



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

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
“ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA CELULAR A LA INFECCIÓN
POR EL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO”

TESIS QUE PRESENTA
IBQ. MIRIAM PIÑA DÍAZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESORA-TUTORA:
D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

CO-ASESORA
M en C. ILANE HERNÁNDEZ MORALES

MORELIA, MICH., Abril de 2021

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la tutoría de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la co-tutoría de la Dra. Ilane Hernández Morales a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradecemos a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y a la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES-UNAM) unidad León por las facilidades en las instalaciones y materiales para la realización de este trabajo. Además, agradecemos la financiación parcial por la CIC-UMSNH 2019-2021.

Agradecimiento al apoyo por parte de CONACYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONACYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular y al Proyecto PAPIIT IA207519 de la UNAM.

Agradecemos el apoyo a Miriam Piña Díaz que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2019-2021 con No. de becario 732520 y número de CVU 949826.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	6
ABSTRACT.....	10
RESUMEN.....	12
I- INTRODUCCIÓN.....	14
1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE PRRSV	14
2. HISTORIA.....	15
3. VÍAS DE TRANSMISIÓN Y PATOGENIA	15
II- MARCO TEÓRICO.....	16
1. VIRUS: GENOMA Y VARIABILIDAD GENÉTICA	16
1.1. INTERACCIÓN VIRUS-HOSPEDERO	17
2. CÉLULAS BLANCO DE PRRSV	17
3. REPLICACIÓN VIRAL	18
4. PROTEÍNA GP5.....	19
5. RESPUESTA INMUNE CONTRA PRRSV	20
5.1. RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA PRRSV	20
6. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA CONTRA PRRSV	21
6.1. RESPUESTA HUMORAL	21
6.2. RESPUESTA ADAPTATIVA CELULAR	22
7. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR PRRSV	22
7.1. ANTICUERPOS OPSONIZANTES.....	22
7.2. MECANISMO DE MODULACIÓN E INHIBICIÓN DE LAS VÍAS RELACIONADAS A INTERFERONES	23
8. MACRÓFAGOS (MΦ).....	24
8.1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO.....	25
8.2. ACTIVACIÓN DE MΦ	26
8.3. FACTORES Y CAMBIOS RELACIONADOS A LA ACTIVACIÓN DE MΦ.....	27
8.4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA POLARIZACIÓN DE MΦ	29
8.4.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA – B (NF-KB)	29

III- ANTECEDENTES	30
EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE MΦ EN PRRSV.....	30
IV- JUSTIFICACIÓN	32
V- HIPÓTESIS	32
VI- OBJETIVO GENERAL	32
VII- OBJETIVOS PARTICULARES	32
VIII- ESTRATEGÍA METODOLÓGICA	33
1. MATERIALES	33
PÉPTIDOS.....	33
LÍNEA CELULAR RAW 264.7 (ATCC ® TIB-71).....	33
SISTEMA DE VECTORES REPORTEROS <i>CIS</i>	33
REACTIVO DE TRANSFECCIÓN LIPOFECTAMINE LTX.....	35
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA QPCR	35
HERAMIENTAS COMPUTACIONALES:	36
SNAPGENE	36
IMMUNE EPITOPE DATABASE (IEDB)	36
CCL MAIN WORKBENCH 20.0	37
CFX MAESTRO SOFTWARE PARA CFX REAL-TIME PCR	37
GRAPHPAD PRISM 6	37
2. METODOLOGÍA	37
2.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS	37
2.2. EVALUACIÓN DE MΦ ACTIVADOS POR MEDIO DE TINCIÓN WRIGHT.	38
2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF-KB	39
TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	39
PURIFICACIÓN O EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO A PEQUEÑA ESCALA (MINIPREP).....	39
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO NF-KB-HRGFP A GRAN ESCALA (MAXIPREP) CON KIT QIAGEN.	40
ANÁLISIS DEL PLÁSMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	40
CURVA DE SENSIBILIDAD CELULAR AL ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN.....	40
TRANSFECCIÓN ESTABLE CON LIPOFECTAMINE LTX Y PLÁSMIDO NF-KB-HRGFP EN CÉLULAS RAW 264.7	41

SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFECTADAS DE MANERA ESTABLE A PARTIR DE LA EVALUACIÓN DE FLUORESCENCIA.....	42
EVALUACIÓN DE FLUORESCENCIA.....	42
3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, QUIMIOKINAS Y GENES RELACIONADOS A LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE NF-KB:.....	43
EXTRACCIÓN DE ARN POR EL MÉTODO TRI REAGENT.....	43
TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	43
PCR PUNTO FINAL: ESTANDARIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	44
PCR CUANTITATIVA.....	44
IX- RESULTADOS.....	45
1.ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS GP5T1, GP5T2 Y GP5T3.....	45
2.EVALUACIÓN DE MΦ ACTIVADOS POR MEDIO DE TINCIÓN WRIGHT.....	49
3.EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB.....	52
4.ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON LOS PÉPTIDOS....	54
X- DISCUSIÓN.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXO I. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL PLÁSMIDO PNF-KB-HRGFP.....	71
ANEXO II. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS RAW 264.7 CON EL PLÁSMIDO PNF-KB-HRGFP.....	72
ANEXO III. EXTRACCIÓN DE ARN POR EL MÉTODO TRI REAGENT Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción entre el receptor CD163 y el complejo heterotrimérico de PRRSV.....	17
Figura 2. Esquema de la Replicación de PRRSV.. ..	19
Figura 3. Representación esquemática de la proteína GP5 de PRRSV.....	20
Figura 4. Modulación de la producción de IFN tipo I por PRRSV.....	24
Figura 5. Esquema representativo de la vía canónica de NF-κB.....	30
Figura 6. Mapa circular de los plásmidos reporteros cis.....	34
Figura 7. Diseño del vector NF-κB, Sistema de Reporteros <i>cis</i> -hrGFP.....	35
Figura 8. GP5T1 Gráfico de Análisis de Antigenicidad.....	46
Figura 9. GP5T1.Gráfico de Análisis de Hidrofilicidad.	46
Figura 10. GP5T2 Gráfica de Análisis de Antigenicidad.	47
Figura 11. GP5T2 Gráfico de Análisis de Hidrofilicidad.....	47

Figura 12. GP5T3. Gráfico de Análisis de Antigenicidad	48
Figura 13. GP5T3. Gráfica de Análisis de Hidrofilicidad	48
Figura 14. Fotografías representativas de la estimulación de células de monocitos RAW 264.7 con diferentes estímulos.....	51
Figura 15. Activación de monocitos Raw 264.7 a Raw 264.7 MΦ a través del tiempo de acuerdo a morfología	52
Figura 16. Evaluación de la activación de NF-κB por medio cuantificación de fluorescencia a través del tiempo después del tratamiento de MΦ RAW-hrGFP-NFκB con los estímulos.....	53
Figura 17. Expresión de TNF-α por MΦ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF-α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3.....	55
Figura 18. Expresión de Interleucinas: IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-12 por MΦ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF-α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3.....	57
Figura 19. Expresión de Interferones: IFN-α1, IFN- α4, IFN-β1 por MΦ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF-α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3	58
Figura 20. Digestión de pNF-κB-hrGFP.....	71
Figura 21. Selección celular con antibiótico de resistencia.	72
Figura 22. Transfección de células RAW 264.7 y selección con antibiótico.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipo de MΦ activados vía clásica M1 y alternativa M2 con subtipos.	28
Tabla 2. Elementos respuesta de los plásmidos del Sistema de Reporteros cis-hrGFP.....	35
Tabla 3. Características de los oligonucleótidos sintetizados para qPCR.....	36
Tabla 4. Concentración usada para la estimulación de células RAW 264.7.....	38
Tabla 5. Diseño experimental del ensayo de restricción enzimática.....	40
Tabla 6. Caracterización de los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.....	49
Tabla 7. Resultados de la cuantificación de ADN.....	71
Tabla 8. Resultados de la extracción de ARN de Raw 264.7 MΦ con diferentes estímulos.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

’: Minutos

’’: Segundos

A20: Factor de necrosis tumoral alfa, inducido por la proteína 3 alfa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

AP-1: Proteína activadora 1

ARN: Ácido Ribonucleico

Bcl-2: Linfoma de células B-2

CBP: Proteína de Unión a CREB

CCL5 (RANTES): Quimiocina (motivo CC) ligando 5 (regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas)

CD: Clúster de Diferenciación

CnA/CnB: Proteína fosfatasa Serina/ Treonina subunidad catalítica 2B

COX2: Ciclooxygenasa 2

CREB: Elemento modulador de respuesta a Adenosín Monofosfato Cíclico

CXCL: Ligando de la Quimiocina

CXCL10: Interferón proteína inducida por gamma-10

DC/ pDC: Células detriticas/ células detriticas plasmocitoides

DEXA: Dexametasona

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dpi: Días después de la infección

ERK: Proteína 1/3 activada por mitógeno

Fc γ / Fc γ RIIA/ Fc γ RIIIB: Fragmento cristalizable gamma/ Receptor activador gamma del Fragmento Cristalizable/ Receptor inhibidor gamma del fragmento cristalizable.

Hpe: hora(s) post-estimulación

Hpi: Horas después de la infección

HP-PRRSV: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino de alta Patógenia

HrGFP: Proteína fluorescente verde *Renilla reniformis* humanizada.

IEDB: Inmuno Epitote Data Base

IFN: Interferón

IgG/ IgM: Inmunoglobulina G / Inmunoglobulina M

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

I κ β α : Inhibidor alfa de NF- κ B

IPS-1: Promotor beta de interferón 1

IRF: Factor regulador de interferón

ISG: Genes estimulados por Interferón

ISG: genes regulados por interferón

ISGF3: factor génico estimulado por interferón 3

IκB: Inhibidor de NF-κB

JAK: Transductor de la Cinasa-Señal de Jano

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

LCMV: Virus de la cariomeningitis linfocítica

LPS: Lipopolisacáridos

MARV: Proteína de señalización antiviral mitocondrial

M-CSF: Factor Estimulante de colonias de Monocitos

MEK1 y 2: Proteína 1, 2 cinasa, cinasa activada por mitógeno

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MIP-1β: CCL4, proteína inflamatoria de macrófagos

MNK1/2: MAP quinasa que interacciona serina / Treonina-proteína quinasa 2

MΦ: Macrófagos

NendoU: Endoribonucleasa específica de uridilato

NFAT: Factor Nuclear de las células T activadas

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

NK: Natural Killer

Nsp: Proteínas no estructurales

ORF: Marco de Lectura Abierta

OTU: Dominio de Tumor Ovárico

P38: cinasa MAP p38

PIAS: Inhibidor de proteínas de STAT activado

PKA: Proteína cinasa A

PLCγ2: Fosfatidil inositol fosfolipasa C gamma 2

PPAR-γ: Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PRRS: Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

PRRSV: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

RSK2: proteína ribosomal cinasa S6 alfa-1/2/3/6

SAGARPA: Secretaria de Agricultura y desarrollo Rural

SFB: Suero Fetal Bovino

SHP2: Proteína-tirosina fosfatasa 1D

STAT: Transductor de señales y activadoras de la transcripción

SyK: Tirosina cinasa del bazo

TGF- β : Factor de crecimiento transformante Beta

TLR: Receptor Tipo Toll

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

URF: Unidades relativas de Fluorescencia

UV: Ultravioleta

ABSTRACT

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) causes a disease of great importance in the swine industry, worldwide. The disease burden is due to the economic losses associated with lower production rates. PRRSV has a single-stranded RNA genome of positive polarity. This virus has a tropism for alveolar macrophages and dendritic cells. The protein encoded by ORF5, called GP5, is closely related to both the evasion of the immune response and the protective immune response. There is a lack of knowledge about the immunodominant T epitopes present in GP5 and their role in the activation/inactivation of the macrophage-mediated protective immune response. The objective of this project was to evaluate the activation of mouse monocytes/macrophages, in an *in vitro* cell model, in response to the stimulation of three synthetic peptides identified in the GP5 protein of PRRSV, which have been suggested to be probable T epitopes, called GP5T1, GP5T2 and GP5T3. The activation of monocytes was evaluated by scoring the morphological changes at 0, 0.5, 1, 2, 8 h after treatment with each of the peptides independently, using Wright's stain. Furthermore, to investigate the possible participation of the NF- κ B signaling pathway in the activation of mouse monocytes/macrophages, we generated the cell line RAW264.7- NF- κ B-hrGFP, that constitutively expresses the plasmid pNF- κ B- hrGFP that contains the cis-element of the transcription factor NF- κ B and that directs the expression of the GFP reporter gene. The cells were stimulated with the three peptides, independently, and the expression of GFP was evaluated at the same times described above. Finally, the expression of cytokines and chemokines was evaluated at 1 and 8 h after treatment with the three peptides independently. Results: the three peptides induced a morphological change from monocyte to macrophage after 1 and 8 h of treatment, similar to the observed results for LPS, DEXA, and TNF- α controls. The GP5T2 and GP5T3 peptides were able to activate the reporter gene significantly compared to the controls, suggesting the participation of the NF- κ B signaling pathway. Moreover, the GP5T1 peptide induced a significant expression of INF- α 4 and IFN- β 1 after 1h of treatment, and at 8h post-stimulation, it induced the expression of IL-1 β , IL-10, and IFN- β 1. GP5T2 induced the expression of all the cytokines evaluated after 1 hour of treatment, and IL-1 β , IL-10, INF- α 1, and IFN- β 1 after 8h of treatment. Finally, GP5T3 favored the expression of all the cytokines and interferons evaluated after 1h of treatment except for IL-10 and IL-12, and IL-1 β , IL-10, IL-12, INF- α 1, and IFN- β 1 after 8 h of treatment. In conclusion, GP5T1, GP5T2, and GP5T3 induced the activation of mouse alveolar macrophages. Besides, the expression profile of cytokines and chemokines supports the hypothesis that GP5T2 and GP5T3 activate the NF- κ B pathway and are, indeed, recognition epitopes for T lymphocytes, since they favor a pro-inflammatory environment related to the M1 phenotype in macrophages.

Key Words:

PRRSV, Macrophage activation, GP5, Epitope, NF- κ B, Peptide.

RESUMEN

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, provocado por el virus del mismo nombre (PRRSV) tiene gran importancia a nivel mundial, debido a que provoca pérdidas económicas cuantiosas en la industria porcícola, principalmente porque se asocia a la reducción de los índices productivos. El PRRSV, posee un genoma de ARN de cadena sencilla, de polaridad positiva. Dicho virus tiene un especial tropismo por macrófagos alveolares y células dendríticas. Se ha mostrado que la proteína codificada por el ORF5, llamada GP5, está estrechamente relacionada tanto con la evasión de la respuesta inmune, como con la respuesta inmune protectora. Poco se conoce sobre los epítomos T inmunodominantes presentes en la proteína GP5 y su función en la activación/inactivación de la respuesta inmune protectora mediada por macrófagos. El objetivo de este proyecto fue evaluar la activación de monocitos/macrófagos de ratón, en un modelo celular *in vitro*, en respuesta al estímulo de tres péptidos sintéticos identificados en la proteína GP5 de PRRSV, los cuales se ha sugerido son probables epítomos T, denominados GP5T1, GP5T2 y GP5T3. Por un lado, se evaluó la activación de los monocitos a través del análisis del cambio morfológico monocito-macrófago durante 0, 0.5, 1, 2, 8h después del tratamiento con cada uno de los péptidos de manera independiente, a través de la Tinción de Wright. Por otro lado, para conocer la posible participación de la vía de señalización NF- κ B en la activación de monocitos/macrófagos de ratón, se obtuvo una línea celular (RAW264.7- NF- κ B-hrGFP) que expresa de manera constitutiva el plásmido pNF- κ B-hrGFP que contiene el elemento *cis* del factor de transcripción NF- κ B y que dirige la expresión de gen reportero GFP. En esta línea celular se realizó el tratamiento con los tres péptidos y se evaluó la expresión del reportero en los mismos tiempos descritos anteriormente. A partir de los datos obtenidos se evaluó la expresión de citocinas y quimiocinas, 1 y 8 h después del tratamiento con los tres péptidos de manera independiente. Resultados: los datos mostraron que los tres péptidos indujeron el cambio morfológico de monocito a macrófago después de 1 y 8 h de tratamiento, de manera similar al comportamiento de los controles LPS, DEXA y TNF- α . Los péptidos GP5T2 y GP5T3 fueron capaces de activar al gen reportero de manera significativa con respecto al control, sugiriendo la participación de la vía de señalización NF- κ B. Por otro lado, el péptido GP5T1 indujo la expresión significativa de INF- α 4 e IFN- β 1 después de 1h de tratamiento, y a las 8h posteriores expresó IL-1 β , IL-10 e IFN- β 1. Por su parte, el péptido GP5T2 indujo la expresión de todas las citocinas evaluadas después de una hora de tratamiento y expresó IL-1 β , IL-10, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8h de tratamiento. Finalmente, el péptido GP5T3, de igual manera favoreció la expresión de todas la citocinas e interferones evaluados después de 1h de tratamiento con excepción de IL-10 e IL-12 y expresó IL-1 β , IL-10, IL-12, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8 h de tratamiento.

En conclusión, los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 son capaces de inducir la activación de macrófagos alveolares de ratón. Además, la expresión de las citocinas y quimiocinas evaluadas dan soporte a la hipótesis de que GP5T2 y GP5T3 activan la vía de NF- κ B y son epítomos de reconocimiento para linfocitos T, ya que favorecen un ambiente proinflamatorio relacionado con el fenotipo M1 en los macrófagos.

Palabras Clave:

PRRSV, Activación de Macrófagos, GP5, Epítomo, NF- κ B, Péptido.

I- INTRODUCCIÓN

1. Importancia del estudio de PRRSV

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino es causado por el virus del mismo nombre (PRRSV, por sus siglas en inglés) que infecta principalmente macrófagos (MΦ) alveolares y MΦ tisulares. El PRRSV es el responsable de enfermedades respiratorias en cerdos y falla reproductiva en cerdas. Afecta a la industria porcina en todo el mundo y ocasiona pérdidas económicas cuantiosas (Singleton *et al.*, 2016). En Estados Unidos se estiman pérdidas hasta de 664 millones de dólares anuales del 2005 al 2010 (Holtkamp *et al.* 2013).

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

PRRSV es el virus más común asociado al complejo de enfermedades respiratorias porcinas, donde la infección puede coexistir en presencia de otros tipos de patógenos, lo que resulta en síntomas clínicos y lesiones pulmonares más graves que por cualquiera de los patógenos de forma individual. Entre los miembros patógenos del complejo respiratorio porcino están: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, circovirus porcino, virus de influenza porcina y *Haemophilus parasuis* (Lunney *et al.* 2016). Las vacunas actuales contra el PRRS no brindan una inmunidad potente y de largo plazo (Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), 2011).

A nivel mundial existe preocupación por la presencia de nuevas cepas del virus PRRSV, algunas de ellas denominadas de alta patogenicidad. De hecho, se ha fortalecido la idea de que la salud animal repercute directamente en la salud de los humanos, por lo que se han organizado foros de discusión, para aumentar el monitoreo y vigilancia epidemiológica de patógenos que provocan enfermedades en animales y que, en el caso de algunos virus originados en animales, representan un riesgo de zoonosis.

2. Historia

El PRRSV se aisló por primera vez a principios de los años noventa en Europa y América del Norte. El primer brote conocido apareció en Carolina del Norte en 1987, luego en Alemania en 1990 y posteriormente se detectaron otros brotes en España, Reino Unido, Holanda y Francia en el año de 1991(Díaz, 2006).

Actualmente se han descrito tres genotipos: el europeo, el norteamericano y el de alta patogenicidad (HP-PRRS), éste último aislado en China en 2006. Estos genotipos presentan cierta regionalización, sin embargo, tanto el genotipo europeo, como el norteamericano se encuentran diseminados en la mayoría de los países productores porcícolas. En México, PRRSV apareció por primera vez en 1992, y desde entonces se ha reportado una prevalencia del 30 a 90 % en granjas con diferentes grados de tecnificación; cifras que coinciden con los reportes de otros países porcicultores (Díaz 2006; Zeng *et al.*, 2018).

3. Vías de transmisión y patogenicidad

Dentro de las vías de transmisión principales del PRRSV está el contacto directo de animales sanos con sangre, aerosoles, orina, semen, heces, secreciones nasales, saliva y calostro de animales infectados. Otra vía que cobra relevancia es la transmisión vertical intrauterina entre la cerda y el lechón, siendo más marcada en el tercer trimestre de gestación. Una vez que hubo exposición al virus, se da la replicación en MΦ permisivos de los tejidos linfoides propagándose rápidamente por la vía linfática (Lunney *et al.*, 2016).

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

Los signos clínicos generales de la enfermedad están caracterizados, en un inicio, por anorexia y letargo, posteriormente en la etapa aguda presentan pelo hirsuto, linfopenia, hipertermia, hiperemia

cutánea, cianosis en extremidades y reducción en ganancia de peso. Por otra parte, en los lechones infectados se presenta una mortalidad casi del 100% presentando conjuntivitis, diarrea, edema periocular y signos nerviosos. En cerdas reproductoras se presenta un fallo reproductivo, principalmente en el tercer trimestre de gestación, tasas bajas de gestación y camadas con lechones muertos o momificados. Los verracos pueden ser asintomáticos o presentar disminución de la libido y reducción en la calidad del semen (Amarilla, 2015).

