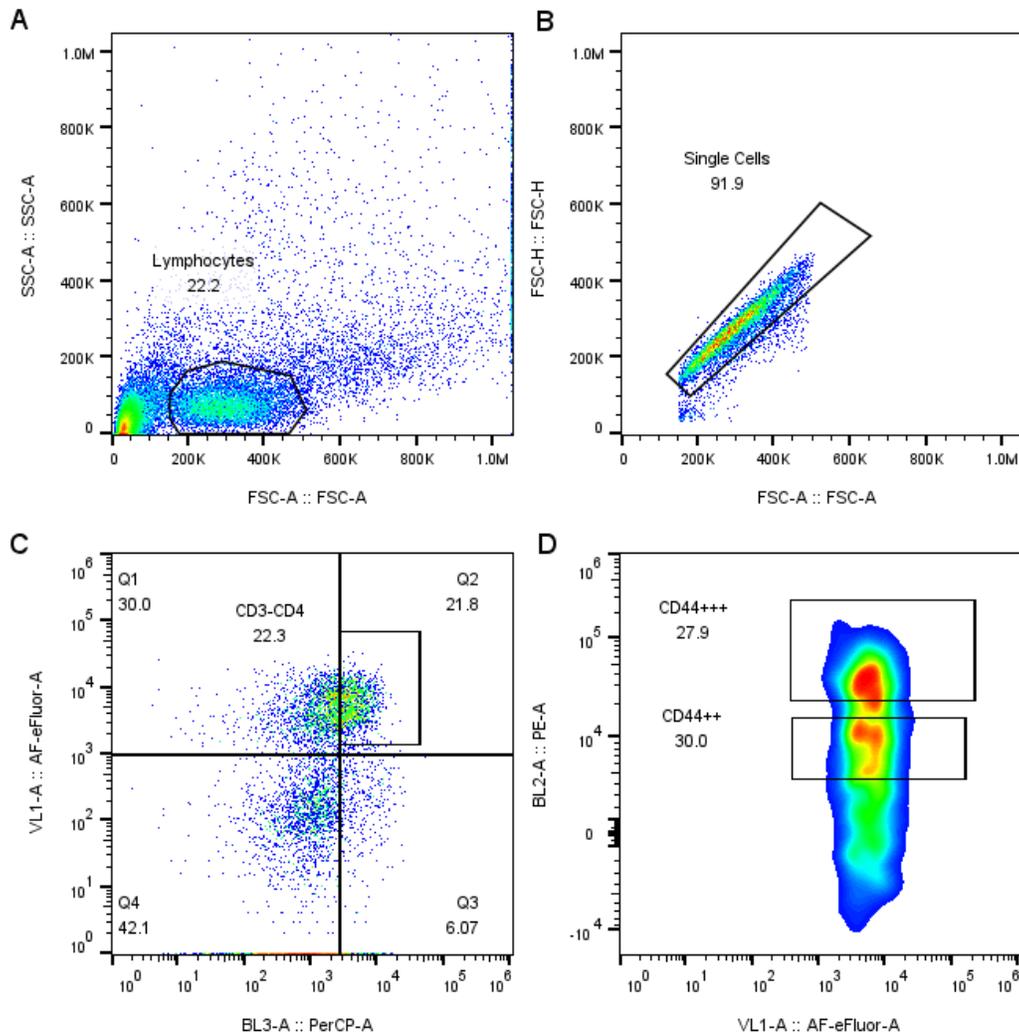
El análisis de anticuerpos se realizó acorde a los procedimientos de Pérez-Durán *et al.* (2024). Sin embargo, en esta parte del estudio, se realizó la detección de IgG1 e IgG2. Los resultados se muestran en concentración en [ng/ml].

### 19.4. Obtención de células blancas en sangre total

Al finalizar el periodo de inmunización de los grupos control y experimentales, los ratones fueron sacrificados por decapitación y se recuperó la sangre periférica total (aproximadamente 600  $\mu$ l por ratón), la cual fue mezclada con 6 ml de buffer de lisis de células rojas 1x (Miltenyi Biotec 10x, núm. Cat: 130-094-183), se mezcló por inversión durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 2,000 RPM durante 6 minutos y se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en el volumen residual y se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1x. Finalmente las muestras se centrifugaron a 2,000 RPM por 6 minutos y se desechó el sobrenadante para resuspender las muestras en PBS 1x para su posterior análisis por citometría de flujo.

### 19.5. Diseño de paneles para inmunotipificación de células T

Se realizaron pruebas de marcaje con los anticuerpos anti-CD3 PerCp/Cy5.5 (145.2C11, Biolegend,), anti-CD4 Alexa Fluóor 405 (RM4.5, ThermoFisher Scientific) y anti-CD44 PE (IM7, ThermoFisher Scientific) para diseñar los paneles de tipificación de células T activas de memoria (Figura 2). Para lo cual, primeramente usando los parámetros de tamaño y complejidad (FSC-A y SSC-A respectivamente) se delimitaron los linfocitos (Figura 2A), a partir de la población de linfocitos, en la figura 2B se seleccionaron las células individuales o singlets mediante los parámetros de tamaño (FSC-A y FSC-H), a partir de los singlets, se realizó un análisis de dobles positivos en el cual se analizaron el canal BL3-A (CD3-PerCp/Cy5.5) contra VL1-A (Alexa Fluóor 405) para la detección de linfocitos T cooperadores CD3+/CD4+ (Figura 2C). Finalmente, a partir de los CD3+/CD4+ se evaluó la expresión de CD44 al comparar VL1-A contra BL2-A (PE), en el cual se observaron las poblaciones de linfocitos T cooperadores activos CD44++ (CD4+/CD44++) y linfocitos T cooperadores efectores de memoria CD4+/CD44+++ (datos no mostrados). Los resultados se muestran en porcentaje de células T CD44++ (Figura 2D).

