



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Obtención de Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) sintético en cultivos
celulares”**

Tesis que para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

presenta:

Raúl Sánchez Vázquez

Asesor:

Doctora en Ciencias Biomédicas Rosa Elvira Nuñez Anita

Co-asesor:

Doctor en Ciencias Biomédicas Marcos Cajero Juárez

Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno del Estado de Michoacán

Morelia, Michoacán, enero 2014

Dedicatoria

A mis padres, Raúl y Rebeca con amor y respeto, porque ustedes son mi fortaleza

A mis hermanos, Edgardo, Karén, Abrahan y Gustavo

A mi familia

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Químico Farmacobiología por haberme otorgado la facilidad de continuar con mi preparación académica y por permitir conocer a gente que ha aportado demasiado en mi vida.

A la Dra. Elvira Nuñez, a quien agradezco infinitamente el apoyo brindado durante este tiempo, por su amistad, confianza, paciencia y enseñanzas, así como su acertada orientación durante mi preparación, gracias.

Al Dr. Marcos Cajero, a quien tuve el privilegio de conocer, a usted le debo gran parte de mi formación académica; además por contagiarme con su forma de trabajo. Gracias por la confianza otorgada, el apoyo brindado en este tiempo y sobre todo por su amistad.

Al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ y a los integrantes del Cuerpo Académico Microbiología y Genética Molecular, gracias por el apoyo brindado.

Al Biólogo Francisco Domínguez por sus consejos y la motivación para seguir adelante.

Al Dr. Marco A. Taneco porque de usted aprendí a trabajar con entusiasmo, dedicación, disciplina y vehemencia.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Vanessa Delgado y Samuel Armas. También a mis compañeros de los Laboratorios 2 y 4.

A la empresa Semiramex por la disposición y apoyo para conseguir la beca del CECTI.

A todos los que me brindaron su apoyo durante mi estancia en la ciudad de Morelia, en especial a la familia Delgado Guzmán.

A todos los que directa e indirectamente me han apoyado en esta etapa.

A mis padres y hermano Edgardo, con amor y gratitud, les agradezco todo su apoyo y por alentarme en la realización de mis sueños y porque siempre y ante todo están conmigo, de corazón gracias por todo...

El presente trabajo fue realizado en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de los Doctores: Rosa Elvira Nuñez Anita y Marcos Cajero Juárez. El trabajo fue parcialmente financiado por la CIC-2013 UMSNH y Landsteiner Scientific S.A. de C.V.

Raúl Sánchez Vázquez fue apoyado por el programa “Becas-Tesis para la Transferencia de Conocimientos y Tecnologías” del CECTI-Michoacán (BEC-TES/711).

"No pasar tanto tiempo pensando en algo, es mucho mejor ir y hacerlo, porque siempre hay que empezar con algo, pero para eso hay que tener un plan, una idea de hacia dónde uno quiere ir y desearlo mucho"

Mario Capecchi; Premio Nobel 2007

INDÍCE

Abstract.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 La vida en la Tierra.....	3
2.2 Dogma Central de la Biología Molecular.....	4
2.3 Reinos en que se organizan los seres vivos.....	5
2.4 Virología.....	6
2.5 Genomas y clasificación viral.....	7
3. ANTECEDENTES.....	9
3.1 Porcicultura Nacional.....	9
3.2 Enfermedades Porcinas.....	10
3.3 Circovirus Porcino.....	10
3.4 Enfermedades asociadas a Circovirus Porcino.....	11
3.5 Transmisión del PCV2.....	12
3.6 Organización morfológica y genómica del Circovirus Porcino.....	13
3.6.1 El complejo Rep.....	16
3.6.2 Replicación del PCV.....	17
3.6.3 Transcripción.....	21
3.6.4 Patogénesis.....	24

3.7 Biología Sintética.....	25
3.8 Inmunidad Animal y Vacunas.....	28
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Materiales biológicos.....	33
6.2 Metodología.....	34
6.2.1 Flujograma de la metodología.....	34
6.2.2 Aislamiento y purificación de los plásmidos.....	35
6.2.3 Obtención del PCV2 sintético.....	37
6.2.4 Transfección del genoma circular de PCV2 sintético.....	40
6.2.5 Determinación de la transfección por un gen reportero.....	40
6.2.6 Infección y propagación de PCV2 sintético.....	40
6.2.7 Inmunofluorescencia directa en células BVE-E6E7 y PK15.....	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1 Obtención del genoma circular del PCV2 sintético.....	42
7.2 Transfección del genoma circular del PCV2 sintético.....	43
7.3 Identificación del PCV2 sintético en células BVE-E6E7 y PK15.....	45
8. DISCUSIÓN.....	47

9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS.....	51
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
12. ANEXO.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dogma central de la biología molecular.....	4
Figura 2. Clasificación viral de Baltimore.....	8
Figura 3. Organización genómica del PCV.....	15
Figura 4. Modelo de la estructura de la subunidad E2 y la cápside viral.....	16
Figura 5. Modelo de replicación del PCV.....	20
Figura 6. Los RNA´s esenciales y no esenciales de PCV2.....	23
Figura 7. Estructura genómica y estrategia para la síntesis del genoma del PCV2.....	38
Figura 8. Digestión enzimática de pUC-PCV2a y pUC-PCV2b.....	42
Figura 9. Ligación del genoma circular del PCV2 sintético.....	43
Figura 10. Células BVE-E6E7 transfectadas con el plásmido pRSV-βgal.....	44
Figura 11. Inmunofluorescencia de células BVE-E6E7 transfectadas con el DNA circular de PCV2 sintético.....	46
Figura 12. Inmunofluorescencia de células infectadas con PCV2 sintético.....	46

Abstract

Disease is a constant threat to human and animal health, particularly those caused by viruses because of their aggressiveness and easy dissemination. Thanks to advances in synthetic biology is now possible to obtain large segments of DNA and assemble synthetic genes or genomes of pathogenic viruses. The common goal of this new strategy is to improve our understanding of the properties of the virus to make use of this information. For the size of its genome, particularly Porcine Circovirus type 2 is susceptible to chemical synthesis thanks to the recent advances in synthetic biology.

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a small non-enveloped virus with circular single-stranded DNA of approximately 1.7 Kb in size. PCV2 is considered the causative agent of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. Since the syndrome was recognized in Canada in 1997, this disease has become a serious problem for the pig industry in many countries including Mexico.

Therefore, and using PCV2 sequence deposited in the public database (NCBI), was synthesized the entire genome. The circular DNA molecules were infectious BVE-E6E7 transfected into cells to generate the synthetic PCV2 virus and then infecting achieve PK15 cells. Finally, obtained under laboratory conditions the virus genome which was able to replicate in and infectious BVE- E6E7 PK15 cells in cells cultured in vitro. Therefore joins PCV2 virus synthetic laboratory-generated DNA from various strategies.

This work demonstrates the potential of synthetic biology as a biotechnological tool in the study, prevention and possible development of methodologies for the treatment of viral diseases, particularly for use PCV2.

Keywords: Porcine circovirus type 2, Biotechnology and Synthetic Biology

1. RESUMEN

Las enfermedades son un riesgo constante para la salud humana y animal, particularmente las causadas por virus debido a su agresividad y fácil diseminación. Gracias a los avances de la biología sintética ahora es posible obtener grandes segmentos de DNA sintético y ensamblar genes o genomas de los virus patógenos. El objetivo común de esta nueva estrategia es mejorar nuestra comprensión de las propiedades de los virus para hacer uso de esta información. Por el tamaño de su genoma, particularmente Circovirus Porcino tipo 2, es susceptible a la síntesis química gracias al reciente avance en la biología sintética.

Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) es un virus pequeño no envuelto con DNA circular de cadena sencilla de aproximadamente 1.7 Kb en tamaño. PCV2 es considerado el agente causante del Síndrome de Perdida Multisistémica Postdestete. Desde que el síndrome fue reconocido en Canadá en 1997, esta enfermedad se ha convertido en un grave problema para la industria porcina en muchos países incluyendo a México.

Por lo anterior, y usando la secuencia del PCV2 depositada en la base de datos pública (NCBI), fue sintetizado el genoma completo. Las moléculas circulares de DNA infecciosas fueron transfectadas en células BVE-E6E7 para generar al virus PCV2 sintético y posteriormente lograr infectar a células PK15. Finalmente, se obtuvo en condiciones de laboratorio el genoma del virus el cual fue capaz de replicarse en células BVE-E6E7 e infeccioso en las células PK15 cultivadas *in vitro*. Por lo tanto PCV2 se suma a los virus sintéticos de DNA generados en laboratorio a partir de diversas estrategias.

Este trabajo demuestra el uso potencial de la biología sintética como herramienta biotecnológica en el estudio, prevención y desarrollo de posibles metodologías para el tratamiento de enfermedades virales, en particular para el PCV2.

Palabras clave: Circovirus Porcino tipo 2, Biotecnología y Biología sintética

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La vida en la Tierra

¿Qué es la vida? Resulta fácil, habitualmente, el decir si algo está vivo o no. Ello es debido a que los sistemas vivos comparten muchos atributos comunes, tales como la capacidad de mantener sus funciones, nacer, crecer y reproducirse; así como intercambiar componentes con su entorno y responder a los estímulos provenientes del mismo. La vida al igual que otros fenómenos naturales es difícil de definir de modo preciso (Madigan *et al.*, 2003).

La materia viva está constituida por un número relativamente pequeño de elementos químicos, Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fosforo y Azufre; todos los cuales forman enlaces covalentes, y que representan cerca del 92% del peso seco de los seres vivos. El resto está constituido por elementos que aparecen en cantidades traza (Voet *et al.*, 2007).

Una hipótesis, ampliamente compartida, acerca de la evolución de los sistemas que se autorreplican es la que indica que inicialmente la primeras moléculas estaban constituidas de ácido ribonucleico (RNA, del inglés ribonucleic acid). Esta idea se basa, en parte, en la observación de que algunas especies de RNA exhiben propiedades catalíticas enzimáticas. Además, como los ribosomas contienen ~ 2/3 de RNA y solamente 1/3 de proteína es razonable que los ribosomas primitivos fueron sólo RNA. Desde este punto de vista, el RNA es la sustancia primitiva de la vida, la participación del ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés deoxyribonucleic acid) y las proteínas fueron refinamientos posteriores que aumentaron la adecuación darwiniana de un sistema de autorreplicación ya establecido (Voet *et al.*, 2007).

A pesar de que los virus contienen todos los elementos que conforman la materia viva y poseen ácidos nucleicos tales como el RNA y DNA, no se consideran sistemas vivos, esto debido a que fuera de una célula no son capaces de replicarse por lo tanto son considerados parásitos obligados. El estudio de los virus es, entre otros descubrimientos, una de las piezas clave para proponer las bases fundamentales de la biología molecular tal como la conocemos hoy en día (Cann, 2005).

2.2 Dogma Central de la Biología Molecular

Los genes se perpetúan como secuencias de ácido nucleico, pero la función se manifiesta cuando se expresa en proteínas. La replicación es responsable de la transmisión de la información genética. La transcripción y la traducción son responsables de la formación de proteínas (Crick, 1970).

El dogma central de la biología molecular fue modificado cuando se descubrió que algunos virus contienen RNA en lugar de DNA en su genoma, y que son capaces de hacer una copia de DNA después de infectar con éxito una célula hospedera, es decir, usan una proteína llamada transcriptasa inversa (figura 1), una enzima que revolucionó la biología molecular (Baltimore, 1970), ya que permite obtener DNA a partir de RNA, tal como se ilustra en la figura 1.

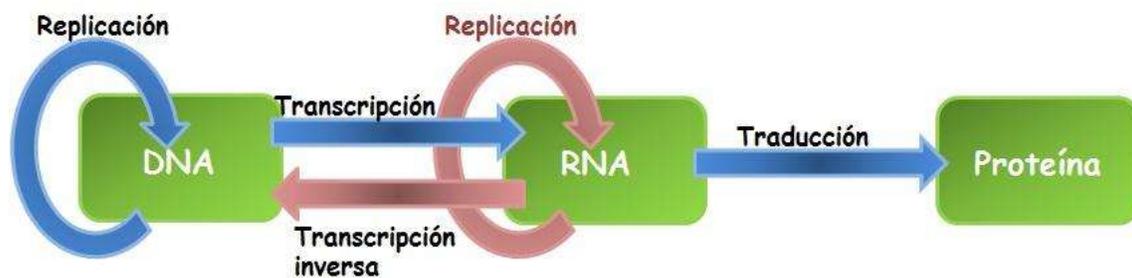


Figura 1. La expresión de la información genética celular por lo general es unidireccional, tal como lo muestra el esquema. La perpetuación de ácido nucleico puede implicar DNA o RNA como material genético. Las células utilizan sólo el DNA y algunos virus utilizan RNA. La transcripción de DNA genera moléculas de RNA que se pueden utilizar para generar secuencias de proteínas. La traducción del RNA en proteína es siempre irreversible.

Asimismo, con la finalidad de establecer una adecuada clasificación de los seres vivos, de acuerdo a sus características para adaptarse al medio ambiente, replicarse y su metabolismo, se propuso la agrupación por reinos. Como veremos a continuación, los virus forman un grupo distinto a aquellos seres con capacidad de reproducirse de forma sexual o asexual.

2.3 Reinos en que se organizan los seres vivos

En 1969 Robert H. Wittaker propuso un esquema innovador que considera la clasificación de los seres vivos en cinco reinos y que sigue vigente hasta la fecha.

Características generales de los reinos:

Reino Monera, Organismos procariontes unicelulares que obtienen nutrientes por absorción o fotosíntesis; pueden ser móviles, con pared celular y generalmente con reproducción asexual.

Reino Protista: Organismos eucariotas unicelulares que pueden absorber, ingerir o fotosintetizar sus alimentos; pueden ser móviles o sésiles y con una pared celular presente sólo en algunos tipos. La reproducción se da en forma sexual y asexual.

Reino Animalia: Organismos eucariontes multicelulares que ingieren sus alimentos y son móviles en algunos casos o sólo en una etapa de su vida. No presentan pared celular y se reproducen sexual o asexualmente.

Las células eucariotas son por lo general más grandes y estructuralmente más complejas y una característica diferencial es la presencia de orgánulos delimitados por membranas (Madigan *et al.*, 2003).

Reino Fungi: Organismos eucariontes, casi siempre multicelulares. Absorben sus alimentos y generalmente son inmóviles. Cuentan con una pared celular formada de quitina y su reproducción es tanto asexual como sexual.

Reino Plantae: Organismos eucariontes multicelulares con capacidad para fabricar sus propios alimentos a partir del fenómeno de la fotosíntesis. Generalmente son inmóviles con una pared celular de celulosa y con reproducción sexual y asexual.

Carl Woese y G. Fox, en 1977, propusieron una versión simplificada y modificada del árbol filogenético que muestra los tres Dominios o líneas primarias: *Archaea*, *Bacteria* y *Eucaria*. En línea descendente siguen seis reinos: Moneras, Archeobacterias, Protistas, Hongos, Plantas y Animales.

Para la clasificación de los virus existe un sistema formal de taxonomía viral que organiza los virus en niveles taxonómicos jerárquicos: orden, familia (y subfamilia), género y especie. El taxón familia parece particularmente útil. Los miembros de una familia de virus poseen morfología (del virión), estructura del genoma y/o estrategia de replicación distintivas. Las familias de virus tienen nombres que incluyen el sufijo *-viridae* (como *Circoviridae*) (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV).

