



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**“Evaluación de la inmunogenicidad de un candidato vacunal multiepitópico
derivado de la proteína GP5 del virus PRRS”**

Tesis que presenta:

LBT. Sergio Molina Campos

Como requisito para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Biológicas

En el área temática de:

Microbiología Celular y Genética Molecular

Directora: **Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita**

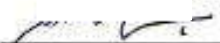
CO-Directora: **Dra. Ricarda Cortés Vieyra**

Morelia, Michoacán, mayo del 2025

Declaración de originalidad

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de Sergio Molina Campos, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por Sergio Molina Campos durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la Co-Dirección de la Dra. Ricarda Cortés Vieyra.

Morelia, Mich., a 08 de abril de 2025

LBT, Sergio Molina Campos 

Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita


Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la Codirección de la Dra. Ricarda Cortés Vieyra a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por las facilidades para la realización del presente trabajo.

Agradecemos al Consejo Nacional de humanidades, Ciencias y Tecnología, por las facilidades para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue auspiciado por CONAHCYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONAHCYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular. Agradecemos también, el apoyo a Sergio Molina Campos que consistió en la Beca Nacional CONAHCYT con No. de becario 84323 y número de CVU 1278247.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero agradecer a una extraordinaria persona e investigadora: mi asesora la Dra. Elvira. por todo su apoyo, por creer en mí desde que era su estudiante de licenciatura y hasta la maestría. También le agradezco por todas sus enseñanzas, consejos y sobre todo por ser parte de mi formación de manera personal y profesional, a partir de lo que considero es la filosofía del grupo de trabajo liderado por usted: esfuerzo, constancia, dedicación y trabajo duro. Quiero agradecer también a otra extraordinaria persona e investigadora: mi co-asesora la Dra. Ricarda, por sus observaciones, enseñanzas, por transmitirme su experiencia, conocimientos y por corregirme cuando me equivocaba, gracias por formar parte de mi aprendizaje y formación como estudiante de maestría.

Quiero agradecer también a 3 admirables investigadores: que además de ser mis sinodales, fueron mis maestros: al Dr. Bravo, el Dr. Cajero y la Dra. Ilane. Les agradezco por haberme transmitido una forma diferente de ver la ciencia, así como sus aplicaciones, desde la objetividad de la teoría y los experimentos, pero sobre todo por haberme generado un mayor interés por la Inmunología, Virología y Biología Molecular.

Agradezco infinitamente a mi familia: a mi mamá, María Teresa y a mi tía Rosy, a mi tía Flory y mi abuelito Pedro Campos por su apoyo incondicional, por su amor, por nunca dejar de creer en mí, les agradezco mucho su apoyo moral, así como su apoyo económico siempre que lo he necesitado. A mis hermanos Lalo y Víctor les doy las gracias por su apoyo, sus consejos y solidaridad conmigo. En conjunto agradezco a mi familia por ser mi mayor motor en la vida para seguir adelante y mi mayor motivación para seguir superándome todos los días. No me queda la menor duda de que sin cada uno de ellos y ellas no estaría hoy aquí.

Por último, agradezco a mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, solidaridad y ayudarme en diferentes aspectos importantes durante mi proyecto, así como por sus correcciones y observaciones cuando me equivocada.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	4
INDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1.-ABSTRACT	11
2.- RESUMEN	12
3.- MARCO TEÓRICO.....	13
3.1 Agente etiológico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.....	13
3.2.- Distribución geográfica del PRRSV	13
3.2.1 Focos de infección por PRRSV en México	15
3.3.- Impacto económico derivado del PRRS en la industria porcina	16
3.4.- Cuadro clínico del PRRS.....	17
3.5.- Patogenia y transmisión de la infección por PRRSV.....	18
3.6.- Genoma de PRRSV	19
3.7.- Glicoproteína GP5 del virus PRRS.....	20
3.8.- Célula blanco de PRRSV	21
3.8.1.- Receptores de macrófagos alveolares	21
3.9.- Mecanismos de PRRSV para la evasión de la respuesta inmune	22
3.9.1.- Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata	22
3.9.2.- Mecanismos de evasión de la respuesta inmune adaptativa.....	23
3.10.- Vacunas comercialmente disponibles contra PRRSV	24
3.10.1.- Vacunas MLV.....	24
3.10.2.- Vacunas Inactivadas	25
3.10.3.- Vacunas de ADN, subunidades y vectores virales	25
3.10.4.- Vacunas basadas en epítomos	27
4.- ANTECEDENTES	31
5.- JUSTIFICACIÓN	33
6.- HIPÓTESIS.....	33

7.- OBJETIVO GENERAL	33
8.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
9.- MATERIALES Y MÉTODOS	34
9.1.- Ratones.	34
9.2.- Características fisicoquímicas de péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS.....	34
9.3.- Modelo vacunal TetraPep-GO.....	35
9.4.- Anticuerpos.....	37
9.5.- Imject® Maleimide Activated BSA.....	37
9.6.- Adyuvante Alhidrogel® 2%	38
9.7.- Adyuvante CpG oligodeoxynucleotides Mouse	38
9.8.- Obtención de muestras sanguíneas.....	38
9.9.- Inmunización.....	38
9.10.- Detección de anticuerpos totales	39
9.11.- Aislamiento de leucocitos de sangre periférica.....	40
9.12.- Diseño de paneles de anticuerpos, para la inmunotipificación de linfocitos T	40
9.13 Detección de citocinas	43
9.14.- Análisis estadístico.....	44
10.- RESULTADOS.....	45
10.1.- Seguimiento de peso de los ratones durante el desarrollo del ensayo.....	45
10.2.- IgGs totales en ratones inmunizados con TetraPep-GO	45
10.3.- Linfocitos T CD4+ activos en ratones inmunizados con TetraPep-GO.....	46
10.4.- Subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en ratones inmunizados con TetraPep-GO.....	47
10.5.- Valores de citocinas relacionadas con la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 en ratones inmunizados con TetraPep-GO.....	48
11.- DISCUSIÓN	50
12.- CONCLUSIÓN	54
13.- PERSPECTIVAS.....	54
14.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	55
15.-BIBLIOGRAFÍA	56
16.- ANEXOS	63

16.1	Reporte de similitud generado por el sistema Turnitin iThenticate	63
16.2.-	Formato de declaración de originalidad y uso de Inteligencia Artificial.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vacunas de nueva generación para PRRSV	27
Tabla 2. Vacunas basadas en epítomos.....	30
Tabla 3. Propiedades inmunogénicas de péptidos derivados de la proteína GP5	32
Tabla 4. Características fisicoquímicas de péptidos GP5T,GP5T3, GP5B y GP5B3.....	35
Tabla 5. Componentes de la formulación de TetraPep-GO y vehículo	36
Tabla 6. Concentración de péptidos evaluados individualmente y en conjunto (TetraPep-Go)	36
Tabla 7. Anticuerpos conjugados a fluorocromos utilizados para la detección específica de marcadores de superficie de leucocitos	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estatus mundial del PRRSV	14
Figura 2. Reporte mundial de animales afectados por PRRSV durante 2019-2020	14
Figura 3. Distribución estatal de focos de PRRSV en México durante 2019 y 2020.	15
Figura 4. Reporte anual de focos y casos de PRRSV en México.....	16
Figura 5 Impacto económico por PRRSV en la industria porcina.....	17
Figura 6 Genoma, transcripción y traducción de PRRSV.....	19
Figura 7. Estructura de la proteína GP5 de PRRSV.....	20
Figura 8. Receptores putativos para PRRSV	21
Figura 9. Mecanismos celulares y moleculares de las respuestas inmunológicas inducidas por vacunas multiepítopo	29
Figura 10. Esquema de trabajo de síntesis de los péptidos GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3.....	35
Figura 11. Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida	37
Figura 12. Esquema del ensayo ELISA para la cuantificación de IgG totales	40
Figura 13. Ruta de análisis representativo para la obtención de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD44+	42
Figura 14. Ruta de análisis representativa para la obtención de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD8+ y CD44+	43
Figura 15. Seguimiento del peso corporal de los ratones durante el curso del experimento.....	45
Figura 16. Concentración de Inmunoglobulinas G (IgG's) totales en sueros de ratones Balb/C inmunizados con TetraPep-GO.	46
Figura 17. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T CD4+.....	47
Figura 18. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T CD8+.....	48
Figura 19. Valores de las citocinas: IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6 y TNF- α en sueros de ratones inmunizados con TetraPep-GO.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

PRRSV: Por sus siglas en inglés, Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

HPI: Horas Pos-Infección

dpi: días post-inmunización

ORF: Por sus siglas en inglés, Marco de Lectura Abierto

pDC: Por sus siglas en inglés, Células Dendríticas Plasmocitoides

ISG: Por sus siglas en inglés. Genes Estimulados por Interferón

OTU: Por sus siglas en inglés, Dominio Desubiquitinante dependiente de TioI

MHC: Por sus siglas en inglés, Complejo Principal de Histocompatibilidad

IFN: Interferón

IgG: Inmunoglobulina de tipo G

LTh: Por sus siglas en inglés, Linfocitos T cooperadores

LTc: Por sus siglas en inglés, Linfocitos T citotóxicos

1.-ABSTRACT

The disease caused by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the leading cause of economic losses in the swine industry worldwide. Available commercial vaccines present deficiencies in aspects of safety, cross-protection, and effectiveness in inducing cellular and humoral responses, thus diminishing their protective capacity. Therefore, research into new vaccine candidates to prevent this disease is relevant. Our group has studied the immunogenic properties of four synthetic peptides derived from the PRRSV GP5 protein, which possess T and B epitopes, called GP5-T, GP5-T3, GP5-B, and GP5-B3. Previously, in piglets, we demonstrated that both GP5T and GP5T3 induced the activation of the cytolytic cellular response mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Likewise, both GP5-B and BP5-B3 induced the secretion of immunoglobulin G (IgG) associated with neutralizing antibodies and promoted the activation of antibody-secreting plasma B lymphocytes. In this study, we evaluated the immunogenicity of a formulation we called Tetra-Pep- GO, composed of the four GP5 peptides previously described, linked to a carrier protein and two adjuvants. A murine model was used with an intradermal immunization schedule and a booster at 21 days post-immunization (dpi). The serum concentration of total IgG and the number of CD4⁺ helper T lymphocytes (HTL) and differentiated and activated CD8⁺ helper T lymphocytes (HTC) (CD44⁺) were evaluated. Tetra-Pep- GO induced an increase in total IgG at 21, 42, and 80 dpi. Likewise, at 80 dpi, activation of the ThL population (CD4⁺/CD44⁺) and a significant increase in the cLT population (CD8⁺/CD44⁻) were observed. Overall, the data generated suggest long-term immunogenicity induced by Tetra-Pep-GO.

2.- RESUMEN

La enfermedad causada por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), es la principal causa de pérdidas económica en la industria porcina en el mundo. Las vacunas comerciales disponibles presentan deficiencias en aspectos de seguridad, protección cruzada y efectividad en la inducción de la respuesta celular y humoral, disminuyendo así su capacidad de protección. Por lo tanto, es relevante la investigación de nuevos candidatos vacunales para prevenir esta enfermedad. En nuestro grupo se han estudiado las propiedades inmunogénicas de cuatro péptidos sintéticos, derivados de la proteína GP5 del PRRSV, los cuales poseen epítomos T (-T) y B (-B), denominados: GP5-T, GP5-T3, GP5-B y GP5-B3. Previamente, en lechones demostramos que, tanto GP5T como GP5T3, indujeron la activación de la respuesta celular citolítica mediada por Linfocitos T citotóxicos (LTc). Asimismo, tanto GP5-B como BP5-B3, indujeron la secreción de inmunoglobulinas G (IgG's) asociadas a anticuerpos neutralizantes y favorecieron la activación de Linfocitos B plasmáticos secretores de anticuerpos. En este trabajo se evaluó la inmunogenicidad de una formulación a la que denominamos Tetra-Pep-GO, compuesta por los cuatro péptidos de GP5 previamente descritos, unidos a una proteína acarreadora y dos adyuvantes. Se empleó un modelo murino con un esquema de inmunización intradérmica y un refuerzo a los 21 días pos-inmunización (dpi). Se evaluó la concentración sérica de IgG's totales y la cantidad de linfocitos T cooperadores (LTh) CD4+ y LTc, CD8+ diferenciados y activados (CD44+). Tetra-Pep-GO indujo un aumento de IgG's totales a los 21, 42 y 80 dpi. Así mismo, a los 80 dpi se observó la activación de la población de LTh (CD4+/CD44+) y el aumento significativo de la población de LTc (CD8+/CD44-). En conjunto los datos generados sugieren inmunogenicidad a largo plazo inducida por Tetra-Pep-GO.