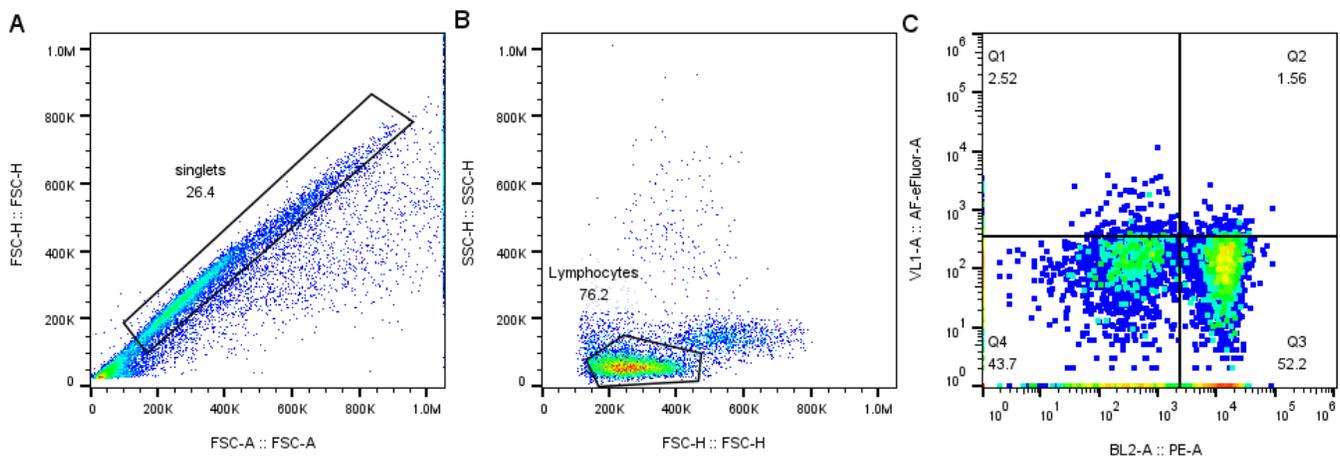


**Figura 2.** Panel de análisis de linfocitos T. La respuesta inmune T dependiente fue inducida en ratones inmunizados con TetraPep-GO. Las células fueron recuperadas al día 80. Los marcadores usados fueron anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD44. A) delimitación de la población general de linfocitos. B) Selección de células individuales o singlets. C) análisis de dobles positivos en panel de cuadrantes donde la población de interés es la de las células CD3+/CD4+ (cuadrante Q2). D) Selección de células CD4+/CD44++, donde se identifican las poblaciones celulares en función de la expresión y sobreexpresión de la fluorescencia de CD44. Los colores representan la densidad poblacional, color azul muestra baja densidad poblacional, color rojo representa la mayor densidad poblacional.

## 19.6. Diseño de paneles para inmunotipificación de células B

Se realizaron pruebas de marcaje con los anticuerpos anti-CD80 eFluor 450 (B7-1, ThermoFisher Scientific) y anti-CD19-PE (1D3, ThermoFisher Scientific) para diseñar los paneles de tipificación de células B activas de memoria

(Figura 3). Para lo cual, primeramente, usando los parámetros de tamaño (FSC-H y FSC-A) se delimitaron las células individuales o singlets (Figura 3A), a partir de singlets, en la figura 3B, se seleccionó la población de linfocitos mediante los parámetros de complejidad y tamaño (FSC-H y SS-H respectivamente), tras la delimitación de los linfocitos, en la figura 3C se realizó un análisis de dobles positivos para evaluar las poblaciones de linfocitos B, comparando BL2-A (PE) contra VL1-A (Alexa Fluor 450). Donde, el panel de cuadrantes identifica la población general de linfocitos B CD19+ (Q3) y la población de linfocitos B activos de memoria CD19+/CD80+ (Q2). Los resultados se muestran en porcentaje de células B.



**Figura 3.** Panel de análisis de linfocitos B. La respuesta inmune humoral fue inducida en ratones inmunizados con TetraPep-Go. Las células fueron recuperadas al día 80. Los marcadores usados fueron anti-CD19 y anti-CD80. A) Selección de células individuales o singlets. B) delimitación de la población general de linfocitos. C) análisis de dobles positivos en panel de cuadrantes donde la población de interés es la de las células CD19+/CD80+ (cuadrante Q2). Los colores representan la densidad poblacional, color azul muestra baja densidad poblacional, color rojo representa la mayor densidad poblacional.

## 19.7. Análisis estadístico

La presentación de gráficos y el análisis estadístico fueron desarrollados en el software GraphPad Prism IX. Los resultados presentan el promedio de tres mediciones diferentes de cada animal y se expresan con media  $\pm$  S.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), prueba de Tukey. Niveles de

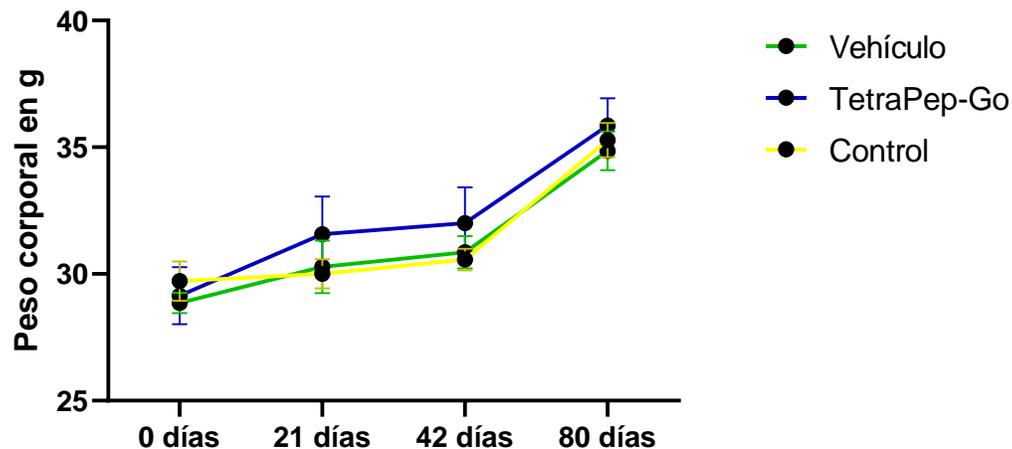
significancia  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Para el análisis de los datos de citometría de flujo se empleó el software FlowJo V. X(BD®).

## 20. RESULTADOS

### 20.1. Seguimiento al peso corporal

Durante todo el proceso de experimentación se realizó la observación clínica en los ratones. No se observó daño a tejido en el sitio de inyección tanto en el grupo control como en los grupos experimentales a través del curso de este estudio.