II- MARCO TEÓRICO

1. VIRUS: GENOMA Y VARIABILIDAD GENÉTICA

PRRSV es un virus envuelto, de ARN (Ácido Ribonucleico) monocatenario de sentido positivo, con un tamaño promedio del virión de 39 nm, pertenece a la familia *Arteriviridae* y al género *Porarterivirus*. El genoma de PRRSV tiene un tamaño de aproximadamente 15 kb, contiene once marcos de lectura abierta (ORF's, por sus siglas en inglés). ORF1a/b, en el extremo 5' del genoma, codifica cuatro poliproteínas: pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2T, pp1a y pp1ab, que se procesan y se escinden en al menos 16 Proteínas no estructurales (Nsp, por sus siglas en inglés): Nsp1a, Nsp1b, Nsp2-6, Nsp7a, Nsp7b y Nsp8-12. Las funciones principales de las Nsp son dirigir la replicación y la transcripción viral anclando la maquinaria de síntesis a las membranas intracelulares modificadas, control de la síntesis de ARN subgenómicos y evasión de la respuesta inmune innata (Kappes and Faaberg, 2015; Snijder, Kikkert, and Fang, 2013).

Los ORF2-ORF7 en el extremo 3' codifican para cinco glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2, GP3, GP4, GP5 y GP5a), dos proteínas de membrana no glicosiladas (E y M), y una proteína nucleocápside (N). GP2, GP3 y GP4 forman un complejo relacionado con la entrada viral y está fuertemente N-glicosilado. GP5 y M forman un heterodímero unido por disulfuro y son el complejo proteico más abundante en la membrana proteica del virión. Por otra parte N forma homodímeros unidos por puentes disulfuro que sirven para empaquetar el ARN genómico viral (Kappes and Faaberg, 2015).

En cuanto a su variabilidad genética, dependiendo de la secuencia de nucleótidos de los ORF's, la homología entre cepas pueden variar entre el 50% y el 90%, y la similitud de aminoácidos varia del 55%-80%. Los ORFs 3, 4 y 5 son más polimórficos que los ORFs 2, 6 y 7, ambas para proteínas estructurales. Esto puede deberse a dos fenómenos, el primero es porque la ARN polimerasa no tiene

la capacidad de corrección de errores durante la duplicación de ARN; en segundo lugar, cierta capacidad de recombinación entre las distintas cepas. La elevada variabilidad repercute negativamente en la protección inmunológica cruzada contra diferentes genotipos y puede favorecer la atenuación viral o la adquisición de virulencia (Díaz, 2006).

1.1. Interacción Virus-Hospedero

Las proteínas estructurales virales pueden interactuar con varios receptores de superficie de los MΦ. Estudios han demostrado que el bloqueo de los receptores CD (Clúster de Diferenciación) 163, CD15, tetraspanina o vimentina parece inhibir la replicación viral o la infección en la célula huésped. Por otro lado, se ve una replicación reducida o ningún efecto cuando se bloquean receptores como el heparán-sulfato o siglec-1. CD163 se ha definido como el principal receptor y el más estudiado, que interactúa con el complejo heterotrimérico formado por las proteínas GP2a, GP3, GP4. La proteína GP5 se une a sialoadhesina, para que se dé dicha formación del complejo heterotrimérico con el receptor, ver Figura 1. Está interacción es fundamental en términos de producción de progenie viral infecciosa y diseminación en el huésped (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

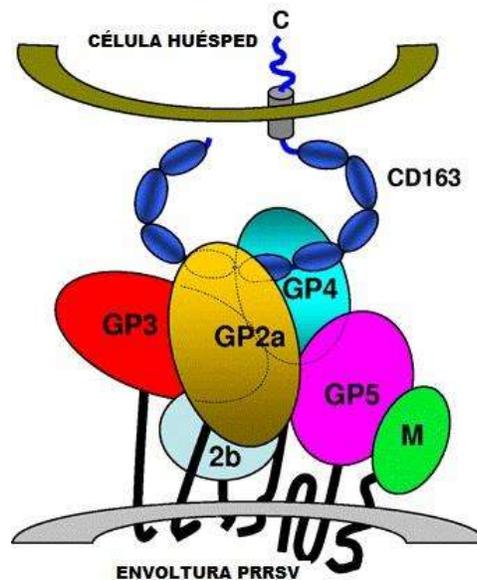


Figura 1. Interacción entre el receptor CD163 y el complejo heterotrimérico de PRRSV. Modificado de (Loving *et al.*, 2015).

2. Células blanco de PRRSV

PRRSV tiene un especial tropismo por células de linaje monocítico, como MΦ y células detriticas, pero especialmente por los MΦ alveolares porcinos. En una infección sistémica, el virus se encuentra en subpoblaciones de MΦ diferenciados en tejido linfoide, placenta, timo, bazo y placas Peyer.

Además, *in vitro*, diferentes líneas celulares son permisivas para PRRSV como las líneas celulares modificadas genéticamente a partir de riñón de mono verde africano, células Marc-145, y sus derivados, CL2621 y SJPL. Por otra parte, se crearon además dos líneas modificadas de PK15 y CHO que pueden expresar los receptores CD163 y CD169, necesarios para la internalización y replicación viral (Truong *et al.*, 2004; Weingartl *et al.*, 2002).

3. Replicación viral

Una vez que el virus es reconocido por los receptores de la célula blanco, este es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina. La replicación tiene 3 características: reordenamiento de las membranas del huésped para establecer complejos de replicación viral, síntesis y expresión de ARN genómico, transcripción de ARN subgenómico para la expresión eficiente de proteínas estructurales y al mismo tiempo, la capacidad única de producir ARNs heteróclitos. Estos últimos, son ARNs aberrantes resultado de una recombinación homóloga en tramos de nucleótidos atípicos, cuya función sugerida es permitir que nuevas secuencias virales coexistan (Kappes and Faaberg 2015; Lunney *et al.*, 2016).

Los complejos de replicación se forman dentro de vesículas perinucleares de doble membrana que derivan del Retículo Endoplásmico. EL ARN genómico sirve como ARN mensajero para la traducción de poliproteínas de replicasa que son: pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas son escindidas por proteinasas virales internas para generar las 14 nsp, que se ensamblan en el complejo de replicación (Kappes and Faaberg, 2015).

El complejo de replicación primero se dedica a la síntesis de ARN de cadena negativa para producir ambas cadenas completas de longitud completa y ARN subgenómicos de sentido negativo. Posteriormente, los ARN mensajeros subgenómicos sirven como plantillas para la síntesis del ARN mensajeros subgenómicos de sentido positivo que codifican para las proteínas estructurales que residen en el extremo 3' del genoma. Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides, se envuelven de las proteínas estructurales y salen del Aparato de Golgi, así los nuevos viriones se liberan de la célula vía exocitosis (Lunney *et al.*, 2016). Ver Figura 2.

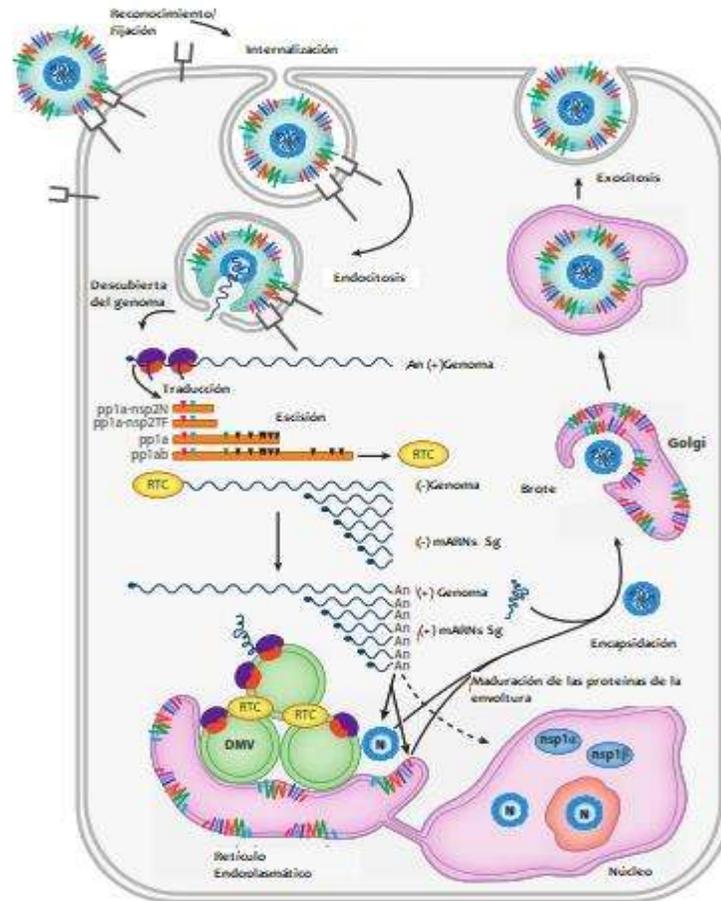


Figura 2. Esquema de la Replicación de PRRSV. Modificado de (Lunney *et al.*, 2016).

4. Proteína GP5

La proteína GP5 juega un papel importante en la entrada y replicación viral, además de ser la principal glicoproteína transmembranal. Está formada por 200 aminoácidos, con un peso de 25 kDa. Contiene un péptido señal N-terminal de 30 aminoácidos aproximadamente, que dirige la síntesis de proteínas al retículo endoplásmico, seguido de un ectodominio también de 30 aminoácidos. GP5 contiene varios sitios de glicosilación N de los cuales N44 y N51 están altamente conservados entre las cepas. La región transmembranal entre los residuos 63 y 135 de aminoácidos es hidrófoba y atraviesa la envoltura viral tres veces. La región C-terminal (endodominio) se encuentra en el citosol abarcando los residuos de aminoácidos 136 al 200, ver Figura 3.

GP5 es una proteína muy antigénica y genéticamente variable, lo cual representa un desafío importante para el control de PRRSV. Se ha reportado que la proteína GP5 contiene epítomos de células B y T, los sitios reportados para células T están ubicados principalmente la región del endodominio en las posiciones de aminoácidos 117-131 y 149-169. Estos cobran importancia ya que juegan un papel relevante en la respuesta inmune adaptativa celular (Vashisht *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2017).

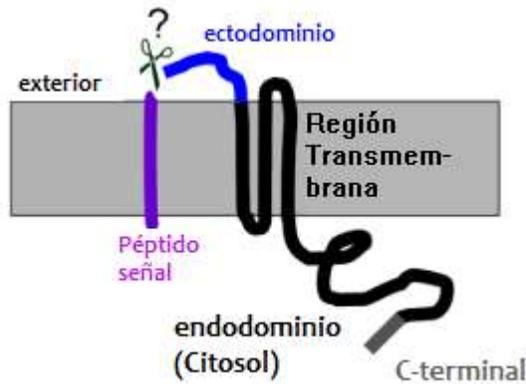


Figura 3. Representación esquemática de la proteína GP5 de PRRSV. Modificado de (Thaa *et al.*, 2013).

5. RESPUESTA INMUNE CONTRA PRRSV

5.1. Respuesta inmune innata contra PRRSV

La activación temprana adecuada del sistema inmune innato es crítica para iniciar la generación de inmunidad protectora adaptativa y lograr la eliminación viral completa. Incluye barreras físicas, como piel y células inmunes, como monocitos, MΦ, neutrófilos y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). La respuesta inmune antiviral innata más efectiva es mediante la producción de interferones (IFN) de tipo I, IFN- α e IFN- β , por células infectadas por el virus, lo que induce un estado antiviral a través de la expresión de numerosos genes estimulados por interferón, como lo son receptores PRR, citocinas y quimiocinas (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

Existen dos tipos de células que son las más especializadas en la producción de un IFN de tipo I en respuesta a la infección por PRRSV: los MΦ y las células dendríticas plasmocitoides (pDC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la respuesta de IFN de los cerdos infectados en este caso es escasa. En las pDC durante la infección por PRRSV, generalmente se ha reportado la subexpresión de las proteínas CD80/CD86/CD40, Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) tipo II, esto puede deberse a la falta de producción de IFN. La secreción de citocinas y el fenotipo expresado por parte de las DC y sus derivados, varían mucho del tipo de cepa de PRRSV por la que el cerdo sea infectado (Crisci *et al.*, 2019).

Además, durante la infección por PRRSV se tiene una función citotóxica reducida en las células NK que se observa desde el día 2 dpi hasta las 3-4 semanas. Por otra parte, la población celular T $\gamma\delta$ aumenta durante la infección por exposición primaria a PRRSV del día 4 al 70 para luego disminuir. Esta población celular es una de las pocas que producen IFN γ durante la infección (Crisci *et al.*, 2019;

Loving *et al.*, 2015; Lunney *et al.*, 2016).

Los neutrófilos interactúan con complejos inmunes opsonizados a través de receptores del Fragmento Cristalizable gamma (Fc γ), receptores activadores e inhibidores que se unen al dominio Fc de IgG para realizar su función. Estudios reportan que la infección por PRRSV induce una disminución en expresión del Receptor activador gamma del Fragmento Cristalizable (Fc γ RIIA) y una regulación tardía del Receptor inhibidor gamma del fragmento cristalizable (Fc γ RIIB), con lo que se deteriora la capacidad fagocítica dependiente de anticuerpos de los neutrófilos y su capacidad de matar bacterias, pero por otro lado parece inducir la producción de IL-8 (Crisci *et al.*, 2019).

En un estudio se reportó que los valores de citocinas, características de la respuesta inmune innata, secretadas en la infección con PRRSV cepa americana es menor comparado con otras infecciones virales como coronavirus o influenza porcina, donde la producción de IL-10 se detectó a partir del día tercer dpi y la de IFN α fue mínima, detectada desde el quinto dpi y Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α) fue indetectable. En condiciones de granja, se encontró que la secreción de IL-4 se incrementó a los dos dpi y se cree que esto está relacionado con el bloqueo de la secreción de anticuerpos e IL-6 y suprime la proliferación de linfocitos B (Dwivedi *et al.*, 2012).

6. Respuesta inmune adaptativa contra PRRSV

6.1. Respuesta humoral

La infección por PRRSV induce una respuesta de anticuerpos circulantes a los cinco-nueve dpi, pero estos no confieren protección efectiva contra la infección. La IgM e IgG específica de PRRSV se detecta a los siete dpi, con títulos que alcanzan un máximo entre los 14 y 21-28 dpi respectivamente; luego disminuyen a niveles indetectables alrededor de 40-42 dpi., los niveles permanecen elevados durante la fase persistente de la infección (Loving *et al.*, 2015; Mateu y Diaz, 2008). Esta respuesta temprana y rápida de IgM e IgG no corresponde a los anticuerpos neutralizantes (NA). La respuesta humoral, mediada por células B, que producen anticuerpos no neutralizantes actúan como un caballo de Troya de PRRSV al recubrir el virus y mejorar la internalización de partículas virales, en consecuencia, aumenta la replicación en los M Φ alveolares (Mateu y Diaz, 2008). La respuesta de anticuerpos neutralizantes es modesta y retardada, aparecen casi un mes después de la infección (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

6.2. Respuesta adaptativa celular

Una respuesta inadecuada de INF tipo I de los cerdos tras la exposición de PRRSV contribuye directamente a un desarrollo deficiente de una respuesta inmune mediada por células. Además, la producción de INF- α regula la expresión del gen de INF- γ , y por lo tanto controla la vía dominante que promueve el desarrollo de la inmunidad adaptativa, específicamente la activación y diferenciación de células T vírgenes (Loving *et al.*, 2015).

Se sabe que ocurre una disminución sustancial y transitoria en las células T CD4⁺ en la sangre aproximadamente de tres a siete dpi, con un retorno a los niveles normales entre siete y 14 días dpi. Se observan con frecuencia células T CD8⁺ aumentadas, generalmente después de cuatro a cinco semanas de infección. La proliferación de linfocitos específicos de antígeno se detecta por primera vez a las cuatro semanas después de la infección, alcanza su punto máximo a las siete semanas después de la infección y disminuye después de 11 semanas. La cantidad de células T específicas secretoras de INF- γ es baja independientemente de la edad del animal (Loving *et al.*, 2015).

Las células T reguladoras aumentan en infecciones virales y son clave para prevenir una respuesta inflamatoria crónica o persistente, pero también pueden ser inducidos por virus para cambiar el equilibrio de la respuesta inmune a favor del mantenimiento de la replicación viral. En PRRSV, el aumento parece ser consecuencia de la inducción de IL-10 y aparecen tan pronto como dos dpi (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

7. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR PRRSV

7.1. Anticuerpos opsonizantes

La proteína GP5 tiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N en las posiciones 34, 44 y 51, donde se encuentra el epítipo de neutralización principal. Estos restos de N-glucano en GP5 del PRRSV son importantes para que el virus escape del efecto neutralizante de los anticuerpos neutralizantes. Se ha postulado que la protección de glucano sirve como un mecanismo primario para la evasión de la respuesta de anticuerpos neutralizantes, asegurando la persistencia del virus (Loving *et al.*, 2015). La presencia de un epítipo señuelo capaz de escindirse en dos sitios cercanos al epítipo neutralizante, así como la glicosilación en este sitio de la proteína GP5 inducen la producción de anticuerpos no neutralizantes, que funcionan como opsoninas y favorecen la entrada de virus a las células blanco mediante fagocitosis facilitada de los complejos virus-anticuerpo no neutralizante (Ansari *et al.* 2006; Thaa *et al.* 2013).

7.2. Mecanismo de modulación e inhibición de las vías relacionadas a Interferones

Los interferones tipo I (IFN α / β) comprenden uno de los mecanismos de protección más potentes contra los virus en las primeras etapas de la infección, lo que desencadena una regulación de una variedad de genes estimulados por INF (ISG), que produce proteínas con una variedad de funciones antivirales. Todas las células mononucleadas son capaces de expresar IFN, pero las pDC son los productores más potentes de esta familia de citocinas (Schneider, Chevillotte, and Rice, 2014). PRRSV es capaz de suprimir esta respuesta, se han identificado varias proteínas virales antagonistas de IFN como: nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp4, nsp11 y N (Ke and Yoo, 2017).

Siguiendo el esquema de la Figura 4, se pueden dividir dos olas de modulación e inhibición en las vías de IFN. La primera ola consiste en que PRRSV reduce la expresión de Receptor tipo Toll 3 (TLR3, por sus siglas en inglés) e Factor regulador de interferón (IRF, por sus siglas en inglés) 7, la proteína Nsp1 α por otra parte tiene la capacidad de degradar la proteína de unión a CREB (CBP, por sus siglas en inglés) en el núcleo a través de la vía dependiente de proteosoma, la subunidad Nsp1 α inhibe la fosforilación de Inhibidor de NF- κ B (I κ B) en el citoplasma. Nsp2 inhibe la producción de IFN al bloquear la ubiquitinilación de I κ B fosforilado y la fosforilación de IRF3 a través del Dominio de Tumor Ovárico (OTU), lo que resulta en la supresión de la activación de Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Nsp11, endoribonucleasa específica de uridilato (NendoU) con actividad nucleasa bloquea la fosforilación y translocación de IRF3, suprime la fosforilación de I κ B e inhibe la activación de NF- κ B. Por otra parte, también suprime la producción de IFN- β a través de la degradación del ARN mensajero de Promotor beta de interferón 1 (IPS-1) y degradando el ARN mensajero de la Proteína de señalización antiviral mitocondrial (MARV).

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

Para la segunda ola de señalización de IFN, PRRSV Nsp1 β bloquea la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) e inhibe la translocación nuclear del complejo ISGF3, lo que conduce a la inhibición de la vía de transductores de la Cinasa-Señal de Jano (JAK)-STAT que resulta en inhibir las expresiones de ISG, suprime la exportación del ARN mensajero del huésped desde el núcleo al citoplasma.

Nsp1 interactúa con el Inhibidor de proteínas de STAT activado (PIAS), está es una proteína multifuncional, la interacción Nsp1 también puede modular vías diferentes a la JAK-STAT. Nsp2 tiene el potencial de desconjugar la ISGilación (conjugación de proteínas ISG15, inducidas por interferón). Además, se ha reportado que la expresión de la proteína GP5 induce la apoptosis al actuar corriente abajo con el linfoma de células B-2 (Bcl-2), y esta región apoptótica se reporta se encuentra en la posición 119 del aminoácido N-terminales de GP5 (Ke and Yoo, 2017; Sun *et al.*, 2012).