Palabras clave: Inmunógeno, epítopo, anticuerpo, linfocitos, citocinas.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1 Agente etiológico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

El virus causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), por sus siglas en inglés), PRRSV, es el agente etiológico de la enfermedad en cerdos, caracterizada por dos afectaciones principales: el deterioro o falla reproductiva en cerdas reproductoras y la enfermedad respiratoria en cerdos de cualquier edad. Actualmente, PRRS se considera una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. PRRS es la enfermedad con mayor prevalencia endémica en los principales países de producción porcícola (OIE, 2008).

Se han identificado dos cepas virales relacionadas, pero distinguibles antigénica y genéticamente; el genotipo 1 (PRRSV-1), predominante en Europa, y el genotipo 2 (PRRSV-2), identificado originalmente en América del Norte. Ambos genotipos fueron reconocidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (Álvarez *et al.*, 2013). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), ha reclasificado estos genotipos, europeo y americano, como Beta arterivirus suid-1 y suid-2, respectivamente (Castillo *et al.*, 2021). Suid -1 y -2 comparten entre el 50-60% de identidad en su secuencia de nucleótidos (Castillo *et al.*, 2021).

3.2.- Distribución geográfica del PRRSV

Estudios serológicos remontan el origen del PRRSV en 1979 en Canadá, mientras que aparentemente en 1985 habría surgido en EUA y en Corea del Sur. Por otro lado, de acuerdo con estudios retrospectivos, el PRRSV pudo haber surgido en 1988 en Japón y en Alemania. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1987 en EUA, nombrándola “La enfermedad de la oreja azul” por el signo clínico característico. Posteriormente la infección se diseminó rápidamente por casi todo el mundo (López *et al.*, 2015).

Actualmente el PRRS ha sido detectado en todos los continentes y en casi todos los países en los que existe un sector productivo porcino. (Álvarez *et al.*, 2013). En México, la infección por PRRSV fue descrita clínicamente y confirmada por pruebas serológicas en 1992. (López *et al.*, 2015). En la figura 1 se observa la actual distribución mundial de PRRSV.

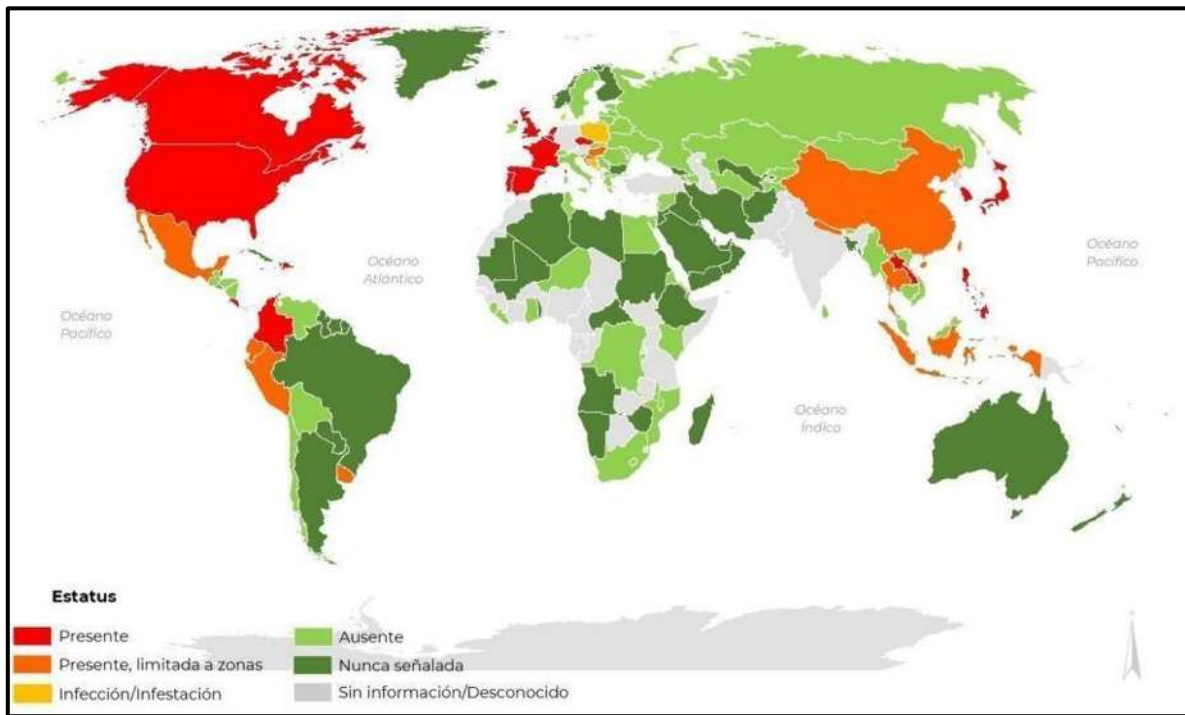


Figura 1 Estatus mundial de la distribución del PRRSV. Tomada de (OMSA, 2021)

En noviembre de 2021, 19 países proporcionaron informes semestrales o anuales a la OMSA, reportando un total de 1,711 casos de infección, de los que el 81.24% corresponden a México (Figura 2).

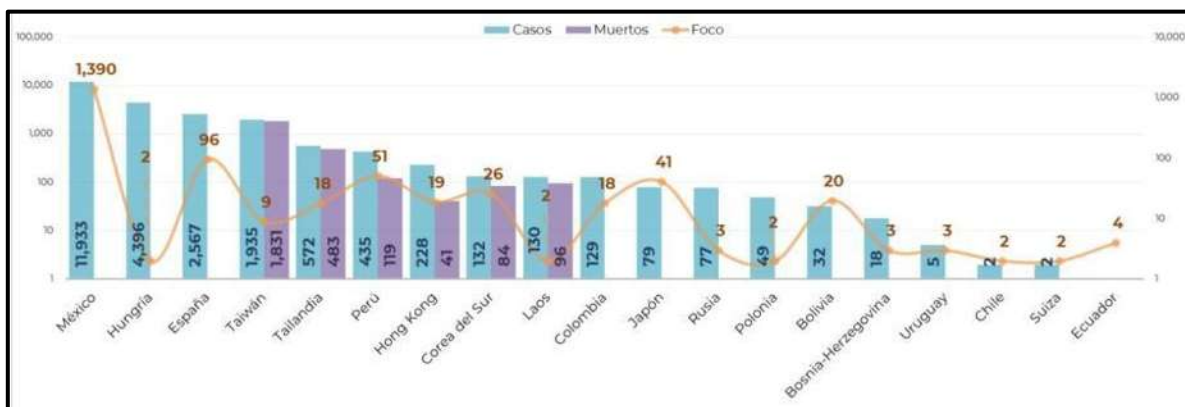


Figura 2. Reporte mundial de animales afectados por el PRRS durante 2019 y 2020. Tomado de Informes anuales y semestrales, OMSA.

3.2.1 Focos de infección por PRRSV en México

En los informes del 2019 emitidos por la OMSA, México informó la presencia de 1,390 focos de infección a nivel nacional, distribuidos en 28 Entidades Federativas, de los cuales el estado de Michoacán reportó un máximo de 27 focos de infección por PRRSV (Figura 3).



Figura 3. Distribución estatal de focos de infección por PRRSV en México. Tomado de Informes semestrales, OMSA

Desde el año 2012 hasta el 2020, en México se han reportado un total de 9,718 focos, el año con el mayor número de focos fue 2018, con 1,683 focos. Dichos focos se vieron reflejados en afectaciones a una población susceptible de un total de 4'076,290 animales, con un promedio de 451,921 animales infectados anualmente; el total de casos de infección para todo el periodo fue de 120,300; con un promedio anual de

13,357 infecciones y una morbilidad aparente promedio de 2.95%. 2017 fue el año con la tasa de morbilidad aparente más elevada, con un 25.38% (Figura 4). En cuanto a la mortalidad, durante los años 2016, 2017 y 2018, se reportaron un total de 150, 8 y 226 animales muertos por la enfermedad, respectivamente.



Figura 4. Reporte anual de focos de infección por PRRS y casos de la enfermedad en México. Tomado de Informes anuales y semestrales, OMSA, 2012-2020.

3.3.- Impacto económico derivado del PRRS en la industria porcina

Las pérdidas económicas ocasionadas por el PRRS se estimaron en aproximadamente \$664 millones de USD anuales y \$1,8 millones de USD por día en los EUA. Estas pérdidas corresponden a costos directos que están relacionadas a pérdidas en el rebaño de cría que representan el 45% (\$302,06 millones de USD) y en la fase de engorde que representan el 55% (\$361,85 millones de USD) del total. En el inventario de cría de EUA, el costo anual es de \$114,71 USD. (Holtkamp *et al.*, 2013). Cabe mencionar también que en el estudio realizado por Holtkamp y colaboradores en 2013, se reportan los costos indirectos del PRRS, los cuales incluyen las inversiones en bioseguridad, vacunación, programas de control, etc., de las que, estaban valorizadas en \$477 millones de USD. En conjunto, el impacto económico total del PRRS en EUA es de más de \$1000 millones de USD por año (Holtkamp *et al.*, 2013) (Figura 5).

En Europa los estudios se concentran en muy pocos países. Se estima que en este continente la enfermedad genera un impacto económico que está entre 1000-1500 millones de € anuales (Holtkamp *et al.*, 2013) (Figura 5).

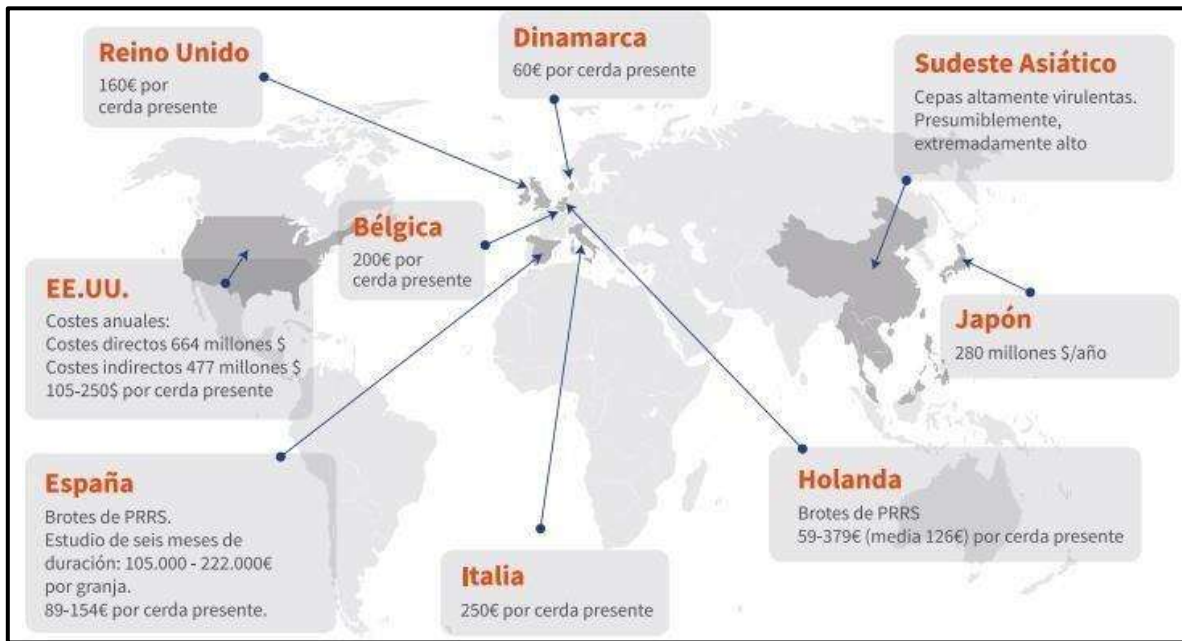


Figura 5. Impacto económico por PRRSV en la industria porcina. Tomado de Holtkamp DJ y col. J Swine Health.