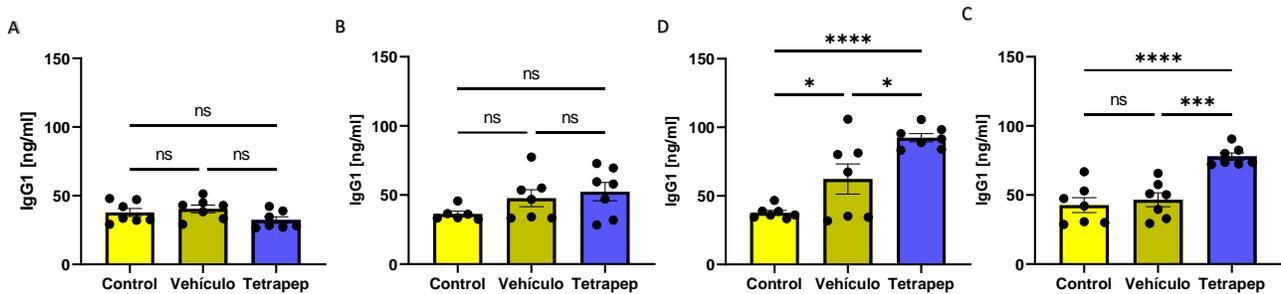
El peso corporal de los ratones experimentales fue registrado desde el día 0 hasta el día 80 dpi. El peso en gramos se graficó a los 0, 21, 42 y 80 días (Figura 4). Los resultados muestran una ganancia de peso en los dos grupos inmunizados con el vehículo y la formulación TetraPep-Go, la ganancia de peso de estos grupos se mantuvo a la par con el grupo control sin que se presentaran cambios significativos entre los grupos. El seguimiento del peso corporal de los ratones es indicador de salud, por lo que el aumento constante de peso a través de la duración del ensayo significa que los ratones se mantuvieron saludables.



**Figura 4.** Seguimiento del peso corporal de los ratones. Se monitoreo el peso corporal de los tres grupos de ratones (N=7 por grupo). Los pesos medios de los siete cerdos de cada grupo se representan con líneas de color y los intervalos intercuartílicos con barras de error. Para evaluar la significación estadística se empleó un ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Tukey. para evaluar la significación estadística. El análisis no reveló diferencias significativas de peso entre los grupos.

## 20.2. Detección de anticuerpos IgG

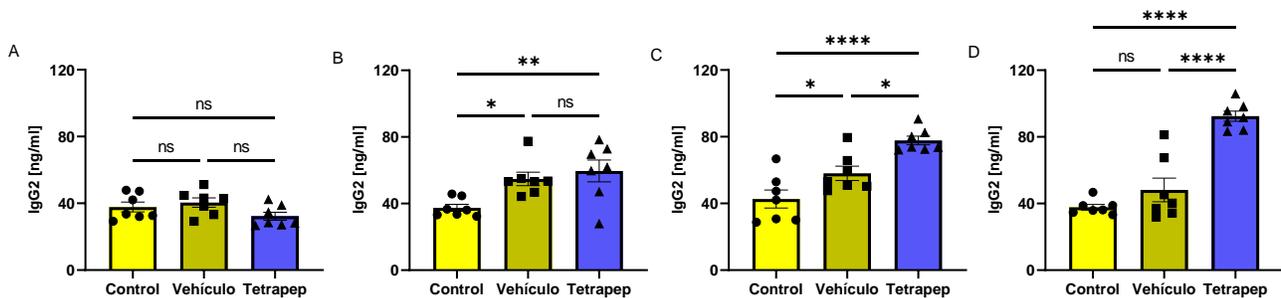
A los 0 días se observan los títulos de IgG1 en concentraciones sin diferencia significativa, es decir, a niveles basales (Figura 5A), donde se realizó la primera inmunización en los grupos vehículo y TetraPep. Tras la primera inmunización, se realizó la evaluación de IgG1 a los 21 días (figura 5B) en la cual se observó un incremento en los títulos de IgG1 en el caso del grupo vehículo y TetraPep. Sin embargo, estos incrementos no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo control. Por otra parte, a los 21 días se realizó la inmunización secundaria que fue evaluada hasta el día 42 (Figura 5D) donde se presentó un incremento significativo de IgG1 en el grupo vehículo con respecto al grupo control, además, el grupo TetraPep también presentó un incremento significativo con respecto al grupo vehículo y con respecto al grupo control. Finalmente, se realizó la última evaluación de los ratones al día 80 (Figura 5D) en donde se demostró que la respuesta de IgG1 aun presentó un incremento estadísticamente significativo con respecto a los dos grupos control y vehículo.



**Figura 5.** Respuesta humoral mediada por anticuerpos IgG1 inducida por inmunización en ratones. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con una formulación de péptidos acoplados a un acarreador BSA en grupo TetraPep + adyuvante alhydrogel® (AIOH 2%) y ODN 1018. Se tomaron muestras de los animales e inmunizados dos veces a intervalos de 21 días. La concentración de IgG1 se evaluó a los 0, 21, 42 y 80 días dpi mediante ensayo ELISA. A) 0 días ns= no significativo. B). 21 días dpi ns= no significativo. C) 42 días \*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . D) 80 días dpi \*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , ns= no significativo. cada grupo. Los datos se presentados como media SEM (n = 7). Las diferencias entre grupos se estimaron mediante la prueba de ANOVA unidireccional con el *post hoc* HSD de Tukey.

Además del subtipo IgG1, también se realizó la evaluación de la inducción de IgG2 en respuesta a la inmunización con las formulaciones vehículo o TetraPep-GO, a continuación, se presentan los datos obtenidos.

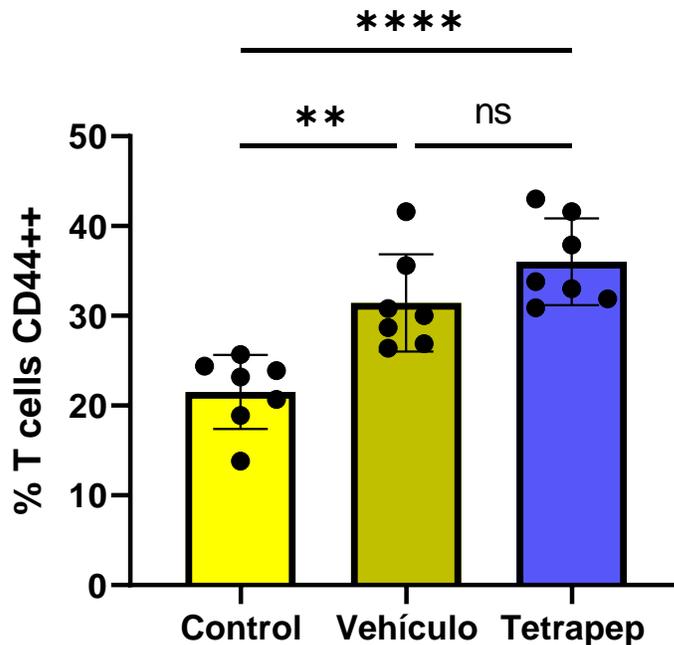
A los 0 días se observan los títulos de IgG2 en concentraciones sin diferencia significativa, es decir, a niveles basales, tal como se había observado en la respuesta de IgG1 (Figura 6A). Tras la primera inmunización, se realizó la evaluación de IgG2 a los 21 días (figura 6B) en la cual se observó un incremento en los títulos de IgG2 los grupos vehículo y TetraPep, dicho incremento fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control, sin embargo, no se presentó diferencia significativa en los grupos vehículo y TetraPep. A los 42 días (Figura 6C) se presentó un incremento significativo de IgG2 en el grupo vehículo con respecto al grupo control, además, el grupo TetraPep también presentó un incremento significativo con respecto al grupo vehículo y con respecto al grupo control. Finalmente, se realizó la última evaluación de los ratones al día 80 (Figura 6D) en donde se demostró que la respuesta de Ig2 también presentó un incremento sostenido de anticuerpos estadísticamente significativo con respecto a los dos grupos control y vehículo.