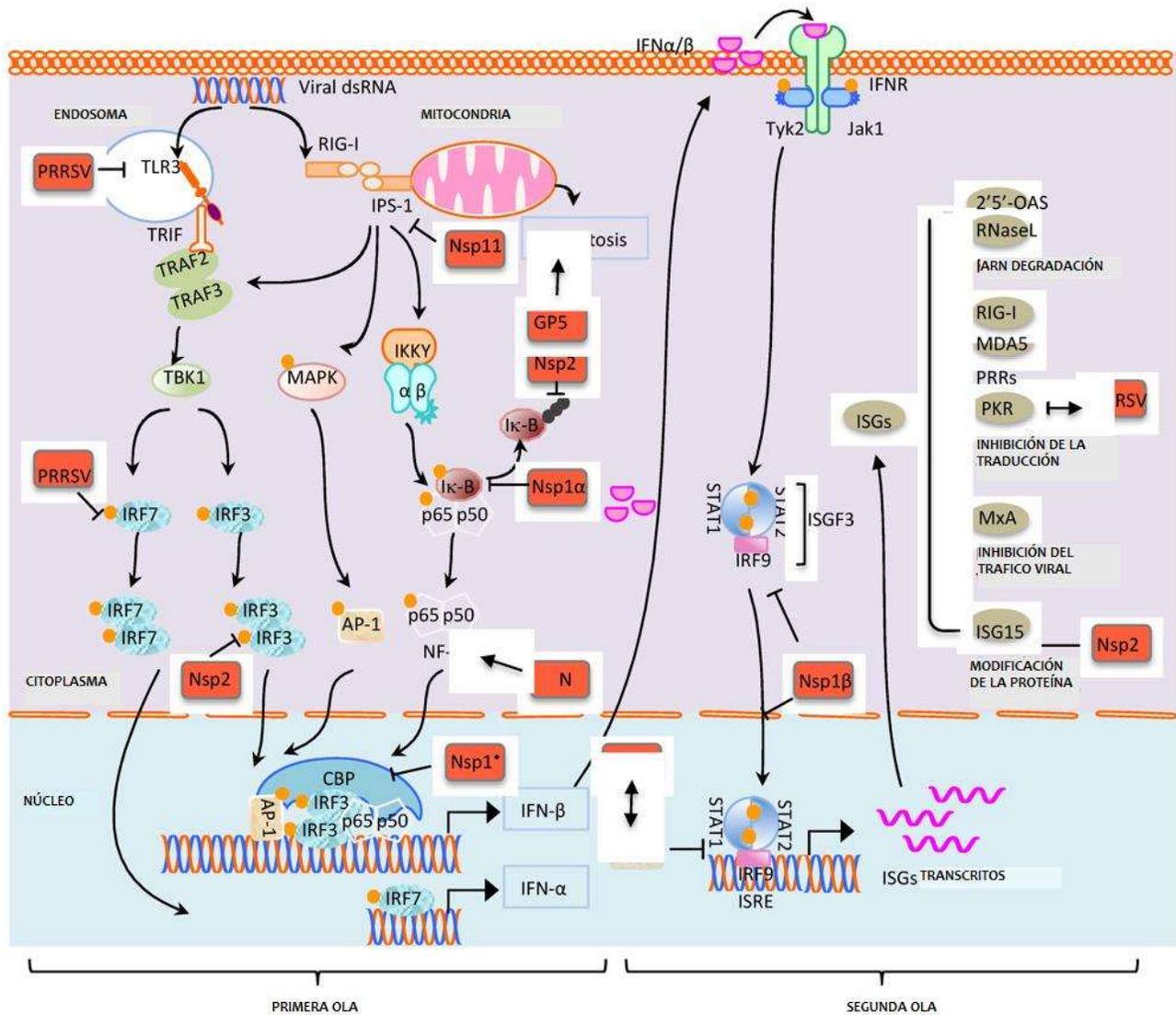


Figura 4. Modulación de la producción de IFN tipo I por PRRSV. Tomado de (Sun *et al.*, 2012).

8. MACRÓFAGOS (MΦ)

Los MΦ son células fagocíticas mononucleares de la línea mieloide. También se han definido como las células más plásticas del sistema inmune, dependiendo del tejido en el que se encuentren reciben diferentes nombres; por ejemplo, en los pulmones se llaman MΦ alveolares.

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

Los MΦ realizan numerosas funciones, la principal es responder a la presencia de patógenos, objetos extraños, restos de células muertas y células cancerígenas en un proceso llamado fagocitosis. Por otra parte, son células críticas en el mantenimiento de la homeostasis, ayudando a la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos dañados. Además, regulan la respuesta innata y adaptativa por medio del reclutamiento de otras células del sistema inmune como los linfocitos. Este reclutamiento se logra a través del procesamiento y la presentación de antígeno, así como la secreción de diversas citocinas y quimiocinas (Lasswell *et al.*, 2017; Lee 2019).

8.1. Procesamiento y presentación de antígeno

Una de las funciones principales de los MΦ es procesar el antígeno una vez que ha sido fagocitado. Las vías de procesamiento de antígeno convierten a los antígenos proteicos en péptidos que se asocian al MHC y estos, son presentados a Linfocitos T.

En la vía de la clase I del MHC, los antígenos presentes en el citoplasma son degradados en proteosomas a péptidos, los cuales pasan del citosol al Retículo Endoplásmico por un transportador dependiente de ATP, para luego ser asociados y transportados con moléculas del MHC tipo I hasta la superficie celular donde se muestra y es reconocido por Linfocitos CD8⁺.

Por otra parte, en la vía de la clase II del MHC, el antígeno es interiorizado por medio de vesículas o endosomas y es procesado dentro de ellos. Las moléculas de la clase II del MHC recién sintetizadas se transportan a los endosomas y ahí se asocian a los péptidos generados. El complejo formado se traslada a la superficie de la célula y se muestra para ser reconocido por Linfocitos T CD4⁺.

Una vez que el complejo receptor del linfocito T (TCR) reconoce a los péptidos asociados al MHC en un macrófago, se movilizan varias proteínas de superficie y moléculas transmisoras de señales hasta la zona de contacto del Linfocito T y el MΦ (o la célula presentadora de antígeno), formando una estructura llamada sinapsis inmunitaria. Las moléculas del Linfocito T que se mueven son el complejo TCR (el TCR, CD3 y la cadena ζ), los correceptores CD4⁺ y CD8⁺, proteínas co-estimuladoras y activadoras. Permitiendo de esta manera la activación del Linfocito T, activando diferentes cinasas que a su vez activan diferentes factores de transcripción, generando linfocitos activos con funciones específicas (Abbas, 2015).

8.2. Activación de MΦ

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

En el año 2000 Mills *et al.*, propusieron la clasificación de MΦ M1 (activación clásica) y M2 (activación alternativa) a partir del metabolismo de arginina en cada fenotipo. Posteriormente en 2002 Mantovani *et al.*, subdividieron el fenotipo M2 en cuatro tipos de M2a al d, con base en el estímulo que lo induce y sus posteriores cambios transcripcionales (Lasswell *et al.*, 2017).

El fenotipo de los MΦ polarizados M1-M2 puede revertirse *in vitro* e *in vivo*. Las vías de señalización para la activación clásica o alternativa del MΦ, comienzan en la membrana por la estimulación de los receptores de citocinas, luego la señal se propaga a las proteínas intracelulares y, finalmente, al núcleo donde se inducen los programas específicos de expresión génica. Estudios han demostrado que la eliminación de receptores IFN-γ o IL-4, anula la capacidad del macrófago de adquirir algún fenotipo (Liu and Yang, 2013; Sica and Mantovani, 2012).

○ Activación Clásica (M1)

Los MΦ M1 se inducen por la expresión de citocinas pro-inflamatorias como INFγ y por productos microbianos, como el lipopolisacáridos (LPS). Los MΦ M1 expresan la mayoría de los TLR, secretan IL-12, TNF-α, IL-1β, IL-23, IL-6, CXCL10 (IP-10) y CCL5 (RANTES) y expresan óxido nítrico sintasa inducible. Por otra parte, aumentan la expresión de MHC II y el CD86 potenciando su capacidad presentadora de antígeno, y promoviendo la diferenciación de Linfocitos Th1. En el contexto de la enfermedad este tipo de MΦ está involucrado en iniciar y mantener la inflamación.

○ **Activación Alternativa (M2)**

Los M2 liberan citocinas antiinflamatorias que ayudan a la proliferación celular y promueven la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Por otra parte, tienen una alta participación en la promoción de tumores y una actividad fagocítica eficiente. Los MΦ M2 producen Arginasa 1 para metabolizar la L-arginina, expresan receptores como el de manosa, receptor falso de IL-1, varios receptores basurero y receptores de quimiocinas. Se pueden subdividir en cuatro subtipos:

M2a: inducidos por IL-4 o IL-13 o IL-21, infecciones de hongos y helmintos. Inhiben la proliferación de células T y promueve la diferenciación de las células Th2.

M2b: inducida por IL-1, LPS, complejos inmunes y agonistas de TLR. Inducen la proliferación de linfocitos T reguladores.

M2c: inducido por IL-10, Factor de crecimiento transformante Beta (TGF-β) o glucocorticoides. También inducen a los linfocitos T reguladores.

M2d: inducido por IL-6 y tienen atributos fenotípicos y funcionales similares a los MΦ asociados a tumores (Arpa 2008; Lasswell *et. al.*,2017; Liu and Yang, 2013)

8.3. Factores y cambios relacionados a la Activación de MΦ.

El estado de activación de un MΦ varia en los diferentes tipos de lesiones, característicamente en una lesión activa los MΦ tienen marcadores de activación tanto tipo M1 como M2, para lograr un equilibrio en la resolución de la inflamación y desenlace adecuado de la enfermedad. En lesiones crónicas los MΦ presentes son principalmente de tipo M1.

Los factores que más se han reportado en la literatura para evaluar la activación de MΦ son la morfología, la producción de citocinas y la expresión de marcadores. En la Tabla 1 siguiente se enlistan los fenotipos de cada tipo de activación de MΦ, conforme al estímulo que lo induce, los marcadores de expresión y la secreción de citocinas y quimiocinas característicos (Vogel *et al.*, 2014).

Tabla 1. Fenotipo de MΦ activados vía clásica M1 y alternativa M2 con subtipos. Tomado y modificado de (Lasswell et al., 2017).

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Estimulación/ Activación	IFN- γ	IL4	ICs	IL-10	IL-6
	LPS	IL-13	IL-1R	TGF- β	LIF
	GM-CSF	Hongos y Helmintos		GCs	Adenosina
Marcador de Expresión	CD68	CD163	CD86	CD163	VEGF
	CD86	MHC II	MHC II	TLR1	
	CD80	SR		TLR8	
	MHC II	MMR/CD206			
	IL-1R	CD200R			
	TLR2	TGM2			
	TLR4	DecoyR			
	iNOS	IL-1R II			
	SOCS3	Solo en ratón: Ym1/2 Fizz1, Arg-1			
	Secreción de citocinas	TNF	IL-10	IL-1	IL-10
IL-1 β		TGF- β	IL-6	TGF- β	IL-12
IL-6		IL-1ra	IL-10		TNF- α
IL-12			TNF- α		TGF- β
IL-23					
Secreción de quimiocinas	CCL10	CCL17	CCL1	CCR2	CCL5
	CCL11	CCL22			CXCL10
	CCL5	CCL24			CXCL16
	CCL8				
	CCL9				
	CCL2				
	CCL3				
	CCL4				

La morfología de los MΦ en los estados de activación está ligada a su elasticidad. La elasticidad es dinámica y está en función de la polimerización de actina para la formación de pseudopodios o filopodios y de la activación de la RhoGTPasa. Influenciada independientemente también por el microambiente, estímulos biológicos, rigidez del sustrato y estiramiento (factores físicos de tejidos y órganos donde se encuentran). Los cambios de elasticidad en los MΦ ejercen una influencia directa sobre la función de estos, por ejemplo, aumento o disminución de la fagocitosis, así como la capacidad de respuesta a ciertos estímulos como LPS (Patel *et al.*, 2012).

Los MΦ de humanos, de ratón y de cerdo con un fenotipo M1 exhiben una forma alargada (fibroblastoídes) con un núcleo pequeño. Se sugiere que LPS / IFN- γ (M1) aumentan la elasticidad, así como la fagocitosis. Mientras que los M2 dan como resultado una forma más circular grande y condensada, sugestiva a daño celular y tienen una disminución en la viabilidad al ser tratados con estímulos como Dexametasona (DEXA) o IL-4. Ambos tipos muestran numerosos filopodios en

comparación con los monocitos sin diferenciar. La expresión de marcadores varía notablemente en cada tipo de MΦ, no se puede decir que sean los mismos tanto en humanos, como en ratón o cerdos (Patel *et al.*, 2012; Porcheray *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2014; Longtao Wang *et al.*, 2017).

8.4. Transducción de señales en la polarización de MΦ

Los MΦ se activan en respuesta a las diferentes señales extracelulares que involucran la activación de vías de señalización y factores de transcripción que dan paso a la expresión de diferentes proteínas y receptores. Los principales factores implicados en la activación son STAT, NF-κB, IRF, la Proteína Activadora 1 (AP-1), el Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR-γ), el Elemento modulador de respuesta a Adenosín Monofosfato Cíclico (CREB) y el Factor Nuclear de las células T activadas (NFAT). Todos ellos forman una interfaz regulada entre sí para impulsar la polarización de los MΦ hacia un fenotipo particular.

8.4.1. Vía de señalización del Factor Nuclear Kappa – B (NF-κB)

Esta vía de señalización involucra la regulación de genes relacionados con la inmunidad, inflamación y supervivencia celular. Existen muchas rutas implicadas en la activación de NF-κB. La vía canónica, o vía que se sigue frecuentemente, es la estimulada por TNFα, IL-1 o por componentes de patógenos bacterianos y virales. Tras una cascada de fosforilaciones y ubiquitinaciones, las diferentes rutas convergen en un mismo punto, que es, la fosforilación de IKKβ-α mediada por IKK en los residuos de aminoácidos Ser32, 36, lo que provoca su degradación y permite que el dímero (p50/p65) NF-κB sea translocado al núcleo y active la transcripción de genes como: IL-8, IL1β, IL-6, IL-12, TNF-α, A20, IκBα, ciclooxigenasa 2 (COX2), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1β), Ligando de la quimiocina (CXCL)1, CXCL10, entre otros. Figura 5 (KEGG PATHWAY, 2020).

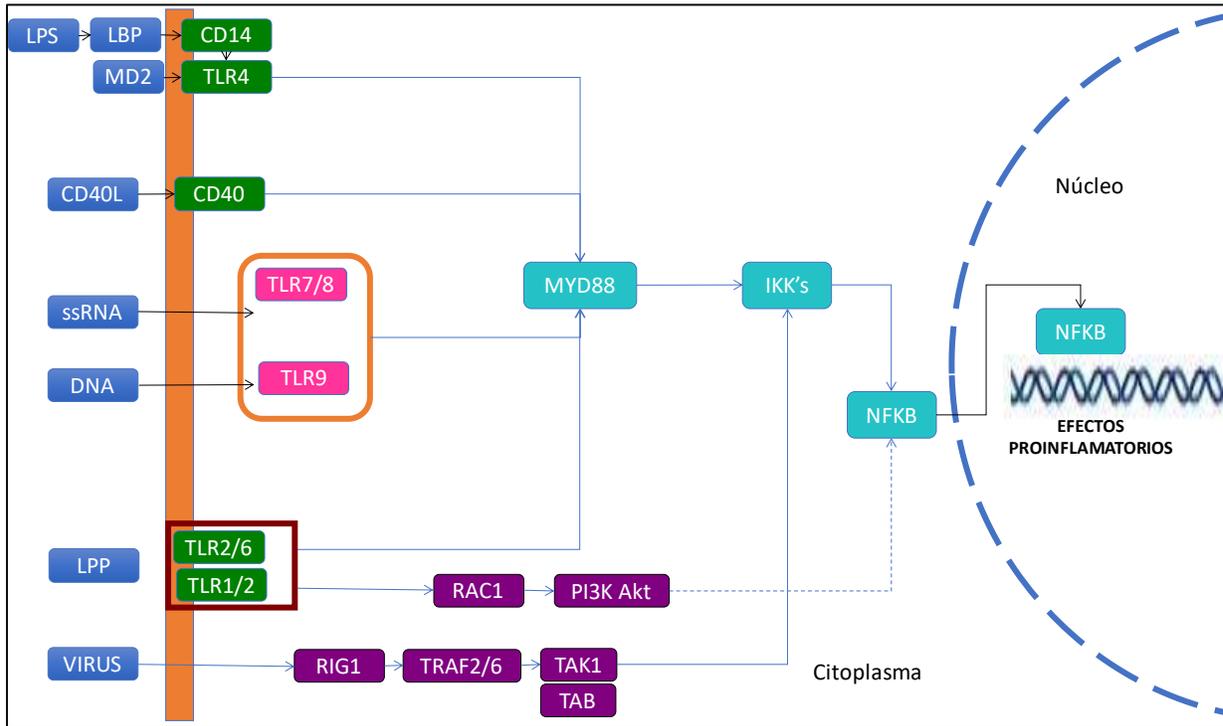


Figura 5. Esquema representativo de la vía canónica de NF-κB (Modificado de KEGG PATHWAY, 2020).

III- ANTECEDENTES

Evaluación de la Activación de MΦ en PRRSV

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

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

Recientemente datos experimentales de Wang *et. al.*, (2017) sugieren que la polarización de los MΦ modula la infección por PRRSV. La expresión de citocinas antivirales fue significativamente mayor

en los MΦ M1 que en los MΦ M2 o en los controles no polarizados; y tanto la replicación viral evaluada con una cepa altamente patógena, como la replicación viral con una cepa PRRSV clásica (PRRSV CH-1a), se vieron significativamente afectadas en los MΦ alveolares tipo M1. Además, durante la infección por HP-PRRSV se redujeron significativamente los genes que están involucrados en las vías de señalización relacionadas con IFN, las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas, la fagocitosis y la presentación y el procesamiento de antígenos, lo que sugiere una función aberrante de los MΦ alveolares porcinos durante la infección (Longtao Wang *et al.*, 2017).

Por otro lado, se conoce que en el caso del Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV, por sus siglas en inglés), ciertos dominios de la proteína Z son determinantes para bloquear la respuesta de activación de MΦ. Particularmente, el dominio N-terminal de esta proteína evita la activación de MΦ y se ha reportado que disminuye la expresión de IL-1β, IL-8, TNF-α, IL6 en MΦ infectados (Xing *et al.*, 2015). Es probable que proteínas estructurales de PRRV, como GP5, pudiesen modular la activación y polarización de los MΦ, aunque esto no se ha estudiado.

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

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

En este proyecto se evaluaron epítopos diseñados a partir de la proteína GP5 de PRRSV con características antigénicas, para ver sí, tal como otras proteínas virales estructurales o inductores de diferenciación de MΦ, estos epítopos son capaces de inducir la activación de MΦ. Y posiblemente funcionen como futuros candidatos para limitar la replicación viral tras una infección por el PRRSV.

IV- JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inmune adaptativa como células presentadoras de antígeno, estimulando la proliferación y activación de los linfocitos, y modulando la expresión de diversas citocinas. En cuanto a las citocinas, la expresión de $INF\gamma$ disminuye la capacidad de replicación de PRRSV. Por lo tanto, la activación oportuna y robusta de la respuesta inmune adaptativa mediada por macrófagos es imprescindible para eliminar la infección.

La proteína GP5 de PRRSV es la más inmunogénica e induce la producción de anticuerpos evidenciando una robusta activación de la respuesta inmune adaptativa humoral. Sin embargo, no se ha estudiado su capacidad de activar la respuesta inmune adaptativa mediada por células, como los macrófagos. En este trabajo se busca evaluar si péptidos derivados de GP5 son capaces de inducir una respuesta antiviral mediante la activación y la polarización de macrófagos. La finalidad es determinar el potencial terapéutico o profiláctico de estos péptidos y establecer criterios para la elaboración de biofármacos que limiten la propagación del PRRSV.

V- HIPÓTESIS

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 son capaces de activar macrófagos alveolares.

VI- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la activación de macrófagos alveolares de ratón en respuesta a péptidos derivados de la proteína GP5 de PRRSV.

VII- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el cambio morfológico relacionado con la diferenciación y activación de macrófagos, después del tratamiento con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.
2. Evaluar la activación de la vía de señalización del factor $NF-\kappa B$ en macrófagos tratados con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.
3. Evaluar la expresión de citocinas y quimiocinas asociadas a la activación de macrófagos, después del tratamiento con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.

VIII- ESTRATEGÍA METODOLÓGICA

1. MATERIALES

Péptidos

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

La elección de los péptidos para su síntesis química se realizó con base en lo reportado en la literatura. Vashisht y colaboradores (2008), estudiaron un conjunto de 96 pentadecapéptidos extraídos a partir de la proteína GP5. El experimento consistió en preparar soluciones de los péptidos en dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 µg / mL en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con PRRSV. Los parámetros evaluados fueron la expresión de INF γ y la capacidad de inducir la proliferación de Linfocitos T. Posteriormente, el diseño se realizó con base en las dos mejores secuencias reportadas (Vashisht *et al.*, 2008).

Línea celular RAW 264.7 (ATCC ® TIB-71)

Las células RAW 264.7 provienen de ratón, tiene una morfología de monocito/ M Φ y son adherentes. Las células fueron mantenidas en medio completo RPMI ó DMEM, a 37°C y 5% de CO₂. (American Type Culture Collection, 2020).

Sistema de vectores reporteros CIS

Los Sistemas Reporteros *Cis* son utilizados para obtener información de la relación existente entre la activación o inhibición de diferentes vías y sus efectos en la expresión génica, donde los elementos de respuesta específicos son fusionados con genes que codifican una proteína reportera. El gen reportero tiene la función de indicador de la actividad transcripcional en las células.

La unidad reportera consiste en un promotor y una secuencia de un gen reportero, el cual, se encuentra unido a una secuencia reguladora, que dentro de un sistema biológico provee de una señal medible cuando la expresión del gen es modulada. La señal se puede analizar midiendo la cantidad de ARN mensajero del gen reportero, la proteína reportera o la actividad enzimática del gen (Jiang, Xing, and Rao, 2008).