En Holanda se llevó a cabo un análisis en 9 granjas con brotes de infección por PRRSV, donde calcularon que el número de cerdos vendidos se reduce en 1,7 cerdos (que representa una pérdida directa de -18%). El impacto económico que se genera, sumando esta pérdida productiva, más los costos de medicación, vacunación, diagnóstico y horas extras de trabajo como costos indirectos, resulta de un rango de entre 59 € y 37 €, entre las diferentes granjas, obteniéndose un promedio de 126 € por cerda, durante el periodo de 18 semanas que tardaron hasta estabilizarse (Nieuwenhuis *et al.*, 2012).

3.4.- Cuadro clínico del PRRS

Una de las principales características del PRRS es la amplia variabilidad en los signos clínicos, que van desde animales asintomáticos hasta una enfermedad aguda. Los signos clínicos, el desarrollo y la extensión de las lesiones están directamente relacionados con la virulencia del PRRSV. La fiebre alta inducida por cepas virulentas del PRRSV es un hallazgo consistente, tanto en casos clínicos como en ensayos experimentales, oscilando entre 40.5°C y 42°C, comenzando a los 2 dpi y

manteniéndose de 1 a 4 semanas pos-infección. Otros signos clínicos comúnmente son la anorexia, el letargo, la conjuntivitis, las petequias, la erupción cutánea eritematosa que palidece, la cianosis, la diarrea y la enfermedad respiratoria evidente. Lo anterior repercute negativamente en el estado sanitario de los cerdos y afecta la ganancia media diaria de peso (Salguero *et al.*, 2015).

Las lesiones se restringen principalmente al pulmón, en infecciones con cepas poco virulentas, mientras que, si las lesiones no se complican, pasan desapercibidas. Las lesiones macroscópicas causadas por cepas virulentas de PRRSV se caracterizan por neumonía intersticial difusa grave, que generalmente se acompaña de bronconeumonía supurativa, pleuresía y manchas hemorrágicas en pulmón que puede conducir a la muerte (Christianson *et al.*, 1992).

3.5.- Patogenia y transmisión de la infección por PRRSV

El virus ingresa a los macrófagos pulmonares y al endometrio uterino, penetrando los epitelios nasal y tonsilar. Tiene un período de incubación de entre tres días a varias semanas, con etapas de latencia en casos endémicos. El período de incubación varía según la edad de los animales, la dosis infectante y la inmunidad. Alcanza los tejidos linfoides regionales y posteriormente se distribuye a nivel sistémico por las vías sanguínea y linfoide (Pileri *et al.*, 2016).

La viremia comienza a las 12 horas posteriores a la infección (hpi) y alcanza su punto máximo de replicación a los 7 dpi. La duración de la viremia varía según la cepa de PRRSV y la edad del animal. En animales adultos dura de 9-15 dpi y en animales jóvenes un promedio de 28-35. La fase de infección es seguida por un período de confinamiento del virus en los tejidos linfoides secundarios y una menor replicación viral (Cho *et al.*, 2006).

La transmisión del PRRSV ocurre por distintas vías, tales como, contacto directo entre animales enfermos, o con material contaminado por su saliva, orina, semen, secreciones mamarias, transplacentarias y excremento (Pileri *et al.*, 2016).

3.6.- Genoma de PRRSV

El PRRSV es un virus envuelto que pertenece al género *Arterivirus*. El genoma de PRRSV, compuesto por ARN de polaridad positiva, tiene un tamaño de aproximadamente 15 kb y contiene once marcos de lectura abiertos (ORF). ORF1a y ORF1b, localizados en el extremo 5' del genoma, codifican una poliproteína que se procesa en 16 proteínas no estructurales: Nsp1a, Nsp1b, Nsp2-6, Nsp7a, Nsp7b y Nsp8-12. ORF2-ORF7 localizados en el extremo 3' del genoma, codifican cuatro glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2, GP3, GP4 y GP5), dos proteínas de membrana no glicosiladas (E y M), y una proteína de nucleocápside (N) (Kappes & Faaberg, 2015). La organización genómica se representa en la Figura 6.

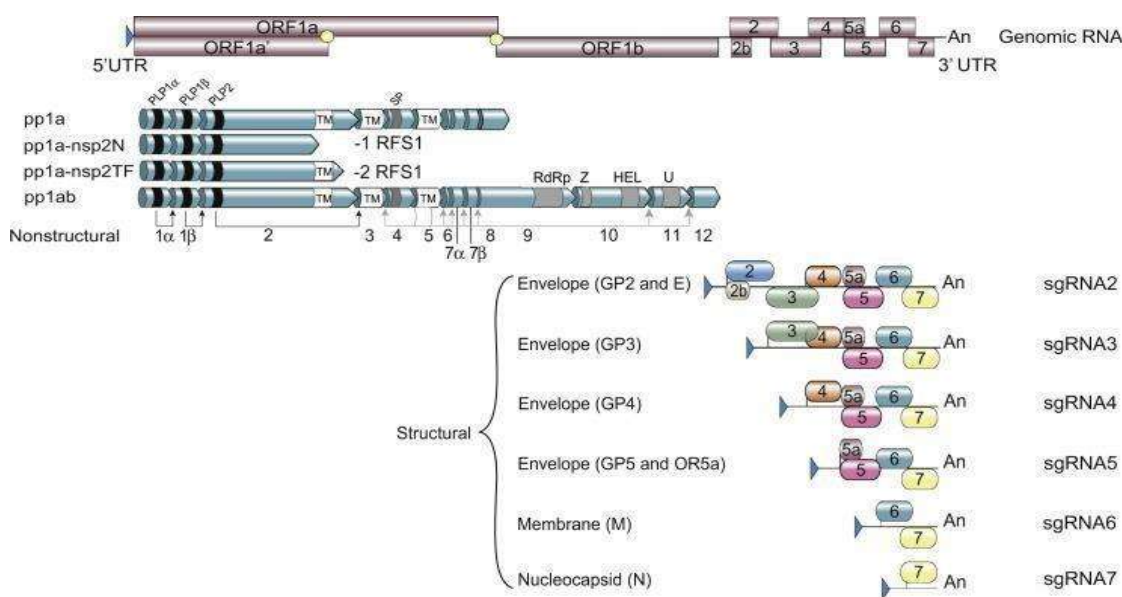


Figura 6. Genoma, transcripción y traducción de PRRSV. La replicación de PRRSV progresa mediante una variedad de mecanismos reguladores genéticos y proteicos. La expresión de las primeras tres cuartas partes del genoma de 14.9–15.5 kb, produce 4 poliproteínas (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF, pp1ab). Las poliproteínas se procesan cotraduccionalmente y postraduccionalmente en al menos 16 proteínas no estructurales (nsps) replicadoras (accesorias) distintas por cuatro proteasas virales denominadas PLP1 α , PLP1 β , PLP2 y SP. Los motivos de polimerasa reconocidos en pp1b son la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), el dominio de dedo de zinc (Z), el dominio helicoidal (HEL) y el dominio de endorribonucleasa específico de uridilato de nidovirus. Las proteínas estructurales canónicas se expresan exclusivamente a través de un conjunto de ARN subgenómicos (sgRNA). Tomada de Kappes & Faaberg 2015.

3.7.- Glicoproteína GP5 del virus PRRS

GP5 es la glicoproteína estructural más abundante del virus. Tiene una secuencia de 200 residuos de aa y un peso molecular de aproximado de 25 KDa. GP5 tiene la función de facilitar la interacción del virus con su célula blanco. La proteína GP5 se encuentra formando un complejo heterodimérico con la proteína M a través de puentes disulfuro (Figura 7). Dicho complejo es esencial para el ensamble del virión, se ha sugerido que, al ser las proteínas con mayor presencia en la envoltura, son las responsables de la curvatura de la membrana (Dokland, 2010).

GP5 es una de las proteínas más estudiadas de PRRSV. Se ha sugerido que GP5 induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Murthy *et al.*, 2015). También se ha reportado que la proteína GP5 contiene epítomos de reconocimiento para linfocitos B y T. Los sitios para células T están ubicados principalmente en la región del endodominio, en las posiciones de aa 117-131 y 149-169. Por lo tanto, estos aa juegan un papel relevante en la respuesta inmune adaptativa celular del hospedero (Vashisht *et al.*, 2008).

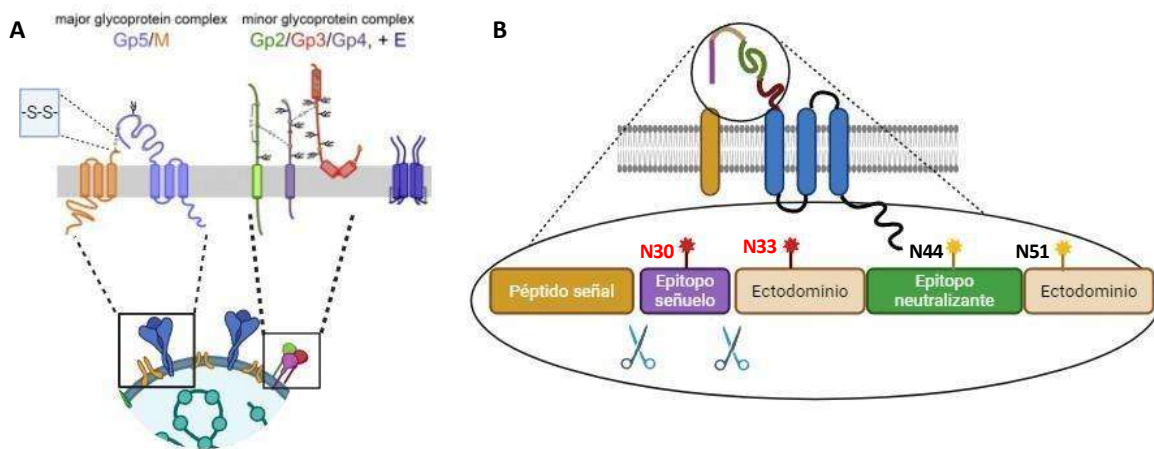


Figura 7. Estructura de la proteína GP5 de PRRSV. (A) Heterodímero de GP5/M (naranja y azul respectivamente) y homotrímero de GP2, GP3, GP4 y E (Verde, morado, rojo y azul marino respectivamente). Membrana en gris claro. (B) Probables sitios de escisión del péptido señal y del epítomo señuelo. Se produce en dos sitios: en A26|V27 (sitio 1) o en A31|S32 (sitio 2), como se indica. El epítomo neutralizante (verde) está presente en todas las variantes predichas, pero el "epítomo señuelo" (magenta) no se conserva en la proteína madura por escisión en el sitio 2. Creado en Biorender, 2024.

3.8.- Célula blanco de PRRSV

La diana celular primaria de este virus son los alveolares e intravasculares de los pulmones. Pero el virus también se replica en macrófagos de tejidos linfoides y en menor medida, en células dendríticas y macrófagos que residen en el espacio perivascular. Cada vez hay más evidencia de que ciertas cepas altamente patógenas del PRRSV también son capaces de infectar células endoteliales de los pulmones, el corazón y el encéfalo. Esta propiedad del virus se asocia a una mayor patogenicidad (OMSA, 2021).

3.8.1.- Receptores de macrófagos alveolares

Hasta ahora se han sugerido al menos seis moléculas celulares como receptores para PRRSV, estas son: el heparán sulfato, vimentina, CD151, sialoadhesina (CD169; siglec-1), molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas que captura no integrina (DC-SIGN; CD209) y CD163 (SRCR, receptor carroñero rico en cisteína) (Zhang & Yoo, 2015) (Figura 8).