**Figura 6.** Respuesta humoral mediada por anticuerpos IgG2 inducida por inmunización en ratones. Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con una formulación de péptidos acoplados a un acarreador BSA en grupo TetraPep + adyuvante alhydrogel® (AlOH 2%) y ODN 1018. Se tomaron muestras de los animales e inmunizados dos veces a intervalos de 21 días. La concentración de IgG2 se evaluó a los 0, 21, 42 y 80 días dpi mediante ensayo ELISA. A) 0 días ns= no significativo. B). 21 dpi \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo. C) 42 días \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . D) 80 días dpi \*\*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo. cada grupo. Los datos se presentados como media SEM (n = 7). Las diferencias entre grupos se estimaron mediante la prueba de ANOVA unidireccional con el *post hoc* HSD de Tukey.

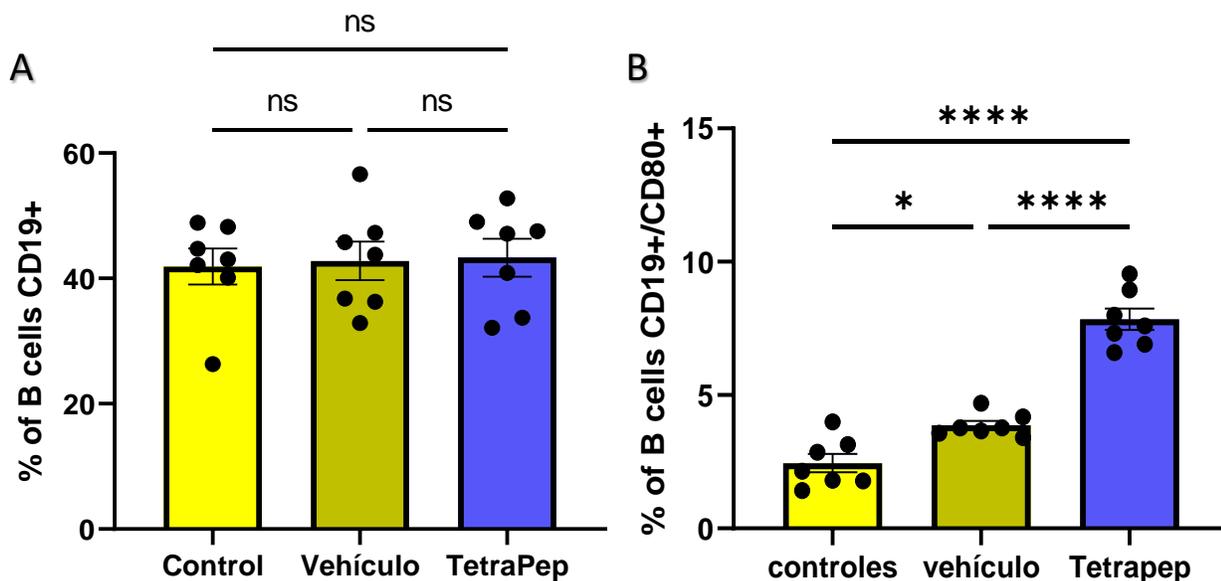
### 20.3. Tetrapep-GO indujo linfocitos T cooperadores

La inmunotipificación de las células T se realizó al día 80 dpi y los porcentajes de células T CD4+/CD44++ se evaluaron en 3 grupos experimentales: Control, Vehículo y Tetrapep (figura 7). Los resultados mostraron la presencia de un alto porcentaje de linfocitos T cooperadores activos (CD4+/CD44++) que era estadísticamente significativo en los grupos vehículo y TetraPep con respecto al grupo control. Además, no se observaron diferencias significativas entre el grupo vehículo y el grupo TetraPep. Esto sugiere que ambas formulaciones son capaces de inducir la activación linfocitos T cooperadores que se mantienen activos a través del tiempo y posiblemente colaborando activamente con la respuesta observada de anticuerpos IgG1 e IgG2.



**Figura 7.** Poblaciones celulares y porcentajes de linfocitos T CD4 activas (++) en sangre total de ratones inmunizados. Leucocitos aislados de sangre total en ratones a los 80 dpi. 10, 000 eventos fueron analizados a través de citometría de flujo siguiendo la ruta de paneles de la figura 2. Análisis estadístico en grupos (n=7 por grupo). \*\* p < 0,05, \*\*\*\* p < 0,001, ns = no significativo. Anova de una vía, prueba *post hoc* Tukey, los datos presentan  $\pm$ SEM.

Además, se realizó la inmunotipificación de los linfocitos B CD19+/CD80+ y se realizó la evaluación del porcentaje de las células B al día 80 (Figura 8). En la figura 8A se muestra el porcentaje de la población general de linfocitos B al día 80, donde se observó que no hubo diferencia significativa entre los tres grupos experimentales Control, Vehículo y TetraPep. Por otra parte, la Figura 8B muestra que las formulaciones vacunales indujeron un incremento significativo de linfocitos CD19+/CD80+ activos de memoria con respecto al grupo control. Además, se observó que en el grupo TetraPep hay un mayor porcentaje significativo de células de memoria con respecto al grupo vehículo. Lo cual nos demuestra que la formulación TetraPep-GO es capaz de inducir una respuesta humoral que se mantiene sostenida a través del tiempo y que también, los resultados observados en la figura 8B se correlacionan directamente con lo observado en la inducción de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2.