En el presente estudio se utilizó el Sistema de vectores reporteros PathDetect (Agilent Technologies), específicamente, el sistema reportero pNF- κ B-hrGFP como un monitor de la activación de la vía pNF- κ B de transducción de señales que convergen en un elemento *cis* de respuesta específico. Un elemento *cis* es una región no codificante que regula la transcripción de un gen o genes cercanos; en este caso, el gen reportero de la proteína verde fluorescente de *Renilla reniformis* humanizada (hrGFP, por sus siglas en inglés). La hrGFP es una variante de GFP con optimización de codones para una expresión máxima, controlada por un promotor sintético básico TATA y varios elementos *cis* actuando (Figura 7 y Tabla 2). Además, contiene el origen de replicación bacteriano (pUC), el gen de resistencia a ampicilina para amplificación y selección bacteriana. Contiene también el gen que confiere resistencia a Higromicina B para una selección en células eucariotas, bajo la regulación del promotor de la timidina quinasa y rio abajo del gen la señal de poliadenilación de la timidina quinasa Ver Figura 6 (Mastropietro, 2014).

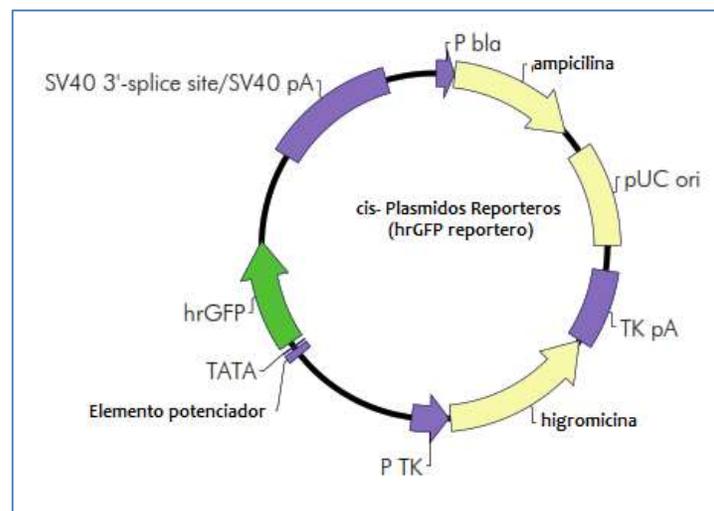


Figura 6. Mapa circular de los plásmidos reporteros *cis* (Modificado de Agilent Technologies, 2019).

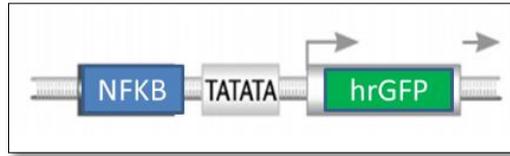


Figura 7. Diseño del vector NF- κ B, Sistema de Reporteros *cis*-hrGFP.

La activación endógena de la proteína cinasa A (PKA) o de otras proteínas cinasas iniciadas por un estímulo extracelular o el producto de un gen cotransfectado puede resultar en la activación de los correspondiente del trans-activador, el cual estimulará la expresión del reportero (Agilent Technologies, 2019).

Tabla 2. Elementos respuesta de los plásmidos del Sistema de Reporteros *cis*-hrGFP (Agilent Technologies, 2019).

Elemento de respuesta	Asociado a la expresión de:	Plásmidos Control +
NF-κB	Proliferación de las células T, TNF- α , IL-6, IL-1	pFC-MEKK

Reactivo de transfección Lipofectamine LTX

Reactivo Lipofectamine™ LTX con reactivo PLUS™ (No. 15338030, Thermo Fisher Scientific Inc.) es una formulación para la transfección de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) plásmidico dentro de células eucariotas con una baja citotoxicidad. Está recomendada para líneas celulares primarias, líneas sintéticas, complejas y sensibles, con una alta eficiencia de transfección y viabilidad celular.

Oligonucleótidos para qPCR

Los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 3 se utilizaron para evaluar la expresión de citocinas y quimiocinas relacionadas a la vía NF- κ B.

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos sintetizados para qPCR.

Gen	Secuencia 5' - 3'	Amplicón (pb)	Tm°	Referencia
Genes relacionados a citocinas y quimiocinas				
IL-1β	F: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG R: GATCCACACTCTCCAGCTGCA	152	60	NM_008361.4
IL-6	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	141	60	NM_031168.2 NM_001314054.1
IL-12b (p40)	F: GTGGAATGGCGTCTCTGTCT R: CGGGTCTGGTTTGATGATGT	206	60	NM_001303244.1
IL-10	F: AAGGCAGTGGAGCAGGTGAA R: CCAGCAGACTCAATACACAC	159	59	NM_010548.2
TNF-α	F: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT R: GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG	139	60	NM_001278601.1
IFN-α1	F: TGAAGGACAGGAAGGACTTTG R: GAATGAGTCTAGGAGGGTTGT	167	57	NM_010502.2
IFN-α4	F: CCTGTGTGATGCAGGAACC R: TCACCTCCCAGGCACAGA	123	59	NM_010504.2
IFN-β1	F: CCAGCTCCAAGAAAGGACGA R: AACACTGTCTGCTGGTGGAG	261	59.7	NM_010510.1
Gen constitutivo				
GAPDH	F: TGGCAAAGTGGAGATTGTTGC R: CCACGACATACTCAGCACCG	215	59.9	NM_008084.3 NM_001289726.1

HERAMIENTAS COMPUTACIONALES:

SnapGene

Software de biología molecular que ofrece la forma más rápida y fácil de planificar, visualizar y documentar sus procedimientos de biología molecular. Cada construcción de ADN puede documentarse en un formato electrónico. Dentro de las herramientas que destaca son: simulación de clonación, Ensamble de Gibson, clonación de restricción, PCR y mutagénesis, sitios de enzimas y simulación de electroforesis, entre otros (Columbia CP Ltd, 2019).

Immune Epitope Database (IEDB)

La base de datos del epítipo inmune (IEDB) es un recurso en línea disponible gratuitamente financiado por el Instituto Nacional de alergias y enfermedades infecciosas (NIAID, por sus siglas en inglés). La base de datos reúne datos experimentales sobre epítipos de anticuerpos y células T estudiados en humanos, primates no humanos y otras especies animales en el contexto de enfermedades infecciosas, alergias, autoinmunidad y trasplantes. El IEDB también alberga herramientas para ayudar en la predicción y análisis de epítipos (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2019).

CCL Main Workbench 20.0

Es un Software que cuenta con un kit completo de herramientas para análisis de genómica, transcriptómica, epigenómica y metagenómica en un solo programa. Además de análisis filogenéticos, correlaciones entre microbiota, su metagenómica y huésped, entre otras funciones de análisis de secuencias (QIAGEN, 2020).

CFX Maestro Software para CFX Real-Time PCR

El software CFX Maestro es un conjunto completo de herramientas para la recopilación y el análisis de datos de PCR en tiempo real de la serie CFX de sistemas de PCR en tiempo real. El software CFX Maestro agiliza el proceso de configuración de la placa, recopilación de datos, análisis de datos y visualización de datos de PCR en tiempo real. (Laboratories, 2017).

GraphPad Prism 6

GraphPad Prism, es la aplicación utilizada para el procesamiento de datos, análisis estadísticos y gráficas de los resultados obtenidos en la metodología a realizar.

2. METODOLOGÍA

2.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS

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

Durante el proceso de síntesis, el extremo de la secuencia naciente es cubierto con grupos permanentes, mientras que el aminoácido entrante es cubierto con grupos temporales, que se remueven a la incorporación del siguiente. Los grupos protectores comúnmente usados son: 9-fluorenilmetoxicarbonil y tert-butoxicarbonil (GenScript, 2021).

Al finalizar la síntesis el péptido es purificado por medio de Cromatografía Líquida de Alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) de fase reversa. Posteriormente, la caracterización del péptido se

hace por Espectrometría de Masas (MS, siglas en ingles). La prueba de Solubilidad se realiza diluyendo el péptido sintetizado ya se en agua grado molecular o DMSO, y se define como insoluble cuando se ha disuelto menos de 0.1 mg/mL (GenScript, 2021).

2.2. EVALUACIÓN DE MΦ ACTIVADOS POR MEDIO DE TINCIÓN WRIGHT.

La tinción de Wright está compuesta por azul de metileno que tiñe estructuras ácidas como los ácidos nucleicos y la eosina que tiñe proteínas. Esta tinción se utilizó para evaluar el cambio morfológico de células Raw 264.7 a Raw 264.7 MΦ con diferentes estímulos activadores.

Se sembraron células Raw 264.7 a una concentración de 2.0×10^5 células por pozo en una placa de cultivo celular (Corning™) de 24 pozos con 500 µl de medio completo: Medio RPMI-1640 (Sigma, # Cat. R5158), adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución de antibiótico y antimicótico (penicilina, streptomycin y Fungizone, marca Gibco). La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Transcurrido el tiempo, las células fueron tratadas con los estímulos control: LPS, Dexametasona (DEXA), TNF- α ; así como los tratamientos con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 en pozos por triplicado para cada estímulo y un control sin estimular. Las concentraciones utilizadas de cada estímulo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración usada para la estimulación de células RAW 264.7.

Estímulo	Concentración	Referencia
LPS	1 µg/mL	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
DEXA	1 µg/mL	
TNF-α	50 ng/mL	(Mastropietro <i>et al.</i> , 2015)
GP5T1	5 µg/mL	(Vashisht <i>et al.</i> , 2008)
GP5T2	5 µg/mL	
GP5T3	5 µg/mL	

La morfología de las células teñidas se evaluó a los 0.5, 1, 2, 4 y 8 h, en cada tiempo se retiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 2% por 15 min, se retiró y agregó Buffer Salino de Fosfatos (PBS) para lavar los pozos. Posteriormente se retiró PBS, se dejó secar la placa y se tiñó con reactivo Wright (Hycel, # de Cat. 64840) incubando 5 min, se retiró el reactivo y se lavó cada pozo con agua. Finalmente, se dejó secar la placa de cultivo celular y se observó morfología al microscopio.

Se analizaron cinco campos diferentes en el microscopio a un aumento de 10X y se tomaron cinco fotografías (cámara Nikon Coolpix P6000 acoplada a microscopio Nikon Eclipse TE2000-U) por

pozo, por triplicado. De cada fotografía, se realizó un conteo manual de las células activadas, calculando el porcentaje de activación con respecto del total de células.

2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NF- κ B

Para evaluar la expresión de la vía NF- κ B asociada a la expresión de citocinas y quimiocinas en respuesta al tratamiento de M Φ con subunidades de la proteína GP5 de PRRSV se utilizó el plásmido NF- κ B-hrGFP. El Sistema de reporteros hrGFP permite la detección de la activación del gen de interés mediante la fluorescencia de un gen reportero, en este caso la proteína verde fluorescente (GFP).

Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó por la técnica de choque térmico, se usó 1 μ l (1 μ g/mL) del plásmido pNF- κ B-hrGFP con 100 μ l de bacterias competentes de la cepa de *E. coli* XL-1. Las bacterias tratadas se cultivaron en dos cajas Petri (50 μ l bacterias / placa) de agar LB, adicionando ampicilina, a una concentración final de 100 μ g/mL de agar LB. Las placas con bacterias se dejaron incubar por 24 h a 37 °C y 250 rpm.

Purificación o extracción de plásmido a pequeña escala (Miniprep)

A partir del crecimiento bacteriano, se seleccionaron cinco colonias resistentes a ampicilina, para posteriormente inocular en 3 mL de medio Luria Bertani (LB), adicionado con ampicilina (100 μ g/mL). Se incubó por toda la noche a 37 °C y 250 rpm.

Para la preparación del plásmido a pequeña escala se utilizó el protocolo de CTAB, por muestra se colocó: 1.25 mL de bacterias en un microtubo (Eppendorf) estéril, se centrifugó a 8,000 rpm / 4', desechando el sobrenadante y se adicionaron 300 μ l de solución de precipitación STET y 5 μ l de lisozima (20 mg/mL), se incubó 5' a temperatura ambiente y 50'' a ebullición. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10' y se retiró moco bacteriano con un palillo.

Luego se adicionaron 10 μ l de solución de precipitación TAB 5%, se mezcló e incubó 5' a temperatura ambiente, se centrifugó 5' a 12 000 rpm y se desechó sobrenadante. Después, se agregó NaCl 1.2M y se resuspendió, se agregó un volumen de isopropanol y el tubo se centrifugó 10' a 12,000 rpm. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se secaron los tubos. Se resuspendió el pellet en 30 μ l de H₂O Milli-Q. Al final se cuantificó la extracción del plásmido en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Purificación de plásmido NF-κB-hrGFP a gran escala (maxiprep) con Kit QiaGen.

Se utilizaron 500 mL de medio LB con bacteria XL-1 blue transformada con el plásmido de interés, y se incubó a 37°C, a 250 rpm por 16 horas antes de la extracción. Se obtuvo el pellet bacteriano por centrifugación.

Se utilizó el Kit QiaGen plasmid purification plasmid maxi kit (25) (# Cat. 12163) para realizar la preparación a gran escala del plásmido pNF-κB-hrGFP. Este kit se basa en la técnica de lisis alcalina, además nos permite obtener un plásmido libre de endotoxinas. Se siguió el protocolo según las indicaciones del proveedor. Al finalizar se midió la concentración de la extracción de plásmido en el NanoDrop 2000.

Análisis del plásmido con enzimas de restricción

Para el análisis del plásmido se deben conocer las enzimas que cortan el plásmido de interés, así como el tamaño de los fragmentos esperados. La preparación del mix de digestión enzimática se realizó con una mezcla de volumen de Buffer apropiado para cada enzima, volumen de enzima, concentración del plásmido a analizar y H₂O desionizada (Milli-Q) para aforar a volumen final de 10 µl. Las mezclas de reacción se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental del ensayo de restricción enzimática.

Enzima	Buffer	ADN plásmido	Enzima	H2O
<i>EcoR1</i>	3.1(1 µl.)	1 µg/ µl	0.5 µl.	8 µl.
<i>BamH1</i>	3.1(1 µl.)	1 µg/ µl	0.5 µl.	8 µl.
<i>Xba1</i>	CutSmart(1 µl.)	1 µg/ µl	0.5 µl.	8 µl.
Control	---	1 µg/ µl	--	9 µl.

Una vez realizada la mezcla como se indica en la tabla 5 para cada muestra, se incubaron los microtubos de 1.5 mL a 37°C por 1 h. Finalmente, los productos de la digestión se evaluaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con un marcador de peso molecular de 1 Kb (GeneCraft, # artículo GC-015-003). Por último, el resultado de la electroforesis se visualizó en un transluminador de luz UV (Bio-Imaging Systems MiniBis Pro). Ver ANEXO I.

Curva de sensibilidad celular al antibiótico de selección.

Con la finalidad de generar una línea celular que expresara de manera constitutiva el plásmido reportero pNF-κB-hrGFP se realizó una curva de sensibilidad a higromicina B (antibiótico de selección para el plásmido en células eucariotas) para determinar la mínima concentración citotóxica del antibiótico. Se utilizó una placa de cultivo celular (24 pozos) para sembrar 12 pozos con una

concentración de 3×10^5 células/pozo y los otros 12 con 6×10^5 células/pozo con 500 μ l de medio RPMI completo.

A partir de un stock de higromicina B (50 mg/mL) se seleccionaron concentraciones finales de trabajo de 50, 100, 150, 200 y 400 μ g /mL de medio en pozos por duplicado y un control sin antibiótico para cada dosis. Luego de ocho días de selección se determinó la viabilidad celular y concentración mínima citotóxica. Ver ANEXO II.

Transfección estable con Lipofectamine LTX y plásmido NF- κ B-hrGFP en células RAW 264.7

Se siguió el protocolo que indica el proveedor del reactivo. Se sembraron M Φ a una concentración de $0.25 - 1 \times 10^6$ células RAW 264.7 por pozo en 2 mL de medio RPMI completo, en una placa de 6 pozos (Corning TM), 24 horas antes de la transfección.

Para la transfección, se colocaron: en un microtubo de 1.5 mL, 150 μ l de Opti-MEM (Gibco by Life Technologies, # Ref. 31985-070) para diluir el reactivo Lipofectamine LTX (Thermo, # Cat. 15338030). Según lo recomendado se realizaron 2 condiciones (6 μ l y 9 μ l de LTX) por duplicado. Se colocaron 700 μ l de Opti-MEM en un microtubo para diluir 14 μ g del plásmido de interés (stock de 1 μ g/ μ l).

Después de tener las diluciones de ambos microtubos, se tomaron 150 μ l de cada dilución para un mix nuevo con volumen final de 300 μ l. Se dejó incubar 30' a temperatura ambiente para la formación el complejo lípido-ADN. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y la mezcla de transfección se dejó caer por goteo. Se incubó la placa a 37 °C y 5 % de CO₂ por 48 h.

Se seleccionaron células resistentes a Higromicina B después de 48 h de la transfección. La selección con higromicina se mantuvo en los pases de cultivo consiguientes y como resultado se obtuvo un cultivo policlonal del plásmido de interés. Las células que sobrevivieron son aquellas que contienen el plásmido.

Selección de células transfectadas de manera estable a partir de la evaluación de Fluorescencia.

Las células policlonales que se obtuvieron después de la selección con higromicina, se mantuvieron en medio de cultivo RPMI completo por 8 días, hasta que se tuvo una confluencia mayor a 70%. Posteriormente se realizó la selección de células monoclonales a partir del método por dilución limitante, donde cada colonia se depositó en placas de cultivo de 24 pozos (clona policlonal). Una vez que las clonas alcanzaron un 70% de confluencia se triplicaron y se sembraron en pozos por triplicado de cada clona en placas de 24 pozos a una concentración de 1×10^5 células/pozo 24 h antes de la evaluación.

La evaluación de la fluorescencia se realizó en cada clona, ya sea sin adición de estímulo (control), y con LPS o TNF- α y PBS 1X (blanco) después de 1 h de la adición del estímulo. Finalmente se seleccionaron como clonas monoclonales aquellas que tenían una lectura de fluorescencia mayor al control y que respondían a ambos estímulos. Se realizó el experimento 2 veces consecutivas para comparar resultados y se propagaron las células RAW-hrGFP-NF κ B para posteriores experimentos y criopreservación.

Evaluación de Fluorescencia

Se sembraron células RAW-hrGFP-NF κ B 24 h antes de la estimulación en placas de 24 pozos a una concentración de 7×10^5 células/pozo con medio RPMI completo. El día de la estimulación se cambió por medio fresco DMEM base sin colorante rojo de fenol (Marca Sigma, # Cat. D5030) con 2% de SFB y el estímulo: control: LPS, DEXA, TNF- α ; péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 respectivamente a la concentración previamente establecida. Ver Tabla 4.

La lectura de la fluorescencia se realizó en los tiempos 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h posterior a la adición de los estímulos, sin necesidad de lisar las células y se realizaron réplicas de cada tratamiento por sextuplicado.

La fluorescencia se midió para todos los experimentos con un fluorómetro, el lector de microplacas multimodo (Thermo Scientific Varioskan LUX) a una longitud de onda de 500/506 nm. El Fluorómetro arrojó los resultados en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). Los resultados obtenidos se procesaron en el Software GraphPad Prism 6. Se consideró que la fluorescencia emitida es una medida indirecta relacionada a activación del gen reportero involucrado en la vía de señalización NF- κ B.

3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y GENES RELACIONADOS A LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE NF-KB:

Se realizó la metodología descrita a continuación para un periodo de incubación de 1 h y 8 h posterior a la adición del estímulo; los experimentos se realizaron para cada tiempo de manera independiente. Estos tiempos se escogieron con base en los mayores porcentajes de MΦ activados obtenidos en la evaluación por Tinción Wright.

Extracción de ARN por el método TRI reagent.

El cultivo de células Raw 264.7 MΦ se realizó en 14 cajas de cultivo celular (100 mm de diámetro por 20 mm de alto, Corning™) hasta que tuvieron una confluencia de 70 -80%. Posteriormente, se agregaron los estímulos control y los péptidos a la concentración reportada en la Tabla 4, se usaron dos cajas de cultivo por estímulo. Se incubó cada caja con los estímulos y medio DMEM base con 2% de SFB, a 37 °C y 5 % de CO₂ por los tiempos establecidos de estimulación.

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

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

Transcripción Reversa

Se realizó la transcripción reversa para obtener Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de la extracción de ARN de cada uno de los tratamientos. Se utilizó el RevertAid First Strand

ADNc Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, # Cat. K1622), el cual contiene la enzima RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Una vez sintetizado el ADNc se cuantificó cada reacción en el espectrofotómetro.

PCR punto final: Estandarización de Oligonucleótidos

Para la estandarización de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados, ver Tabla 3, se realizó una PCR punto final cualitativa con gradientes de temperatura, y así conocer la temperatura óptima de hibridación (T_m°) de cada uno de los oligonucleótidos. Además, se realizó una curva de diluciones de ADNc para determinar la concentración adecuada para una amplificación óptima con base en los amplicones de los genes constitutivos.

PCR cuantitativa

Se realizó PCR tiempo real para analizar la expresión de los diferentes genes. También, se utilizó una mezcla para la PCR: SYBER Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (TAKARA, # Cat. RR420L). El gen constitutivo GAPDH se utilizó como control de expresión para la reacción de PCR. Condiciones qPCR: un ciclo a 94 °C, 4 min; 40 ciclos a 94 °C / 30 s; T_m° específica / 30 s; 72 °C / 30 s y un ciclo 72 °C, 4 min.