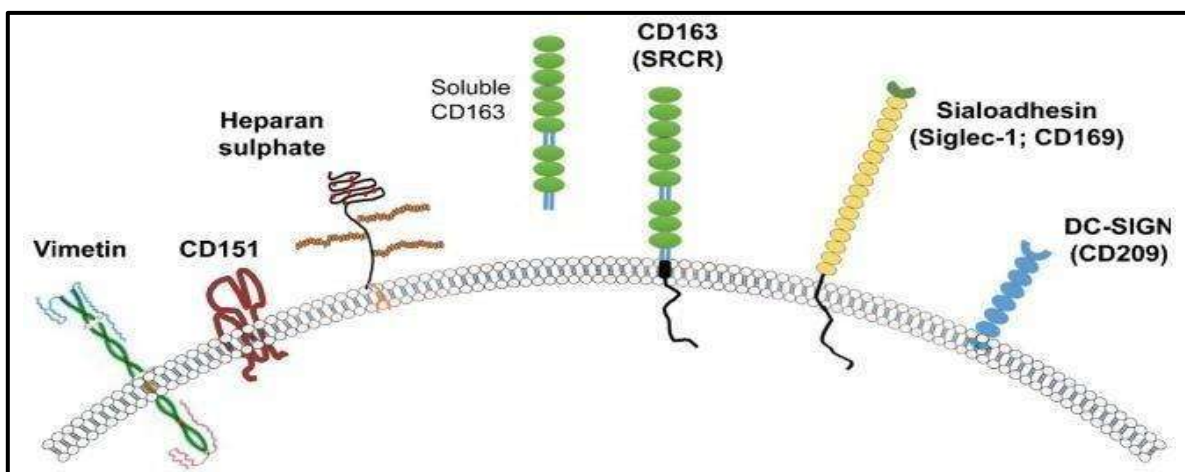


Figura 8. Receptores para PRRSV. Se han descrito seis moléculas como receptores celulares para PRRSV. Tomado de Zhang & Yoo, 2015.

Durante de la infección por PRRSV, CD163 desempeña un papel esencial, ya que participa en la eliminación del revestimiento y en la internalización del virión. Se sabe que el complejo formado por las glicoproteínas de membrana GP2a, GP2b, GP3, GP4,

M y GP5 se une al receptor CD163, y esta interacción es fundamental para el ingreso del virus a la célula (Dokland, 2010). La expresión de CD163 está restringida al linaje de los macrófagos y está estrechamente regulada por señales proinflamatorias y antiinflamatorias, lo que sugiere un papel crítico en las respuestas inmunitarias.

3.9.- Mecanismos de PRRSV para la evasión de la respuesta inmune

3.9.1.- Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata

Se ha informado que el PRRSV reprime las respuestas de interferón (IFN) tipo I y de citocinas proinflamatorias en células dendríticas plasmocitoides (pDCs por sus siglas en inglés) porcinas, que son una fuente importante de IFN- α y de otras citocinas proinflamatorias con una reacción rápida a la infección viral (Calzada-Nova *et al.*, 2011). Los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores tipo RIG-I (RLR) son dos PRR principales en mamíferos que detectan virus de ARN (Chow *et al.*, 2015). Entre todos los TLR, TLR3 reconoce el ARN bicatenario viral; TLR7 y TLR8 reconocen el ARN monocatenario viral (Heil *et al.*, 2004). TLR3 y TLR7 porcinos son los TLR más investigados en células porcinas. En la infección por PRRSV, la expresión de TLR3 y TLR7 porcinos está regulada positivamente y tiene la capacidad de provocar la activación de IFN. Sin embargo, los TLR están limitados en la detección de virus porque se expresan en un rango limitado de tipos celulares. Por el contrario, los RLR, RIG-I y la proteína 5, asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5), expresados en casi todos los tipos de células, son helicasas de ARN citoplasmáticas que reconocen ARN no propio (Chow *et al.*, 2015).

En términos generales, todas las células nucleadas tienen la capacidad de producir IFN- α/β , pero las pDC son las productoras más potentes de esta familia de citocinas (Malterer *et al.*, 2014). Estudios en cerdos infectados mostraron que PRRSV ha desarrollado un conjunto de mecanismos para suprimir la actividad de los IFN α/β , manteniendo bajos niveles de expresión de estas citocinas, durante casi todo el curso de la infección, poco después de la elevación transitoria en los pulmones. La supresión

de IFN- α/β también tiene lugar *in vitro* en macrófagos alveolares porcinos y MARC-145 infectados con PRRSV (Chen *et al.*, 2019).

La proteína nsp1 de PRRSV se considera el antagonista más fuerte de la producción de IFN- β , al interferir con la fosforilación y traslocación nuclear del factor regulador de interferón 3 (IRF3). Por otro lado, se sugirió que nsp2 tiene diferentes roles relacionados con mecanismos de evasión inmune. Se ha determinado que el dominio desubiquitinante dependiente de tiol (OTU) en nsp2, inhibe al factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NF- κ B), lo que deriva en la inhibición de la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias. La proteína nsp11 también antagoniza la producción de IFN- β . En el contexto de IL-10, la cual es una citocina anti inflamatoria, se ha reportado que PRRSV modula su expresión positivamente para suprimir la respuesta inmune innata y adaptativa (Song *et al.*, 2010).

3.9.2.- Mecanismos de evasión de la respuesta inmune adaptativa

Los linfocitos CD4⁺ de tipo Th1 pueden diferenciarse a células T de memoria, además, pueden mejorar la función de los macrófagos e inducir la proliferación de linfocitos T CD8⁺ al secretar IL-2 e IFN- γ . Mientras que, los linfocitos CD4⁺ diferenciados a Th2 pueden promover la maduración de linfocitos B a células plasmáticas, mejorando su capacidad de secretar anticuerpos específicos anti-PRRSV; igualmente los linfocitos Th1 pueden inducir la conversión de linfocitos B a linfocitos B de memoria (Wang *et al.*, 2007). El PRRSV afecta la funcionalidad de los linfocitos T a través de la alteración de las DC y la regulación negativa de las moléculas de la superficie celular. La muerte celular de las DC conduce a un fracaso en el inicio de una inmunidad adaptativa eficiente (Xiao *et al.*, 2004). Se ha informado que las respuestas de las células T aparecen entre 4 y 8 semanas y las células CD4⁺ y CD8⁺ permanecen bajas y constantes después de la infección, lo que indica que la inmunidad mediada por células (IMC) es transitoria y se retrasa en la infección por PRRSV. Estas respuestas anormales de células T sugieren que la infección con PRRSV interfiere con su funcionalidad a través de mecanismos indirectos que aún no están bien descritos (Ke

& Yoo, 2017).

Las respuestas débiles y tardías de anticuerpos neutralizantes (Nabs), así como el desarrollo de cantidades significativas de anticuerpos no neutralizantes, son las principales formas en que el PRRSV afecta la inmunidad humoral del huésped (Tarbes-Montaner *et al.*, 2019). El PRRSV tarda entre 7 y 9 dpi en inducir la secreción de anticuerpos; sin embargo, estos anticuerpos no son protectores, mientras que los Nabs están presentes hasta 28 días después de la infección (Loving *et al.*, 2015).

3.10.- Vacunas comercialmente disponibles contra PRRSV

Actualmente la vacunación es la medida de prevención y de control de propagación del PRRSV más empleada en la industria porcina a nivel global. Existen dos tipos de vacunas comercialmente disponibles: la vacuna con virus atenuado (MLV por sus siglas en inglés) y la vacuna que incluye al PRRSV inactivado.

3.10.1.- Vacunas MLV

Un estudio demostró que la vacuna MLV brinda una protección eficaz frente a cepas homologas de PRRSV, pero brinda una protección parcial o nula contra cepas heterólogas (Chareerntantanakul, 2012). Por otro lado, (Chareerntantanakul, 2012; Wang *et al.*, 2013) demostraron que los cerdos vacunados con MLV podrían desarrollar viremia cuatro semanas después de la inmunización, lo que lleva a la transmisión del virus de la vacuna a cerdos no vacunados. Estos hechos, refuerzan la necesidad de proponer el desarrollo de plataformas vacunales más seguras y eficaces frente a cepas heterólogas de PRRSV.

En granjas libres de PRRSV, las vacunas MLV se utilizan generalmente para la prevención de la enfermedad. Las vacunas MLV ofrecen una prevención inmunológica adecuada en cerdos de 3 a 18 semanas de edad. Además, pueden ejercer efectos protectores dentro de los 7 días posteriores a la vacunación y el período de protección es más largo, llegando a más de 16 semanas. La inmunización de cerdas jóvenes también puede mejorar su desempeño reproductivo. La cepa de la vacuna determina la efectividad de la vacuna atenuada, y la diversidad genética del PRRSV influye en la

efectividad de la vacuna atenuada (Charoenchanikran *et al.*, 2016). Sin embargo, las vacunas MLV han provocado brotes de PRRSV asociados al virus vacunal. En consecuencia, la reversión a la virulencia de los animales vacunados con MLV es de gran preocupación, y estas observaciones experimentales también son consistentes con los brotes atípicos de, PRRS, informados en rebaños vacunados desde 1996 (Mengeling *et al.*, 1998).

3.10.2.- Vacunas Inactivadas

Las vacunas inactivadas contra el PRRSV han sido autorizadas en todo el mundo, debido a su mayor seguridad. Sin embargo, desde 2005 ya no las ha distribuido dentro EU, debido a la observación de su baja eficacia. Se ha reportado que algunas de las ventajas de las vacunas inactivadas se correlacionan con la disminución en el número de mortinatos y la tasa de abortos de las cerdas inmunizadas, mientras que la fertilidad de las cerdas y la tasa de supervivencia de los lechones aumentaron. Por otro lado, como parte de los efectos adversos, informaron la falta de producción de anticuerpos específicos frente a PRRSV (Kim *et al.*, 2011).

3.10.3.- Vacunas de ADN, subunidades y vectores virales

Las vacunas de ADN, también conocidas como vacunas genéticas, se basan en la inoculación directa de vectores (plásmidos) de expresión en células eucariotas para producir antígenos específicos de microorganismos patógenos, en el cuerpo de un animal para estimular una respuesta inmune. (Cui *et al.*, 2016). Un estudio demostró que la inmunización de cerdos con una vacuna de ADN recombinante, la cual consta de un plásmido que contiene secuencias en mosaico de la proteína de GP5 del PRRSV, provoca una mayor expresión de anticuerpos específicos del virus y aumenta la expresión de IFN- γ , sin embargo, la protección conferida es parcial (Cui *et al.*, 2016).

Esto sugiere que la vacuna de ADN basada en el antígeno GP5 de PRRSV es inmunogénica, pero sería necesario incluir otros antígenos del PRRSV para inducir una respuesta celular y humoral más completa (Cui *et al.*, 2016).

Por su parte, las vacunas de subunidades constan de genes que codifican para antígenos específicos de un microorganismo. Aunque son seguras y estables, su inmunogenicidad podría ser baja y con un periodo de inmunidad corto. Además, su costo de producción es alto y su tiempo de desarrollo es relativamente largo. La vacunación en cerdas gestantes con una vacuna de subunidades de PRRSV confirió protección parcial contra los genotipos PRRSV-1 y PRRSV-2 (Oh *et al.*, 2019).

Las vacunas de PRRSV hechas a partir de vectores virales, utilizan principalmente poxvirus, adenovirus, virus del herpes y virus de la pseudorrabia porcina para expresar los genes inmunogénicos centrales del virus. Estudios recientes han demostrado que rPRRSV-E2, una vacuna candidata para un vector de PRRSV recombinante que expresa la proteína E2 del virus de la peste porcina clásica (CSFV), indujo cierta protección contra los genotipos HP-PRRSV y CSFV (Gao *et al.*, 2020). En los últimos años, los vectores virales vivos han demostrado un gran potencial en la investigación de vacunas contra PRRSV, pero sus costos de producción son altos, su eficiencia es baja y el virus portador también puede desencadenar una respuesta inmune, reduciendo así la efectividad de la vacuna (Gao *et al.*, 2020).