Finalmente, los virus que constituyen una clase importante de microorganismos, no son células, por lo cual no pertenecen a ninguno de los reinos mencionados anteriormente, ya que carecen de muchos atributos de las células y se diferencian de ellas, principalmente, por la ausencia de metabolismo propio. Los virus pueden clasificarse en función de los hospedadores que pueden infectar. Así, existen virus de animales, plantas y bacterias (Koonin *et al.*, 2006). De esta manera, el campo de la microbiología donde se estudian a los virus es la virología.

2.4 Virología

La virología es considerada como un campo de la microbiología que se dedica al estudio de los virus, su clasificación, evolución, estructura, su forma de infectar, enfermedades que causan, las técnicas de aislamiento, su cultivo, además de su uso en la investigación y terapia.

Un virus es un parásito intracelular obligado e infeccioso, su genoma puede ser de DNA o RNA. El genoma viral dentro de una célula hospedera apropiada se replica y dirige la síntesis de sus componentes virales a través de los sistemas celulares (Flint *et al.*, 2004).

Las partículas virales se producen a partir de un conjunto de componentes preformados, mientras que otros agentes crecen a partir de un aumento en la suma integrada de sus componentes y se reproducen por división. Los virus carecen de la información genética que codifica aparatos necesarios para la generación de energía

metabólica o para la síntesis de proteínas (ribosomas); ellos por lo tanto, son absolutamente dependientes de la célula hospedera para esta función. Los virus dentro de células hospederas están vivos, mientras que fuera de ella son simplemente asociaciones complejas de sustancias químicas inertes metabólicamente (Cann, 2005).

Los virus se colocan dentro de la continuidad evolutiva de los agentes biológicos. En general son mucho más simples que los microorganismos más pequeños, pero en ocasiones, incluso el virus más pequeño, construido a partir de un genoma muy limitado y un solo tipo de proteína, es significativamente más complejo que otros patógenos (Villarreal y Witzany, 2010).

Los virus, en comparación con las bacterias, sólo consisten en pequeñas macromoléculas: genoma de DNA o de RNA, un limitado número de polipéptidos víricos, y si están envueltos, una capa de lípidos celulares. La partícula del Circovirus Porcino tipo 2, por ejemplo, es un icosaedro sin envoltura, construida a partir de 60 copias de la proteína de la cápside (Crowther *et al.*, 2003), que rodean una molécula de DNA cadena sencilla de 1768 nucleótidos de longitud. A pesar de su diseño básico común, los virus se producen en una desconcertante variedad de estructuras y formas. Un ejemplo de esto es el virus más grande conocido hasta ahora, el Mimivirus, él cuenta con un genoma de DNA de 1.2 Mpb (Millones de pares de bases) (Raoult *et al.*, 2004) dos veces más grande que el genoma de la bacteria *Mycoplasma genitalium*, la bacteria más pequeña (Fraser *et al.*, 1995).

2.5 Genomas y clasificación viral

En la naturaleza hay miles de viriones diferentes, pero solamente un número finito de genomas virales. Los virus pueden ser divididos en clases, cada una de las cuales tiene su propio método de transmisión de la información genética de una generación a otra y su propio estilo de expresar su información.

Existen siete tipos de genomas virales de DNA o RNA según la clasificación de Baltimore 1971 (figura 2). La composición y las estructuras de estos siete tipos de genomas virales son más variadas que cualquier genoma en los dominios *procarionota*, *archaea* o *eucariota* (Flint *et al.*, 2004).

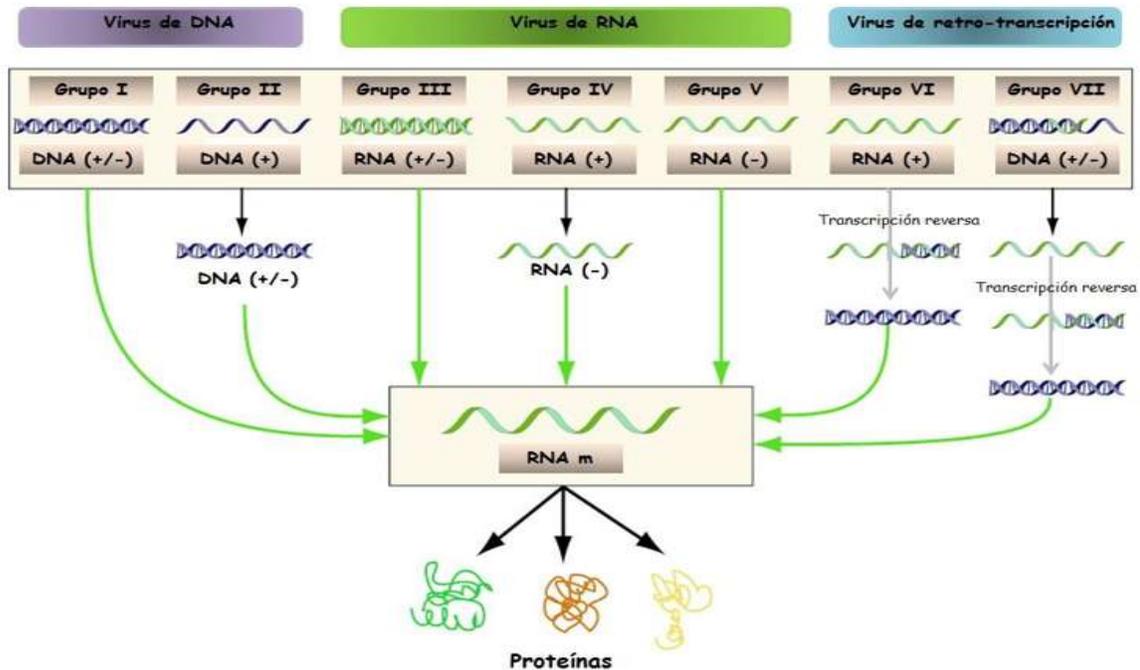


Figura 2. Clasificación viral de Baltimore, se observan 7 grupos o clases. En particular el PCV2, se clasifica en el Grupo II, debido a que su genoma viral es DNA de cadena sencilla. Tal como muestra el esquema, un virus debe generar RNA mensajero (RNAm) a partir de su genoma con el fin de generar proteínas y replicarse. Modificado de Young, 2013.

El estudio de los virus ha resultado exitoso gracias al uso de células de mamífero en cultivo *in vitro*. El cultivo de células de mamíferos comenzó a principios del siglo XX, tanto en cultivo primario, como células inmortalizadas. En 1949, John Enders y cols. fueron capaces de propagar al Poliovirus en cultivo primario de células humanas. Con esto inició la identificación y el aislamiento de muchos virus y su asociación con

las enfermedades. Además, el gran avance de la virología se ha facilitado por la inmunología y biología molecular con métodos como Pruebas de fijación de complemento, Radioinmunoanálisis, Ensayos de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Radioinmunoprecipitación, Western Blot e Inmunofluorescencia.

3. ANTECEDENTES

3.1 Porcicultura Nacional

La industria porcina es una actividad económica relevante en todo el mundo. La carne de cerdo es la más consumida a nivel mundial por encima de la carne de res y pollo. Los principales productores mundiales de carne de cerdo son China, Europa, Estados Unidos y Brasil. China es el mayor productor, generando más del doble que la Unión Europea, 5 veces más que Estados Unidos y casi 18 veces más que Brasil. Los mayores exportadores de carne de cerdo son la Unión Europea, seguida por Estados Unidos, Canadá y Brasil (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]).

En México, las exportaciones de carne de cerdo son de 36 mil toneladas y las importaciones para abastecer el consumo interno son del orden de 310 mil toneladas.

A nivel mundial, México ocupa el décimo séptimo lugar en producción de carne de cerdo (1.6 millones de toneladas anuales). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el consumo de carne *per cápita* a nivel mundial es 41 kilogramos en los últimos años y en México de 17.4 kilogramos.

La población porcina en México en el 2011 se estima en 15,547,260 cabezas porcinas. Por estado, Jalisco sobresale con 2, 267,226; Sonora 1, 671,536; Puebla 1, 246,589; Guanajuato 1,093,700 y Michoacán con 740,040 cabezas porcinas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pecuaría, [SiAP] de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, [SAGARPA]).

3.2 Enfermedades Porcinas

Actualmente, las enfermedades en porcinos se han convertido en una de las preocupaciones más importantes de los productores y autoridades sanitarias, esto debido a sus consecuencias. Las enfermedades provocan pérdidas económicas cuantiosas debido a que la producción porcícola se reduce, causando una pérdida del inventario por la despoblación. A estos efectos se suman las pérdidas indirectas como son los empleos y servicios asociados con la producción porcina (Morilla, 2003)

Los patógenos más importantes en la industria porcina, según datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), son *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hypopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Erysipelo rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella cholerasuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la pseudorabia, virus de la influenza porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la gripe porcina (SIV), parvovirus porcino (PPV), incluyendo el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) causante de las Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino.

Los patógenos asociados a enfermedades porcinas de mayor relevancia son los virus debido a su agresividad y fácil diseminación; por esta razón, el presente trabajo se centra en uno de los principales patógenos virales, el Circovirus Porcino tipo 2.

3.3 Circovirus Porcino

La familia *Circoviridae* consta de un grupo de diversos virus animales pequeños, no envueltos de cadena monomérica sencilla, son genomas circulares cerrados de DNA que se replican a través de una doble hebra intermediaria (Fauquet y Fargette, 2005).

El Circovirus Porcino fue descrito como un contaminante de la línea celular de riñón de cerdo, PK15. Estudios posteriores revelaron que se trataba de un virus muy pequeño, el cual presentaba un genoma de DNA circular, por tal motivo fue

denominado Circovirus Porcino (PCV, del inglés Porcine Circovirus) (Tischer *et al.*, 1982).

En 1997 el PCV fue asociado a una enfermedad conocida como Síndrome de Pérdida Multisistémica Postdestete (PMWS, del inglés Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) que afectaba a cerdos (Ramamoorthy y Meng, 2009). Posteriormente con la secuenciación genómica se demostró que el genotipo de PCV presente en cerdos afectados con PMWS era diferente al genotipo de PCV que contaminaba la línea celular PK15 (Hamel *et al.*, 1998). Por ello se sugirió la denominación de PCV tipo 1 (PCV1) para el circovirus asociado a la línea celular PK15 y PCV tipo 2 (PCV2) para el circovirus patógeno (Meehan *et al.*, 1998).

3.4 Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino

El término “Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino”, PCVAD (abreviatura por sus siglas en inglés de Porcine Circovirus Associated Disease) es una nueva forma de nombrar a las enfermedades producidas por PCV2, que incluye a todos los síndromes reconocidos asociados a la infección producida por dicho virus.

La PCVAD puede ser subclínica o incluir una o más manifestaciones clínicas, incluida la enfermedad Multisistémica con la pérdida de peso y la alta mortalidad. Tres signos característicos se deben considerar para diagnosticar a cerdos con PCVAD, pérdida de peso, lesiones microscópicas de pérdida linfocitaria con infiltración histiocítica y la presencia de PCV2 en las lesiones (Segalés *et al.*, 2005).

La PCVAD afecta principalmente a los cerdos en crecimiento con 7 a 16 semanas de edad. Los signos clínicos incluyen pérdida de peso, ganglios linfáticos agrandados, ictericia y falta de crecimiento. Depleción linfocítica severa y reemplazo histiocítico en los tejidos linfoides son las lesiones histológicas características. La dificultad respiratoria también se manifiesta en algunos cerdos infectados, la neumonía intersticial y la bronquiolitis con infiltración mononuclear se ven en los pulmones (Bochev, 2008). En los cerdos con diarrea, la mucosa intestinal se ve engrosada con

agrandamiento de los ganglios linfáticos mesentéricos y enteritis granulomatosa. La insuficiencia reproductiva es otra manifestación clínica de la PCVAD (Kim *et al.*, 2004). El PCV2 también ha sido incriminado como una causa potencial de dermatitis porcina y síndrome de nefritis, caracterizado por coalescencia de las lesiones de rojo a púrpura piel, glomerulares y nefritis intersticial, y vasculitis (Chae, 2005). El PCV2, sin duda, se asocia con las condiciones de la enfermedad descritas anteriormente, pero el alcance y el mecanismo de acción del PCV2 necesitan más estudios. La omnipresencia de dicho virus en poblaciones porcinas, y su relación cada vez mayor con varias condiciones de enfermedad, indican que la PCVAD es una enfermedad muy compleja, con muchas preguntas sin respuesta.

La manifestación más significativa de PCVAD es el Síndrome de Perdida Multisistémica Postdestete (PMWS) (Chae, 2004). Los signos clínicos son inespecíficos y variables. En los cerdos destetados, PMWS se caracteriza por debilitamiento, con o sin signos respiratorios, diarrea, palidez de la piel o ictericia y un marcado aumento de la mortalidad por una o varias infecciones bacterianas concurrentes (Chae, 2004). PMWS se ve a menudo en combinación con otros virus y patógenos bacterianos tales como el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV), Virus de Influenza Porcina, Parvovirus Porcino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim y Chae, 2002; Pallarés *et al.*, 2002).

3.5 Transmisión del PCV2

Se considera que la vía aerógena es la ruta más probable de transmisión natural de PCV2 entre los cerdos (Rose *et al.*, 2012). En los lechones infectados de forma natural y/o experimental se ha detectado la presencia de PCV2 en heces, orina, saliva y secreciones oculares, por lo que es probable que éstas puedan ser vías de excreción del virus y, por tanto, fuentes de contaminación (Madison y Opriessing, 2011; Segalés, 2012).

El PCV2 se localiza principalmente en las células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas foliculares (Rosell *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000). En sangre periférica se observa una disminución de linfocitos T (especialmente linfocitos CD4+ y CD8+) y linfocitos B (Darwich *et al.*, 2002; Grierson *et al.*, 2007; Darwich y Mateu, 2012; Darwich *et al.*, 2002).

3.6 Organización morfológica y genómica del Circovirus Porcino

El PCV es un virus no envuelto, de simetría icosaédrica, con un diámetro de 16-21 nm, contiene un genoma circular cerrado de cadena sencilla de DNA de 1759 a 1768 nucleótidos dependiendo del tipo, lo que lo hace uno de los virus animales más pequeños (Crowther *et al.*, 2003). Los genomas de los PCV1 y PCV2 tienen, aproximadamente, 68-76 % de identidad en su secuencia nucleotídica (Tischer *et al.*, 1982; Tischer, 1986).

Los dos principales genes presentes en el genoma viral son el gen *rep*, con 942 nucleótidos en la cadena de sentido positivo, y el gen *cap*, con 702 nucleótidos en la cadena de sentido negativo (figura 3A). El gen *rep* es altamente conservado entre PCV1 y PCV2 con aproximadamente 83% de identidad en la secuencia nucleotídica, mientras que el gen *cap* tiene aproximadamente 67-70 % de identidad (Mankertz *et al.*, 2004).