Los datos obtenidos se analizaron con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (-delta delta CT) para cuantificar la expresión relativa de los genes evaluados. Este método usa los ciclos del umbral (CT) generados por el termociclador, determinando cambios en la expresión en relación a una muestra de referencia como normalizador. El primer ΔCT es la diferencia en el ciclo umbral entre los genes diana y de referencia. El $\Delta\Delta CT$ es la diferencia en ΔCT entre las muestras objetivo y las de referencia. La expresión génica relativa generalmente se establece en una para las muestras de referencia porque $\Delta\Delta CT$ es igual a 0 y, por lo tanto, 2^0 es igual a 1. Fórmula para el cálculo, $2^{\Delta\Delta CT} = \Delta CT$ (una muestra de destino) $-\Delta CT$ (una muestra de referencia), el resultado se expresa en veces de cambio, del inglés Fold Change (Rao *et al.*, 2013).

IX- RESULTADOS

1. Análisis bioinformático y caracterización de los péptidos GP5T1, GP5T2 Y GP5T3.

Previo a la síntesis química de los péptidos, se realizó una caracterización inmunológica *in silico* con la base de datos IEDB, en donde se evaluó la inmunogenicidad e hidrofiliidad de cada péptido, cabe recordar que cada péptido seleccionado proviene de una secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína GP5.

En el análisis de antigenicidad se aplicó el método de Kolaskar and Tongaonkar y en cuanto a la prueba de hidrofiliidad se aplicó el método de predicción de Parker, ambos análisis se realizaron en la plataforma de consulta IEDB. A continuación, se presentan los resultados mediante gráficas (Ver Figura 8-13).

En las gráficas, el eje de las X representó la posición aproximada del aminoácido en la secuencia evaluada contra su valor obtenido en eje de las Y con parámetro Score. Todas las gráficas tienen una línea horizontal roja llamada threshold, la cual es promedio de los valores obtenidos en cada análisis. Los valores obtenidos a lo largo de la secuencia de péptidos dibujaron superficies de respuesta sobre las gráficas, aquellos valores de la secuencia por arriba del threshold formaron una superficie en amarillo y por debajo una región verde, Ver Figura 8-13. (Kolaskar and Tongaonkar 1990; Parker and Hodges 1986; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2019).

El parámetro de Score para la antigenicidad es el valor obtenido de propensión antigénica de cada aminoácido que forma la secuencia. Los aminoácidos Serina, Lisina, Treonina, Glutamato y Alanina tienen un valor más alto en la escala ya que se encuentran formando determinantes antigénicos con mayor frecuencia. Valores mayores a uno corresponden con regiones más antigénicas, estos valores ya han sido reportados para otras secuencias dando buenos resultados en otros trabajos experimentales (Pérez, 2020). En cambio, para hidrofiliidad el Score corresponde a un valor asignado para cada aminoácido en referencia a su coeficiente de retención máximo en una columna de HPLC. Valores más positivos en los aminoácidos tienen tendencia a ser más hidrofílicos y, al contrario, valores negativos son hidrofóbicos (Kolaskar and Tongaonkar 1990; Parker and Hodges 1986; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2019).

Para el péptido GP5T1, se obtuvieron valores de antigenicidad promedio de 1.039 (mínimo de 0.971 y máximo de 1.111) (Figura 8). En la prueba de hidrofiliidad para el péptido GP5T1, se obtuvieron valores de antigenicidad promedio de -0.225 (mínimo de -1.800 y máximo de 0.957). El promedio es un valor negativo, este tiende a ser más positivo en comparación con los resultados de GP5T2 y GP5T3 (Figura 9). El promedio indicó empíricamente que es un péptido hidrofóbico. Comparando con los resultados obtenidos en la solubilidad reportada por el proveedor de la síntesis (GenScript), éste indicó que GP5T1 es anfipático, ya que se puede disolver tanto en agua como en DMSO.

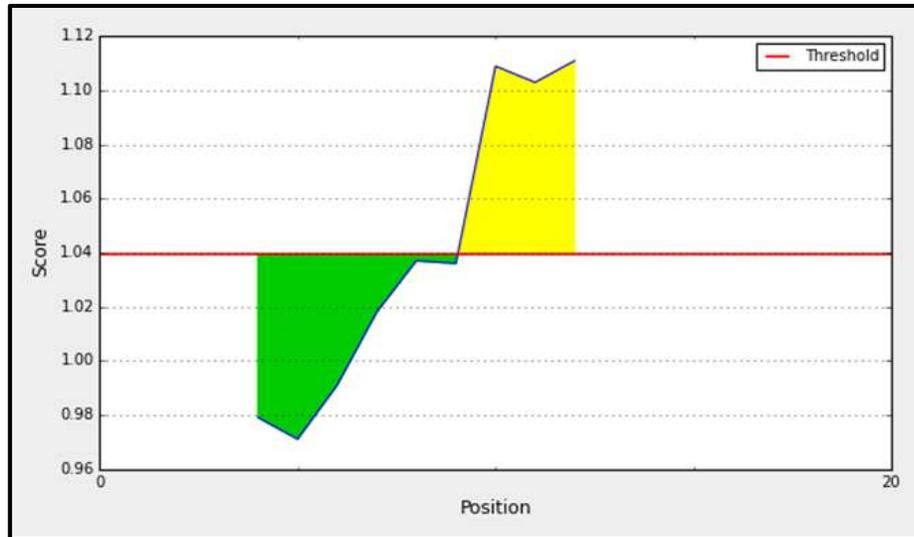


Figura 8. GP5T1 Gráfico de Análisis de Antigenicidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Kolaskar and Tongaonkar.

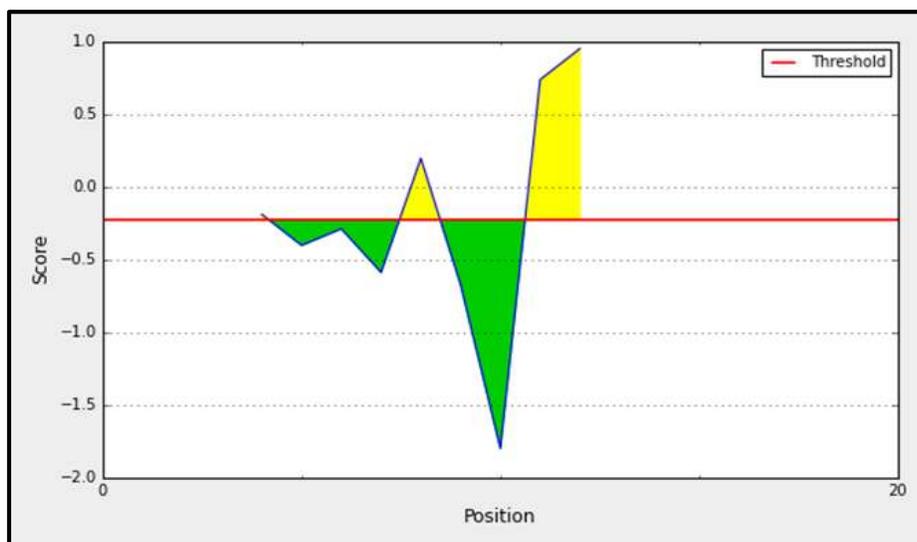


Figura 9. GP5T1. Gráfico de Análisis de Hidrofiliidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Parker.

Para el péptido GP5T2, se obtuvo un valor promedio de antigenicidad de 1.165 (mínimo de 1.061 y máximo de 1.215), todos los valores son cercanos o superiores a uno. En el análisis de hidrofiliicidad se obtuvo un valor promedio de -3.509, (mínimo de -4.943 y máximo de -0.271), empíricamente por el valor promedio indicó que es un péptido hidrofóbico, lo que concuerda con el resultado reportado por GenScript.

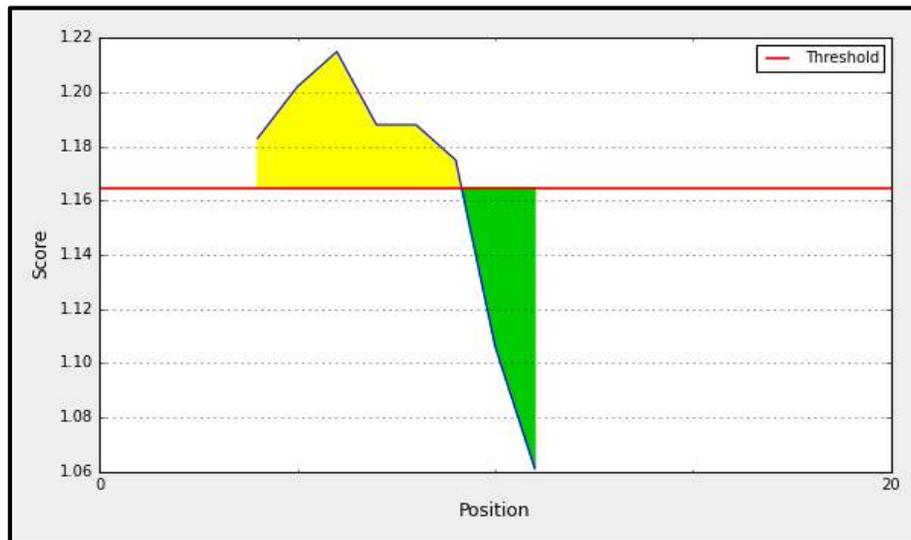


Figura 10. GP5T2 Gráfica de Análisis de Antigenicidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Kolaskar and Tongaonkar.

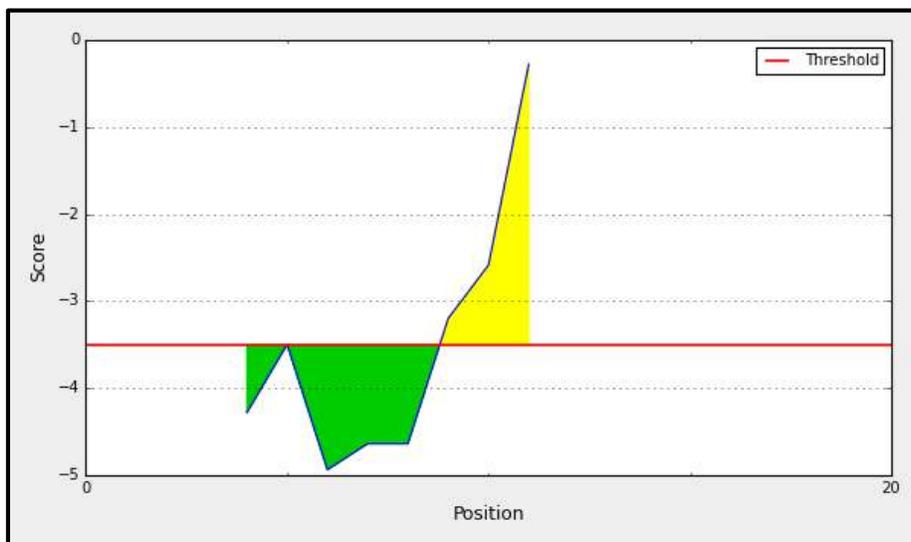


Figura 11. GP5T2 Gráfico de Análisis de Hidrofiliicidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Parker.

Para el péptido GP5T3, se obtuvo un valor promedio de antigenicidad de 1.105 (mínimo de 0.971 y máximo de 1.215 (Figura 12). En el análisis de hidrofiliicidad se obtuvo un valor promedio de -1.616 (mínimo de -4.943 y máximo de 0.957) (Figura 13). Los resultados de solubilidad reportados por GenScript indicaron que es un péptido anfipático, ya que se disuelve tanto en agua como en DMSO.

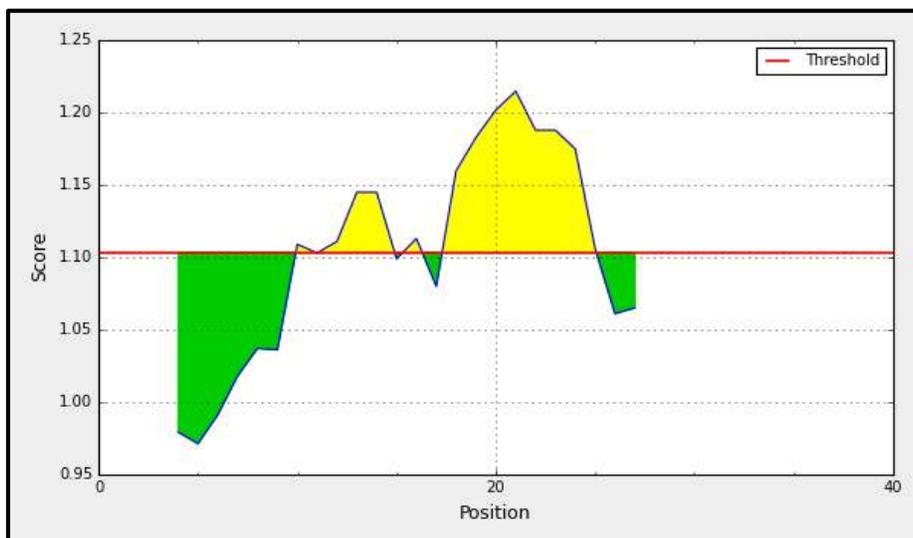


Figura 12. GP5T3. Gráfico de Análisis de Antigenicidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Kolaskar and Tongaonkar.

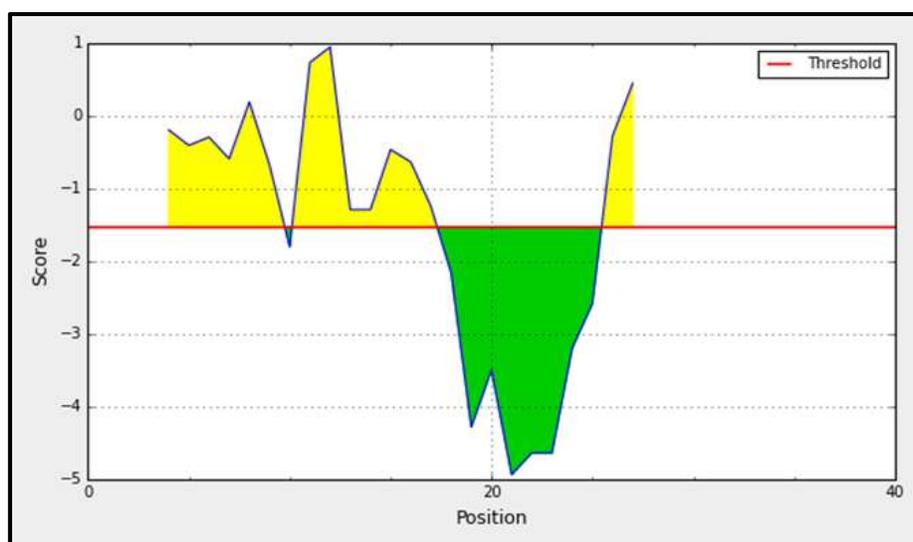


Figura 13. GP5T3. Gráfica de Análisis de Hidrofilicidad. El análisis se realizó en la base de datos de IEDB prueba de Parker

Los péptidos se obtuvieron con una pureza mayor a 95%. Se evaluó longitud (L), punto isoelectrico (P.I.), el peso molecular (P.M.), la carga a un pH neutro, pureza y solubilidad. Se corroboró el valor de P.I., P.M. y carga reportado en el certificado enviado por el proveedor a través del software CCL Main Workbench 20.0. Los resultados de la caracterización de los péptidos se reportan en la Tabla 6.

Los tres péptidos se disolvieron en DMSO, a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, según las indicaciones del proveedor de la síntesis química de los péptidos.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.

Péptido	GP5T1	GP5T2	GP5T3
Secuencia	KGRLYRWRSPVIVEK	LAALICFVIRLAKN	KGRLYRWRSPVIVEKLAALICFVIRLAKN
L (aa)	15	14	29
Pureza	97.8%	97.4%	98.0%
P. M. (Da)	1,887.24	1,544.95	3,414.18
P. I.	11.13	10.17	10.7
Carga	4.0	2.0	6.0
Solubilidad	DMSO	agua y DMSO	agua y DMSO

2. Evaluación de MΦ activados por medio de Tinción Wright.

La tinción Wright fue una técnica eficiente para evidenciar el cambio morfológico de monocito a macrófago relacionado con la activación de las células RAW 264.7. La activación se indujo con diferentes estímulos control: LPS, DEXA y TNF- α , y los péptidos experimentales GP5T1, GP5T2 y GP5T3 a las 0.5, 1, 2, 4 y 8 horas post estimulación (hpe).

Se calculó el porcentaje de MΦ con cambios morfológicos mediante conteo manual a partir de cinco fotografías correspondientes a cinco campos representativos por pozo por triplicado por estímulo (placa de 24 pozos), tomadas al microscopio con un aumento de 10X. A continuación, se presentan imágenes representativas (Figura 14).

Las células consideradas como activadas son las que presentaron una morfología de células grandes o alargadas y con numerosas proyecciones filopodiales (ver flecha azul de Figura 14); por otra parte, las células consideradas no activadas fueron aquellas células redondas y pequeñas (ver flecha roja de Figura 14). Con base en lo anterior se realizó el conteo y con los resultados se obtuvieron los porcentajes de activación en cada horario y con cada estímulo.

Los tratamientos con estímulos control y con los péptidos de GP5 indujeron un aumento significativo del porcentaje de MΦ con cambios morfológicos sugerentes a activación en los tiempos 0.5, 1 y 8 hpe ($P \leq 0.05$) (*) comparado con las células no estimuladas (Control). A las 2 hpe, únicamente con LPS y TNF- α se observó diferencia significativa comparado contra el control ($P \leq 0.05$) (*) (Figura 15).

El estímulo con LPS indujo un 75.3% de células activadas (promedio de tres pozos estimulados, cinco fotos por pozo), siendo el mayor porcentaje observado para todos los estímulos, una hora después de la estimulación. El porcentaje de activación registrado para DEXA y TNF- α fue de 70.4% y 68.3%,

respectivamente, y se alcanzó el máximo efecto a las 0.5 hpe. El porcentaje de Raw 264.7 MΦ activados con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 fue de 62.8%, 65.94% y 67.8%, respectivamente; con un pico de activación a la 0.5 hpe (Figura 15).

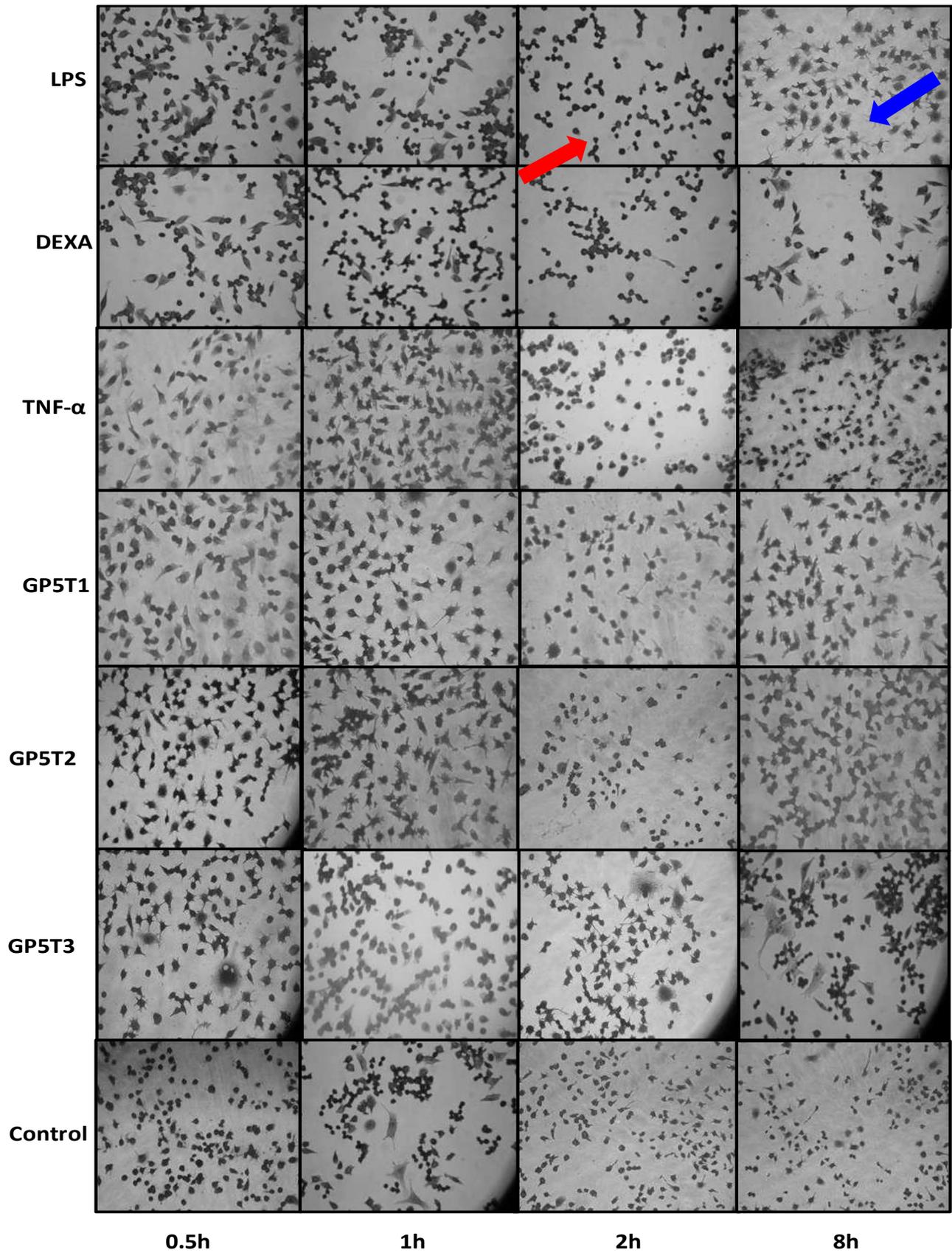


Figura 14. Fotografías representativas de la estimulación de células de monocitos RAW 264.7 con diferentes estímulos. La fecha en color rojo indica la morfología de un monocito y la fecha en color azul indica la morfología de un MΦ. Las fotografías se tomaron con la cámara Nikon Coolpix P6000 acoplada a un microscopio TE2000-U, magnificación de 10X.