Las nuevas vacunas aún están lejos de estar listas para la aplicación en campo. En la (Tabla 1) se incluye una lista de vacunas candidatas a vacunas en desarrollo y sus desventajas o beneficios.

Tabla 1. Vacunas de nueva generación para PRRSV.

	Codificación ORF/GP	Inmunogenicidad		Protección		Referencia
		Anticuerpos	CMI	Homóloga	Heteróloga	
Vacuna de DNA	ORF 1-7	+	+	+	ND	(Barfoed <i>et al.</i> , 2004)
Vacuna de subunidades	GP5	Pobre	Pobre	-	ND	(Prieto <i>et al.</i> , 2011)
Vacuna de péptidos sintéticos	GP5	-	-	ND	-	(Chareerntantanakul <i>et al.</i> , 2006)
Vacuna de vector adenovirus	GP3,4,5	+	+	ND	ND	Zhou <i>et al.</i> (2010)
Vacuna de vector de poxvirus	GP3,5, M	+	+	+	ND	Zheng <i>et al.</i> (2007)

3.10.4.- Vacunas basadas en epítomos

Un epítopo es un determinante antigénico específico para inducir una respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T o una respuesta humoral mediada por linfocitos B. Se ha diseñado una vacuna multiepítopo contra brucelosis, basada en epítomos predichos que tenían una longitud de 377 residuos de aa. Donde evaluaron las propiedades fisicoquímicas, las estructuras secundarias y terciarias, la estabilidad, el desorden proteico intrínseco, la solubilidad y la alergenicidad de esta vacuna multiepítopo, utilizando herramientas y servidores inmunoinformáticos. Así mismo,

reportaron que este prototipo de vacuna peptídica fue capaz de inducir consistentemente respuestas inmunes mediadas por células T (Saadi *et al.*, 2017).

El desarrollo de una vacuna multiepítopo exitosa depende en primer lugar de la selección de antígenos candidatos apropiados y sus epítomos inmunodominantes. La predicción de epítomos antigénicos apropiados de una proteína diana mediante métodos inmunoinformáticos, es extremadamente importante para diseñar una vacuna multiepítopo.

En la figura 9 se describe, a partir de un modelo, el mecanismo molecular y celular propuesto sobre el sistema inmunitario de las vacunas multiepítopo. En comparación con las vacunas clásicas y las vacunas de un solo epítopo, las vacunas de epítopo múltiple tienen conceptos de diseño únicos con las siguientes propiedades: (I) constan de múltiples epítomos restringidos al MHC que puede ser reconocido por TCR de múltiples clones de varios subconjuntos de células T; (II) constan de epítomos de células CTL, Th y B que pueden inducir respuestas inmunes celulares y humorales, simultáneamente; (III) constan de múltiples epítomos de diferentes antígenos virales que pueden ampliar los espectros de reconocimiento o inmunogenicidad; (IV) introducen algunos componentes con capacidad adyuvante que pueden potenciar la inmunogenicidad y respuestas inmunes duraderas (Saadi *et al.*, 2017).

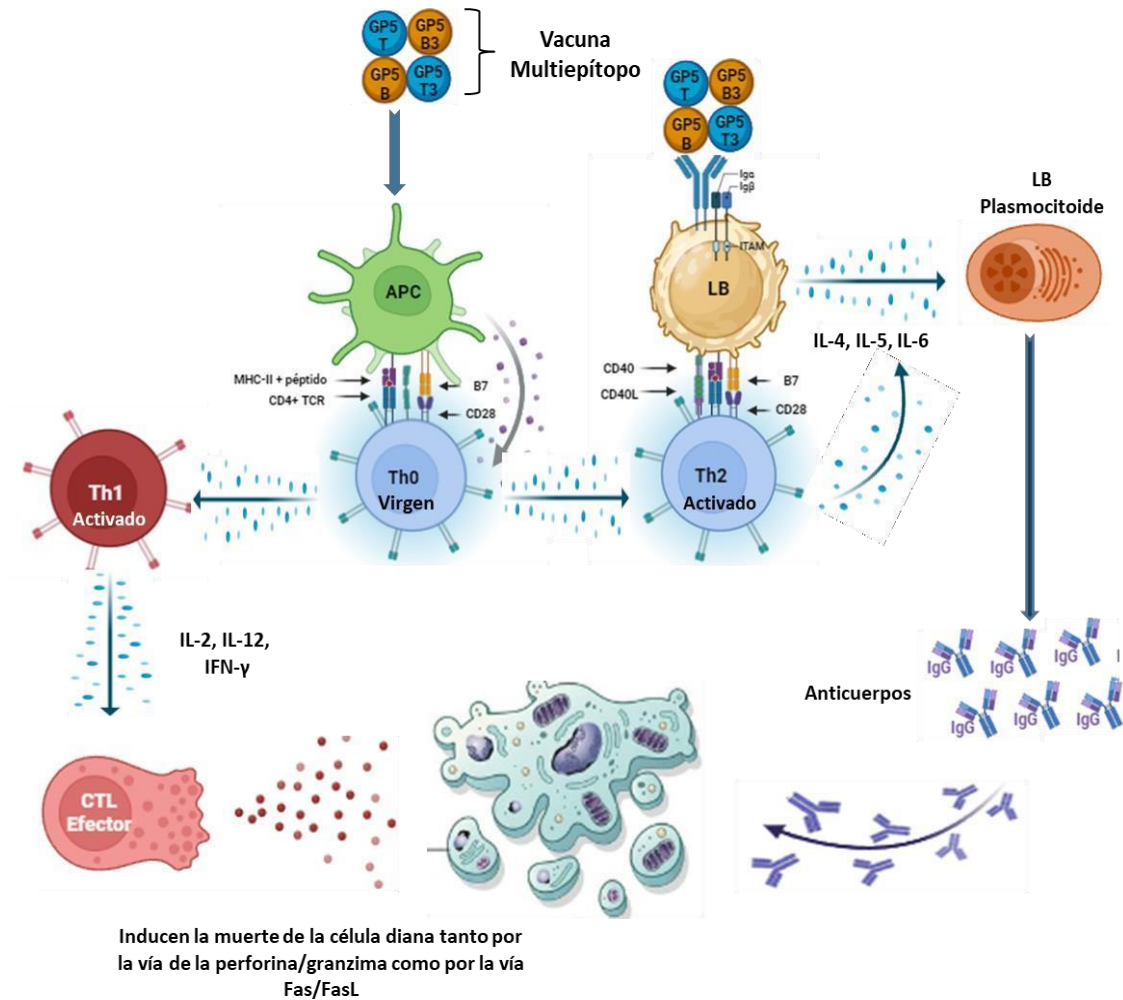


Figura 9. Mecanismos celulares y moleculares de las respuestas inmunológicas inducidas por vacunas multiepitótopo. Las vacunas multiepitótopo están constituidas de epítomos de reconocimiento por células CTL, Th y B, en péptidos de epítomos en serie o epítomos superpuestos. A) A través de receptores TCR, los precursores de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ (pCTL CD8+) reconocen los complejos de péptidos antigénicos CTL, presentados por moléculas MHC-I de las células infectadas. B) Las células presentadoras de antígeno (APC) toman la vacuna multiepitótopo y presentan los péptidos antigénicos Th unidos a las moléculas MHC-II a las células Th0 que pueden diferenciarse en células CTL CD4+, Th1 y Th2. Las células CTL CD4+ secretan citotoxinas, matando directamente a las células infectadas mediante la liberación de gránulos que contienen perforina y granzima. Las células Th1 secretan citocinas que estimulan a los pCTL CD8+ para generar células CTL efectoras, las cuales matarán a las células infectadas, tanto por la vía de perforina/granzima como por la vía Fas/FasL. C) Las células Th2 reconocen el epítomo Th unido a MHC-II presentado por las células B. Después de ser activadas, las células Th2 expresan moléculas CD40L y secretan citocinas para estimular la activación de células B. Las células B reconocen a los epítomos B a través de BCR, presentando los epítomos Th a través de MHC-II para activar a las células Th2. En consecuencia, las células B proliferan y se diferencian en células plasmáticas por la interacción del ligando CD40L a su receptor CD40 y por acción de las citocinas Th2. Las células plasmáticas secretan anticuerpos multiepitótopo específicos para realizar funciones antivirales en las células infectadas, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento. Modificado de Zhang, 2018 en Biorender.

Actualmente se trabaja en el desarrollo de diversos modelos vacunales, dirigidos contra diferentes enfermedades infecciosas, basados en epítipo único o múltiples epítipos (Tabla 2).

Tabla 2. Vacunas basadas en epítipos

Vacunas en desarrollo	ORF	Epítipos	Componentes	Protección	Referencia
PRRSV	GP3 y GP5	(4) MHCII, (5) MHCI y (10) LB	• Adyuvante • Entrelazadores • Epítipos	• Humoral • Celular	(Liu & Chen 2024)
SARS-COV2	Spike (S)	(2) CTL, (2) HTL y (2) LB	• Adyuvante • Entrelazadores • Epítipos	• Humoral • Celular	(Umintaibatin <i>et al.</i> , 2023)
MPXV (Virus de la viruela del simio)	A35R, B6R y H3L	CTL, HTL y LB	• Se desconoce	• Humoral • Celular	(Tan <i>et al.</i> , 2023)
DENV (Virus del dengue)	NS1, NS3 y NS5	CTL, HTL y LB	• Adyuvante • Entrelazadores • Epítipos	• Humoral • Celular	(Fadaka <i>et. al.</i> , 2021)
SARS COV-2	RBD de la proteína (S1)	CTL, HTL, LB y TLR-3	• Se desconoce	• Respuesta innata • Humoral • Celular	(Sirohi <i>et al.</i> , 2020)

4.- ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado y descrito las propiedades inmunogénicas de 4 péptidos sintéticos, derivados de la proteína GP5 del virus PRRS, en modelos *in vitro* y en modelos *in vivo* (roedores y lechones). Dos de ellos, GP5-T y GP5-T3, son capaces de inducir de manera fuerte y sostenida, la activación de la respuesta celular de Linfocitos Th y T citotóxicos (CTL). Además, ambos péptidos inducen la expresión de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, dos péptidos, el GP5-B y GP5-B3, han mostrado ser capaces de inducir la producción de anticuerpos IgG asociados a anticuerpos neutralizantes y de favorecer la activación de Linfocitos B plasmáticos (Tabla 3). Las propiedades inmunogénicas y los modelos *in vitro* e *in vivo* se muestran en las tablas 2-5.

Con los antecedentes descritos, en este trabajo se planteó continuar evaluando, en un modelo murino, la inmunogenicidad de los péptidos GP5-T, GP5T3, GP5-B y GP5-B3 conjugados a una proteína acarreadora y con los adyuvantes CpG 1018 y Alhydrogel. Si bien, en nuestro grupo de trabajo ya se habían evaluado los péptidos de manera individual en el modelo murino, aún quedaba la incógnita de qué tipo de respuesta inducirían de manera conjunta. Es por eso que, en este trabajo se planteó caracterizar la respuesta de los péptidos de manera conjunta, en el contexto de la activación de linfocitos T CD4+, CD8+ y anticuerpos totales (IgG).