La organización genómica de los PCV1 y PCV2 es muy similar. Sus genomas poseen marcos de lectura abiertos (ORFs, de sus siglas en inglés Open Reading Frames) que codifican a tres proteínas y una región no codificante involucrada en la regulación de la transcripción y replicación del virus (Hamel, 1998). Típicamente, el origen de replicación (Ori) es representado por un tallo-bucle. El tallo es formado por el apareamiento de 11 pares de bases (pb), que son regiones con secuencias repetidas invertidas (palindrómicas). Mientras que el bucle contiene 10 nucleótidos que incluye una secuencia motivo de ocho nucleótidos ($A_1 x_2 T_3 A_4 x_5 T_6 \downarrow A_7 C_8$) (\downarrow indica el sitio de escisión) (Oc8). Una secuencia repetida directa en tándem de seis

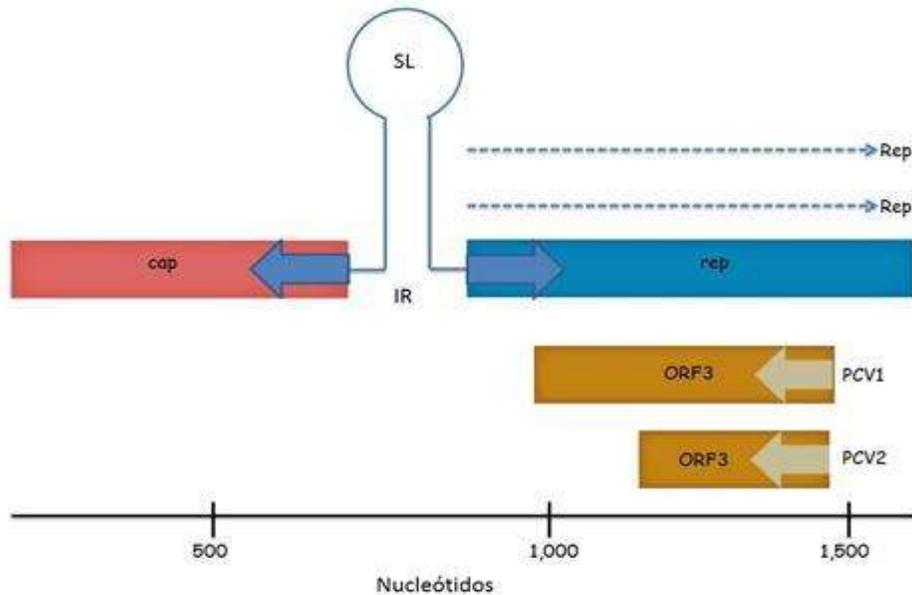
pares de bases (H1/H2) está presente en el tope con el brazo derecho de la estructura tallo-bucle (figura 3B) (Mankertz *et al.*, 2003; Cheung, 2003a).

Dos de estos marcos de lectura abiertos, ORF1 y ORF2, codifican para las proteínas esenciales para la replicación y para la conformación estructural del virus. Sin embargo, divergen en el sitio Ori (Segalés *et al.*, 2005). Los extremos 5' de estos dos ORFs están separados por la región Ori-intergénica (IR) y los extremos 3' están separados por la terminación de IR (Cheung, 2012).

El ORF1 orientada en el sentido de las agujas del reloj, codifica para dos proteínas de replicación (Rep y Rep'). En tanto, el ORF2 codifica la proteína E2 de 234 aminoácidos de la cápside (figura 3A) (Faurez *et al.*, 2009).

La proteína E2 está implicada en la formación del homopolímero de la cápside y es probable que participe en la translocación del genoma viral en el núcleo durante la replicación del virus (Liu *et al.*, 2001; Nawagitgul *et al.*, 2000). Recientemente, se informó de la estructura cristalina de una subunidad monomérica E2 y su orientación dentro de una partícula de PCV2 (Khayat *et al.*, 2011). En este modelo, 60 subunidades de E2 forman un icosaedro con simetría $T = 1$. Una reconstrucción por ordenador del monómero E2 de PCV2 y su incorporación en la cápside (Trible y Rowland, 2012) se presentan en la figura 4.

A. Organización del genoma y transcripción de genes del PCV



B. Origen de replicación (Ori) del PCV2

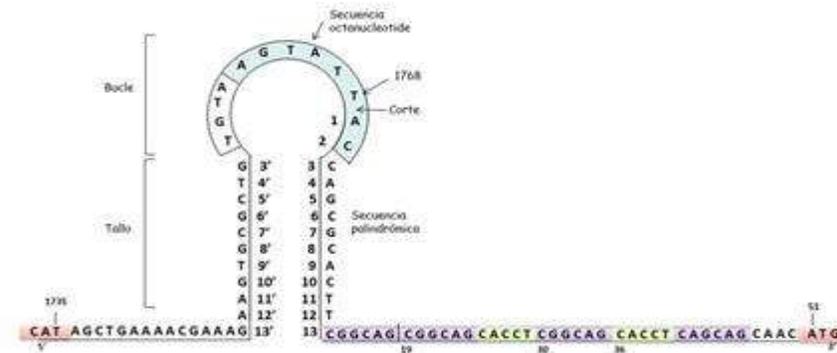


Figura 3. Organización genómica del PCV. (A). Los dos principales marcos de lectura *cap* y *rep*, se representan con cuadros y sus orientaciones de la traducción se indican con flechas. Se ilustra la estructura tallo-bucle (SL) situado en la región intergénica (IR) entre *cap* y *rep*. *Rep* se traduce de *rep* de longitud completa, mientras que *Rep'* se produce a través de splicing alternativo de la transcripción de *rep*. (B). La secuencia octanucleótide se muestra sombreada en azul. Las coordenadas de nucleótidos (nt) (1, 2, 3, 4,..., 13) se basan en la secuencia genómica real y las coordenadas de nt (3', 4', 5',..., 13') se le asigna arbitrariamente para mostrar la complementariedad de las secuencias palindrómicas que forman el tallo-bucle. La secuencia repetida directa en tándem de 6 nt (CGGCAG) y la secuencia común de 5 nt (CACCT) están en morado y amarillo, respectivamente. Los codones de iniciación de *Rep* y *E2* están en rojo. Modificado de Meng XJ, 2013 y Cheung, 2012.

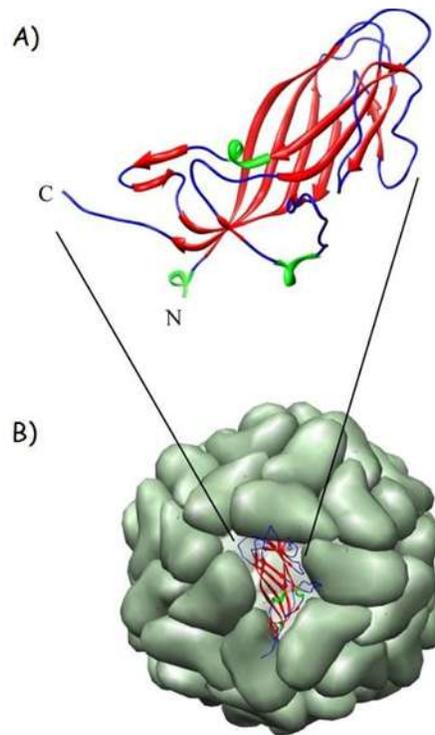


Figura 4. Modelo de la estructura de la subunidad E2 y la cápside viral. A) Estructura secundaria de la subunidad E2 con hélices, bucles y las hojas que se muestran en color verde, azul y rojo, respectivamente. B) Muestra una subunidad E2 colocada en el contexto de la cápside viral. Las restantes 59 subunidades E2 se muestran en color verde. Tomado de Tribble y Rowland 2012.

3.6.1 El complejo Rep

El gen *rep* codifica para dos proteínas esenciales en el inicio de la replicación, Rep y Rep'. Rep (312 residuos de aminoácidos) es codificada por todo el ORF1 y contiene los motivos de unión comúnmente asociados al mecanismo de Replicación del Círculo Rodante (Mankertz y Hillenbrand, 2002). Estos motivos conservados incluyen RC-I (su función es desconocida), RC-II (coordinación ión divalente), RC-III (contiene un residuo de tirosina para la introducción de un corte en la secuencia octanucleótide para la unión covalente de Ori y el extremo 5' del DNA desplazado) y P-loop (un

domino helicasa que exhibe actividad de ATPasa en la presencia de iones divalentes) (Cheung, 2012).

Rep' (168 residuos de aminoácidos) se traduce a partir de un RNA empalmado internamente de ORF1. Rep y Rep' son idénticas en la porción N-terminal, pero difieren en la porción C-terminal. Rep' contiene RC-I, RC-II y RC-III pero no P-loop (Cheung, 2012). Rep y Rep' pueden formar homo-complejos (Rep-Rep y Rep'-Rep') y hetero-complejos (Rep-Rep'). Rep y Rep' son requeridos para la replicación del DNA del PCV; el hetero-complejo Rep-Rep' es generalmente referido como el Complejo Rep (Mankertz y Hillenbrand, 2002).

3.6.2 Replicación del PCV

El PCV se replica por el mecanismo del círculo rodante (RCR, del inglés Rolling Circle Replication), este mecanismo es ampliamente utilizado en plásmidos, bacteriófagos, gemivirus de plantas, así como los virus animales (Cheung, 2006) y el proceso de replicación se lleva a cabo por enzimas celulares expresadas durante la fase S del ciclo celular del huésped. Tras la infección hay un rompimiento de la proteína de cápside que libera el genoma viral de cadena simple para ser transportado al núcleo. El modelo de la replicación del PCV se muestra en la figura 5 (Cheung, 2012).

Etapas de la replicación del PCV:

Eta 1: Conversión del genoma de cadena sencilla (ss, del inglés single strand) a cadena doble (ds, del inglés double strand)

El genoma viral inicial de cadena sencilla (ssDNA₀) se convierte en un intermediario de doble cadena (ds-RF), que después se convierte en una estructura molecular en la que la hélice se enrolla en sí misma (molécula superenrollada) y sirve como templado para la síntesis del DNA viral. La conversión del genoma de ss a ds requiere de una cadena menor como cebador para iniciar la síntesis del DNA complementario naciente.

Etapa 2: Iniciación de la replicación del DNA

La replicación del genoma del PCV requiere de la interacción del Complejo Rep (Rep-Rep') y elementos activadores en *cis* (conformación apropiada) estén presentes en el Ori, en la región de reconocimiento, sitio de unión mínimo (MBS, del inglés, minimum binding site) del genoma viral (Cheung, 2012).

Para iniciar la síntesis del genoma progenie de primera ronda (DNA₁) de sentido positivo, el Complejo Rep se une a las repeticiones directas de hexanucleótidos H1/H2 en la cadena doble (Steinfeldt *et al.*, 2007). Esta interacción induce cambios conformacionales que incluyen relajación en la secuencia octanucleótide (Oc8) situada en el bucle y así presentar características de cadena sencilla para que el Complejo Rep haga el corte de Oc8 (A₁ x₂ T₃ A₄ x₅ T₆ ↓ A₇ C₈) del ssDNA₀ entre T₆ y A₇ (Cheung, 2012; Steinfeldt *et al.*, 2007). La posición de los nucleótidos específicos es esencial para la replicación del DNA, mientras la posición indicada con x puede aceptar nucleótidos variables. En el Complejo Rep, Rep pero no Rep' desempeña un papel importante en el desenrollado de la secuencia Oc8 de cadena doble, debido a que tiene una helicasa con dominio P-loop (Cheung, 2012).

La escisión del enlace fosfodiéster entre T₆ y A₇ en el Oc8 es catalizada por ataque nucleofílico del grupo hidroxilo (-OH) de la tirosina 93 (Tyr₉₃) presente en el motivo RC-III de la proteína Rep (Steinfeldt, 2007). La actividad de corte es dependiente de cationes divalentes (función de RC-II) (Cheung, 2012).

Después de la escisión, Rep se une covalentemente al desplazado del DNA₀ con extremo 5' a través de un enlace Rep-tirosin-fosfodiéster y así generar un extremo 3'-OH libre (DNA₀-T₆-A₇-DNA₁) que sirve como cebador para la síntesis de DNA del naciente DNA₁ unidireccional (Cheung, 2012).

Cuando el Complejo Rep se une a las repeticiones directas H1/H2 en la cadena doble, se introduce una esfera de inestabilidad con los cambios conformacionales que incluyen 10 pb del bucle y 10 pb del palíndromo, SP (palindromic sequence). El bucle exhibe características de cadena sencilla para la escisión de Oc8 y el tallo de doble cadena es inducido para formar una estructura de cuatro hebras similar a la

horquilla triple. Aunque la presencia de la configuración tallo-bucle no es esencial para la escisión de Oc8, se prevé que estará en existencia durante el inicio y terminación de la síntesis de las secuencias palindrómicas de la replicación del DNA del PCV. Las cadenas de DNA permanecen en estrecha proximidad una de la otra y están yuxtapuestas en una estructura terciaria de cuatro cadenas (Cheung, 2012).

Etapa 3: Elongación

La recién generación del extremo 3'-OH (DNA₀-T₆-OH) es reconocido por la DNA polimerasa III y sirve como cebador para la síntesis de la primera ronda de DNA₁, ya que el complejo Rep no tiene actividad de polimerasa. Como la configuración de superenrollado es esencial para la iniciación de la replicación del DNA del PCV, el genoma resultante de la replicación será incapaz de iniciar otra ronda de replicación del DNA hasta que la primera ronda de la síntesis del genoma se haya completado (Cheung, 2012).

Etapa 4: Terminación de la replicación del DNA

La extensión procede hasta que la cadena temprana es completamente desplazada. Posteriormente, Rep realiza un segundo corte en el límite entre la nueva cadena y la original, donde se ha regenerado el sitio de corte. Con esto se producen dos moléculas, una de DNA de doble cadena y un monómero de cadena sencilla. Luego de una serie de eventos de corte y unión, la molécula de DNA de doble cadena (la cual contiene la cadena temprana recién sintetizada) es ligada y superenrollada por las enzimas ligasa y girasa respectivamente. El DNA de cadena sencilla que fue desplazado es convertido a DNA de doble cadena (ds-RF) para el inicio de otro ciclo de replicación. Siempre que se produce el apareamiento de bases palindrómicas para volver a establecer la estructura tallo-bucle, la reconstitución de Oc8 y terminación de la replicación de DNA comenzara a producir un genoma ssDNA₀ circular cerrado cuando la totalidad de síntesis del DNA₁ y el desplazamiento del DNA₀ viejo se ha completado (Cheung, 2012).