**Figura 8.** Poblaciones celulares y porcentajes de linfocitos B CD19+/CD80+ activas en sangre total de ratones inmunizados. Leucocitos aislados de sangre total en ratones a los 80 dpi. 10, 000 eventos fueron analizados a través de citometría de flujo siguiendo la ruta de paneles de la figura 3. Análisis estadístico en grupos (n=7 por grupo). A) población general de linfocitos B CD19+ ns = no significativo. B) \* p < 0,05, \*\*\*\* p < 0,001. Anova de una vía, prueba *post hoc* Tukey, los datos presentan  $\pm$ SEM.

## 21. DISCUSIÓN

El PRRSV cobra relevancia por las afectaciones en la salud de los animales, lo que se traduce en grandes pérdidas económicas en la industria porcina. La mejor manera de evitar los altos impactos de las infecciones virales, es a través de la vacunación. Sin embargo, a la fecha en que se realiza este manuscrito, las vacunas comerciales no son capaces de inducir una respuesta protectora altamente eficiente contra virus silvestres circulantes, ya sean homólogos o heterólogos a la cepa con la que se diseñaron dichas vacunas, además de los efectos adversos que llegan a presentar las vacunas basadas en virus atenuado. Por lo tanto, en este trabajo se planteó analizar la respuesta inmune inducida por una formulación vacunal multiepitópica un modelo *in vivo*. El uso de epítomos que sean inductores de las distintas fases de la respuesta inmune adaptativa son un tema que ha cobrado mucha relevancia en el desarrollo de vacunas de nueva generación que sean eficaces y seguras. Particularmente, en este trabajo se analizó la respuesta mediada por anticuerpos IgGs, subtipos IgG1 e IgG2, los cuales se ha reportado participan en las respuestas a patógenos intracelulares con funciones variadas como fijación del complemento, inhibición de la internalización del patógeno (neutralización) participación en la respuesta celular mediada por toxicidad, fagocitosis, etc. como lo reportó Paudal *et al.* (2022). En donde, la fusión efectora de las IgG se debe a las fracciones cristalizables (Fc) de cada subtipo, sin embargo, también mencionó que las funciones de los subtipos pueden llegar a variar según el tipo de patógeno que induzca la infección (Rostamian *et al.*, 2017).

Los resultados de la inmunización con la formulación TetraPep-GO, mostraron un aumento significativo de los anticuerpos IgG1 e IgG2 a los 42 y 80 dpi mientras, a los 21 días se mantiene sin cambios significativos la IgG1 y la IgG2 presenta cambios significativos solamente con respecto al grupo control, lo cual sugiere que ambas inmunoglobulinas responden en forma similar a la estimulación por la formulación experimental, sin embargo, IgG2 es la primera que aparece en esta respuesta humoral lo cual resulta interesante ya que esta inmunoglobulina es una de las que se encuentran en menor concentración en torrente sanguíneo del ratón (Bolliger & Everds 2012). Por otra parte, al día 42 donde se observó que ambos subtipos se incrementaron, se pudo observar que la respuesta de IgG1 presenta una mayor concentración de inmunoglobulinas con respecto a la respuesta observada a IgG2 al día 42, lo

cual es algo esperado ya que según la literatura (Bolliger & Everds 2012), IgG1 es la principal IgG que se encuentra en circulación y es a la que se atribuye la principal respuesta antiviral según estudios realizados en otros virus, tales como el virus de la influenza, el virus elevador de lactato deshidrogenasa murina y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (Huber et al, 2006) y HIV (Posner *et al.*, 1991; Kadelca *et al.*, 2018).

Finalmente, se observó que tras la inmunización secundaria se indujo nuevamente un incremento en la concentración de ambas IgGs que fue significativo en el grupo TetraPep, lo cual es algo que se había observado en el modelo de lechón (Perez-Duran *et al*, 2024) donde los animales se habían inmunizado con los péptidos basados en epítomos B de manera independiente y que en este modelo multiepitópico también se replicó esta respuesta potenciada por la reinmunización. Interesantemente, se observó al día 80 que la respuesta de IgG1 se mantuvo estadísticamente significativa con respecto a los grupos control y vehículo, sin embargo, aparentemente la concentración de IgG1 se ve disminuida con respecto a los títulos del día 42. Mientras que para la IgG2 al día 80, los títulos se siguen presentando significancia con respecto a sus grupos control y vehículo y lo que es más interesante, los títulos de IgG2 al día 80 se ven incluso superiores los títulos del grupo TetraPep al día 42. Lo cual sugiere que la respuesta de IgG2 aún está respondiendo a algún tipo de estímulo inducido por la formulación TetraPep-GO, lo anterior pudiera verse involucrado los adyuvantes de la formulación ya que al contener un adyuvante de aluminio, este induce un efecto deposito que puede mantener viable el antígeno por un tiempo más largo, sin embargo, hacen falta experimentos que pudieran demostrarlo.

En otro grupo de experimentos, se evaluó la respuesta inmune celular a través inmunotipificación de células T cooperadoras. Así que, se hicieron los siguientes grupos experimentales: control sin inmunizar, grupo vehículo y TetraPep. A los 80 días, los datos evidenciaron que no hubo diferencia en los porcentajes de estas células entre los grupos inmunizados, lo cual es algo esperado ya que la respuesta inmune T dependiente consiste en la inmunización con antígenos proteicos y dado que nuestras formulaciones consisten en antígenos peptídicos acoplados a núcleos de BSA, los resultados corresponden a la inducción de células T cooperadoras activas CD4+/CD44++. Lo que resulta interesante en los datos obtenidos es que los linfocitos cooperadores se mantienen activos hasta el día 80 sin

que se haya aplicado refuerzo al día 42. Lo anterior podría soportar la idea de que el mecanismo de acción de alguno de los dos adyuvantes podría mantener los antígenos viables por más tiempo.

Los resultados obtenidos aportan conocimiento nuevo que puede favorecer el desarrollo y optimización de modelos vacunales y desarrollos biológicos dirigidos selectivamente contra uno o varios epítomos incluidos en un modelo multiepitópico. De tal manera que se pueda avanzar en la formulación de vacunas mejoradas y superando a las vacunas clásicas que funcionan con modelos de virus o bacterias completos. Cabe destacar que en algunas vacunas de virus atenuados se ha reportado que los virus se pueden retornar a patógenos en estado silvestre. En las partículas caso de las proteínas de PRRSV, estas proteínas por si solas son capaces de inducir cierta inmunosupresión sobre el animal según lo reportado por Prieto y colaboradores en 2011. Nuestros resultados muestran que de manera específica la formulación multiepitópica pudo inducir de manera eficaz la respuesta humoral mediada por anticuerpos de subtipo IgG1 e IgG2, además de inducir células B de memoria por un tiempo extenso. También se demostró la presencia de células T cooperadoras activadas a través del tiempo.