Tabla 3. Propiedades inmunogénicas de péptidos derivados de la proteína GP5

Péptidos	Modelo	Respuesta del hospedero	Referencia	Resultados
GP5-T	In vivo: • Ratón • Cerdo	• Humoral • Celular	• Perez Duran (2020) • Calderón Rico (2023)	• Aumento de leucocitos totales y anticuerpos totales IgG. • Inducción TNF α , IL1B e IL-6, IL-12, IL-4 e IL10 de CTL's totales y actividad citolítica in vitro.
	In vitro: • Macrófagos de ratón • Macrófagos de cerdo	• Celular • Celular	• Piña Díaz (2021) • Morales Gachuz (2022)	• Inducción de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1b. • Aumento en la expresión de TNF- α
GP5-T3	In vivo: • Cerdo	• Celular	• Calderón Rico (2023)	• Inducción de citocinas proinflamatorias: TNF α , IL1B e IL-6, IL-12, IL-4 e IL10.
GP5-B	In vivo: • Ratón • Cerdo	• Humoral • Humoral	• Perez Duran (2020) • Perez Duran (2024)	• Aumento de Ac's totales IgG. Y activación de LB. • Inducción de Ac's específicos (IgG1 e IgG2)
	In vivo: • Ratón • Cerdo	• Humoral • Humoral	• Zamora Avilés (2021) • Pérez Duran (2024)	• Inducción de títulos altos de Ac's específicos (IgG1 e IgG2)

5.- JUSTIFICACIÓN

Desde su aparición hace más de 30 años, las pérdidas económicas ocasionadas por el PRRSV rebasan los \$1000 millones de USD anualmente en la industria porcícola a nivel mundial. Aunado a ello, la alta tasa de mutación en el genoma del virus, da lugar a nuevas variantes del PRRSV a partir de brotes.

La vacunación es la medida más eficaz para la prevención y contención de la infección por PRRSV, sin embargo, las dos vacunas comerciales actualmente disponibles, tienen deficiencias en aspectos de eficacia y seguridad. La vacuna MLV, que ha sido la más utilizada, confiere protección tardía pero efectiva contra cepas homólogas de PRRSV, mientras que solo confieren protección parcial o ninguna protección contra cepas heterólogas. Con respecto a la seguridad se ha reportado la propagación del virus vacunal, de animales vacunados a animales no vacunados. Es por eso que, ha surgido la necesidad de evaluar nuevas formulaciones vacunales.

En el presente trabajo se pretende evaluar la inmunogenicidad, tanto humoral como celular, de un candidato vacunal basado en epítomos derivados de la proteína GP5 del PRRSV.

6.- HIPÓTESIS

El candidato vacunal TetraPep-GO, conformado por cuatro péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV: GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3, inducirá inmunogenicidad humoral y celular en ratones.

7.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inmunogenicidad humoral y celular del modelo vacunal TetraPep-GO en ratones.

8.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la producción de anticuerpos totales en ratones inmunizados con el modelo vacunal TetraPep-GO.
2. Evaluar la activación de linfocitos T (CD8+ y CD4+) en ratones inmunizados con el modelo vacunal TetraPep-GO.
3. Evaluar la expresión de las citocinas IL-6, INF- γ , TNF- α , IL-12, IL-5 e IL-4, en suero de ratones después de la inmunización con TetraPep-GO.

9.- MATERIALES Y MÉTODOS

9.1.- Ratones.

Se utilizaron ratones hembra de la línea Balb/C, los cuales fueron adquiridas en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) a una humedad del 50%, en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h, alimentación *ad libitum* (Purina Certified Rodent Chow) y agua. Todos los procedimientos siguieron el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, USA) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999.

Los procedimientos de toma de muestra de sangre se realizaron con ayuda de un dispositivo de inmovilización y sin anestesia. Se registró el peso corporal cada 7 días. Se utilizaron ratones de 6 semanas de edad. Los ratones se separaron en 3 grupos de 6 individuos de manera aleatoria, a los cuales se les asignaron los tratamientos: grupo de control negativo, grupo vehículo de control positivo (BSA-Maleimida + adyuvante CpG1018 + adyuvante ALOH) y el grupo experimental, TetraPep-GO (Péptidos + proteína acarreadora + adyuvante CpG1018 + adyuvante ALOH).

9.2.- Características fisicoquímicas de péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS

Los péptidos GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3 fueron sintetizados por Genscript, bajo el siguiente esquema de trabajo.



Figura 10. Esquema de trabajo de síntesis de los péptidos GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3

Finalmente, los péptidos sintetizados quedaron con las características fisicoquímicas que se enuncian en la Tabla 4.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de péptidos GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3

Péptidos	GP5-T	GP5-T3	GP5-B	GP5-B3
Secuencia	RLYRWRSPIVGHILDKRVV RVSAEQWGRP	KGRLYRWRSPIVEKLAALI CFVIRLAKN	ASNDSSSHLQLIYNLTCELNG TDWLANKF	SSSNLQLIYNLTTPVTRVSA EQWGRPC
(aa)	30	29	30	27
Pureza	95.0 %	98.0 %	95.0 %	96.3 %
P.M (Dáltones)	3644.29	3414.18	3368.72	3044.42
P. I	12.2	10.7	4.54	
Solubilidad	DMSO	DMSO y H2O	DMSO	DMSO

9.3.- Modelo vacunal TetraPep-GO

Se utilizó la formulación del modelo vacunal TetraPep-GO conformado por cuatro péptidos derivados de la proteína GP5 del virus PRRS, una proteína acarreadora y dos adyuvantes (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes de la formulación de TetraPep-GO y vehículo

Componentes de la formulación vacunal	Control	Vehículo	TetraPep-GO
Péptidos (GP5T, GP5T3, GP5B y GP5B3)			✓
BSA- Maleimida		✓	✓
Adyuvante Alhidrogel® 2%		✓	✓
Adyuvante CpG (1018)		✓	✓

Tabla 6. Concentración de péptidos evaluados individualmente y en conjunto (TetraPep-Go)

Referencia	Péptidos (probados individualmente)	Concentración/ peso	Concentración final/ratón	TetraPep-GO (modelo murino)	Concentración final/ratón
Pérez Duran (2020)	GP5-T (murino)	1 µg /g	32 µg/30 g de peso	GP5-T	32 µg
Calderón Rico (2023)	GP5-T3 (cerdo)	0.02 µg/g	200 µg/7.5 kg de peso	GP5-T3	32 µg
Pérez Duran (2020)	GP5-B (murino)	1 µg /g	32 µg/30 g de peso	GP5-B	32 µg
Zamora Avilés (2021)	GP5-B3 (murino)	1 µg /g	32 µg/ 30 g de peso	GP5-B3	32 µg

1. Inmunización Péptidos independientes

- Péptido-BSA + ALOH = 128 µl
- Péptido 32 µg (32 µl)
- BSA (1 mg/ml) 96 µl

- ALOH (2%)

2. Inmunización TetraPep-Go

- TetraPep-GO-BSA + ALOH + CpG
- Péptido 32 µg (32 µg)
- BSA (1 mg/ml) 96 µl
- ALOH (2%)

9.4.- Anticuerpos

Se utilizó el anticuerpo secundario cabra-anti-ratón IgG (H+L) (Invitrogen, número de catálogo 31430), HRP el cual, es un anticuerpo policlonal, creado en cabra que reacciona contra las cadenas pesadas y ligeras de IgGs de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). En su presentación viene liofilizado en un volumen de 2 ml y a una concentración de 0.8 mg/mL.

9.5.- Imject® Maleimide Activated BSA

La BSA activada con maleimida es utilizada como proteína acarreadora porque permite la conjugación de antígenos peptídicos que contienen sulfhídrido con la proteína portadora de albúmina sérica bovina inmunogénica, para la inmunización y la producción de anticuerpos. La albumina de suero bovina se encuentra acoplada a un grupo imida, el cual reacciona con grupos sulfhídrido (SH) formando enlaces tiol, mediante este enlace la BSA funge como acarreador del péptido (Figura 11). Fue obtenida de Thermo Scientific, número de catálogo: 77115.

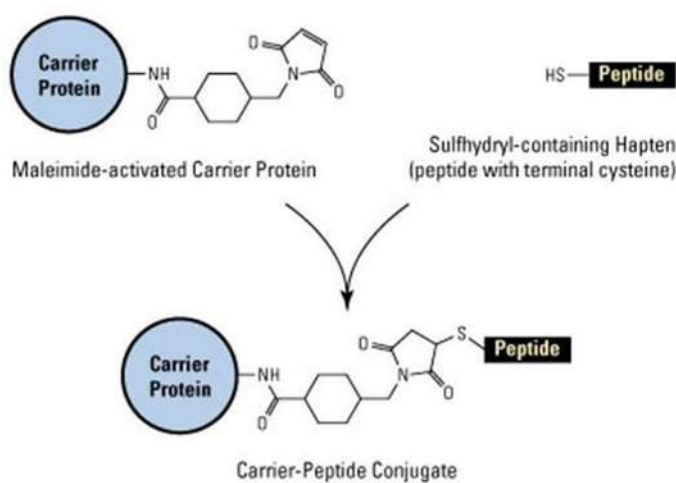


Figura 11. Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida. De Denovo biotechnology.

9.6.- Adyuvante Alhidrogel® 2%

Alhidrogel® adyuvante al 2%, denominado alumbre, es una suspensión de gel húmedo de hidróxido de aluminio. El alumbre induce una respuesta Th2, al mejorar la atracción y absorción del antígeno por las células presentadoras de antígeno (APC) (Morefield GL. *et al.*, 2005). También puede activar vías de inmunidad innata desencadenadas por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). El alumbre actúa principalmente mediante la formación de un depósito en el lugar de la inyección, lo que permite una mayor disponibilidad de antígenos (Franchi & Nuñez., 2008). El adyuvante Alhidrogel® se utilizó en las 2 inmunizaciones al día 0 y al día 21. Se obtuvo de InvivoGen con el número de catalogo: vac-alu-50; vac-alu-250.

9.7.- Adyuvante CpG oligodeoxynucleotides Mouse

Los oligodesoxinucleótidos (ODN) CpG, son moléculas cortas de ADN monocatenario sintético no metilado. Este adyuvante es útil para la activación de TLR9, a una concentración de 5-20 ug/ml (Jeong *et al.*, 2021). Su secuencia es la siguiente: ODN (1018) Tipo B: 5' T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*C*G*T*T*C*G*A*G*A* T*G*A 3'. Se obtuvo de Novus Biologicals a Biotech Brand con el número de catalogo: NBP2-31142.

9.8.- Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de los ratones al día 0 antes de inmunizar, al día 21 antes de la segunda inmunización y al día 42, a través de punción de la vena lateral de la cola. Se recolectaron 150 µl/ratón. La punción se realizó con agujas de 0.80 mm de diámetro, mientras los ratones se encontraban sujetos en un dispositivo de inmovilización. La sangre completa se recolectó con pipetas Pasteur humedecidas con EDTA 0.5 M, pH 8.5, con las que se obtuvo la sangre por capilaridad.

Para el procesamiento de las muestras de sangre, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos para obtener suero control y experimental, mismos que se preservaron en ultracongelación a -80°C.

9.9.- Inmunización

Se realizaron 2 inmunizaciones por vía subcutánea a los días 0 y 21, siguiendo el

esquema de inmunización establecido. Los ratones fueron sujetos de la piel del dorso y la cola.

Esquema de inmunización:

- **Día 0.** Se obtuvo suero preinmune (control) y se realizó la primera inmunización con el adyuvante Alhidrogel® 2%, adyuvante CpG (1018), BSA-Maleimida y los péptidos GP5-T, GP5-T3, GP5-B y GP5-B con un volumen total del mix de 202 µl/ratón.
- **Día 21.** Se obtuvo suero de la 1ra. Inmunización, después se llevó a cabo la segunda inmunización con el adyuvante Alhidrogel® 2%, adyuvante CpG (1018), BSA-Maleimida y los péptidos GP5-T, GP5-T3, GP5-B y GP5-B con un volumen total del mix de 202 µl/ratón.
- **Día 42.** Se obtuvo suero y sangre periférica de la 2da. Inmunización (al día 21).
- **Día 80.** Los ratones de los 3 grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación. La sangre fue recolectada en tubos estériles con EDTA y se obtuvo suero.