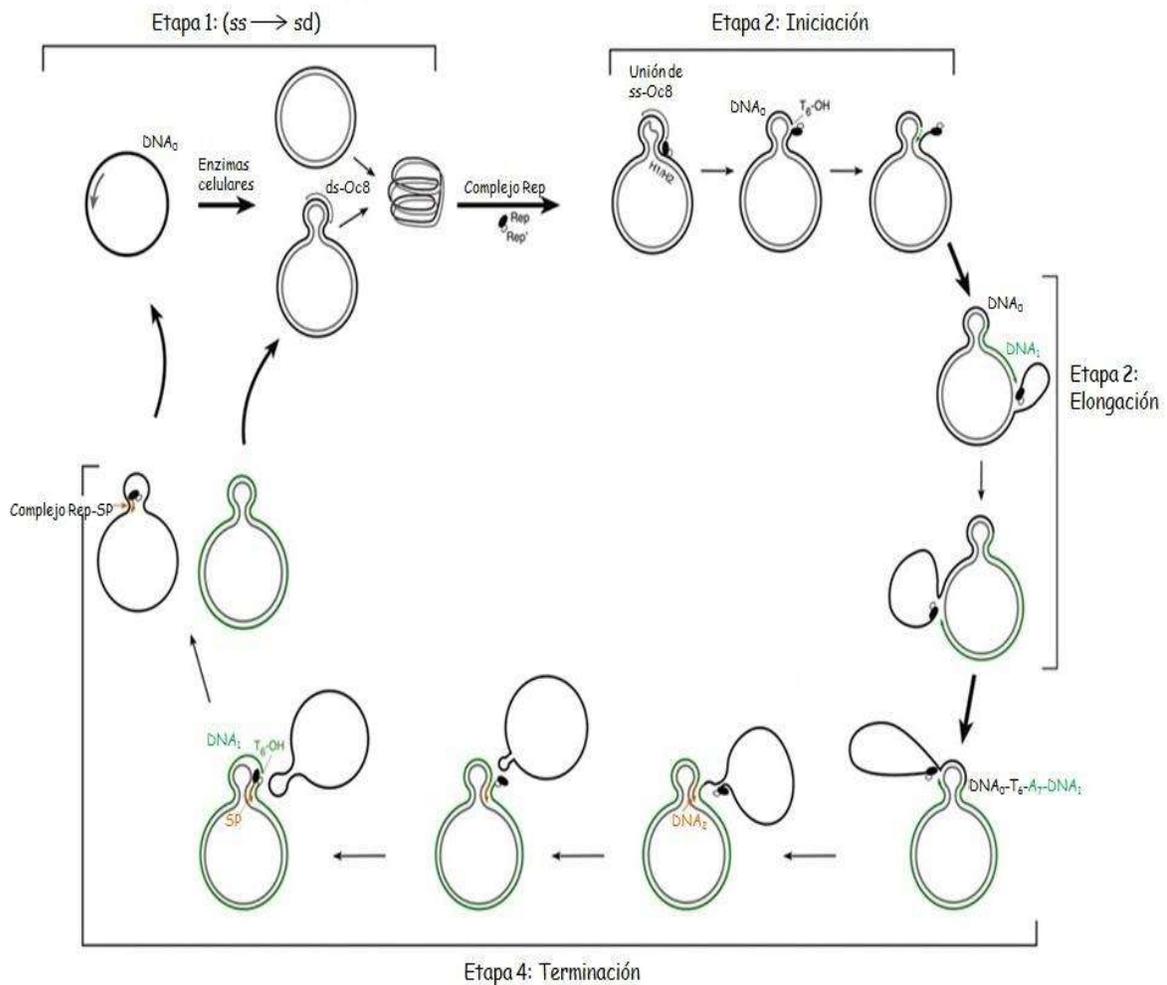


Figura 6. Modelo de replicación del PCV. El genoma viral inicial de cadena sencilla ($ssDNA_0$) está representado por un círculo negro y el genoma de hebra complementaria sintetizada en el nuevo host está representado por el círculo gris. El genoma progenie de primera ronda (DNA_1) de sentido positivo se indica en verde y la segunda ronda de ADN (DNA_2) se indica en color naranja. SP-Rep-complejo indica la molécula que sirve como molde para el inicio de la replicación y que contiene una secuencia palindrómica corta de 10-12 nt en el Ori (SP) unido covalentemente a la secuencia de la Rep-complejo (ver texto para detalles). Modificado de Cheung, 2012.

3.6.3 Transcripción

El PCV exhibe un patrón de transcripción muy complejo. La síntesis de RNA se lleva a cabo mediante enzimas celulares, después de que el genoma viral de cadena sencilla se convierte en una molécula de cadena doble en el huésped. La estrategia de transcripción es bidireccional y diversos RNAs virales se producen a través de corte y empalme alternativo. Los PCV1 y PCV2 utilizan señales de iniciación y terminación similares en las localizaciones comparables dentro del genoma viral. Sin embargo, se diferencian el uno del otro con respecto al nivel de la expresión específica de RNA, así como selección única de empalme y unión en cada uno de ellos (Cheung, 2003b).

Trece RNAs se han reportado para PCV1 y diez para PCV2 durante la replicación viral en células PK15 *in vitro* (figura 5) (Bratanich y Blanchetot, 2002). La cadena complementaria codifica para dos transcriptos, el gen *cap* que codifica para la proteína de la cápside viral (E2) y el *ORF3-RNA* que codifica una proteína asociada a apoptosis. Mientras que la función de la proteína correspondiente es la misma, ORF3 en el PCV1 es dos veces el tamaño de su homólogo en el PCV2 (Chaiyakul *et al.*, 2010; Cheung, 2012) (figura 4).

Los elementos activadores en *cis* (Sp1, TATA, ISRE y USF/MLTF), comúnmente asociados con promotores eucariotas, están presentes en el promotor del gen *cap*. De la región del gen *rep*, una agrupación de cinco RNAs asociados (Rep, Rep', Rep3a, Rep3b y Rep3c) y tres RNAs menores asociados a NS (NS515, NS672 y NS0) (NS, RNA,s no estructurales) han sido detectados (Mankertz *et al.*, 2003).

Los RNAs asociados a *rep* comparten en común las secuencias nucleotídicas 5' y 3', que indican que probablemente derivan desde la longitud completa de *rep* a través de splicing alternativo (Mankertz y Hillenbrand, 2002). Los elementos activadores en *cis* eucariotas (AP3, Sp1 y AP2) han sido observados en el promotor de *rep*. Los RNAs menores asociados a NS que comparten secuencias de nucleótidos 3' con los RNAs asociados a *rep*, es probable que sean sintetizados a partir de tres promotores diferentes (Cheung, 2012).

Los polipéptidos codificados por *rep*, *rep'*, *cap* y *ORF3-RNA* ya se conocen. Sin embargo, aún no es clara la función que desempeñan cada uno de los RNAs menores en el ciclo de vida del PCV y si codifican a proteínas. Sólo Rep y Rep' son esenciales para la replicación del DNA viral en las células de mamífero. Las proteínas asociadas a ORF3 en el PCV1 y PCV2 inducen muerte celular por apoptosis (Cheung, 2006).

Las proteínas de la cápside encapsulan al genoma viral circular de cadena sencilla para formar los viriones infecciosos y también es posible que desempeñen un papel importante en el transporte de las proteínas Rep y Rep' desde el citoplasma al interior del núcleo para facilitar la replicación del DNA del PCV (Cheung y Greenlee, 2011; Lin *et al.*, 2009).

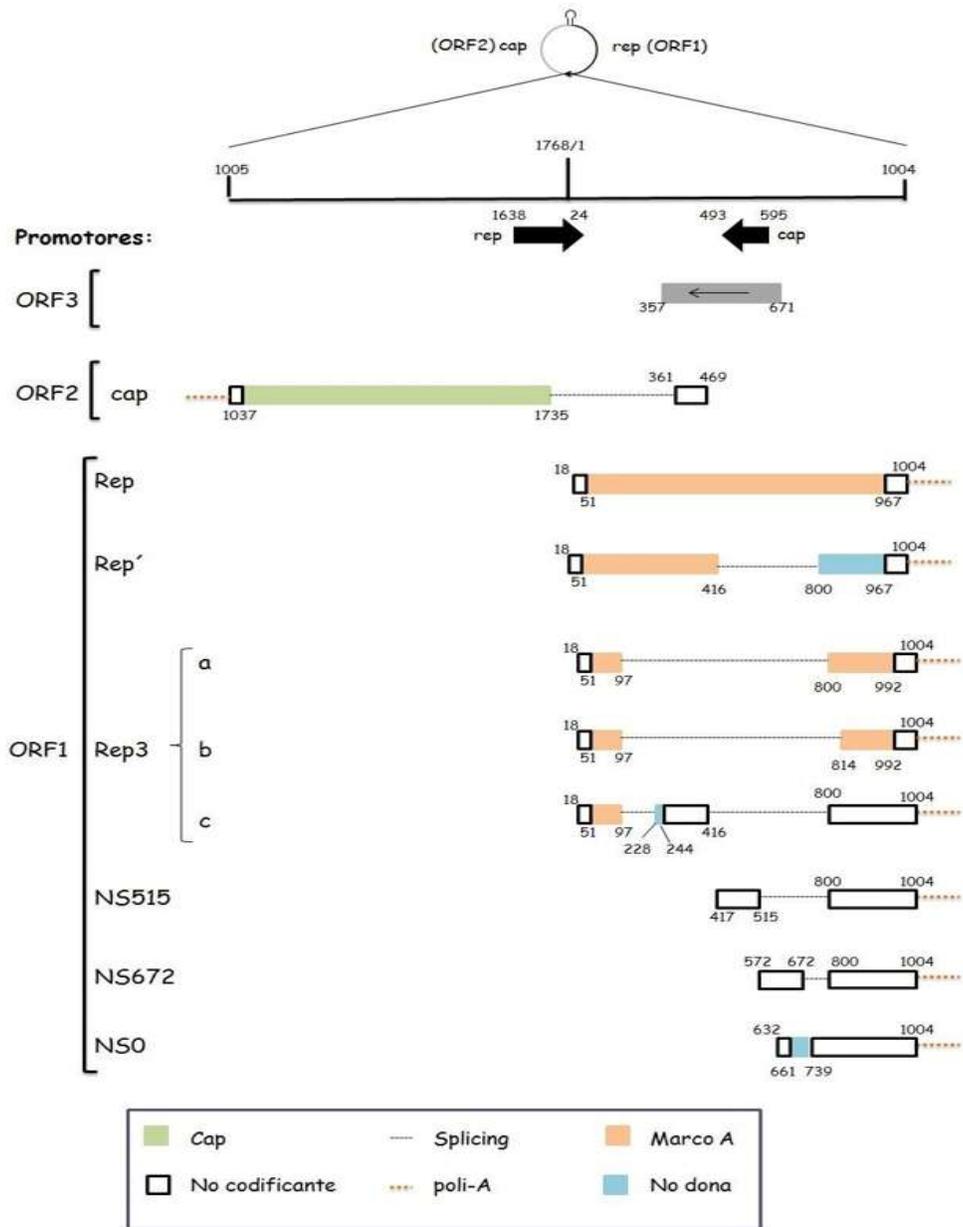


Figura 5. Los RNA's esenciales y no esenciales de PCV2. Representación esquemática del genoma de PCV2, los promotores para *rep* y *cap* (flecha negra) y los RNA's codificados por los ORF3 (orientación indicada por una flecha), ORF2 Y ORF1 se indican. Los RNA's se anotan con coordenadas nt que indican el último nucleótido de cada exón correspondiente. Modificado de Cheung, 2012.

3.6.4 Patogénesis

La identificación de la célula blanco para la replicación del PCV2 ha sido objeto de numerosos estudios. Basados en la identificación morfológica, se han detectado antígenos del PCV2 principalmente en monocitos/macrófagos y en menor medida en los hepatocitos, diferentes tipos de células endoteliales, linfocitos, células musculares, fibroblastos y neuronas (Rosell *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000).

En la etapa inicial de la infección por el PCV2, el virus se adhiere a la superficie celular. Se cree que el PCV2 utiliza un receptor celular relativamente común, porque la replicación viral y el antígeno del PCV2 han sido encontrados en los diferentes tipos celulares mencionados anteriormente (Gillespie *et al.*, 2009).

El PCV2 se une a sulfato de heparina y sulfato de condroitina, que son glicosaminoglicanos (GAGS) como un primer paso en la fijación (Misinzo *et al.*, 2006). Sin embargo, como el PCV2 se encuentra en células que carecen de GAGs, se cree que utiliza otro correceptor para la entrada viral (Gillespie *et al.*, 2009). Después de adherirse a la superficie celular, el virus es internalizado por endocitosis mediada por clatrina y la organización de actina celular. La acidificación endolisosomal aumenta la infección del PCV2 (Misinzo *et al.*, 2005), mientras que en células epiteliales la inhibición de la acidificación endolisosomal aumenta la replicación del PCV2 (Ramamoorthy y Meng, 2009).

Después de que el virus es internalizado, forma agregados en forma de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (ICIs). Posteriormente, el PCV2 se asocia estrechamente con las mitocondrias, completándose así la primera fase citoplasmática (Rodríguez *et al.*, 2011).

El virus entra al núcleo para la replicación del DNA y la encapsidación del ssDNA circular cerrado se produce en el núcleo con la participación de la membrana nuclear y no en compartimentos citoplasmáticos como se ha descrito para otros virus de ADN. La segunda fase citoplasmática se produce con el reclutamiento de los virus y la asociación con las membranas de orgánulos, incluyendo el Aparato de Golgi y el Retículo Endoplásmico Rugoso, y también son agregados en cuerpos de inclusión

intracitoplasmáticos (ICIs); con esto las partículas virales maduras pueden ser liberadas de la célula por tres diferentes mecanismos: lisis celular, gemación de ICIs y exocitosis (Rodríguez *et al.*, 2011).

De acuerdo a la información presentada en párrafos anteriores, se muestra que PCV2 a pesar de que es un virus de DNA ha adquirido la capacidad de vivir en el hospedero incluso sin causar enfermedad, pero en un momento determinado puede replicarse y provocar una variedad de enfermedades que pueden llevar a la muerte del animal infectado. Recientemente se han propuesto diversas herramientas biotecnológicas para el control de éste virus, tales como la producción de partículas virales obtenidas a través de la tecnología de DNA recombinante y de la biología sintética.

3.7 Biología Sintética

La síntesis y el análisis de la secuencia de DNA han tenido una gran contribución a la biología molecular y al surgimiento de un nuevo campo llamado biología sintética. Por mencionar un ejemplo, el primer gen funcional, tRNA supresor de tirosina con 207 pb de DNA de *Escherichia coli*, fue sintetizado en 1979 (Khorana, 1979), una hazaña que anunció una nueva era en los estudios moleculares de los sistemas biológicos. La herramienta fundamental de la biología sintética es, sin duda, la síntesis de genes (Forster y Church, 2007).

La biología sintética es el diseño y construcción de nuevas entidades biológicas, como las enzimas, circuitos genéticos y células, o el rediseño de sistemas biológicos existentes (Benner y Sismour, 2005). Tales cambios exceden los introducidos previamente en los sistemas biológicos por métodos clásicos de ingeniería molecular. La secuenciación de un DNA en el rango de una mega base (Mb, un millón de bases) ya no es una tarea de enormes proporciones. Por el tamaño del genoma de la mayoría de los virus de RNA y DNA, se puede lograr fácilmente su síntesis química (Wimmer *et al.*, 2009).

La síntesis química de los genomas virales proporciona una nueva y potente herramienta para el estudio de la función y expresión de genes virales, así como su potencial patogénico. Este método es particularmente útil si la plantilla viral natural no está disponible. También permite la modificación genética de los genomas virales en una escala que sería imposible de lograr por métodos convencionales de biología molecular (Wimmer *et al.*, 2009).

Los estudios de las partículas virales y los pasos de su ciclo de vida han impulsado nuestra comprensión de los sistemas biológicos a nivel molecular. Estos estudios, sin embargo, se basaron en muestras virales aisladas de la naturaleza. Esta dependencia cambió para siempre en 2002, cuando se publicó la síntesis química de poliovirus, un virus de RNA, en ausencia de cualquier plantilla natural (Cello *et al.*, 2002).

Los más de 2,000 virus cuyas secuencias genómicas han sido depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI (del inglés National Center for Biotechnology Information) se pueden recrear en el laboratorio en ausencia de aislados naturales (Wimmer y Aniko, 2011).

La biología sintética se esfuerza para generar nuevos sistemas biológicos que no existen en la naturaleza, principalmente para aplicaciones médicas o comerciales. La síntesis de virus de la polio (Cello *et al.*, 2002), no es un ejemplo y, de hecho, casi no cae en la categoría de la biología sintética, ya que dio lugar a virus con un fenotipo casi idéntico el modelo de virus de tipo salvaje (Wimmer y Aniko, 2011).

No es sorprendente, por lo tanto, que la síntesis *de novo* de genomas virales en la ausencia de una plantilla natural ha encontrado su camino en los estudios de los virus. La síntesis química de los genomas virales proporciona una nueva y potente herramienta para el estudio de la función y expresión de genes virales, así como su potencial patogénico. Lo anterior permite la modificación genética de los genomas virales en una escala que sería imposible de lograr por métodos convencionales de biología molecular (Wimmer *et al.*, 2009).