## 22. DISCUSIÓN GENERAL

El complejo de enfermedades respiratorias porcinas contribuye a la disfunción de las necesidades nutricionales y de crecimiento de los animales, lo que provoca el detrimento de la salud del animal a largo plazo. En nuestro grupo de trabajo, se ha estudiado la respuesta del sistema inmune del hospedero ante un inmunógeno peptídico, es decir, péptidos individuales o en conjunto, derivados de una de las proteínas mas estudiadas del PRRSV, la proteína GP5.

Un primer acercamiento que se realizó para conocer como respondía el sistema inmune del cerdo ante una infección natural y la respuesta específica de los linfocitos T cooperadores, fue el trabajo realizado por (Calderón-Rico *et al.*, 2023), en el que se demostró que dependía del tiempo de infección, la carga viral y los agentes patógenos presentes en el cerdo, en conjunto estos factores determinan la capacidad para activar mecanismos de defensa antiviral. En dicho trabajo se demostró que efectivamente el PRRSV coexiste con otros virus y microorganismos que conforman el complejo respiratorio porcino. Este antecedente nos facilitó la decisión de delimitar que individuos que efectivamente estaban infectados por el PRRSV, para después demostrar que los anticuerpos presentes en el suero

de dichos animales naturalmente infectados reconocían a los antígenos peptídicos que se utilizaron para inmunizar los lechones y así explorar su potencial inmunogénico por primera vez. Lo anterior, nos permitió sugerir que los péptidos estudiados presentan una reactividad cruzada y además son conservados en comparación con epítomos presentes tanto en una vacuna comercial, como en el virus silvestre circulante en la región de Michoacán.

En párrafos anteriores se mencionó que las vacunas actuales para la prevención del PRRSV, consisten en virus inactivos o virus con baja virulencia. Sin embargo, en cada caso están bien descritas las desventajas técnicas de cada una de ellas. En comparación con las vacunas clásicas y las vacunas de un solo epítomo, las vacunas de epítomo múltiple tienen diseños únicos y cumplen con propiedades muy particulares, tales como: contiene diversos epítomos seleccionados previamente utilizando bioinformática, constan de epítomos que son reconocidos por células B y/o T, contienen epítomos de diferentes antígenos virales que pueden ampliar su espectro, así como incluir información de uno a más virus específicos; contienen adyuvantes o potenciadores de la respuesta inmune e intrínsecamente cumplen con la bioseguridad que se requiere porque no son capaces de inducir la enfermedad (Saadi *et al.*, 2017). En los últimos años ha cobrado gran relevancia el estudio de una nueva plataforma de vacunas basadas en epítomos contra los virus SARS-COV-2 (Umintaibatin *et al.*, 2023; Sirohi *et al.*, 2020), Viruela símica o Mpox (Tan *et al.*, 2023), Dengue (Fadaka *et al.*, 2021) y PRRSV (Liu & Chen 2024).

La pregunta de investigación que se abordó en este trabajo fue analizar las propiedades inmunogénicas de 4 péptidos lineales (GP5-B, GP5-B3, GP5-T y GP5-T3), derivados de una de las proteínas virales de PRRSV. Para ello, estudiamos las propiedades por separado y luego en conjunto. Por un lado, Calderón-Rico *et al.*, 2024, demostró la eficacia y potencia para inducir una respuesta celular mediada por dos péptidos que contenían epítomos T, lo cual promovió actividad citolítica en células infectadas por PRRSV. Por otro lado, con los datos presentados en el capítulo 1 de este trabajo, en el que lechones inmunizados con los péptidos GP5-B o GP5-B3 mostraron una respuesta humoral sostenida de anticuerpos IgG específicos de péptidos. Además, indujeron la activación de las células B y su diferenciación en células B plasmáticas/formadoras de anticuerpos IgG específicas de péptidos se obtuvieron datos concretos para el estudio de los cuatro péptidos unidos a una proteína acarreadora. Los resultados

hasta este punto sugerían que la formulación vacunal multiepítopo tendría la capacidad de inducir la respuesta inmune humoral y celular en el hospedero.

El paso siguiente consistió en evaluar la respuesta inmune inducida por los péptidos GP5-B, GP5-B3, GP5-T y GP5-T3 de manera conjunta en un modelo murino (Capítulo 2), tanto en el contexto de la respuesta mediada por anticuerpos totales (IgG) como la respuesta de células B asociadas a la inducción de anticuerpos. Al evaluar IgG total en un curso temporal de 0, 21, 42 y 80 días se observó que en los grupos de ratones inmunizados con TetraPepGo, la concentración de IgGs, alcanzó su nivel más alto a los 42 dpi y que esta respuesta de anticuerpos se mantuvo hasta el día 80, lo cual, se puede asociar a la presencia anticuerpos (IgG total) de vida larga. Datos preliminares que se encuentran en curso mostraron que la respuesta a TetraPepGo en ratones es sostenida. Tal como lo han reportado otros autores, el siguiente experimento sería establecer un reto viral en lechones y analizar la protección contra un virus silvestre (Franzoni *et al*, 2013).

De acuerdo con los datos en la literatura, las características de la formulación de TetraPepGo, sugieren la inducción de la respuesta inmune del hospedero, tanto humoral como celular, con las ventajas técnicas de seguridad, inmunogenicidad y posible protección contra cepas heterólogas.

## 23. CONCLUSIÓN

Este estudio mostró que la formulación multiepitépica TetraPep-Go pudo inducir la respuesta humoral mediada por IgGs tanto IgG1 e IgG2 y una respuesta celular mediada por células T CD4+/CD44+ en ratones. TetraPep-Go podría ser un potencial candidato para el desarrollo de un modelo vacunal efectivo y seguro para la prevención de infecciones por PRRSV.

## 24. PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en el presente trabajo sientan las bases para estudios futuros que realicen las pruebas *in vivo* de TetraPep-Go en un modelo de lechones.