Una hora después de la estimulación hubo un menor porcentaje de células activadas en los tratamientos con los péptidos (#), comparado con células tratadas con los estímulos control ($P \leq 0.05$). A las ocho hpe, únicamente el estímulo con DEXA tuvo un menor porcentaje de activación en relación al porcentaje de los otros estímulos (&) ($P \leq 0.05$). Por otro lado, no hubo diferencias estadísticas entre los porcentajes de células activadas inducidas por los péptidos en ningún horario.

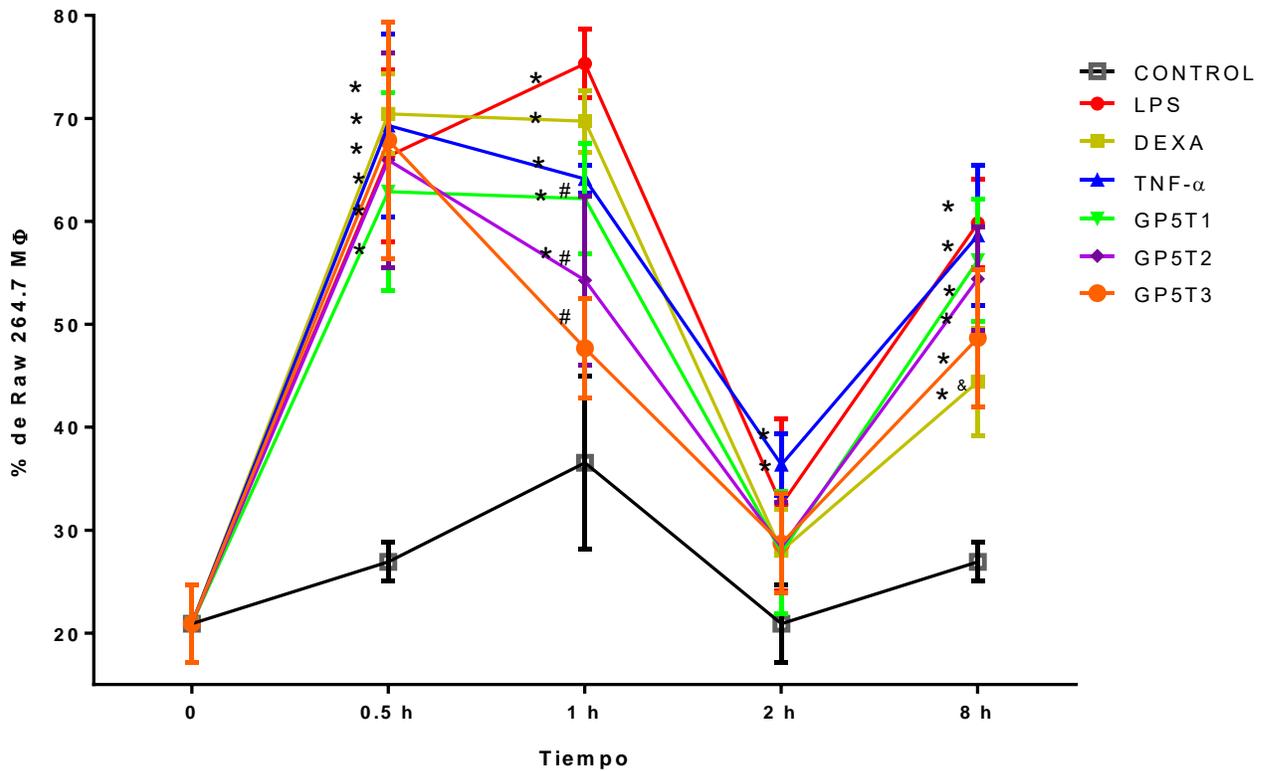


Figura 15. Activación de monocitos Raw 264.7 a Raw 264.7 M Φ a través del tiempo de acuerdo a morfología. Se utilizaron los estímulos control LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Dexametasona (DEXA) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); TNF- α (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Péptidos: GP5T1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); GP5T2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); GP5T3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se tomaron 5 fotografías de 5 campos diferentes. Se realizó conteo manual de células totales y con cambios morfológicos. Se calculó el porcentaje de M Φ . Los datos del conteo se analizaron con una ANOVA de una vía y las diferencias entre cada grupo con una prueba pos-hoc de Tukey. Los símbolos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control (*) y entre grupos (#, &).

3. Evaluación de la activación de NF-Kb

Para evaluar la activación de NF-kB en M Φ estimulados con los péptidos se generó la línea RAW-hrGFP-NF κ B. Las células RAW 264.7 fueron transfectadas con el plásmido reportero pNF-kB/hrGFP. De la transfección se obtuvieron 49 clonas policlonales, que se evaluaron por fluorescencia posterior a la adición de estímulos control: TNF- α y LPS. Después de esta evaluación, se seleccionaron 12 clonas que mostraron los valores más altos de fluorescencia con respecto a una clona sin estímulo. Estas 12 se sometieron a una segunda evaluación con los mismos estímulos y su propio control sin estimular, finalmente se conservaron seis clonas que presentaron mayor fluorescencia. Se consideraron como células monoclonales las clonas numeradas como: 9,10,11,15,16 y 23, se

criopreservaron y se nombraron RAW-hrGFP-NFκB.

La evaluación de la fluorescencia con los estímulos control y los péptidos se realizó con la clona 11 RAW-hrGFP-NFκB. En la Figura 16, se muestra la evaluación de la fluorescencia a través del tiempo, el símbolo (*) representa diferencias estadísticas en cada tiempo y con cada tipo de estímulo contra células sin estimular (Control) ($P \leq 0.05$).

Tras la estimulación con LPS se obtuvieron valores significativos de fluorescencia en comparación con el Control durante la evaluación a las 0.5, 1 y 2 hpe, con valores de 1.863, 1.83 y 1.74 URF respectivamente, y posteriormente hubo un comportamiento descendiente. TNF-α, sólo indujo valores significativos a la 1 y 2 hpe, fue éste último, el pico más alto de fluorescencia de todos los estímulos con un valor de 1.9 URF ($P \leq 0.05$).

DEXA y los péptidos GP5T1 y GP5T3, mantuvieron los valores de fluorescencia más altos que el Control durante todo el tiempo de evaluación, pero sin diferencias estadísticas. GP5T1 tuvo un comportamiento descendiente, siendo las 0.5 hpe su máxima fluorescencia. GP5T3 mostró un valor máximo de fluorescencia a la hora post- estímulo con 1.5 URF, luego descendió y tuvo un repunte a las 8 hpe con 1.2 URF. GP5T2 mostró valores de URF más bajos o similares al Control, con un pico máximo a las 2 hpe similar a GP5T1 (1.5 URF).

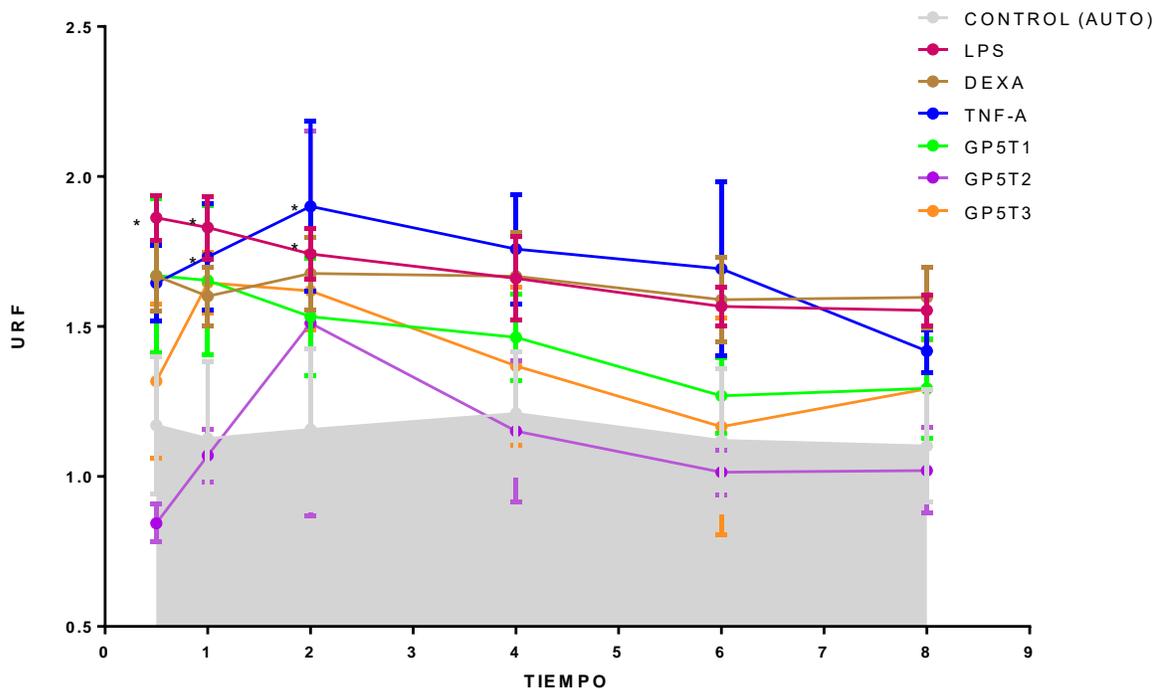


Figura 16. Evaluación de la activación de NF-κB por medio cuantificación de fluorescencia a través del tiempo después del tratamiento de MΦ RAW-hrGFP-NFκB con los estímulos control: (LPS, DEXA y TNF-α) y los péptidos: GP5T1,

GP5T2 y GP5T3. Los datos se presentan con un análisis ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Fisher. Los símbolos (*) representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al Control (sin estímulo). El área sombreada representa la autofluorescencia del control. URF: Unidades Relativas de Fluorescencia.

El hecho de no encontrar diferencias estadísticas en cuanto a los valores de RFU con respecto al Control, se le puede atribuir a que las células con las que se realizó la experimentación no provenían de un cultivo monoclonal, ya que al observarlas al microscopio no todas respondían al gen reportero de GFP tras la estimulación.

En conclusión, GP5T1 y GP5T3 fueron capaces de inducir una expresión de fluorescencia más alta que el Control, aunque no tan alta como los estímulos control LPS y TNF- α . Por lo tanto, GP5T1 y GP5T3 podrían estar relacionados con la activación de la vía NF-kB.

4. Análisis de la expresión de citocinas después de la estimulación con los péptidos.

Se cuantificó la expresión de diversas citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α 1, IFN- α 4, IFN- β 1, de M Φ de la línea celular Raw 264.7 tratados con estímulos control (LPS, DEXA y TNF- α) y los péptidos de GP5T, mediante PCR tiempo real a la hora y ocho hpe. Los datos obtenidos se normalizaron con los resultados del gen constitutivo GAPDH y se procesaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Rao *et al.* 2013) para obtener el parámetro *fold change* o veces de cambio (Ver Figura 17, 18, 19).

La Figura 17 muestra los resultados para la expresión de TNF- α . Los estímulos LPS, GP5T2 y GP5T3 indujeron un aumento en la expresión de TNF- α ($P \leq 0.05$) después de la hora de estimulación celular con respecto al control (C) sin estímulo (Figura 17, A). Por otro lado, a las 8 hpe la inducción de esta citocina solamente se incrementó con los estímulos control de LPS y TNF- α ($P \leq 0.05$) (Figura 17, a).

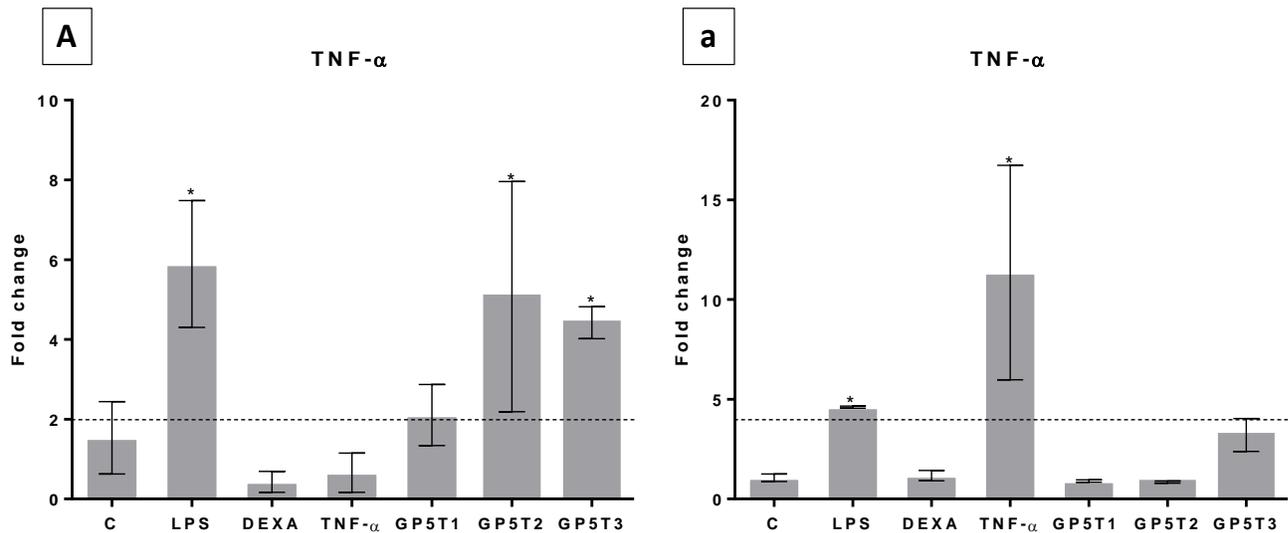
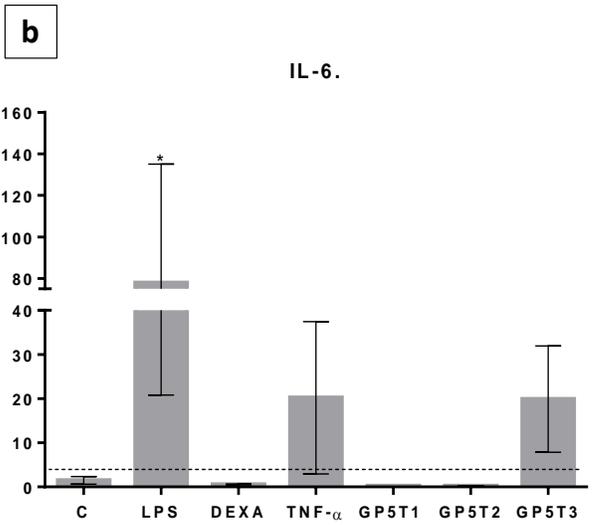
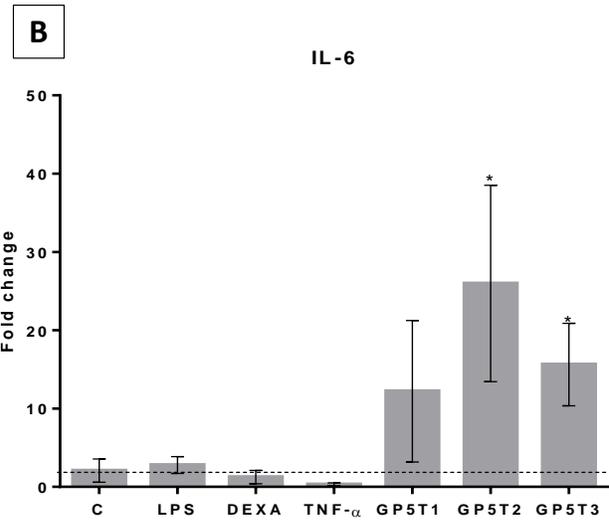
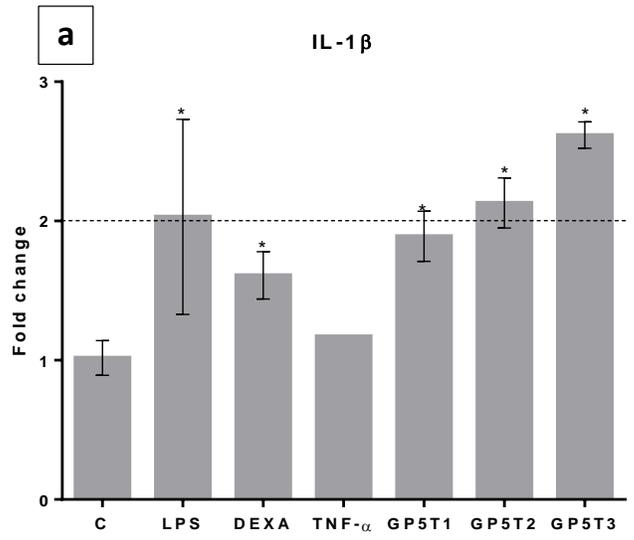
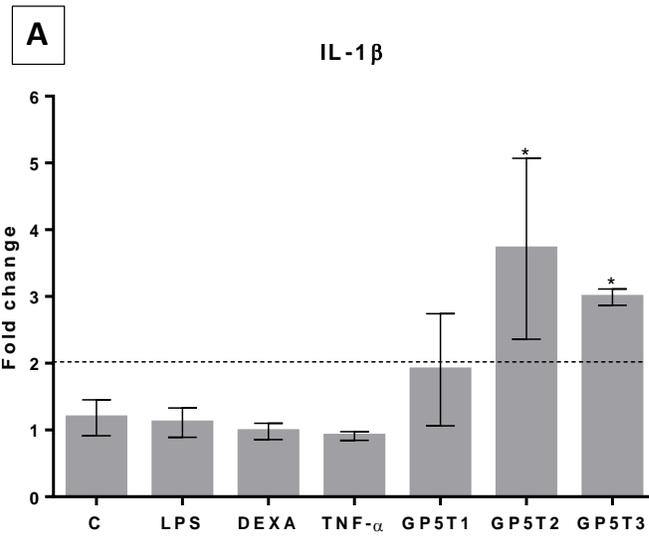


Figura 17. Expresión de TNF- α por M Φ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. La letra mayúscula corresponde a la expresión después de 1 hpe. La letra minúscula corresponde a la expresión a las 8 hpe. Se realizó una cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR, normalizado con gen constitutivo GAPDH. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Tukey. Los símbolos representan un valor de $P \leq 0.05$. con respecto al control (C).

Se evaluó la inducción de las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12 como interleucinas de función proinflamatoria, y la IL-10, de carácter antiinflamatorio. Los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron la expresión de todas las interleucinas una hora después de la estimulación, con excepción de IL-12 que solo se indujo con el estímulo de GP5T2 significativamente ($P \leq 0.05$) (Figura 18, A, B, C, D).

La inducción de la expresión de citocinas a las 8 horas está representada en las gráficas a, b, c, d de la Figura 18. En este punto IL-1 β se expresó tras la estimulación tanto de LPS como de los tres péptidos; para IL-6 se indujo la expresión con los estímulos LPS, TNF- α y GP5T3, teniendo el mismo comportamiento para IL-12. Finalmente, IL-10 se expresó en presencia de todos los estímulos control y péptidos ($P \leq 0.05$).