9.10.- Detección de anticuerpos totales

El análisis de anticuerpos para cuantificar inmunoglobulinas G totales, se llevó a cabo bajo la metodología del Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) de tipo directo (Figura 12). Este ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de alta unión de la marca COSTAR con el número de catalogo 3361. Siguiendo el protocolo establecido para el acoplamiento de los sueros, en la placa se colocó 1µl de sueros de ratón por duplicado de los días 0, 21, 42 y 80, se colocaron 99 µl de buffer de carbonatos, posteriormente se dejó incubando durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05% y se llevó a cabo el bloqueo, utilizando gelatina de pescado [0.05%] suspendida en PBS/Tween 0.05%, se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0.05%, seguido de la adición del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG (H+L), conjugado con peroxidasa de rábano (HRPe, por sus siglas en ingles), con el que se incubó la placa 2 h a TA. Nuevamente se realizaron 3 lavados con

PBS/Tween 0.05% y se agregaron 100 μ l de ABTS (sustrato para la reacción enzimática). Finalmente, para cuantificar la intensidad colorimétrica catalizada por la enzima HRP del conjugado que se unió a los anticuerpos IgG en los sueros de los ratones, se llevaron a cabo las lecturas cada 5 min, durante 30 min, a 415 nm en un microlector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader).



Figura 12. Esquema del ensayo ELISA para la cuantificación de IgG totales. Creada con BioRender

9.11.- Aislamiento de leucocitos de sangre periférica

A los 80 días pos-inmunización (dpi) se llevó a cabo el sacrificio de los ratones de los tres grupos: control sin inmunizar, vehículo y TetraPep-GO, para recuperar 600 μ l de sangre periférica por ratón, en tubos lila EDTA-K2 de 4 ml. La sangre se mezcló con 100 μ l del buffer de lisis de glóbulos rojos (Roche, número de catalogo: 60669400) por inversión durante 10 min en microtubos de 2 ml. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2,000 RPM durante 6 minutos. Después se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en el volumen residual y se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1x. Las muestras se centrifugaron a 2,000 RPM por 6 minutos y el sobrenadante fue desechado para resuspender las muestras en 500 μ l PBS 1x. Finalmente se llevó a cabo la inmunotipificación de células por citometría de flujo.

9.12.- Diseño de paneles de anticuerpos, para la inmunotipificación de linfocitos T

La caracterización de linfocitos T se realizó a partir de la detección de marcadores de superficie (CD3+), que es un marcador específico de linfocitos T maduros, así como a

través de la detección de marcadores específicos de linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y a través de la detección de marcadores de activación (CD44+). Las pruebas de marcaje se llevaron a cabo con anticuerpos conjugados con diferentes fluoróforos: anti-CD3e-PerCp/Cy5.5 (Biolegend, núm. Cat: 45003182), anti-CD4-Alexa Flúor 405 (RM4.5, ThermoFisher Scientific, núm. Cat: MCD0426), anti-CD44-PE (IM7, ThermoFisher Scientific, núm. Cat: 12044182) anti-CD8a-PE (Sigma-Aldrich, núm. Cat: SAB4700566), y CD44-eFluor 450 (Thermo Fisher Scientific, núm. Cat: 48-0441-82) (Tabla 7).

Para la delimitación de la población de linfocitos, se partió de los parámetros de tamaño a través de la dispersión de luz frontal (FSC-A) y de complejidad a través de la dispersión de luz lateral (SSC-A) (Figura 14A). Utilizando los mismos parámetros, se generó una ventana de las células individuales (Figura 14B). Posteriormente para la caracterización de las subpoblaciones de linfocitos, se realizaron análisis de dobles positivos a través de histogramas bivariados. En una gráfica de densidad se muestra las determinaciones del canal BL3-A (CD3) contra el canal VL1-A (CD4), para la selección de linfocitos T cooperadores CD3+/CD4+ (Figura 14C). Por último, a partir de la población de células CD3+/CD4+, se evaluaron las poblaciones de linfocitos T cooperadores activos (CD4+/CD44++) en el canal BL2-A y linfocitos T cooperadores efectores de memoria (CD4+/CD44+++) en el canal VL1-A (Figura 14D). Para el análisis de linfocitos T CD8+, se partió de la delimitación de linfocitos totales como se describió previamente (Figura 15A y 15B). Para detectar la población CD8+/CD44+ se realizó un análisis de dobles positivos en los canales VL1-A (CD44+) y BL2-A (CD8+).

Tabla 7. Anticuerpos conjugados a fluorocromos utilizados para la detección específica de marcadores de superficie de leucocitos.

ANTICUERPO	FLUORÓFORO	VOLUMEN	CANALES	VOLTAJE
ANTI-CD3	PerCP/Cy 5.5	2µl	BL3-A	380
ANTI-CD4	Alexa Flúor 405	2µl	VL1-A	210
ANTI-CD44	PE	2µl	BL2-A	290
ANTI-CD3	PerCP/Cy 5.5	2µl	BL3-A	380
ANTI-CD8	PE	2µl	BL2	300
ANTI-CD44	eFluor 450	2µl	VL1-A	210

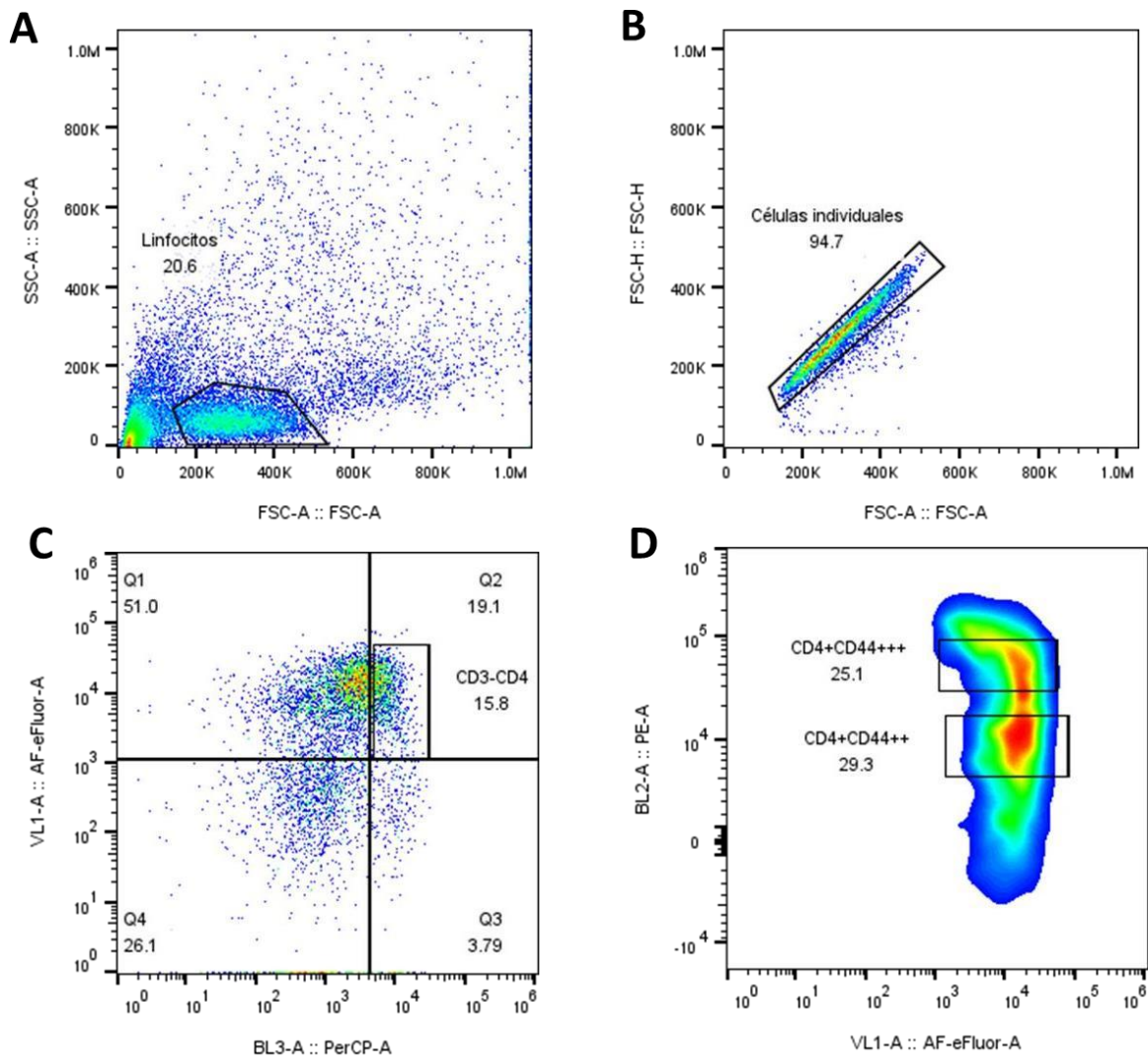


Figura 13. Ruta de análisis representativo para la obtención de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD44+. A) Delimitación de la población de linfocitos totales. B) Selección de células individuales. C) Selección de dobles positivos a través de cuadrantes. La población de interés de las células CD3+/CD4+ se ubica en el cuadrante Q2. D) Delimitación de la población de linfocitos CD4+/CD44++ y CD4+/CD44+++. Los colores representan la densidad poblacional, el color azul muestra baja densidad poblacional, el color rojo representa la mayor densidad poblacional

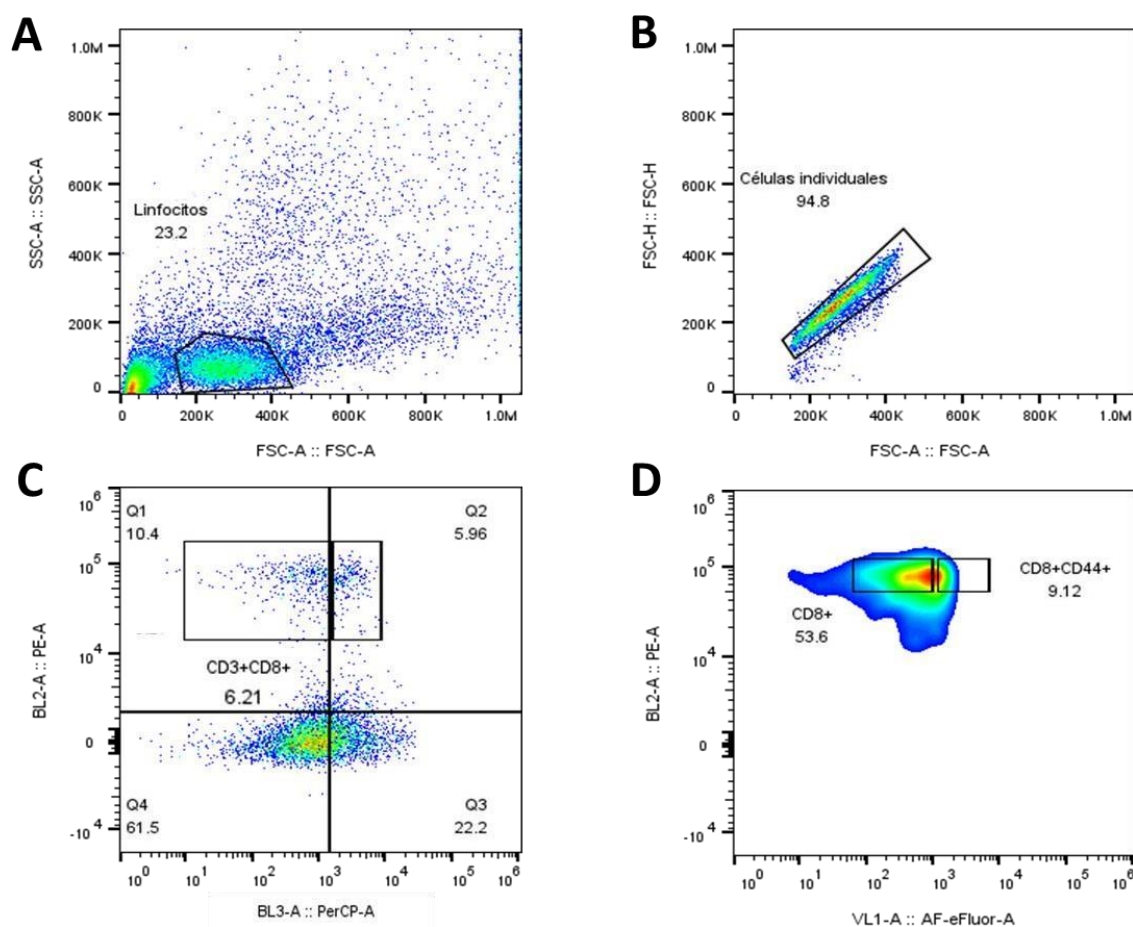


Figura 14. Ruta de análisis representativa para la obtención de los porcentajes de linfocitos T CD3+, CD8+ y CD44+. A) Delimitación de la población de linfocitos totales. B) Selección de células individuales. C) Selección de dobles positivos a través de cuadrantes. La población de las células CD3+/CD8+ se ubica en el cuadrante Q2. D) Delimitación de las subpoblaciones de linfocitos CD8+ y CD8+CD44+. Los colores representan la densidad poblacional, el color azul muestra baja densidad poblacional, el color rojo representa la mayor densidad poblacional