Hay casos en los que no existen las secuencias completas del genoma viral y por lo tanto no están disponibles para la síntesis química. Un ejemplo es la síntesis del virus de la gripe española de 1918, que causó la pandemia de gripe más grave de la historia. Aunque el virus de la pandemia no se aisló en el momento, se trabajó en un laboratorio para descifrar la secuencia del genoma utilizando fragmentos de RNA viral, de más de 100 nucleótidos de longitud, que se han preservado en los tejidos de las víctimas de la pandemia de 1918 (Tumpey *et al.*, 2005)

Hasta la fecha, los genomas completos de virus de DNA han sido montados por síntesis química. Dieciocho meses después de la síntesis del virus de la polio se describe la síntesis *de novo* del primer genoma del virus de DNA, afinando los métodos de síntesis de DNA, se completó el genoma en 2 semanas. El DNA sin editar se transformó en bacterias produciéndose bacteriófagos viables (Smith *et al.*, 2003). En el mismo sentido, la síntesis química del Bacteriófago G4 se realizó en 2011. El trabajo demuestra que un fago infeccioso puede ser sintetizado y manipulado genéticamente de acuerdo con la secuencia publicada en la base de datos, y lo suficientemente eficaz para infectar a *E. coli*, que muestra el uso potencial de la biología sintética para la aplicación médica (Yang *et al.*, 2011).

En trabajos más recientes, utilizando biología sintética y técnicas de genética inversa se han logrado generar dos patógenos, uno de ellos de importancia en salud animal, el Virus de Schmallenberg (genoma de RNA cadena sencilla de polaridad negativa) que es un *Orthobunyavirus* emergente de rumiantes asociados con brotes de malformaciones congénitas en animales abortados y mortinatos en varios países de Europa (Varela *et al.*, 2013). El otro patógeno es de importancia en salud humana, el coronavirus del síndrome respiratorio del medio oriente (MERS-CoV) que es un coronavirus emergente que infecta humanos y se asocia a neumonía aguda, insuficiencia renal ocasional y una alta tasa de mortalidad. La construcción de un clon infeccioso de DNA de longitud completa del genoma del MERS-CoV en un cromosoma artificial bacteriano, facilitará el estudio de la biología molecular del virus y desarrollar virus atenuados como posibles vacunas (Almazán *et al.*, 2013).

La biología sintética ha dado lugar al nacimiento de la virología sintética, es decir, el nuevo diseño y la síntesis de genomas de virus enteros, se ha convertido económicamente viable con las rápidas mejoras en la tecnología de síntesis de DNA. Tal libertad de diseño podría proporcionar un enorme poder para llevar a cabo el rediseño o modificación en las secuencias codificantes para estudiar el impacto de los cambios, con el objetivo de desarrollar una nueva plataforma de ingeniería genética para el diseño de vacunas (Mueller *et al.*, 2009)

Por lo tanto, con las modificaciones dentro del genoma de los virus, pueden mantener la misma estructura y codificar las mismas proteínas de replicación como el virus de tipo salvaje, pero puede ser sustancialmente desventajoso en términos de proliferación viral. Tal variante de un virus patógeno humano o animal puede entrar en el hospedero por su ruta normal y replicar mal, pero aun así permitir que el hospedero pueda montar una respuesta inmune lo suficientemente fuerte como para inducir inmunidad protectora duradera. En otras palabras, tales virus patógenos sintéticos modificados podrían servir como una vacuna.

Es de nuestro interés la producción del PCV2 sintético, mismo que serviría en primer instancia para probar inmunógenos diseñados a partir de proteínas estructurales virales, que han sido desarrolladas en nuestro laboratorio (Nuñez-Anita *et al.*, 2012), que son capaces de inducir protección contra la infección viral de PCV2. Además tener el PCV2 sintético nos permitirá conocer más sobre su biología y con esto plantear posibles estrategias para el diagnóstico y control de las enfermedades asociadas a circovirus porcino.

3.8 Inmunidad Animal y Vacunas

El sistema inmunitario surgió como parte de la evolución, para la protección de los organismos contra los agentes patógenos. Las células y moléculas responsables constituyen el sistema inmunitario y su reacción conjunta y coordinada genera la respuesta inmunitaria adaptativa. Cuando el sistema inmunitario reconoce un antígeno extraño por primera vez, se produce una respuesta inmune adaptativa.

Cuando el cuerpo se encuentra con el mismo antígeno posteriormente, se produce una respuesta inmune más fuerte. El primer estímulo antigénico es de iniciación, mientras que los estímulos posteriores son de refuerzo; este es el principio de la inmunización activa (Abbas, 2008)

La vacunación implica la exposición deliberada a un antígeno en condiciones donde la enfermedad no se desarrolle. La vacunación está dirigida a la inducción de inmunidad activa en un individuo, de modo que en contactos posteriores con el patógeno la infección natural induce una fuerte respuesta inmune protectora. La inmunidad de protección puede implicar la secreción de anticuerpos neutralizantes, producción de Linfocitos T citotóxicos de memoria o Linfocitos T CD4⁺ (Kindt *et al.*, 2007).

La vacunación hace uso del sistema inmune para combatir infecciones causadas por los patógenos. La mayor parte de los daños causados por los virus a las células durante la infección viral se produce muy tempranamente, a menudo antes de que aparezcan los síntomas clínicos de la enfermedad. Esto hace que el tratamiento a las infecciones virales sea difícil, por lo tanto, además de ser menos costoso, la prevención (vacunación) contra enfermedades causadas por los virus es sin duda la mejor alternativa. Para el diseño de vacunas eficaces, es importante conocer tanto la respuesta inmune a la infección por el virus y las etapas de la replicación del virus que son dianas adecuadas para la intervención inmunológica (Staley, 2009; Anderson, 2000). A continuación se resumen los tipos de vacunas:

Vacunas inactivadas: Este tipo de vacunas contienen virus inactivados, por lo general, mediante el tratamiento de los mismos con productos químicos, calor o irradiación. Esto causa que no puedan replicarse en absoluto. La desventaja es que la estimulación inmunitaria es pobre si se compara con las vacunas vivas (Staley, 2009).

Vacunas vivas: Estas vacunas contienen microorganismos vivos atenuados que causan una infección limitada en sus anfitriones, suficiente para inducir una respuesta inmune sin llegar a causar la enfermedad. Esto representa una ventaja

importante ya que se reproduce el ciclo infeccioso del patógeno, sin que represente peligro para el hospedero, provocando un estímulo inmunológico muy poderoso (Staley, 2009).

Vacunas de subunidades: Contienen antígenos purificados en lugar de organismos completos. Estas vacunas consisten de sólo aquellos antígenos que provocan la respuesta inmune protectora en el organismo. Pueden contener fragmentos subcelulares o antígenos de superficie. La eficacia de las vacunas de subunidades aumentó con el uso adyuvantes (Anderson, 2000).

Vacunas recombinantes: Este tipo de vacunas se producen usando la tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética. Este tipo de vacunas se logran insertando los genes para antígenos específicos en un vector, con la finalidad de lograr la expresión del antígeno utilizando diferentes sistemas de expresión, como lo son: levaduras, bacterias, células de insecto, plantas o células animales (Ma *et al.*, 2003)

Vacunas de DNA: Igual que las vacunas recombinantes, los genes para los antígenos deseados se identifican y se clonan. Posteriormente el DNA clonado se inyecta en el músculo del animal que está siendo vacunado, con la finalidad de que algunas células del músculo lo integren y expresan para generar péptidos que estimulen el sistema inmunológico. Con este tipo de vacunas se ha logrado inducir tanto la inmunidad humoral como a la inmunidad celular (Fynan *et al.*, 1993)

VLP's (del inglés virus-like particles): Son partículas no infecciosas que consisten de proteínas estructurales virales y carentes de ácido nucleico viral. Su estructura antigénica les permite inducir respuesta celular generando la aparición tanto de linfocitos T CD4⁺ como linfocitos T citotóxicos fuertes y sin la necesidad de ningún adyuvante. Estas partículas pueden activar aún más las células dendríticas (DCs), las cuales son actores esenciales en la iniciación de la respuesta inmune mediante la captura y el procesamiento de los antígenos (Crisci *et al.*, 2012)

Ingeniería de virus sintéticos atenuados: Con la biología sintética, en los genomas virales se puede introducir sesgo en el uso de codones, lo cual hace referencia a que los diferentes organismos a menudo muestran preferencias particulares para uno de

los varios codones que codifican el mismo aminoácido, por ejemplo, los codones preferidos por las bacterias son diferentes de los codones preferidos por los mamíferos, de esta manera, la alanina (codón GCC) se utiliza cuatro veces más frecuentemente que el codón sinónimo (GCG) en los seres humanos. Por consiguiente, los codones raros se asocian con una traducción de un RNAm más baja. Por lo tanto se ha demostrado que es posible explotar el fenómeno de sesgo en los codones para la síntesis de nuevos virus atenuados (Mueller *et al.*, 2009; Wimmer *et al.*, 2009; Wimmer y Aniko, 2011).

La habilidad para manipular los genomas virales ha sido durante mucho tiempo importante como un modelo para el establecimiento de sistemas moleculares, para investigar la patogénesis viral, así mismo, la producción de vacunas virales. Los métodos de biología molecular, el conocimiento de la secuencia de genomas virales y el uso de la síntesis de DNA, permiten la rápida generación y modificación de los virus, en ausencia de aislados infecciosos naturales disponibles, importantes para la salud pública.

Basados en la información presentada consideramos de suma importancia el uso de la biología sintética como una herramienta biotecnológica para en el estudio, prevención y desarrollo de posibles metodologías para el tratamiento de las enfermedades virales producidas por el PCV2 en la industria porcina, ya que dichas enfermedades tienen un impacto desfavorable en la sustentabilidad alimentaria, debido a que en México hay un alto consumo en carne de cerdo. El objetivo de común de esta nueva estrategia es contribuir en el diagnóstico, control del impacto del PCV2 y además mejorar el conocimiento de las propiedades moleculares del virus.

4. HIPÓTESIS

El empleo de la biología sintética permite obtener el genoma completo del PCV2 infectivo en cultivos celulares

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener el PCV2 sintético en cultivos de células PK15 *in vitro*

5.2 Objetivos particulares

- Generar el genoma completo y circular del PCV2
- Transfectar el genoma de PCV2 sintético en células BVE-E6E7
- Infectar las células PK15 con el PCV2 sintético
- Identificar mediante inmunofluorescencia la presencia de PCV2 sintético en las células BVE-E6E7 y PK15

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales biológicos

Cultivo celular

La línea celular PK15 (células epiteliales de riñón porcino, ATCC CCL-33) fue cultivada en medio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, Life Technologies) y la línea celular BVE-E6E7 (células endoteliales de vena umbilical de bovino, Cajero *et al.*, 2002), fue cultivada en medio F12-K (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco BRL, Life Technologies) ambos medios suplementados con suero fetal de bovino al 10% (SFB); penicilina-estreptomicina al 1% (10.000 UI/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomicina, Gibco BRL, Life Technologies). Cuando las células llegaron a confluencia, se trataron con tripsina para remover y hacer el pasaje; el conteo de las mismas se realizó con un hematocitómetro. Las células fueron mantenidas en incubadora a 37° C, con 95% de humedad relativa y 5% de CO₂.

Plásmidos

- pUC-PCV2a, (4478 pb) que contiene el genoma completo de Circovirus Porcino tipo 2, del cual a partir de él se obtendrá el fragmento grande de un tamaño de 1113 pb (F2).
- pUC-PCV2b, (3369 pb) él cual contiene el fragmento pequeño de 655 pb (F2).
- pRSVβgal (7284 pb) que contiene a la β-galactosidasa, como gen reportero, así como el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación de procariontes y el promotor LTR del Virus del Sarcoma de Rous que le permite expresarse en eucariontes.

Bacterias

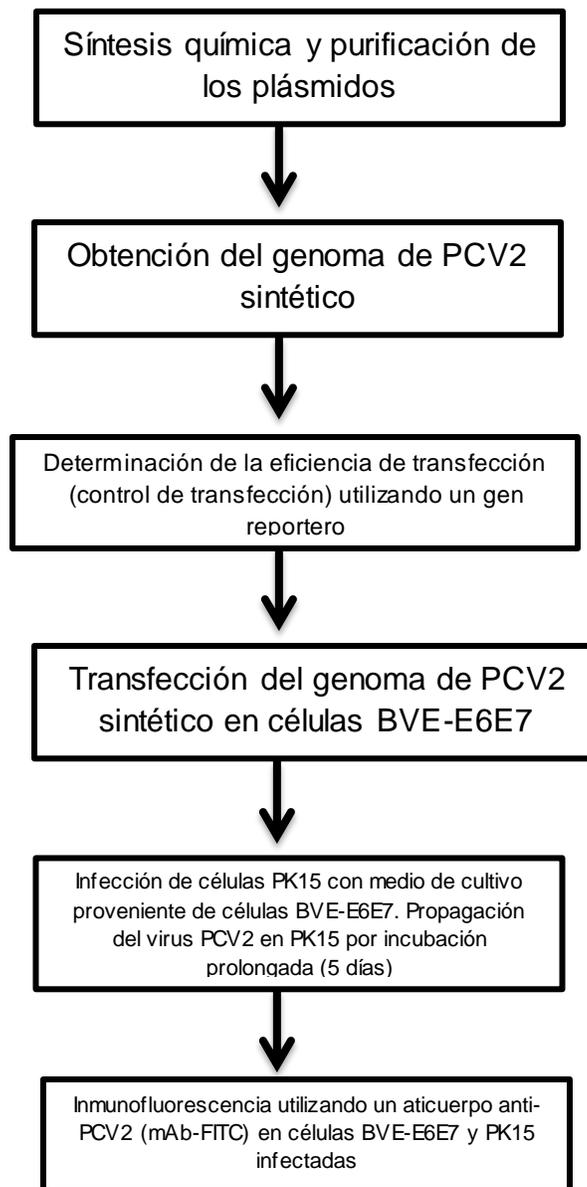
Escherichia coli cepa DH5α

Anticuerpos

Anticuerpo monoclonal anti-PCV2 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (VMRD, Inc.)