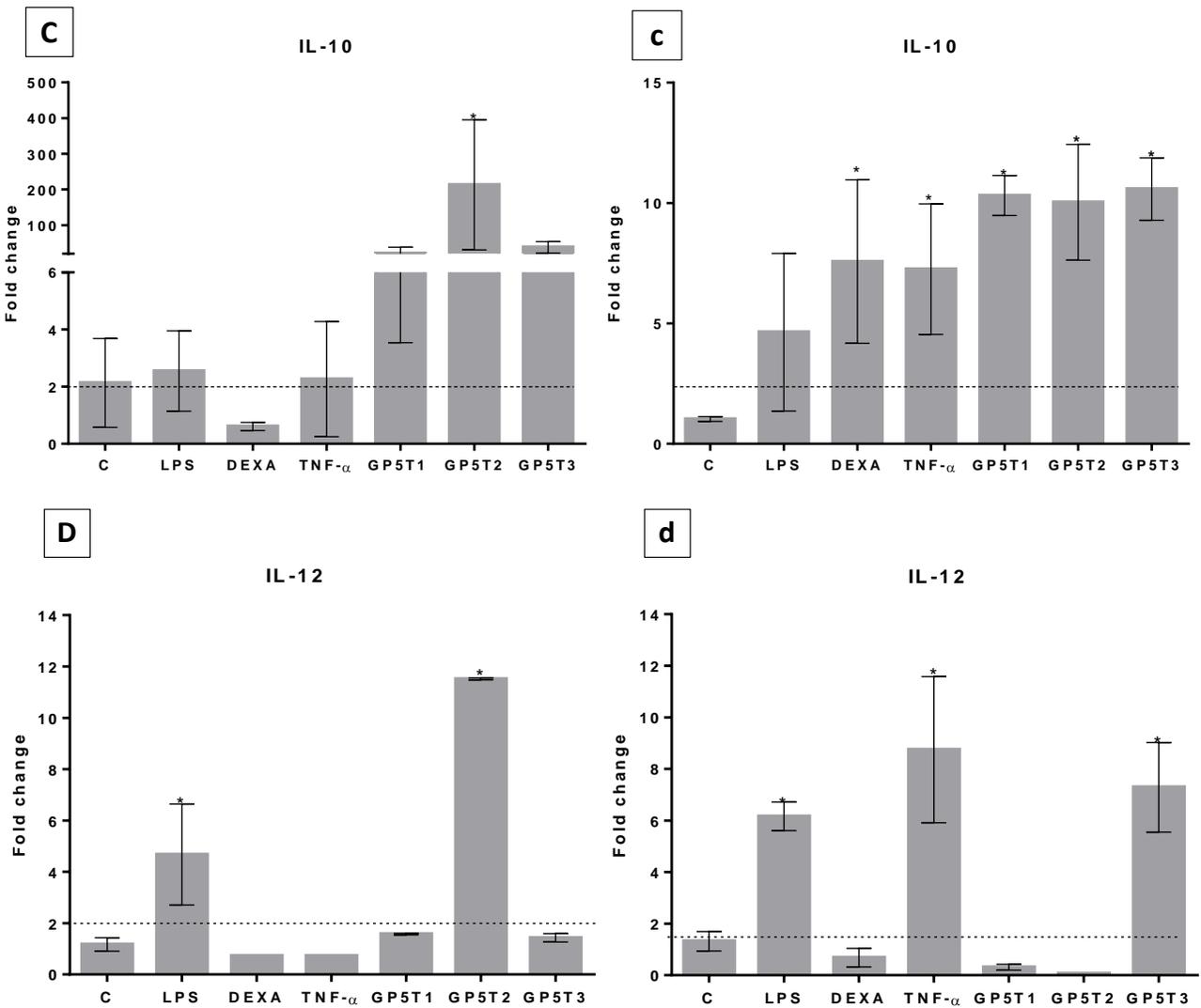


Figura 18. Expresión de Interleucinas: IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 por M Φ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. La letra mayúscula corresponde a la expresión después de 1 hpe. La letra minúscula corresponde a la expresión a las 8 hpe. Se realizó una cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR, normalizado con gen constitutivo GAPDH. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Tukey. Los símbolos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control (C).

En la Figura 19 se presentan las gráficas de la expresión de los interferones en M Φ Raw 264.7 tratados con los diferentes estímulos. Después de la hora de la adición de los estímulos, los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron a IFN- α 1 ($P \leq 0.05$) (Figura19, A). Por otro lado, los tres péptidos indujeron un aumento en la expresión de IFN- α 4 (Figura 19, B). Además, tanto los péptidos como TNF- α indujeron la expresión de IFN- β , ver Figura 19, C ($P \leq 0.05$).

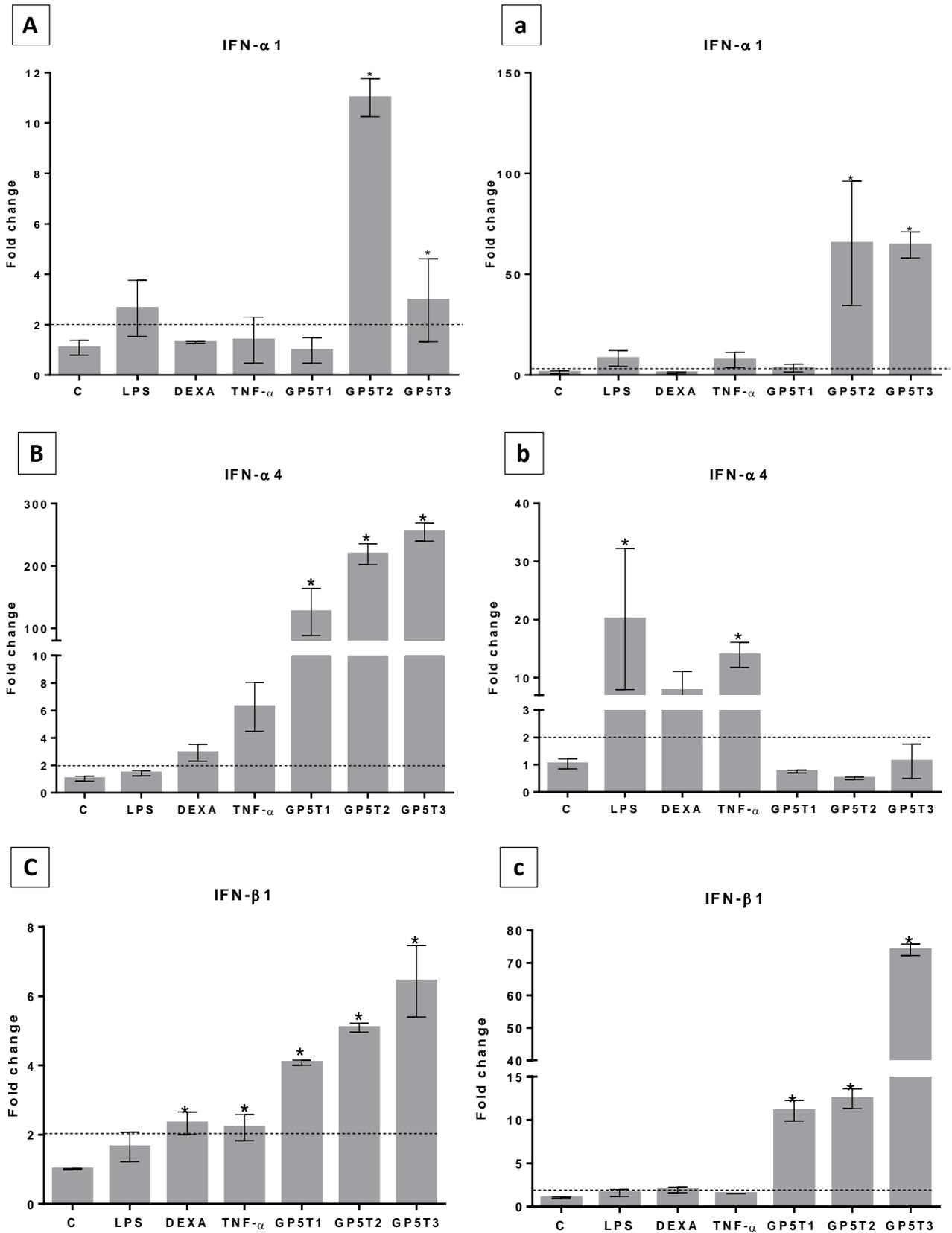


Figura 19. Expresión de Interferones: IFN- α 1, IFN- α 4, IFN- β 1 por MΦ Raw 264.7 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. La letra mayúscula corresponde a la expresión después de 1 hpe. La letra minúscula corresponde a la expresión a las 8 hpe. Se realizó una cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR, normalizado con gen constitutivo GAPDH. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Tukey. Los símbolos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control (C).

A las 8 horas de incubación, solamente los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron la expresión significativa de IFN- α 1 (Figura 18, a) ($P \leq 0.05$). Los estímulos control LPS, DEXA y TNF- α indujeron la expresión significativa de IFN- α 4 (Figura 18, b) y los tres péptidos indujeron la expresión de IFN- β 1 de manera significativa (Figura 18, c) ($P \leq 0.05$).

En resumen, se puede decir que los péptidos que indujeron una sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias son los péptidos GP5T2 y GP5T3 después de una hora de la adición del estímulo y esta sobreexpresión se mantiene con el péptido GP5T3 después de 8 horas.

X- DISCUSIÓN

Los M Φ son indispensables en la respuesta inmune adaptativa mediada por células contra PRRSV. Además, son las células diana para la infección y la replicación. El virus es capaz de alterar el estado de activación de M Φ a su favor para permitir la replicación viral, modulando las vías de señalización inmunitaria, lo que genera una respuesta inmune celular inadecuada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de los péptidos GP5T1, GP5T2 Y GP5T3, sintetizados a partir de la proteína GP5 de PRRSV, para activar M Φ alveolares de ratón.

Se tiene poca información del efecto de péptidos virales en la estimulación de monocitos murinos. Sin embargo, en monocitos porcinos, PRRSV regula la expresión de citocinas pro-inflamatorias e inhibe la expresión de interferones, principalmente IFN- γ (Ke and Yoo 2017b; Sun et al. 2012). También se sabe que el estímulo con LPS e INF- γ , antes de la infección por PRRSV, disminuye los títulos virales durante las primeras 24 horas que el macrófago aún conserva su polarización hacia el fenotipo M1. Respuesta contraria sucede cuando los monocitos porcinos son estimulados con Dexametasona hacia un fenotipo M2, lo cual aumenta la replicación viral (Longtao Wang et al. 2017).

Los M Φ activados y no activados presentan una morfología diferente dependiendo del fenotipo, M1 o M2. Los monocitos, precursores de M Φ , presentan una morfología redonda y pequeña. Wang et al., 2017, describen que los monocitos porcinos tratados con IFN- γ / LPS se diferencian en M1 y exhiben una forma alargada y grande, con numerosas proyecciones filopodiales y un núcleo pequeño. En tanto que los monocitos tratados con IL-4 se diferencian a M2 y presentan una forma redondeada grande y con proyecciones (Longtao Wang et al. 2017).

En este trabajo, se utilizaron estímulos control reportados en la literatura, como LPS y TNF- α (fenotipo M1) y Dexametasona (fenotipo M2), para inducir la polarización y activación de M Φ murinos. Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 fueron capaces de inducir un cambio morfológico de monocito a M Φ con un comportamiento similar a los estímulos LPS y DEXA. GP5T3 fue el péptido que indujo el mayor porcentaje de células activadas.

Sin embargo, basándonos únicamente en los datos del cambio morfológico es imposible distinguir entre fenotipo M1 y M2, para ello se requieren estudios más específicos. Por ejemplo, Miller y colaboradores en 2017, demostraron, mediante secuenciación de ARN, que monocitos infectados con una cepa de PRRSV altamente patógena presentaron un perfil transcriptómico correspondiente al fenotipo M2 (Miller *et al.*, 2017). Por otro lado, en 2014 Sang, Rowland y Blecha, determinaron que los diferentes fenotipos de monocitos porcinos produjeron un perfil diferente de citocinas tras la infección por PRRSV. El fenotipo M1, inducido por IFN- α e IFN- γ , indujo la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α); mientras que el fenotipo M2, inducido por IL-4, produjo IL-10. Sería importante aplicar algunas de las técnicas antes mencionadas para determinar el fenotipo que pudiesen inducir los péptidos de GP5 (Sang, Rowland, and Blecha, 2014).

La activación de la vía NF- κ B es importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. Diversos estímulos inducen la activación y la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B que induce la expresión de diferentes citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. NF- κ B se activa como mecanismo de respuesta inmune antiviral. Por lo tanto, los virus -como el dengue- han desarrollado estrategias para evadir esta respuesta, bloqueando la vía NF- κ B (Yan *et al.*, 2015).

Estudios en células infectadas con PRRSV indican que la proteína nsp2 y la proteína N pueden activar la vía de NF- κ B. Yan *et al.*, en 2015 estudiaron la activación de NF- κ B en células MARC-145 infectadas con una cepa China de PRRSV. A través de ensayos de Western Blot determinaron la sobreexpresión de p65 de NF- κ B a las 48 hpi. Además, esta sobre expresión estaba directamente relacionada con el nivel de expresión de nsp2 y N (Yan *et al.*, 2015).

Tras evaluar la activación del factor de transcripción NF- κ B en células RAW-hrGFP- NF- κ B estimuladas con los péptidos se sugiere que: los péptidos GP5T1 y GP5T3 podrían estar involucrados en la activación de NF- κ B y por lo tanto podrían inducir la expresión de citocinas proinflamatorias. Correlacionando los resultados obtenidos por Yan *et al.*, en 2015, se puede sugerir que al igual que el

PRRSV, los péptidos GP5T1 y GP5T3 podrían activar al factor NF- κ B, sin embargo, el mecanismo de activación se desconoce. La detección de la fluorescencia del gen reportero es una medición indirecta de la activación de NF- κ B. Para tener una respuesta más certera se podría evaluar directamente la activación de NF- κ B por Western Blot o evidenciando su translocación al núcleo mediante ensayos de inmunofluorescencia.

El plásmido reportero pNF- κ B-hrGFP se ha utilizado en diversos estudios. Por ejemplo, Mastropietro et al., en 2015, generaron líneas celulares, Caco-2 (ATCC ® HTB-37) y HT-29 (ATCC ® HTB-38), con expresión constitutiva del plásmido reportero y las estimularon con LPS (10 μ g/ mL), TNF- α (50 ng/mL) y IL-1 β (25 ng/mL). La evaluación de la expresión de GFP se realizó por citometría de flujo en cinéticas curso de tiempo y con los diferentes estímulos dosis-respuesta de GFP. También se evaluó por medio de inmunofluorescencia visualizando la translocación nuclear de p65 en un microscopio confocal, etiquetando las células con un anticuerpo primario anti-p65. Además, la expresión de GFP se midió hasta las 144 h posteriores al estímulo, donde la mayor expresión se registró a las 48 y 144 h para la clona Caco-2-pNF- κ B-hrGFP y de 24h para HT-29-pNF- κ B-hrGFP. En comparación, en nuestros experimentos sólo se midió la fluorescencia hasta las ocho horas, detectando el pico de expresión una hora después de la estimulación con los péptidos.

La diferencia entre las respuestas máximas de fluorescencia con un mismo plásmido se puede deber a que son líneas celulares distintas (Mastropietro et al. 2015). Sin embargo, se podría extender el tiempo de la evaluación de GFP en la línea celular RAW-hrGFP-NF κ B para asegurar la estabilidad en la expresión del gen reportero y evaluar la respuesta tras la estimulación con los péptidos en un tiempo más prolongado

En cuanto a los resultados de la expresión de citocinas y quimiocinas, los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron la expresión de citocinas proinflamatorias. El péptido GP5T3 es el que indujo una mayor expresión de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α 1, IFN- β 1 tanto a la hora como a las ocho horas post-estimulación.

Estos resultados confirman la capacidad inmunomoduladora de los péptidos reportada en otros estudios. Por ejemplo, Vashisht y colaboradores en 2008 realizaron ensayos de ELISpot (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos) en monocitos primarios aislados de cerdos infectados con PRRSV y reportaron que las secuencias correspondientes a GP5T1 y GP5T2 indujeron la

sobreexpresión de IFN- γ (Vashisht et al. 2008). Cabe destacar que GP5T3 corresponde a la unión de las GP5T1 y GP5T2 y es interesante que esta unión tenga una respuesta potenciada para la producción de citocinas inflamatorias en M Φ de ratón.

Xiao et al., en 2010 estudiaron las respuestas transcripcionales de pulmón porcino infectado con una cepa norteamericana de PRRSV mediante un sistema de expresión génica digital y secuenciación basada en etiquetas. Los resultados obtenidos sugieren que PRRSV utiliza estrategias de inducción de estados anti-apoptótico y antiinflamatorio. Al inicio de la infección, el virus interactúa con diversos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR, por sus siglas en inglés) en las células blanco, lo que desencadena la producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 β , IL-10, IL-12, que desarrollan los signos clínicos característicos de la infección. Sin embargo, se encontró una disminución en la activación de las vías de señalización del IFN tipo I. Posteriormente, el virus induce la expresión de citocinas anti-inflamatorias, como IL-10, PGE2, NFKBIA, y algunos relacionados al metabolismo de lípidos, lo que provocaría los efectos antiinflamatorios y apoptóticos (Xiao et al. 2010). En contraste con nuestros resultados, los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron la expresión de interferones de tipo I (INF- α 1 e IFN- β 1) tan pronto como a 1 hpe, así como citocinas proinflamatorias.

Proteínas de microorganismos patógenos, completas o sus fragmentos, son capaces de estimular elementos PRRs e inducir la producción de citocinas y quimiocinas. Por ejemplo, la proteína sintética rACA de 136 aminoácidos, que se encuentra naturalmente en el micelio del hongo *Antrodia camphorata*, es capaz de estimular la producción de citocinas pro-inflamatorias en M Φ peritoneales de ratón (Sheu et al. 2009).

Específicamente, rACA indujo la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, con un pico de expresión en los tiempos 1h, 8h, 2h y 8h, respectivamente (Sheu et al. 2009). En nuestros resultados, GP5T3 indujo la expresión de estas citocinas a la hora y 8 horas post estimulación. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que los péptidos sintéticos son capaces de inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias en M Φ de ratón.

Los péptidos también estimularon la expresión de IL-10, a pesar de no ser una citocina de naturaleza pro-inflamatoria. Chung et al., en 2008 mencionan que en M Φ murinos la expresión de IL-10 puede ser constitutiva, a niveles bajos, a través de la activación constitutiva de los factores de transcripción

Sp1 y Sp3, esto con el objetivo de mantener ciertos niveles de control ante estímulos de inflamación inicial.

Por otro lado, Pengal et al., en 2006 mencionan que el LPS induce la expresión de citocinas inflamatorias mediante la vía NF- κ B, pero también es capaz de inducir la regulación positiva de la expresión de IL-10 mediante la activación de la vía PI3K-Akt. Esto lo demostraron en un estudio donde los niveles de IL-10, después de la exposición a LPS, fueron más altos en los ratones con expresión específica de M Φ de Myr-Akt en comparación con los M Φ de tipo salvaje.

También Saraiva and O'Garra en 2010 realizaron una revisión acerca de la regulación de la producción de IL-10 en las células inmunes, donde mencionan que hay varios factores de transcripción involucrados en la transcripción positiva de IL-10, entre ellos: NF- κ B, CREB, p38 y ERK, presentes principalmente en las células presentadoras de antígeno (M Φ) y células T. Además, mencionan que IL-10 es una citocina pleiotrópica, que se induce en muchas situaciones junto con las citocinas proinflamatorias como un autoregulador endógeno para regular negativamente la expresión de citocinas inflamatorias (Saraiva and O'Garra 2010). Lo anterior ayuda a entender el porqué, en nuestros resultados, observamos una sobre expresión de IL-10 tras la estimulación con los péptidos y los estímulos control.

Como perspectiva, es importante estudiar el mecanismo de la vía de señalización río arriba de la vía de señalización NF- κ B tras la estimulación de los M Φ con los péptidos. Se sabe que el LPS activa el receptor TLR-4, formando un complejo con la proteína MD2 y CD14, que converge en la fosforilación de Myd88. TNF- α se une al receptor TNFR y ambos activan el factor de NF- κ B. DEXA por otra parte, atraviesa la membrana por difusión simple y se une a los Receptores Glucocorticoides que forman dímeros y se translocan al núcleo para inducir la expresión de citocinas antiinflamatorias, inhibiendo la unión del factor NF- κ B (Mastropietro et al., 2015).

Durante una infección viral, los virus ingresan a las células por endocitosis o fusión con la membrana citoplasmática. En las células se encuentran PRR's que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), así como patrones moleculares asociados a daños (DAMP, por sus siglas en inglés). Los TLR 2,3,4,7,8 y 9 son PPRs virales que se agrupan según el PAMP que reconocen. Una pregunta muy interesante es - ¿Cómo es que los péptidos de la proteína GP5 de PRRSV podrían estar siendo detectados por el macrófago para su activación? – Es posible

que los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 pudiesen ser reconocidos por los TLR2 y TLR4 que, se sabe, reconocen proteínas de la envoltura viral (Olejnik, Hume, and Mu, 2018; Saito and Michael, 2007).

Saito and Michael exponen que la activación por TLR4 puede, por un lado, desencadenar una respuesta inflamatoria excesiva dañina para el huésped cuando el receptor es sobreestimulado. Por otro lado, una activación moderada puede establecer una respuesta inmune protectora (Crisci *et al.*, 2019; Saito and Michael 2007).

En resumen, los datos de la investigación mostraron que los tres péptidos indujeron el cambio morfológico de monocito a macrófago después de 1 y 8 h de tratamiento, de manera similar a los controles LPS, DEXA y TNF- α . Los péptidos GP5T1 y GP5T3 estimularon la transcripción de hrGFP como reportero de NF- κ B, sugiriendo la participación de esta vía de señalización. Por otro lado, el péptido GP5T1 indujo la expresión significativa de INF- α 4 e IFN- β 1 después de 1h de tratamiento, y a las 8h posteriores al tratamiento indujo la expresión IL-1 β , IL-10 e IFN- β 1. Por su parte, el péptido GP5T2 indujo la expresión de todas las citocinas evaluadas después de una 1h de tratamiento y de IL-1 β , IL-10, IL-12, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8h de tratamiento. Finalmente, el péptido GP5T3, de igual manera favoreció la expresión de todas las citocinas e interferones evaluados después de 1h de tratamiento con excepción de IL-10 y después de 8h de tratamiento indujo la expresión de IL-1 β , IL-10, IL-12, INF- α 1 e IFN- β 1 después de 8 h de tratamiento. Por lo tanto, la expresión de citocinas y quimiocinas sugieren que los péptidos GP5T2 y GP5T3 favorecieron un ambiente proinflamatorio relacionado con el fenotipo M1.