## 25. ANEXOS

## Realidad sobre las vacunas. Su contenido y seguridad

Francisco Perez-Duran y Rosa Elvira Nuñez Anita  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### Resumen

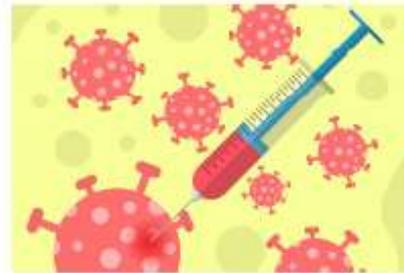
Se han cumplido casi dos siglos de la muerte del padre de la vacunología, Edward Jenner. Su legado se ha visto afectado cada vez más por grupos de personas, quienes buscan persuadir de la vacunación. Dichos movimientos radicales tienen una clara postura contra las vacunas, las consideran sustancias peligrosas. Argumentan que dichos biológicos pueden desencadenar diversos efectos adversos, tales como: alergias severas, el desarrollo de enfermedad grave e incluso la muerte. Es importante resaltar que, pese a su gran beneficio, todo medicamento, incluidas las vacunas, algunas veces, no siempre, pueden causar reacciones adversas en su mayoría de leves a moderadas. Por lo tanto, la ausencia de cualquier reacción no deseada, no se puede asegurar de manera absoluta cuando se administra una vacuna o cualquier otro producto sanitario. Sin embargo, esta concepción se exagera con opiniones en redes sociales e internet, lo cual hace dudar a la población del gran beneficio de la vacunación, salvar la vida de las personas. El objetivo de este artículo es informar desde el conocimiento científico, pero en términos simples acerca del contenido de las vacunas, su proceso de elaboración y la forma en que se garantiza su seguridad.

### Desde el padre de la inmunología a la actualidad

Edward Jenner es considerado el padre de la inmunología. Sus principales logros datan de finales del siglo XVIII, durante una época donde las enfermedades provocadas por diversos microorganismos, incluidos bacterias y virus, eran el común asociado a la muerte de incontables individuos y animales. La gran proeza del médico inglés fue controlar al "gran monstruo moteado", el cual, mató a millones de personas en Europa y arrasó con tribus indígenas en el continente americano. Estamos hablando, por supuesto, del virus que provoca la viruela. Jenner, observó que las personas que manipulaban de manera continua a las vacas, que presentaban la viruela bovina, no desarrollaban los cuadros mortales de la enfermedad. Por lo tanto, dedujo que: "algo" que estaba presente en las lesiones en vacas protegía de alguna manera a los individuos. Así fue como desarrolló un método inédito, mediante el cual transfirió de manera segura el agente causal de la viruela bovina a una persona y comprobó su hipótesis. Esta práctica ya se había descrito antes de que Jenner la utilizara. Sin embargo, Jenner demostró de manera sistemática e inequívoca, la alta eficiencia de este método para prevenir enfermedades virales. Este hecho cambió la historia de la medicina para siempre, al convertirse en la primera vacuna.

A partir del éxito que tuvo Jenner con su vacuna contra la viruela, otros grandes científicos del desarrollo de vacunas, tales como

Louis Pasteur, obtuvieron grandes avances en otras vacunas que, por una parte, prevenían el desarrollo de enfermedades causadas por microorganismos infecciosos (patógenos) o que, por otra parte, brindaban el beneficio de reducir o atenuar los síntomas cuando se presentaba la enfermedad. Lo que condujo a mejorar las expectativas en la calidad de vida y salud pública.



### Tecnología de las primeras vacunas y de las vacunas actuales

Estas vacunas del pasado, desarrolladas con la tecnología, métodos y conocimiento de la época, estuvieron basadas en microorganismos atenuados, es decir, virus o bacterias que fueron destruidos por calor o métodos químicos para que permanecieran completos y activos, pero que perdieron capacidad para desarrollar la enfermedad. Este tipo de vacunas se mantuvieron en uso durante mucho tiempo, hasta que el avance científico y el desarrollo de tecnologías, permitieron el desarrollo de las primeras vacunas que contienen solo algún componente de los microorganismos.

Actualmente el avance científico en el área de la biotecnología, la medicina y la biología, han permitido el desarrollo de vacunas de nueva generación, las cuales han logrado superar por mucho los posibles efectos adversos que pudiesen presentarse con las vacunas clásicas. Estas vacunas están constituidas de una pequeña fracción del microorganismo contra el que se desea generar protección a través de la vacunación, por ejemplo, de ácidos nucleicos (ADN y ARN) o de secuencias cortas de aminoácidos (péptidos y epítopos). El principal obstáculo que superan estos modelos de nueva generación con respecto a las vacunas del pasado, es eliminar el posible efecto adverso en el microorganismo atenuado para retornar a su forma infecciosa, reduciendo así el desarrollo de la enfermedad en los pacientes vacunados. Debido a que estas vacunas no contienen microorganismos ni proteínas completas, sino fracciones de ellos que posteriormente de cumplir su función de montar protección

inmune, son destruidos por las mismas células del paciente, sin que ello suponga una alteración o modificación de su material genético. Las nuevas vacunas también superan el problema de las **reacciones alérgicas**. Esto, debido a que pueden ser totalmente sintéticas y generadas en condiciones totalmente estériles, libres de partículas contaminantes, de tal manera que se evita el uso de **conservadores** en su formulación.



#### Lo que hay detrás del desarrollo de las vacunas

El avance tecnológico en las últimas décadas ha sido tal, que actualmente hay conocimiento constante en el ámbito del desarrollo de componentes vacunales. Conocimiento que permite a los científicos tomar decisiones fundamentadas para la elaboración de vacunas con mayor eficacia y seguridad. Tales componentes, tanto por separado, como en la formulación de la vacuna, deben superar una rigurosa evaluación por parte de la comunidad científica. Para ello, la información de las vacunas se publica en revistas científicas con arbitraje estricto, donde se puede consultar la información teórica y práctica que sustenta y valida la eficiencia y seguridad de los modelos vacunales. Posteriormente, si el producto biológico pretende ser comercializado como una vacuna, éste debe ser sometido a evaluación por parte de organizaciones especializadas en el área de la salud humana de cada país, donde se pretenda licenciar la vacuna. Por ejemplo, por la FDA (*Food and drug administration*, por su significado en inglés) en Estados Unidos o por la Comisión Federal para la protección de riesgos sanitarios (COFEPRIS) en México. Esto implica someter la vacuna a pruebas clínicas muy rigurosas en las que cada organización tiene protocolos y estándares para la validación y aprobación de las vacunas. Los protocolos de estas organizaciones son similares en todo el mundo y son basados en recomendaciones de organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre otras.

#### Las vacunas contra COVID-19

Las vacunas que se desarrollaron para combatir la problemática mundial de Covid-19, pertenecen principalmente a vacunas de nueva generación, como las vacunas de ARN, vacunas de subunidades y las vacunas de vectores virales. Si bien, estas vacu-

nas fueron desarrolladas y aprobadas para su uso en un lapso de tiempo muy corto en comparación con otras vacunas. Es muy importante resaltar que todas las vacunas cuentan con los estudios de calidad y seguridad apropiados para garantizar su eficiencia al proteger de la enfermedad causada por el virus SARS-Cov-2.