6.2 Metodología

6.2.1 Diagrama de flujo de la estrategia metodológica



6.2.2 Aislamiento y purificación de los plásmidos

Para obtener cantidades suficientes de los plásmidos pUC-PCV2a, pUC-PCV2b, pRSV β gal, se realizaron los siguientes pasos:

a) Transformación de *Escherichia coli* cepa DH5 α

La transformación bacteriana se realizó por choque térmico. Para esto se adicionaron 3 μ L del DNA plasmídico (10 ng) a 40 μ L de bacterias competentes *E.coli* DH5 α (10^6 UFC). Incubar 30 minutos en hielo. Seguido de incubación a 37 °C por 3 minutos. Inmediatamente incubar 3 minutos en hielo. A continuación se adicionan 800 μ L de medio líquido LB (Luria-Bertuani). Incubar 1 hora a 37 °C. Sembrar en placas de cultivo con medio semi-sólido LB adicionado de ampicilina (antibiótico de selección). Incubar toda la noche a 37 °C.

b) Minipreparación de DNA plasmídico

Transferir una clona de las colonias transformadas en 3 mL de medio líquido LB con ampicilina [50 mg/mL]. Incubar a 37 °C con agitación continua (180 rpm) toda la noche. Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos. Desechar el sobrenadante. Adicionar 300 μ L de solución STET (10 mM de Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 1 mM de EDTA; 5% de Triton X-100) y 5 μ L de lisozima [50 mg/mL], agitar con vortex hasta levantar la pastilla; reposar por 5 minutos. Incubar 50 segundos en agua en ebullición y centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Retirar con un palillo de madera estéril los restos de membranas bacterianas, agregar 10 μ L de solución de precipitación CTAB al 5%, mezclar por inversión y reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 300 μ L de Cloruro de Sodio (NaCl [1.2 M]); posteriormente adicionar un volumen de isopropanol y centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70 % frío. Resuspender en 60 μ L de agua.

c) Caracterización del plásmido:

Realizar digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *SmaI* y *SacI* de los plásmidos pUC-PCV2a y pUC-PCV2b. Al producto de la digestión enzimática se le realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en buffer TBE 1X. Se tiñe con bromuro de etidio 50 mg/mL. Se observan las bandas esperadas de acuerdo a las enzimas utilizadas y al plásmido a identificar.

d) Maxipreparación de DNA plasmídico

Transferir un inóculo de 1mL de bacterias transformadas a 100 mL de medio líquido LB con ampicilina a una concentración de 50 mg/mL. Incubar a 37°C con agitación continua (180 rpm) por toda la noche. Transferir el contenido a botellas y centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos. Desechar el sobrenadante. Adicionar 10 mL de la solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA). Deshacer la pastilla y reposar por 5 minutos. Adicionar 10 mL de la solución II (0.2 N de NaOH; 1 % de SDS) agitar suavemente y reposar 5 minutos. Agregar 10 mL de solución III (60 ml de acetato de potasio [5 M]; 11.5 mL de ácido acético glacial; 28.5 mL de agua) agitar y reposar 5 minutos. Filtrar con fibra de vidrio y recibir el filtrado en un tubo falcón de 50 mL, adicionar un volumen de isopropanol, homogenizar y reposar por 2 horas. Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos. Desechar el sobrenadante. Lavar la pastilla con 2 volúmenes de 750 µL de etanol al 70% frío y pasar a tubo eppendorf. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 800 µL de agua. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. Recuperar el sobrenadante y agregar 20 µL de RNAsa. Incubar a 37 °C por 1 hora. Adicionar 800 µL de PEG 8000 (polietilenglicol 8000 al 13 %; NaCl [6 M]), mezclar por inversión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70 % frío. Evaporar el etanol a temperatura ambiente. Resuspender en 1 mL de buffer TE pH7.4. Cuantificar 5 µL de DNA más 995 µl de agua en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

6.2.3 Obtención del PCV2 sintético

Para llevar a cabo la construcción del genoma del PCV2, se consideró el mecanismo de replicación de este virus, que es el mecanismo del círculo rodante (RCR). Para la replicación el genoma viral debe ser circular y en la primer etapa de replicación hay un DNA de doble cadena circular, llamado intermediario de doble cadena (ds-RF) (Cheung, 2012); por lo tanto al introducir el DNA circular sintético de doble cadena por transfección a las células se debe replicar y generar las partículas virales.

La secuencia completa del PCV2 (1768 nucleótidos) (figura 7A) reportada por Hamel y colaboradores en el año 2000 (GenBank No. de acceso: AF117753.1) se sometió a un análisis de endonucleasas de restricción en el programa NTI Vector (Invitrogen), para ubicar los sitios de restricción de corte único, los cuales son *SacI* de corte cohesivo (posición 378) y *SmaI* de corte parejo (posición 1491) (figura 7B) con las cuales se obtiene un fragmento de 1113 pb (F1) (figura 7C). El resto de la secuencia viral que falta para circularizar el genoma es un fragmento de 655 pb (F2) con los mismos sitios de corte único *SacI* y *SmaI*. Ambos fragmentos se generaron por síntesis química (GenScript) y se encuentran clonados en los vectores pUC-PCV2a y pUC-PCV2b, respectivamente (figura 7C). Los fragmentos lineales obtenidos de cada vector se utilizaron para generar el genoma completo circular del PCV2 en el sentido correcto que permita su replicación.

El F1 tiene el extremo 5' cohesivo y el extremo 3' parejo; para el F2 tanto el extremo 5' y 3' son parejos, estos tipos de extremos se generaron al cortar los vectores pUC-PCV2a y pUC-PCV2b, respectivamente, con las enzimas *SacI* y *SmaI* (figura 7B).

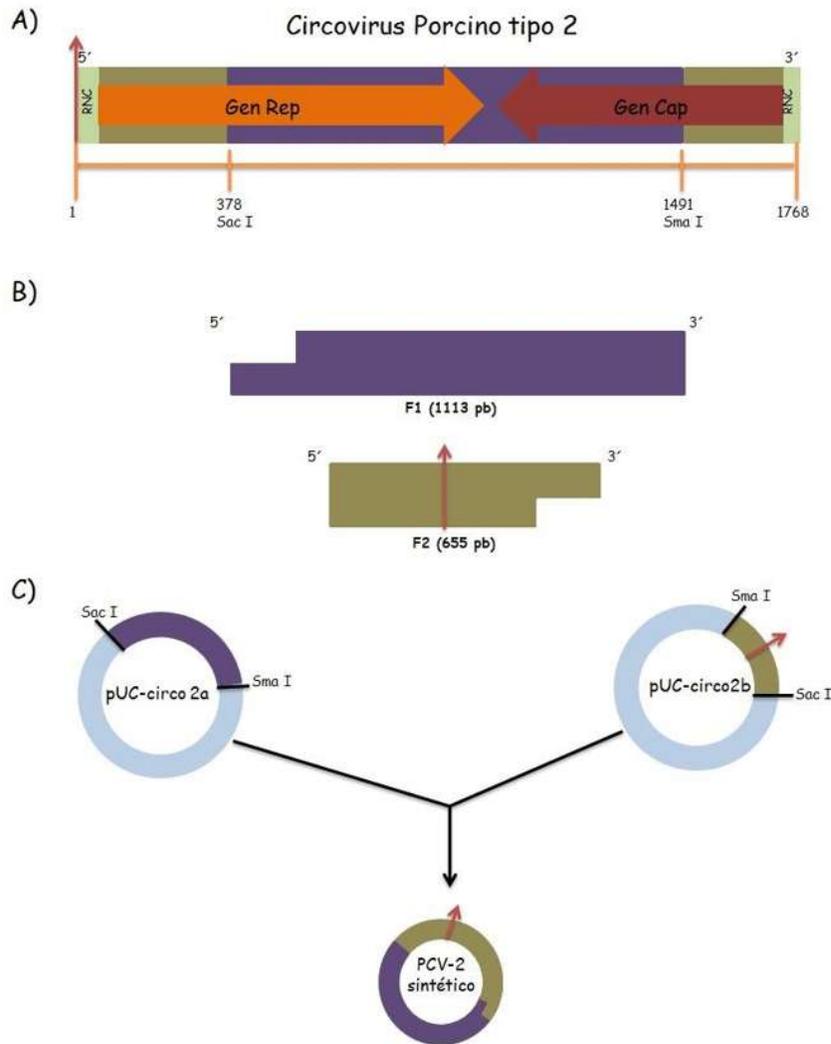


Figura 7. Estructura genómica y estrategia para la síntesis del genoma del PCV2. A) Genoma viral (representación lineal), se muestran los dos genes codificados, gen Rep con 942 nucleótidos en la cadena de sentido positivo y gen cap con 702 nucleótidos en la cadena de sentido negativo; y una región no codificante (RNC) involucrada en la regulación de la transcripción y replicación del virus. Verificación de sitios de corte de las endonucleasas de restricción de corte único en el genoma, utilizando el programa NTI Vector. B) El genoma se divide en dos fragmentos (F1 y F2) para su síntesis (análisis *In silico*). El F1 (1113 pb) tiene el extremo 5' cohesivo y el 3' parejo y F2 (659 pb) tiene el extremo 5' y 3' parejos. C) El F1 se obtendrá a partir del pUC-PCV2a y el F2 se obtendrá de pUC-PCV2b, con los sitios únicos de corte de las endonucleasas *SacI* y *SmaI* en cada vector. Se marca el Origen de replicación con una flecha roja. Las moléculas circulares de PCV2 sintético se ensamblaron a partir de las dos partes generadas.

Para obtener el F1 y F2 del genoma del PCV2 sintético, se sometió a digestión enzimática, 10 µg de cada uno de los vectores pUC-PCV2a y pUC-PCV2b con las enzimas *SacI* y *SmaI* (New England BioLabs) utilizando 10 Unidades de cada enzima, 5 µL de su buffer correspondiente en un volumen final de 50 µL, incubar a 37°C por 1 hora. Para separar los fragmentos obtenidos, el volumen total de la digestión enzimática se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) por 30 minutos, se tiñó con bromuro de etidio. Se observó en luz UV y fueron seleccionados los fragmentos adecuados, comparando con un marcador de DNA, para purificarlos.

El método de purificación consistió centrifugar el gel de agarosa que contiene el DNA a través de fibra de vidrio, la fibra de vidrio retiene los componentes no deseados. Posteriormente el volumen obtenido se afora a 120 µL con agua, se adicionó un volumen de fenol-cloroformo, seguido de agitación con vortex y centrifugación por 5 minutos a 10000 rpm, se recuperó la fase acuosa que contiene el DNA en un tubo eppendorf adicionando 1.2 µL de glicógeno [5 mg/mL], 10 % de NaCl [2M] y un volumen de isopropanol, se precipitó por almacenamiento a - 80 °C por 30 minutos; se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm y se resuspendió la pastilla en 15 µL de agua.

Se estimó la cantidad de muestra haciendo una dilución 1:10 del volumen final de la reacción y separando los fragmentos en electroforesis con gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio en buffer TBE.

La reacción de ligación del F1 y F2 del genoma del PCV2 sintético se realizó de la siguiente manera; se agregó a la mezcla de reacción 20 ng del F1 y 36 ng del F2, 1 µL del Buffer ligasa, 1 µL de T4 DNA Ligasa (40 u/µL, New England BioLabs) y 6 µL de agua. La mezcla fue incubada a 24°C durante 2 horas.

6.2.4 Transfección del genoma de PCV2 sintético

La transfección se realizó en células BVE-E6E7 utilizando 250,000 células en cajas de 35 mm en las condiciones de cultivo estándar. Después de que las células se adhirieron a la caja, se utilizó el total del producto de la ligación del genoma de PCV2 para transfectar las células con Xfect Transfection Reagent (Clontech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como controles se transfectó el vector pUC-PCV2a y así como células control negativo sin transfectar. Cinco días postransfección se colectó el medio de cultivo y se utilizó para identificar al virus mediante inmunofluorescencia en células BVE-E6E7.

Para determinar la eficiencia de la transfección, se utilizó como control positivo 1 µg del plásmido pRSVβgal en las células BVE-E6E7 y se evaluó cualitativamente la expresión del gen reportero.

6.2.5 Determinación de la transfección por un gen reportero

Después de 48 horas postransfección las células se lavaron con PBS y fijaron 15 minutos con paraformaldehído al 2 % en PBS. Se lavaron nuevamente 5 veces con PBS y se les adiciona una mezcla de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galotopiranosido (Xgal) a concentración de 5 mg/caja disuelto en solución de ferrocianuro de potasio 5 mM con MgCl₂ 2 mM y se incuban a 37°C. Las células transfectadas que expresaron el gen reportero se tiñeron de color azul, ya que recibieron el gen Lac Z que codifica para la β-galactosidasa.

6.2.6 Infección y propagación del PCV2 sintético en células PK15

El medio colectado de las células BVE-E6E7 transfectadas se utilizó para realizar la infección y propagación en las células PK15 de la siguiente manera, se sembraron 120,000 células PK15 en cajas de 60 mm, posteriormente se adicionó el medio de cultivo proveniente de las células BVE-E6E7 transfectadas. Las células infectadas se

mantuvieron en medio DMEM al 5 % de SFB durante 5 días. Posteriormente el medio fue colectado y utilizado para identificar al PCV2 sintético mediante el ensayo de inmunofluorescencia en células PK15.

3.6.7 Inmunofluorescencia directa en células BVE-E6E7 y PK15

Se sembraron células BVE-E6E7 y PK15, 50,000 células por pozo en cámaras Lab-Tek® con dos pozos (condiciones de cultivo estándar). Una vez adheridas al pozo se sustituyó el medio de cultivo por el medio colectado de las células BVE-E6E7 y PK15 respectivamente. Como control, en ambos procedimientos, las células son mantenidas con medio de cultivo al 5 % de SFB. Las células son incubadas por 48 horas bajo las condiciones estándar.

Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (SIGMA), utilizando 0.2 µg/mL, se incubó 15 minutos a 37 °C, posteriormente se lavó 2 veces con PBS, después, la monocapa de células se bloqueó y permeabilizó con el 10 % de SFB en Triton X-100 al 0.03 % por 2 horas; se lavó 2 veces con PBS para finalmente agregar el anticuerpo monoclonal anti-PCV conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (VMRD, Inc.), que no tiñe al PCV1, (dilución 1:50 en PBS Tween 0.05%) e incubó durante toda la noche a 4°C, después se retiró el exceso con 3 lavados de PBST. Para evitar la deshidratación de las células se adicionó 200 µl de glicerol al 40 % por pozo y se tomaron fotografías en el microscopio confocal OLYMPUS FLUOVIEW- FV1000.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención del genoma circular del PCV2 sintético

En pUC-PCV2a las enzimas *SacI* y *SmaI* generaron el F1 con un tamaño de 1113 pb y en pUC-PCV2b el F2 con un tamaño de 655 pb, (figura 8). Ambos fragmentos resultan orientados, ya que el fragmento F1 tiene el extremo 5' cohesivo y el extremo 3' parejo y el fragmento F2 tanto el extremo 5' y 3' son parejos (ver figura 7), de esta manera al ligar se generó el genoma circular del PCV2.

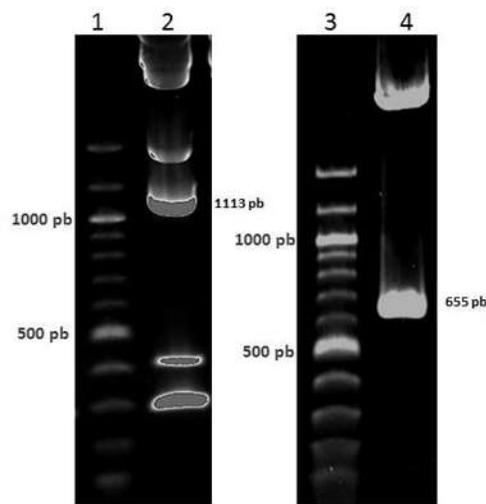


Figura 8. Digestión enzimática de pUC-PCV2a y pUC-PCV2b con *SacI* y *SmaI*. Gel de agarosa al 1 % en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 3: Marcador de DNA. Carril 2, Identificación del fragmento de 1113pb. Carril 4, Identificación del fragmento de 655 pb.

Después de la purificación y cuantificación de los fragmentos de DNA (aproximadamente 10 ng, basado en la intensidad de tinción con bromuro de etidio) de cada parte del genoma se ligaron ambos fragmentos con la T4 DNA ligasa utilizando 10 ng del F1 y 18 ng del F2, figura 9. La reacción de ligación fue terminada con extracción fenol-cloroformo.

La ligación de ambos fragmentos además de generar el genoma circular del PCV2 sintético se generaron varios tipos de ligaciones (presentándose un múltiple bandeo en la ligación, figura 9) ya que ambos fragmentos no solo se pueden ligar para

generar el genoma circular (1768 pb) sino que existen otras posibilidades de ligación, las cuales son la unión de varios fragmentos F1 y F2 en tándem, otra posibilidad es que se unan ambos fragmentos pero que no se genere el genoma circular, esta variabilidad de ligaciones se generaron por el tipo de extremos que existen en los fragmentos F1 y F2 (especificados en la sección 7.1); sin embargo estas diversas posibilidades de ligación no afectan en absoluto en la transfección, ya que la replicación del genoma viral solo se origina por la ligación de los fragmentos F1 y F2 en forma circular y esta ligación es la única que garantiza la generación de viriones infecciosos de PCV2 sintético.