En conclusión, durante una infección por PRRSV las funciones de los macrófagos se encuentran alteradas, sin embargo, los péptidos GP5T2 y GP5T3 podrían mejorar la respuesta mediada por macrófagos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Abul k. 2015. “Inmunología Celular y Molecular.” In España: Elsevier Inc.
2. Agilent Technologies. 2019. “Pathdetect En Vivo Transducción de Señales Camino Cis- Sistemas de Información Manual de Instrucciones Estados Unidos y Canadá.” 219073.
3. Amarilla, Shyrley Paola. 2015. “Reproductive and Respiratory Syndrome inmunopatogenia del PRRS : cepas de distinta virulencia del PRRSV-1.”
4. American Type Culture Collection. (10 de enero de 2020). ATCC Build 1.1.54.0 . Obtenido de ATCC Build 1.1.54.0 : <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-71.aspx#characteristics>
5. Ansari, I. H., B. Kwon, F. A. Osorio, and A. K. Pattnaik. 2006. “Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on Virus Infectivity, Antigenicity, and Ability To Induce Neutralizing Antibodies.” *Journal of Virology* 80(8): 3994–4004.
6. Arpa, Luis. 2008. “Mecanismos Moleculares Que Regulan La Activación Clásica y Alternativa En Los Macrófagos.” : 151.
7. Centre de Recerca en Sanitat Animal (cresa), UAB-IRTA. 2011. “Organized By:” 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases.
8. Chung, Elaine Y et al. 2008. “Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Mediated by the TALE Homeoproteins Pbx-1 and Prep-1.” *NIH Public Access* 27(6): 952–64.
9. Crisci, Elisa, Lorenzo Fraile, and Maria Montoya. 2019. “Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses.” *Veterinary Sciences* 6(1): 1–26.
10. Cui, J. Et al. 2016. “A GP5 Mosaic T-Cell Vaccine for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Is Immunogenic and Confers Partial Protection to Pigs.” *Vaccine Reports* 6: 77–85.
11. Columbia CP Ltd. (20 de diciembre de 2019). Culumbia. Obtenido de Culumbia: <http://www.columbiacp.com/cat/112227/Molecular-BiologySoftware/SnapGene?subcatid=112226&catspath=112226%7C112227>
12. Dwivedi, Varun et al. 2012. “Evaluation of Immune Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Pigs during Early Stage of Infection under Farm Conditions.” *Virology Journal* 9(1): 45.

13. GenScript. (10 de Enero de 2021). Peptide Handbook, A Guide to Peptide Design and Applications in Biomedical Research, First Edition. Obtenido de Peptide Handbook, A Guide to Peptide Design and Applications in Biomedical Research, First Edition: <https://www.genscript.com/peptide-handbook.html>
14. Holtkamp, Derald J et al. 2013. "Assessment of the Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on United States Pork Producers." *Journal of Swine Health and Production* 21(2): 72–84.
15. Jiang, Tingting, Bengang Xing, and Jianghong Rao. 2008. "Recent Developments of Biological Reporter Technology for Detecting Gene Expression." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25(1): 41–76.
16. Kappes, Matthew A., and Kay S. Faaberg. 2015. "PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity." *Virology* 479–480: 475–86.
17. Ke, Hanzhong, and Dongwan Yoo. 2017a. "The Viral Innate Immune Antagonism and an Alternative Vaccine Design for PRRS Virus." *Veterinary Microbiology* 209: 75–89.
18. KEGG PATHWAY Database. (13 de ENERO de 2020). KEGG PATHWAY Database. Obtenido de KEGG PATHWAY Database: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04064
19. Kolaskar, A S, and Prasad C Tongaonkar. 1990. "A Semi-Empirical Method for Prediction of Antigenic Dete ~ Inants Protein Antigens." 276(1): 172–74.
20. Laboratories, Bio-Rad. 2017. "CFX maestro[™] Software User Guide."
21. Lasswell, Harold D., Abraham Kaplan, and Ronald D. Brunner. 2017. "Macrophage Polarization Mini Review." *Power and Society: A Framework for Political Inquiry* 2: 1–295.
22. Lee, Kun Yeong. 2019. "M1 and M2 Polarization of Macrophages: A Mini-Review." *Medical Biological Science and Engineering* 2(1): 1–5.
23. Liu, Guangwei, and Hui Yang. 2013. "Modulation of Macrophage Activation and Programming in Immunity." *Journal of Cellular Physiology* 228(3): 502–12.
24. Loving, Crystal L, Fernando A Osorio, Michael P Murtaugh, and Federico A Zuckermann. 2015. "Veterinary Immunology and Immunopathology Innate and Adaptive Immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 167(1–2): 1–14.
25. Lunney, Joan K. Et al. 2016. "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System." *Annual Review of Animal Biosciences* 4(1): 129–54.

26. Mastropietro, Giuliana. 2014. “Universidad ORT Uruguay. Generación y caracterización de líneas Factor de Transcripción Nuclear Factor Kappa-B Co-Tutores: Karen Perelmuter e Inés Tiscornia.”
27. Mastropietro, Giuliana.. 2015. “HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation.” *Mediators of Inflammation* 2015.
28. Mateu, E., and I. Diaz. 2008. “The Challenge of PRRS Immunology.” *Veterinary Journal* 177(3): 345–51.
29. Miller, Laura C et al. 2017. “Comparative Analysis of Signature Genes in PRRSV-Infected Porcine Monocyte-Derived Cells to Different Stimuli.” : 1–17.
30. Montaner-Tarbes, Sergio, Hernando A. Del Portillo, María Montoya, and Lorenzo Fraile. 2019. “Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV).” *Frontiers in Veterinary Science* 6(February): 1–15.
31. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (15 de diciembre de 2019). Immune Epitope Database. Obtenido de Immune Epitope Database: <https://www.iedb.org/>
32. Olejnik, Judith, Adam J Hume, and Elke Mu. 2018. “Toll-like Receptor 4 in Acute Viral Infection : Too Much of a Good Thing.” : 1–7.
33. Parker, J.M.R., and R.S. Hodges. 1986. “New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-Ray-Derived Accessible Sites?” (1978): 5425–32.
34. Patel, Naimish R. Et al. 2012. “Cell Elasticity Determines Macrophage Function.” *Plos ONE* 7(9): 1–10.
35. Pengal, Ruma A. Et al. 2006. “Lipopolysaccharide-Induced Production of Interleukin-10 Is Promoted by the Serine/Threonine Kinase Akt.” *Molecular Immunology* 43(10): 1557–64.
36. Pérez, Francisco. 2020. Título de la tesis “Evaluación de la respuesta inmune contra subunidades proteicas del virus PRRS en un modelo murino” Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1974
37. Pileri, Emanuela, and Enric Mateu. 2016. “Review on the Transmission Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus between Pigs and Farms and Impact on Vaccination.” *Veterinary Research* 47(1): 1–13.
38. Porcheray, F. Et al. 2005. “Macrophage Activation Switching: An Asset for the Resolution of Inflammation.” *Clinical and Experimental Immunology* 142(3): 481–89.

39. QIAGEN. (8 de ENERO de 2020). QIAGEN. Obtenido de QIAGEN: <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>
40. Rao, Xiayu, Xuelin Huang, Zhicheng Zhou, and Xin Lin. 2013. “An Improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis.” *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* 3(3): 71–85.
41. SAGARPA. (2017). Fondo Sectorial de Investigación en Materias, Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos. ANEXO B. DEMANDAS ESPECÍFICAS DEL SECTOR 2017-6.
42. Saito, Takeshi, and Gale Michael. 2007. “Principles of Intracellular Viral Recognition.”
43. Sang, Yongming, Raymond R R Rowland, and Frank Blecha. 2014. “Antiviral Regulation in Porcine Monocytic Cells at Different Activation States.” 88(19): 11395–410.
44. Saraiva, Margarida, and Anne O’Garra. 2010. “The Regulation of IL-10 Production by Immune Cells.” *Nature Reviews Immunology* 10(3): 170–81.
45. Schneider, William M., Meike Dittmann Chevillotte, and Charles Rice. 2014. “Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses.” *Annual Review of Immunology* 44(3): 735–45.
46. Secretaria de Desarrollo Rural y Agroalimentario. (01 de Marzo de 2018). Coordinación General de Comunicación Social. Obtenido de Coordinación General de Comunicación Social: <http://sedrua.michoacan.gob.mx/destaca-sedrua-importancia-de-la-porcicultura-para-el-desarrollo-de-michoacan/>
47. Sheu, Fuu et al. 2009. “Purification, Cloning, and Functional Characterization of a Novel Immunomodulatory Protein from *Antrodia Camphorata* (Bitter Mushroom) That Exhibits TLR2-Dependent NF-KB Activation and M1 Polarization within Murine Macrophages.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(10): 4130–41.
48. Sica, Antonio, and Alberto Mantovani. 2012. “Plasticity and Polarization.” *Journal of Clinical Investigation* 122(3): 787–95.
49. Singleton, Helen et al. 2016. “Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1.” *Frontiers in Microbiology* 7(JUN): 1–15.
50. Singleton, Helen et al. 2018. “Infection of Monocytes with European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Strain Lena Is Significantly Enhanced by Dexamethasone and IL-10.” *Virology* 517(November 2017): 199–207.

51. Snijder, Eric J., Marjolein Kikkert, and Ying Fang. 2013. "Arterivirus Molecular Biology and Pathogenesis." *Journal of General Virology* 94(PART10): 2141–63.
52. Sun, Yan et al. 2012. "Interplay between Interferon-Mediated Innate Immunity and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Viruses* 4(4): 424–46.
53. Tang, Chao et al. 2018. "Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from Purple Sweet Potato on Lipopolysaccharide Treated RAW 264.7 Macrophages." *Journal of Food Biochemistry* 42(3): 1–11.
54. Thaa, Bastian et al. 2013. "Signal Peptide Cleavage from GP5 of PRRSV: A Minor Fraction of Molecules Retains the Decoy Epitope, a Presumed Molecular Cause for Viral Persistence." *Plos one* 8(6): e65548.
55. Truong, Ha M. Et al. 2004. "A Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Generated from an Infectious CDNA Clone Retains the in Vivo Virulence and Transmissibility Properties of the Parental Virus." *Virology* 325(2): 308–19.
56. Vashisht, Kapil et al. 2008. "Identification of Immunodominant T-Cell Epitopes Present in Glycoprotein 5 of the North American Genotype of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Vaccine* 26(36): 4747–53.
57. Vogel, Daphne Y.S. et al. 2014. "Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared." *Immunobiology* 219(9): 695–703.
58. Wang, Longtao et al. 2017a. "Porcine Alveolar Macrophage Polarization Is Involved in Inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Replication." *Journal of Veterinary Medical Science* 79(11): 1906–15.
59. Weingartl, H.M et al. 2002. "Continuous Porcine Cell Lines Developed from Alveolar Macrophages." *Journal of Virological Methods* 104(2): 203–16.
60. Wongyanin, Piya et al. 2012. "Role of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein in Induction of Interleukin-10 and Regulatory T-Lymphocytes (Treg)." *Journal of General Virology* 93(6): 1236–46.
61. Xiao, Shuqi et al. 2010. "Understanding PRRSV Infection in Porcine Lung Based on Genome-Wide Transcriptome Response Identified by Deep Sequencing." 5(6).
62. Xie, Sha et al. 2017. "Generation of an Infectious Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Virus Research* 9(5): 1–19.

63. Xing, Junji, Zheng Chai, Hinh Ly, and Yuying Liang. 2015. "Differential Inhibition of Macrophage Activation by Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Pichinde Virus Is Mediated by the Z Protein N-Terminal Domain." *Journal of virology* 89(24): 12513–17.
64. Yan, Yulin et al. 2015. "Induction of ROS Generation and NF- κ B Activation in MARC-145 Cells by a Novel Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Southwest of China Isolate." *BMC Veterinary Research*: 1–10.
65. Zeng, Nanfang et al. 2018. "Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Gene Expression Profiles in Porcine Alveolar Macrophages in Response to the Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus." *Biomed Research International* 2018: 1–23.

ANEXO I. Preparación y análisis del plásmido pNF-κB-hrGFP.

A partir de las colonias obtenidas de la transformación bacteriana se realizó la preparación del plásmido a pequeña escala para extraer el ADN plásmidico, obteniéndose las concentraciones indicadas en la tabla 8.

NO. TUBO	[ADN] ng/ μ l
1	147.1
2	131.1
3	88.0
4	108.3
5	110.7

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de ADN.

Posteriormente se realizó una Maxipreparación de plásmido con el Kit QiaGen a partir del tubo más concentrado en la extracción a pequeña escala. De esta extracción se obtuvo una concentración de 778 ng/ μ l de plásmido libre de endotoxinas. Este plásmido se utilizará para las transfecciones.

Se llevó a cabo un análisis de restricción del plásmido pNF-κB-hrGFP usando las enzimas *EcoR*I, *Bam*H1 y *Xba*I). Los fragmentos esperados visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 1Kb, los siguientes 3 corresponden a las enzimas de restricción, cuyo tamaño de los fragmentos esperados son: para *EcoR*I- 5779 nucleótidos (n), 1112n y 388n; para *Bam*H1- 4979n, 2195n y 105n; para *Xba*I-5915n y 1364n; y el último carril corresponde al control (plásmido completo sin digerir). Ver Figura 12.

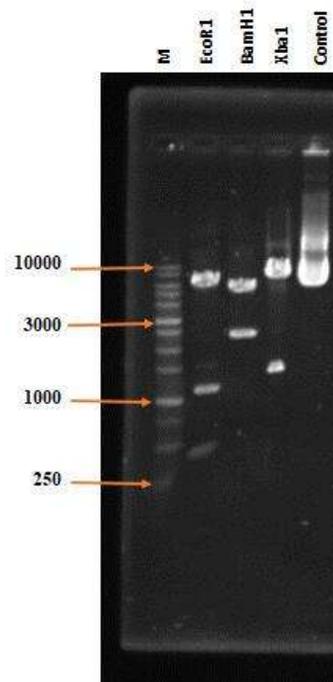


Figura 20. Digestión de pNF-κB-hrGFP.

ANEXO II. Transfección de células RAW 264.7 con el plásmido pNF- κ B-hrGFP.

Antes de la transfección se obtuvo la evaluación de la dosis mínima citotóxica celular para la línea celular Raw 264.7. Esta se realizó por un periodo de 8 días conforme la metodología descrita. Se evaluó la viabilidad celular en el día 3 para todas las concentraciones, ver Figura 13. Se encontró que para este día en las concentraciones de 200 y 400 μ g/mL no había sobrevivencia celular (Figura 13, e y f).

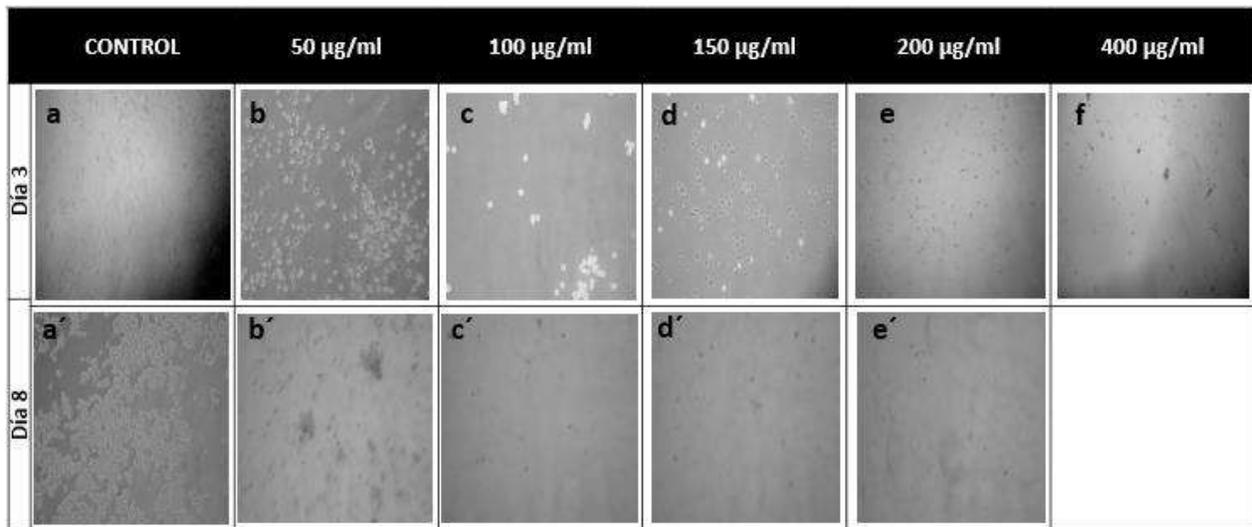


Figura 21. Selección celular con antibiótico de resistencia. **a-f**, representan las células viables al día 3 post-tratamiento. **a'-e'**, representan las células viables al día 8 post-tratamiento.

La concentración de higromicina de 100 μ g/mL fue la que se usó para la selección positiva durante 8 días de células Raw 264.7 transfectadas con el plásmido pNF- κ B-hrGFP (Figura 13, **c'**).

Después de la selección positiva con antibiótico de resistencia de las células transfectadas, se obtuvieron 2 cajas con colonias de células policlonales. La mejor condición de transfección resultante fue: 6 μ l de reactivo Lipofectamine LTX y 3.5 μ l reactivo Plus para 3.5 μ g de plásmido pNF- κ B-hrGFP en 7×10^5 células RAW 264.7/pozo en placa de 6 pozos, Ver Figura 14.

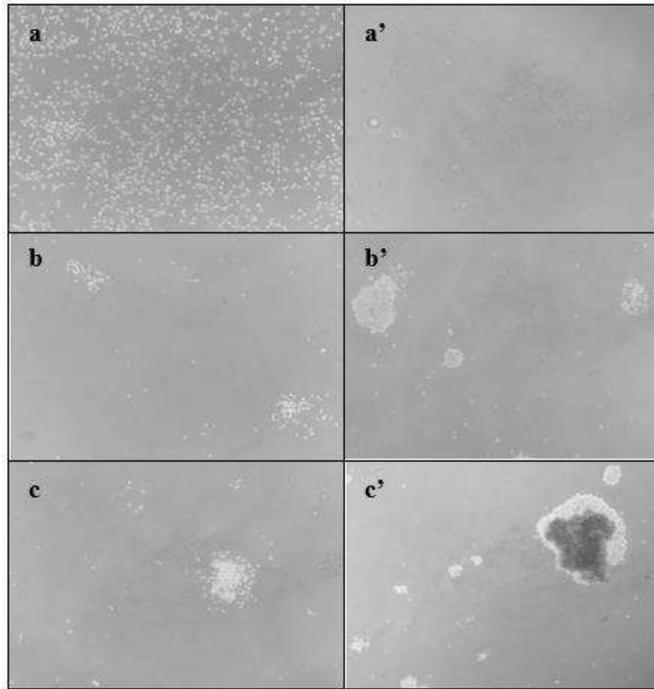


Figura 22. Transfección de células RAW 264.7 y selección con antibiótico. **a-a'**: células día 1 y 8, **b-c**: células transfectadas día 1, **b'-c'**: células transfectadas día 8; respectivamente posterior a la selección con antibiótico.

ANEXO III. Extracción de ARN por el método TRI reagent y Transcripción Reversa.

En la tabla 9 siguiente se reportan las concentraciones de ARN obtenido por caja de cultivo con los agentes estimuladores (Control: LPS, DEXA, TNF- α ., Péptidos: GP5T1, GP5T2 y GP5T3), la extracción se realizó a la 1h y 8h de incubación, posteriores a la adición del estímulo siguiendo el protocolo descrito en la metodología.

Estímulo	Muestra	ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		Volumen μl		ARN μg totales	
		1h	8h	1h	8h	1h	8h
Control	1	0.54	1.4	51	38	27.5	55.0
	2	0.87	1.9	51	39	44.6	73.0
LPS	3	0.78	1.3	51	39	40.0	52.0
	4	0.47	1.9	51	39	24.3	75.5
DEXA	5	0.47	1.8	51	39	24.1	71.7
	6	0.69	4.8	51	39	35.1	186.9
TNF- α	7	0.60	1.7	51	39	30.6	68.0
	8	0.48	1.9	51	39	24.4	74.0
GP5T1	9	0.49	1.3	51	39	24.8	49.8
	10	0.94	1.7	51	39	47.6	67.1
GP5T2	11	0.93	2.0	51	39	47.1	78.6
	12	0.62	1.8	51	39	31.6	71.1
GP5T3	13	0.75	1.9	51	39	38.3	75.0
	14	0.42	2.1	51	39	21.3	82.3

Tabla 8. Resultados de la extracción de ARN de Raw 264.7 M Φ con diferentes estímulos.

A partir del ARN total que se obtuvo de los MΦ posterior al tratamiento con cada uno de los estímulos, se usaron 6 µg de ARN de cada una de las 14 muestras para realizar la transcripción reversa. Se obtuvo una concentración promedio de ADNc de 2231.72 ng/ µl y 2587.5 ng/ µl para las extracciones de 1h y 8h respectivamente. Se realizaron diluciones de las muestras de ADNc para tener una concentración final en cada tubo por muestra de 130 ng/ µl.