La seguridad en las vacunas es la mayor prioridad en el desarrollo de estas y por ello, las vacunas contra COVID-19 han sido sometidas a rigurosas normas de seguridad para poder aprobar su uso en la población. A la fecha, millones de personas en todo el mundo han recibido alguna de las distintas vacunas que se comercializan sin que se hayan reportado efectos secundarios a largo plazo.

Desde la aparición de la primera vacuna contra covid-19 en 2021, todavía continúa el monitoreo de las vacunas para garantizar que sean seguras y efectivas a largo plazo.



La vacunación se ha consolidado como uno de los grandes hitos de la medicina ya que, gracias a esta práctica, se ha mejorado la calidad de vida de los seres humanos y animales. Pero lo más importante es que la aplicación de vacunas ha salvado millones de vidas. Por lo tanto, entender que el desarrollo de vacunas es un proceso metódico y muy riguroso, que busca la generación de productos biológicos seguros y eficaces capaces de prevenir la enfermedad y/o evitar la muerte, permitirá acabar con el temor infundido inculcado en la población hacia las vacunas.

#### Bibliografía

- Martínez-Mateo, P., Bustos-Fonseca, M. J., & Gil-Díaz, M. J. (2012). Actualización en vacunas. Teoría, realidades y mitos (I). *Semergen*, 38(3), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2011.10.021>
- MayoClinic. (2022). ¿Cómo funcionan las vacunas? <https://www.mayoclinic.org/es-es/coronavirus-covid-19/how-the-vaccines-work>
- Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, 11(5), 55–511. <https://doi.org/10.1038/nm1209>



## 25.2. Anexo II: Reporte de herramienta anti plagio

**Francisco Pérez Duran**

### **INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME RE...**

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

#### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:398303601

Fecha de entrega

25 oct 2024, 7:45 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

25 oct 2024, 7:46 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL S...pdf

Tamaño de archivo

2.3 MB

57 Páginas

10,324 Palabras

61,318 Caracteres



Página 1 of 65 - Portada

Identificador de la entrega trn:oid::3117:398303601

## 25.3. Anexo III: Formato de Declaración de Originalidad y Uso de IA

### Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
<b>Programa educativo</b>	Doctorado en Ciencias Biológicas	
<b>Título del trabajo</b>	INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO	
	<b>Nombre</b>	<b>Correo electrónico</b>
<b>Autor/es</b>	Francisco Perez Duran	0618713g@umich.mx
<b>Director</b>	Rosa Elvira Nuñez Anita	rosa.anita@umich.mx
<b>Codirector</b>	Alejandro Bravo Patiño	alejandro.bravo@umich.mx
<b>Coordinador del programa</b>	Omar Chassin Noria	ochassin@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (si/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	No aplica

## Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	No aplica
Traducción a otra lengua	No	No aplica
Revisión y corrección de estilo	No	No aplica
Análisis de datos	No	No aplica
Búsqueda y organización de información	No	No aplica
Formateo de las referencias bibliográficas	No	No aplica
Generación de contenido multimedia	No	No aplica
Otro	No	No aplica

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Francisco Perez Duran
Lugar y fecha	Morelia Michoacán México a 23 de octubre 2024

## 26. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

- Liu, D., & Chen, Y. (2024). Epitope screening and vaccine molecule design of PRRSV GP3 and GP5 protein based on immunoinformatics. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(3), 1–12.  
<https://doi.org/10.1111/jcmm.18103>
- Fadaka, A. O., Sibuyi, N. R. S., Martin, D. R., Goboza, M., Klein, A., Madiehe, A. M., & Meyer, M. (2021). Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. *Scientific Reports*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99227-7>
- Franzoni, G., Kurkure, N. V., Edgar, D. S., Everett, H. E., Gerner, W., Bodman-Smith, K. B., Crooke, H. R., & Grahama, S. P. (2013). Assessment of the phenotype and functionality of porcine cd8 t cell responses following vaccination with live attenuated classical swine fever virus (CSFV) and virulent CSFV challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1604–1616. <https://doi.org/10.1128/CVI.00415-13>
- Saadi, M., Karkhah, A., & Nouri, H. R. (2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.009>
- Sirohi, P. R., Gupta, J., Somvanshi, P., Prajapati, V. K., & Grover, A. (2022). Multiple epitope-based vaccine prediction against SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(8), 3347–3358. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1846626>
- Tan, C., Zhu, F., Pan, P., Wu, A., & Li, C. (2023). Development of multi-epitope vaccines against the monkeypox virus based on envelope proteins using immunoinformatics approaches. *Frontiers in Immunology*, 14(March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112816>
- Umitaibatin, R., Harisna, A. H., Jauhar, M. M., Syaifie, P. H., Arda, A. G., Nugroho, D. W., Ramadhan, D., Mardliyati, E., Shalannanda, W., & Anshori, I. (2023). Immunoinformatics Study: Multi-Epitope Based Vaccine Design from SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Vaccines*, 11(2), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines11020399>

# Francisco Pérez Duran

## INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME RE...

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:398303601

Fecha de entrega

25 oct 2024, 7:45 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

25 oct 2024, 7:46 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL S....pdf

Tamaño de archivo

2.3 MB

57 Páginas

10,324 Palabras

61,318 Caracteres

# 14% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Fuentes principales

- 13%  Fuentes de Internet
- 7%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
<b>Programa educativo</b>	Doctorado en Ciencias Biológicas	
<b>Título del trabajo</b>	INVESTIGACIÓN DE UNA FORMULACIÓN VAGINAL MULTIEPITÓPICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO	
	<b>Nombre</b>	<b>Correo electrónico</b>
<b>Autor/es</b>	Francisco Perez Duran	0618713g@umich.mx
<b>Director</b>	Rosa Elvira Nuñez Anita	rosa.anita@umich.mx
<b>Codirector</b>	Alejandro Bravo Patiño	alejandro.bravo@umich.mx
<b>Coordinador del programa</b>	Omar Chassin Noria	ochassin@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	No aplica

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	No aplica
Traducción a otra lengua	No	No aplica
Revisión y corrección de estilo	No	No aplica
Análisis de datos	No	No aplica
Búsqueda y organización de información	No	No aplica
Formateo de las referencias bibliográficas	No	No aplica
Generación de contenido multimedia	No	No aplica
Otro	No	No aplica

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Francisco Perez Duran
Lugar y fecha	Morelia Michoacán México a 23 de octubre 2024