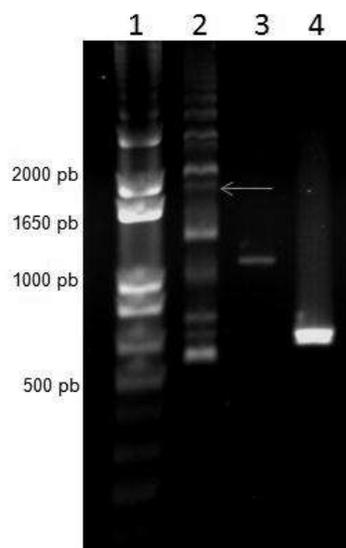


Figura 9. Ligación del genoma circular del PCV2 sintético. Gel de agarosa al 1 % en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de ADN. Carril 2, Ligación del fragmento de 1113 pb con el fragmento de 655, se muestra una banda de 1768 pb que corresponde al genoma completo del virus (indicado con flecha). Carril 3, fragmento de 1113pb independiente. Carril 4, fragmento de 655 pb independiente.

7.2 Transfección del genoma circular del PCV2 sintético

El producto total de la ligación de los fragmentos F1 y F2 se utilizó para transfectar a las células BVE-E6E7 con el reactivo Xfect Transfection. Como control positivo y para determinar de forma cualitativa la eficiencia de la transfección, se transfectó de

forma transitoria el gen reportero β -galactosidasa, bajo las mismas condiciones que se utilizaron para la transfección del genoma viral del PCV2 sintético. En la figura 10 se muestra que la transfección del gen reportero fue eficiente por el número de células que se tiñen de color azul; de esta manera se garantiza que la transfección transitoria del genoma viral del PCV2 sintético fue correcta y se generaron los viriones del virus para posteriormente ser identificados mediante inmunofluorescencia.

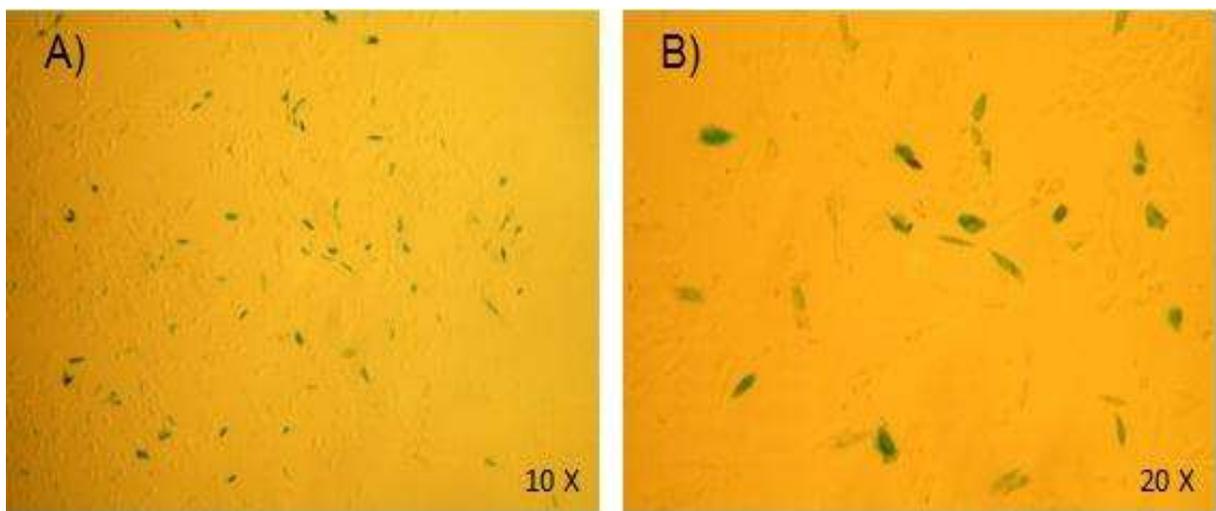


Figura 10. Células BVE-E6E7 transfectadas con el plásmido pRSV β gal que codifica para el gen reportero para beta-galactosidasa. Las células se tiñen de azul en presencia del substrato X-gal, lo que indica que el plásmido fue internalizado por la célula. A) Células BVE-E6E7 observadas en microscopio, magnificación 10X; B) Células BVE-E6E7 bajo las mismas condiciones de luz normal, magnificación 20X.

7.3 Identificación del PCV2 sintético en células BVE-E6E7 y PK15

Con la transfección transitoria del genoma viral en células BVE-E6E7 se generaron los viriones del PCV2 sintético; de esta manera, las células endoteliales funcionaron como buen modelo para la replicación viral del PCV2, ya que esta línea celular tiene una alta tasa de división celular, esto es fundamental, debido que para la replicación viral del PCV2 se requiere de las enzimas celulares expresadas en la fase S de la división celular del huésped (Cheung, 2006), por lo tanto, con una alta tasa de división celular de las células BVE-E6E7 se incrementa el número de virus generados.

Después de la transfección del genoma viral, el PCV2 sintético se recuperó colectando el medio de cultivo de las células BVE-E6E7 transfectadas. Posteriormente para evidenciar la presencia del PCV2 sintético, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia en las células BVE-E6E7, figura 11, la imagen muestra una baja presencia del PCV2, este dato es congruente ya que para tener mayor presencia del virus es necesario enriquecer el medio de cultivo postransfección mediante el pase continuo en cultivos de células BVE-E6E7 o PK15.

La infección y propagación del PCV2 sintético se realizó en células PK15 utilizando el medio colectado postransfección. Las células infectadas fueron mantenidas con el 5% de SFB, ya que con una alta concentración de suero en el medio de cultivo, en las células se activan los sistemas antivirales como el sistema interferón, y por lo tanto, la replicación del virus sería disminuida notablemente.

Posteriormente, después de mantener a las células PK15 con el medio de cultivo postransfección, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia para evidenciar la mayor presencia del PCV2 sintético en comparación con la inmunofluorescencia realizada a las células BVE-E6E7 (figura 11), ya que las células PK15 son la línea celular utilizadas para propagar al PCV2 (Tischer *et al.*, 1987); como se muestra en la figura 12, la presencia del PCV2 en células PK15 fue evidente y en mayor proporción que en las células BVE-E6E7. Esto nos habla, de manera cualitativa, de un enriquecimiento del PCV2 sintético.

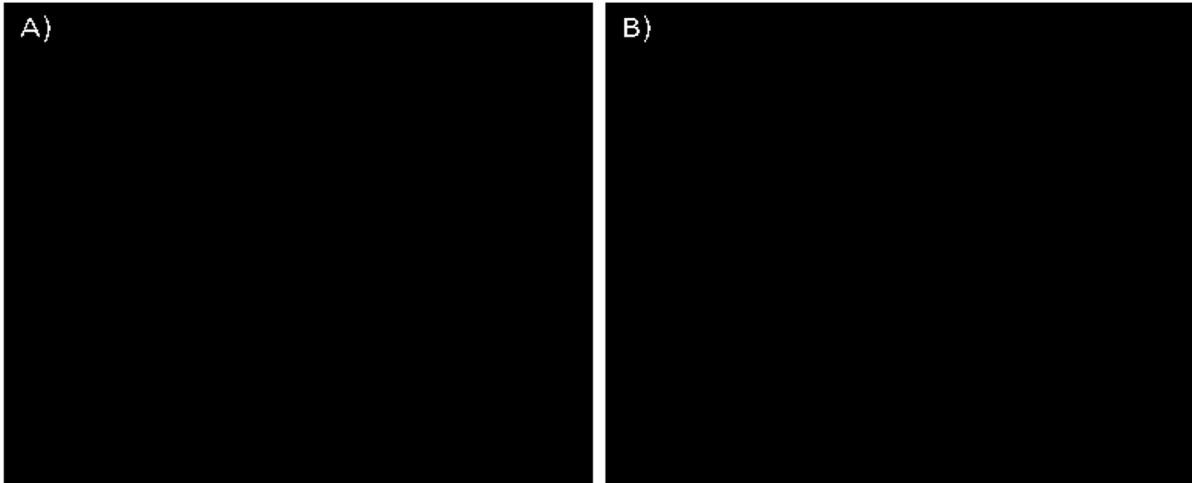


Figura 11. Inmunofluorescencia directa de células BVE-E6E7 transfectadas con el genoma circular de PCV2 sintético. Se utiliza el anticuerpo monoclonal para la proteína E2 de la cápside del virus. A) Células BVE-E6E7 transfectadas con el genoma circular de PCV2 sintético. B) Células BVE-E6E7 transfectadas con el vector pUC-PCV2a. Ambas observadas a una magnificación de 10X.

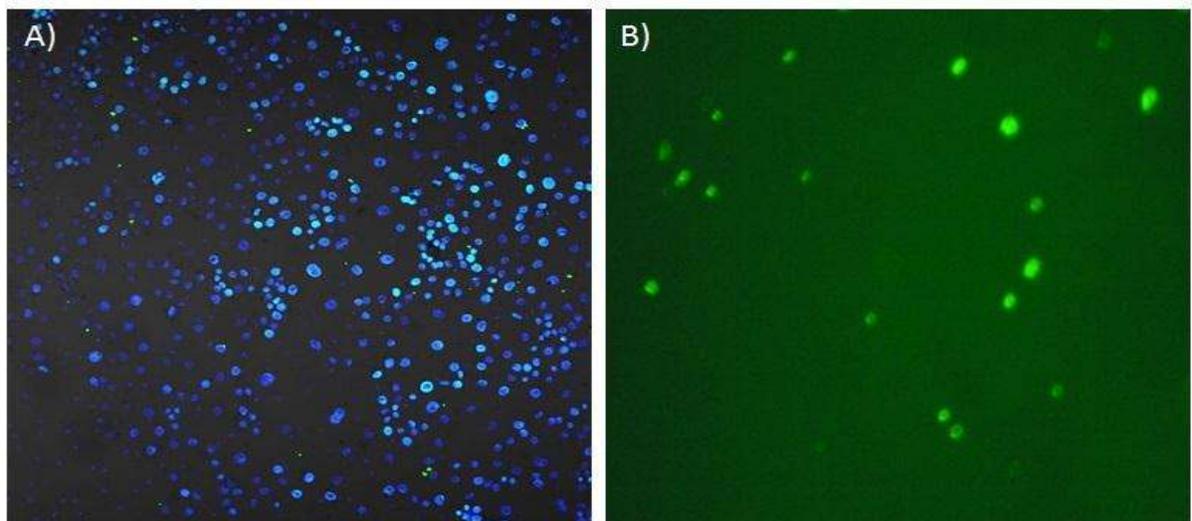


Figura 12. Inmunofluorescencia directa de células infectadas con PCV2 sintético. Después de la transfección del genoma en células BVE-E6E7, el virus generado en las células BVE-E6E7 fue utilizado para infectar a las células PK15. A) Células PK15 infectadas con el PCV-2 sintético, las cuales fueron teñidas con Hoechst 33342 y el anticuerpo monoclonal para la proteína E2 acoplado a FITC, observadas a una magnificación de 10X. B) Células PK15 con sólo el anticuerpo, magnificación 20X.

8. DISCUSIÓN

Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) ha sido reconocido como el principal agente causal del Síndrome de Perdida Multisistémica Postdestete, una enfermedad económicamente dañina en los cerdos jóvenes (Tischer *et al.*, 1986). La enfermedad causada por la infección de PCV2 ha aumentado en México en los últimos años, lo que resulta en un incremento de la morbilidad y la mortalidad porcina que se refleja en pérdidas económicas significativas en la industria porcina.

Con el presente trabajo desarrollamos una metodología para generar al PCV2 sintético, será posible posteriormente caracterizar y manipular el genoma del virus, con propósitos biotecnológicos. Basados en la secuencia del PCV2 depositada en la base de datos pública, se diseñaron *in silico* dos fragmentos lineales y fueron sintetizados *in vitro* por síntesis química, para posteriormente ligar ambos fragmentos y formar el genoma circular del virus, de esta manera transfectar en líneas celulares para generar al PCV2 sintético e identificarlo mediante inmunofluorescencia.

Con el diseño *in silico* se sintetizaron dos fragmentos lineales (F1 y F2) para construir el genoma circular del PCV2; esto fue fundamental, ya que el virus se replica por el mecanismo del círculo rodante, de tal manera que al circularizar los dos fragmentos se generó el intermediario de doble cadena (ds-RF) (Cheung 2012); por lo tanto, al transfectar el genoma circular de doble cadena en células BVE-E6E7 se generó el PCV2 sintético.

Sin embargo, en la ligación de los F1 y F2 (figura 9) no sólo se observa la banda de 1768 pb que representa el genoma completo del PCV2, sino que hay varias bandas, debido a que la reacción de ligación de los fragmentos generó más de un tipo de ligación como la unión de varios fragmentos F1 y F2 en tándem, otra posibilidad es que se unan ambos fragmentos pero que no se genere el genoma circular, esto se explica por el tipo de extremos que existen en los fragmentos F1 y F2 (especificados en la sección 7.1); sin embargo estas diversas posibilidades de ligación no afectaron en absoluto, ya que la replicación del genoma viral solo se origina por la ligación de

los fragmentos F1 y F2 en forma circular y esta ligación es la única que garantizó la generación de viriones infecciosos de PCV2 sintético.

Debido a la dificultad de transfectar a las células PK15 con los diferentes productos comerciales, se procedió a obtener el medio de cultivo de las células BVE-E6E7 transfectadas e infectar a las células PK15, ya que esta línea celular es considerada la mejor en términos generales para propagar al virus por ser susceptible a la infección por PCV2 (Tischer *et al.*, 1987). A pesar de que las células PK15 se han utilizado para generar con éxito partículas virales de PCV2, en nuestro caso no observamos una gran cantidad de virus tal como se ha reportado para el virus silvestre.

Se ha documentado que la replicación viral del PCV2 requiere de la DNA polimerasa expresada durante la fase S del ciclo celular del hospedero, por tanto, se requiere de factores que favorezcan la replicación del virus *in vitro*. En este sentido, el tratamiento de las células PK15 con D-glucosamina favorece la propagación del virus, ya que la glucosamina induce la penetración al hospedero y la pérdida de la cápside del virus favoreciendo la replicación viral y por tanto una mayor cantidad de viriones (Tischer *et al.*, 1987). Resta por analizar el efecto de la D-glucosamina en la propagación del virus sintético descrito en el presente trabajo.

PCV2 sintético fue capaz de replicarse y producir virus infecciosos en las células endoteliales de bovino, BVE-E6E7, esto se demostró por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-PCV2 posterior a la transfección de las células con el genoma circular del PCV2. Nuestros datos coinciden con reportes de otros autores cuyos datos muestran que PCV2 es capaz de replicarse en células endoteliales *in vivo*, ya que los cerdos infectados presentan lesiones cutáneas de tipo eritematoso, con presencia de pápulas y máculas que evidencian en daños en los vasos sanguíneos (Chae, 2004). Sumado a lo anterior, para la replicación del PCV2 son necesarias las enzimas expresadas en la fase S del ciclo celular del huésped (Cheung, 2006), con una alta tasa de división celular de las células BVE-E6E7 se incrementa el número de virus generados. A pesar de que los datos en la literatura apuntan a que las células PK15 son las más adecuadas para replicar PCV2, nuestros

experimentos nos llevan a proponer a las células BVE-E6E7 como un buen modelo para la tranfección del virus y posterior propagación.

Con la inmunofluorescencia directa, utilizando el anticuerpo monoclonal contra la proteína E2 de la cápside, se identificó en las células BVE-E6E7 y PK15 al PCV2 sintético, esto demuestra que el DNA circular generado a partir de dos fragmentos transcribió y tradujo a las proteínas de la replicación (Complejo Rep) y la proteína E2 para el ensamble de nuevas partículas virales. De esta manera el PCV2 sintético tiene la capacidad de replicarse y generar progenie.

Mostramos también en este trabajo que la transfección del vector que contiene clonado el genoma completo lineal del virus no genera las partículas virales, tal como se esperaba. Está bien documentado que es necesario el genoma circular, ya sea en cadena sencilla (virus silvestre) o como cadena doble (virus sintético) para la replicación viral. Además de ser imperioso que el origen de replicación del PCV2 contenga una secuencia de repetición invertida que forma una estructura de tallo-bucle (Mankertz *et al.*, 2003). La posición de apertura del bucle es esencial para el inicio de la replicación del PCV2, de esta manera favorecer la pérdida o inserción de nucleótidos en dicha secuencia, se puede aprovechar para buscar la posible atenuación del virus al modificar el tallo donde se ubica una secuencia palindrómica que puede afectar el inicio de la replicación viral, o en el bucle como lo hacen Zhu y Ren (2011), quienes introducen 6 nucleótidos entre el inicio y final de la secuencia viral. En nuestro caso, el genoma viral que se encuentra clonado en el vector pUC-PCV2a se cortó con enzimas de restricción y posteriormente se ligó, de esta manera logramos introducir al genoma 35 y 61 nucleótidos en el bucle (experimentos por separado), con dichas inserciones, los genomas se transfectaron en células BVE-E6E7 y realizo el ensayo de inmunofluorescencia, donde no se identificó al virus (no se muestran datos). Por lo tanto, dicha cantidad de nucleótidos insertados al genoma fue suficiente para que no hubiera replicación viral a diferencia del trabajo de Zhu y Ren. En estudios futuros, sería interesante determinar la cantidad de nucleótidos necesarios que se deben insertar en el bucle para lograr la atenuación del virus y utilizarlo como estrategia de control en las enfermedades asociadas al PCV2.

La generación del PCV2 sintético facilitará las investigaciones posteriores sobre patogenicidad del virus, ya que no habrá necesidad de aislar al virus silvestre; sin embargo, queda pendiente por hacer la comparación en cuanto a la capacidad patogénica del virus sintético con el virus silvestre en cerdos; así mismo el PCV2 sintético puede ser utilizado para el desarrollo de metodologías para la prevención temprana de las enfermedades asociadas al virus (vacunación).

Con la metodología que utilizamos para generar el genoma circular de PCV2 y haciendo uso de la biología sintética se pueden clonar los diferentes genotipos de PCV2 silvestres del país, con esto se puede crear un banco de virus patógenos de cerdos para su estudio en cultivo celular y de esta manera generar vacunas con genotipos nacionales que tendrían mayor eficiencia que las vacunas comerciales ya que éstas tienen genotipos virales de otros países. Paralelamente se obtendrá una fuente de virus para establecer estrategias en el control efectivo de las enfermedades porcinas, ya que serán genotipos circulantes del país y no de países diferentes que no logran controlar las enfermedades animales.

Con el surgimiento de la biología sintética, la síntesis de genomas completos de virus y el diseño de los mismos se han convertido en una potente herramienta para el estudio de la función y expresión de genes virales, así mismo su potencial patogénico. También, gracias a la biología sintética, se pueden realizar modificaciones genéticas en los genomas virales, con mayor rapidez que con los métodos convencionales de biología molecular como los realizados en el presente trabajo.

De acuerdo con la información y resultados de este trabajo, PCV2 se suma a los virus sintéticos de DNA generados en laboratorio a partir de diversas estrategias. Diseñando estrategias que permitan modificar los genomas virales podemos generar y producir virus atenuados para la vacunación de las enfermedades en los cerdos, y de esta manera contribuir a la prevención y control de las enfermedades porcinas causantes de grandes pérdidas económicas en dicha actividad de relevancia alimentaria. Finalmente, los datos de este trabajo sugieren potencialmente, que con la síntesis química de los genomas de diversos virus se podrán establecer

estrategias de detección, conocer su naturaleza o producir vacunas modificadas. Lo anterior muestra la importancia del potencial de la biología sintética para la aplicación médica animal y humana.

9. CONCLUSIONES

- El DNA de doble cadena obtenido por síntesis química con la secuencia completa del genoma de PCV2 es capaz de generar al virus PCV2 sintético en cultivo celular.
- El virus sintético de PCV2 puede replicarse y producir virus infecciosos en células de endotelio bovino.
- Inserciones genéticas de 35 o 61 nucleótidos en el origen de replicación (bucle) del genoma viral impiden la producción de virus en cultivo celular.

10. PERSPECTIVAS

- Usando ingeniería genética y síntesis química se pueden clonar genotipos diferentes de PCV2 silvestres del país.
- Ayudados de la biología sintética se puede crear un banco de virus patógenos de cerdos para su estudio en cultivos celulares.
- Usando biología sintética se pueden producir virus atenuados seguros y útiles para la vacunación de cerdos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas Abul K., Lichtman Andrew H., Pillai Shiv. Inmunología celular y molecular. 6° edición. Elsevier Saunders. Madrid. 2008.
- Almazán F, DeDiego ML, Sola I, Zuñiga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andrés G, Enjuanes L. 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 4(5):e00650-13. doi:10.1128/mBio.00650-13.
- Andersson C. 2000. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden. ISBN 91-7170-633-X
- Baltimore D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Baltimore D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 35(3):235
- Benner SA, Sismour AM. 2005. Synthetic Biology. *Nature Reviews* 6:533-543
- Bochev I. 2008. Porcine respiratory disease complex (PRDC): a review. II. Diagnostics, treatment and prevention. *Bul J Vet Med.* 11(4):219-234
- Bratanich AC and Blanchetot A. 2002. PCV2 Replicase Transcripts in Infected Porcine Kidney (PK15) Cells. *Virus Genes* 25:3, 323-328
- Cajero-Juárez M, Avila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol.* 81(1): 1-8
- Cann Alan J. Principles of Molecular Virology. 4° ed. Elsevier Academic Press. Burlington, MA, USA. 2005
- Cello J, Paul AV, Wimmer E. 2002. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 297:1016-18
- Chae C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J.* 168(1):41-9.
- Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 169(3):326-36

- Chaiyakul M., Hsu K., Dardari R., Marshall F., Czub M. 2010. Cytotoxicity of ORF3 proteins from a nonpathogenic and pathogenic porcine circovirus. *J. Virol.* 84 (21):11440-11447
- Cheung A.K. 2012. Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. *Virus Res.* 164 (1-2): 46-43
- Cheung AK, Greenlee J.J. 2011. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res.* 155(1): 358-362.
- Cheung AK. 2003a. Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus Type 2. *Virology* 305, 168-180
- Cheung AK. 2003b. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 313: 452-459
- Cheung AK. 2006. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol.* 80(17):8686-8694.
- Crick F. 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227, 561-563
- Crisci E, Bárcena J, Montoya M. 2012. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148(3-4): 211-25
- Crother RA, Berriman J.A., Curran W.L., Allan G.M., Todel D. 2003. Comparison of the structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J. Virol*, 77(24): 13036-41
- Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. 2003. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J. Virol.* 77:13036–41.
- Darwich L, Mateu E. 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164:61-67.
- Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E. 2002. Changes in CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD8⁺, and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9:236-42.

- Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan GM, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F. 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest*, 11, 3-14
- Fauquet CM, Fargette D. 2005. International committee on taxonomy of viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology*. 2,64
- Faurez F, Dory D, Grasland B, Jestin A. 2009. Replication of porcine circoviruses. *Virology*. 6:60
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR and Skalka AM. 2004. Principles of virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Forster AC and Church GM. 2007. Synthetic biology projects in vitro. *Genome Res*. 17(1): 1-6
- Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397–403
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Syntoro JC, Robinson HL. 1993. DNA vaccines: protective immunization by parental, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci*. 90:11478–11482
- Gillespie J, Opriessning T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell. 2009. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. *J. Vet. Intern. Med*. 23:1151-1163
- Grierson SS, King DP, Tucker AW, Donadeu M, Mellencamp MA, Haverson K, Banks M, Bailey M. 2007. Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pigs: correlation with the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol*. 119(3-4):254-68.
- Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. 1998. Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs. *J. Virol*. 72 (6):5262-67
- International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. <http://www.ictvonline.org/index.asp>

- Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122(1):9-24
- Khayat R, Brunn N, Speir JA, Hardham JM, Ankenbauer RG, Schneemann A, Johnson JE. 2011. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *J. Virol.* 85(15):7856-62
- Khorana HG. 1979. Total synthesis of a gene. *Science* 203:614–25
- Kim J and Chae C. 2002. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest.* 14:236-240
- Kim J, Jung K, Chae C. 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet Rec.* 155(16):489-92.
- Kindt Thomas J, Goldsby Richard A, Osborne Barbara A. *INMUNOLOGÍA de Kuby.* 6^o edición. McGRAW-HILL. México, 2007
- Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct.* 19;1:29
- Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringles S, Rings DM, Allan G. 2001. Activation of the Immune System is the Pivotal Event in the Production of Wasting Disease in Pigs infected with Porcine Circovirus-2 (PCV2). *Vet. Pathol.* 38, 31-42
- Lin WL, Chien MS, Du YW, WU PC, Huang C. 2009. The N-terminus of porcine circovirus type 2 replication protein is required for nuclear localization and ori binding activities. *Biochem Biophys. Res Commun.* 379 (4): 1066-1071
- Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285(1):91-9
- Ma JK, Drake PM, Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 4(10):794-805.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos.* 10^o edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003

- Madison DM, Opriessnig T. 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev.* 12:47-65.
- Magar R, Muller P and Laroche R. 2000. Restrospective serological survey of antibodies to Porcine Circovirus Type 1 and Type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64, 184-186
- Mankertz A and Hillendrand B. 2002. Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J. Gen. Virol.* 83 (11): 2743-2751
- Mankertz A, Mueller B, Steinfeldt T, Schmitt C, Finsterbusch T. 2003. New Reporter Gene-Based Replication Assay Reveals Exchangeability of Replication Factor of Porcine Circovirus Types 1 and 2. *J Virol.*, 77 (18): 9885-93
- Manketz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T. 2004. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology* 98:81-88
- Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171-2179
- Meng XJ. 2013. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:43-64
- Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, Lefebure DJ, Nauwynck HJ. 2006. Porcine Circovirus 2 Uses Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate B Glycosaminoglycans as Receptors for Its Attachment to Host Cells. *J. Virol.* 80(7): 3487-94
- Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol.* 86(Pt 7):2057-68.
- Morilla González Antonio. 2003. Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencia Veterinaria.* 9-2003-4.
- Mueller S, Coleman JR, Wimmer E. 2009. Putting synthesis into biology: a viral view of genetic engineering through de novo gene and genome synthesis. *Chem Biol.* 16(3):337-47

- Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen Virol.* 81(Pt9):2281-7.
- Nuñez-Anita RE, Valdez-Alarcón JJ, Bravo Patiño A y Cajero Juárez M. Diseño y caracterización de inmunógenos contra virus patógenos de porcinos. Memorias en extenso del XXXIII Encuentro de Investigación Veterinaria y producción animal. Morelia Mich., 18 de Diciembre de 2012, pp 299-306.
- Pallarés FJ, Halbur PG, Opriessning T, Sorden SD, Villar D, Janke BH, Yaeger MJ, Larson DJ, Schwartz KJ, Yoon KJ, Hoffman LJ. 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest.* 14(6):515-9
- Ramamoorthy S and Meng XJ. 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim. Health. Res. Rev.* 10 (1): 1-20
- Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, et al. 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 306:1344–50.
- Rodríguez-Cariño C, Duffy C, Sánchez-Chardi A, McNeilly F, Allan GM, Segalés J. 2011. Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the 135 lymphoblastoid cell line. *J Comp Pathol.* 144(2-3):91-102
- Rose N, Opriessig T, Grasland B, Jestin A. 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164:78-89.
- Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijoja GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. 1999. Pathological immunohistochemical and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120 (1): 57-78
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (3^o ed). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sánchez R, Nauwynck H and Pensaert M. 2001. Serological suvery of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and fetal pig populations in Belgium. *Proceeding of ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates*, p.p. 122.

- Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health. Res. Rev.* 6:119-142
- Segalés J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164:10-19
- Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkoch C, Venter JC. 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci.* 100:15440–45
- Staley AP. 2009. Vaccines: the Fourth Century. *Clin. Vaccine. Immunol.* 16(12): 1709-19
- Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. 2006. Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep proteins of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 80 (13), 6225–6234.
- Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. 2007. Functional Analysis of cis- and trans-Acting Replication Factors of Porcine Circovirus Type 1. *J. Virol.* 81(11): 5696-5704
- Tischer I, Gledlerblam H, Vetterman W, Koch MA. 1982. A very small porcine with circular single-stranded DNA. *Nature.* 295:64-66
- Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91 (3-4), 271-276
- Tischer I, Peters D, Rasch R, Pociuli S. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol.* 96(1-2):39-57.
- Tribble BR, Rowland RR. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164(1-2): 68-77
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, et al. 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 310:77–80
- Varela M, Schnettler E, Caporale M, Murgia C, Barry G, McFarlane M, McGregor E, Piras IM, Shaw A, Lamm C, Janowicz A, Beer M, Glass M, Herder V, Hahn K, Baumgärtner W, Kohl A, Palmarini M. 2013. Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog.* 9(1):e1003133. doi: 10.1371/journal.ppat.1003133. Epub 2013 Jan 10.

- Villarreal LP, Witzany G. 2010. Viruses are essential agents within the roots and stem of the tree of life. *J Theor Biol.* 262:698–710
- Voet D, Voet J, Pratt W. *Fundamentos de Bioquímica.* 2° edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid, 2007
- Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrel TS, Ellis JA, Allan GM. 2000. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 400-405
- Wimmer E and Paul AV. 2011. Synthetic Poliovirus and Other Designer Viruses: What Have We Learned from Them? *Annu Rev. Microbiol.* 65:583–609
- Wimmer E, Mueller S, Tumpey TM, Taubenberger JK. 2009. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat Biotechnol.* 27(12): 1163
- Yang R, Han Y, Ye Y, Liu Y, Jiang Z, Gui Y, Cai Z. 2011. Chemical Synthesis of Bacteriophage G4. *PLoS ONE.* 6(11):e27062.doi: 101371/journal.pone.0027062
- Zhu W, Ren X. 2011. Isolation, Genome Phylogenetic Analysis and In vitro Rescue of a Newly Emerging Porcine Circovirus Type2. *Pakistan Veterinary Journal.* 32(2):165-170

12. ANEXO

Preparación de Buffers y Reactivos

Buffer Fosfato Salino (PBS)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, y 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Adicionar H₂O para 1 litro. Filtrar y alicuotar, después esterilizar en el autoclave por 20 minutos a 15 psi.

Soluciones y Buffers de lisis y extracción alcalina

Solución I

50 mM glucosa

25 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Solución II

0.2 N NaOH

1% (w/v) SDS

Solución III

5 M Acetato de potasio 60 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

H₂O 28.5 ml

La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

STET

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.1 M NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

5% (v/v) Triton X-100

pH 8.0

Buffer Tris base-Ácido bórico-EDTA (TBE) 10X

108 g de Tris base

55 g de Ácido Bórico

40 ml de 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Adicionar 1 g de bromuro de etidium a 100 ml de H₂O.

Medio LB (Medio Luria-Bertani)

Por litro:

A 950 ml de H₂O adicionar:

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Agitar hasta que los solutos se han disuelto. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5 N.

Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con H₂O.