9.13 Detección de citocinas

La concentración de citocinas IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α se determinó utilizando el kit comercial ProcartaPlex™ Mouse Essential Th1/Th2 Cytokine Panel, 6plex de inmunoensayo multiplex Cytokine (Invitrogen, Cat. EPX080-20832-901), siguiendo los protocolos del fabricante. En la primera etapa del protocolo, se llevó a cabo la preparación de las muestras de suero de ratón (obtenidos a las 24 h y 48 h posteriores a la inmunización), centrifugándolas a 1,000 rpm por 10 min. Después se colocaron 25 μ l de suero en tubos nuevos, como siguiente paso, se preparó la mezcla

de anticuerpos de detección de las citocinas a evaluar, donde se añadieron 60 µl de cada anticuerpo de detección al tubo de mezcla y posteriormente se añadió el anticuerpo diluido a 1x a un volumen final de 3 ml para la placa completa.

En la siguiente etapa del protocolo, se preparó la placa colocando el mix de perlas de captura 1x a cada uno de los pocillos, para después llevar a cabo el lavado de las perlas con 150 µl del buffer de lavado. Posteriormente, se añadieron 25 µl de las muestras de suero de ratón y los estándares en los pocillos correspondientes de la placa, se cubrió la placa y se dejó en agitación durante 2 h a TA. Transcurridas las 2 h, se llevó a cabo un lavado y se adicionaron los anticuerpos de detección biotinilados a cada uno de los pocillos. Después de lavar, se añadió estreptavidina-PE (SA-PE) en los pocillos. Finalmente se llevó a cabo la cuantificación en un equipo Luminex 200 (Austin, TX, EE. UU.).

9.14.- Análisis estadístico

El análisis de datos y las gráficas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA). Las diferencias entre grupos fueron analizadas a través de ANOVA de una vía con poshoc de Tukey. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

10.- RESULTADOS

10.1.- Seguimiento de peso de los ratones durante el desarrollo del ensayo

El peso corporal de los ratones, correspondientes a los tres grupos: control, vehículo y TetraPep-GO, fue registrado cada semana desde el día de llegada de los ratones (una semana antes del día 0) hasta los 42 dpi. Los resultados muestran una ganancia de peso constante en los 3 grupos, sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 15). También se mantuvo en observación el sitio de inoculación durante todo el experimento, en general se observó que no hubo daño al tejido en el sitio de inyección, tanto en el grupo vehículo como en los grupos experimentales, a través del curso de este estudio (Dato no mostrado).

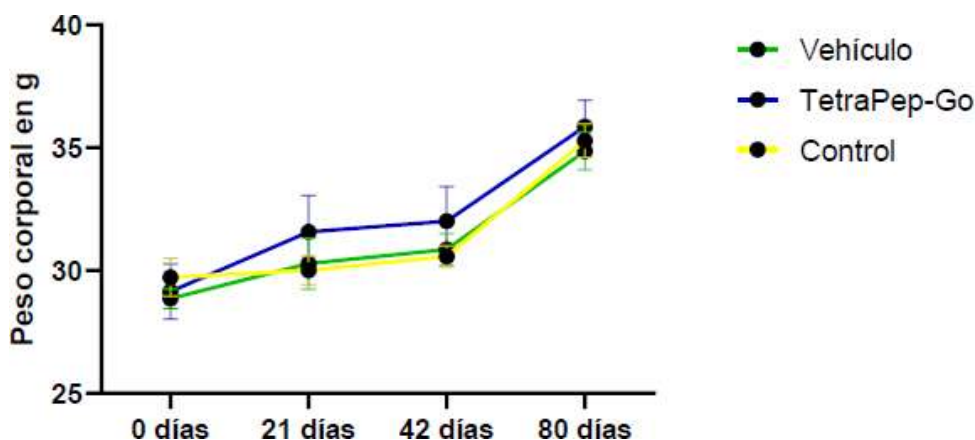


Figura 15. Seguimiento del peso corporal de los ratones durante el curso del experimento. Se graficaron los promedios de masa corporal en gramos de los sujetos pertenecientes al grupo control (n=5) y los grupos inmunizados con vehículo y TetraPep-GO (n=5 en cada grupo), durante el desarrollo del tratamiento experimental.

10.2.- IgGs totales en ratones inmunizados con TetraPep-GO

Las IgG's totales se evaluaron en un curso temporal de 0, 21, 42 y 80 dpi. Al día 0 en las muestras recolectadas de suero preinmune, se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control, vehículo y TetraPep-GO (Figura 16A). Sin embargo, al día 21 después de la primera inmunización, se observó un aumento significativo de IgG's totales en el grupo vehículo y en el grupo inmunizado con TetraPep-GO con respecto al grupo control sin inmunizar (Figura 16B). A los 42

dpi, se observó que la concentración de IgG's aumentó a casi el doble en comparación con los 21 dpi en el grupo inmunizado con TetraPep-GO, el cual mostró diferencias significativas con respecto al grupo control sin inmunizar y con respecto al grupo inmunizado con el vehículo (Figura 16C). Finalmente, a los 80 dpi también se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de TetraPep-GO con respecto a los grupos control y vehículo. Además, se observó una diferencia significativa entre el grupo vehículo con respecto al grupo control (Figura 16D).

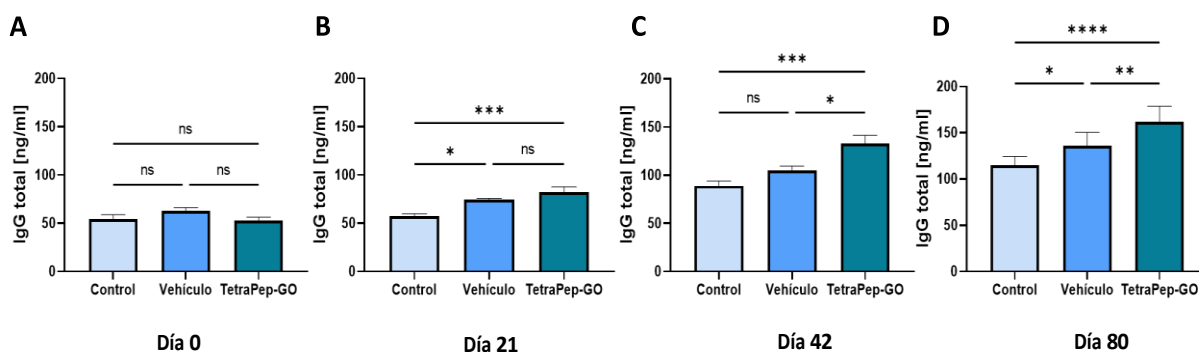


Figura 16. Concentración de Inmunoglobulinas G (IgG's) totales en sueros de ratones Balb/C inmunizados con TetraPep-GO. IgG's totales [ng/ml] evaluadas en el grupo control sin inmunizar, en el grupo vehículo inmunizado con dos adyuvantes y una proteína acarreadora e IgG's totales evaluadas en el grupo inmunizado con TetraPep-GO, 2 adyuvantes y una proteína acarreadora. (A) IgG's evaluadas al día 0. (B) IgG's evaluadas al 21 dpi. (C) IgG's evaluadas al 42 dpi (D) IgG's evaluadas al 80 dpi. Las gráficas muestran el error estándar de la media ($\pm$ S.E.M) con $n=6$. Los valores de P se obtuvieron analizando los datos con una prueba de Anova de una vía con poshoc de Tukey. *P $\leq$; **P $\leq$; ***P $\leq$; ****P $\leq$; NS (no significativo) P 0.05.

10.3.- Linfocitos T CD4+ activos en ratones inmunizados con TetraPep-GO

Al evaluar la subpoblación de linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ activados a los 80 dpi, se observó un aumento estadísticamente significativo de en el porcentaje de células activadas CD4+/CD44++ en el grupo inmunizado con el vehículo e inmunizado con TetraPep-GO con respecto al grupo control, pero no se observó diferencia en el grupo inmunizado con TetraPep-GO con respecto al grupo vehículo (Figura 17A). Con respecto a las células activadas CD4+/CD44++, se observó un aumento de esta subpoblación de linfocitos T en el grupo inmunizado con TetraPep-GO con respecto a los grupos control y vehículo (Figura 17B).

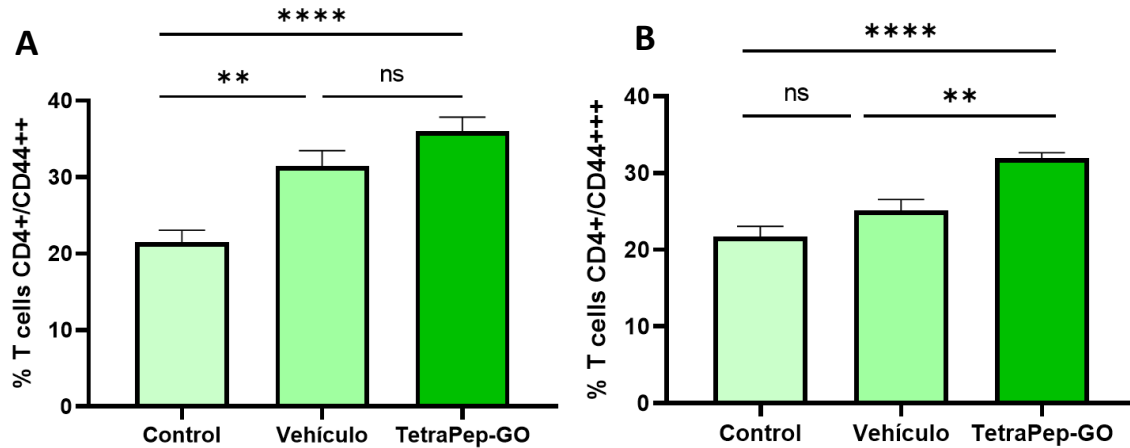


Figura 17. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T (CD4+) en sangre total de ratones inmunizados con TetraPep-GO. (A) % de linfocitos T (CD44++). (B) % de linfocitos T (CD44+++). Las gráficas muestran el error estándar de la media ($\pm$ S.E.M) con $n=7$. Los valores de P se obtuvieron analizando los datos con una prueba de Anova de una vía con poshoc de Tukey. ** $P \leq 0.005$; *** $P < 0.0001$; NS (no significativo) $P \geq 0.05$.

10.4.- Subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en ratones inmunizados con TetraPep-GO

En el análisis de linfocitos T CD8+ se observó un aumento de esta subpoblación celular en el grupo inmunizado con TetraPep-GO al día 80 con respecto al grupo control sin inmunizar y con respecto al grupo inmunizado con el vehículo (Figura 14A). Por otra parte, también se optó por evaluar si TetraPep-GO inducía activación de linfocitos T CD4+/CD44+ sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos. Estos datos sugieren que TetraPep-GO indujo un aumento de linfocitos T citotóxicos CD8+ totales, pero no indujo un fenotipo de activación CD8+/CD44+.

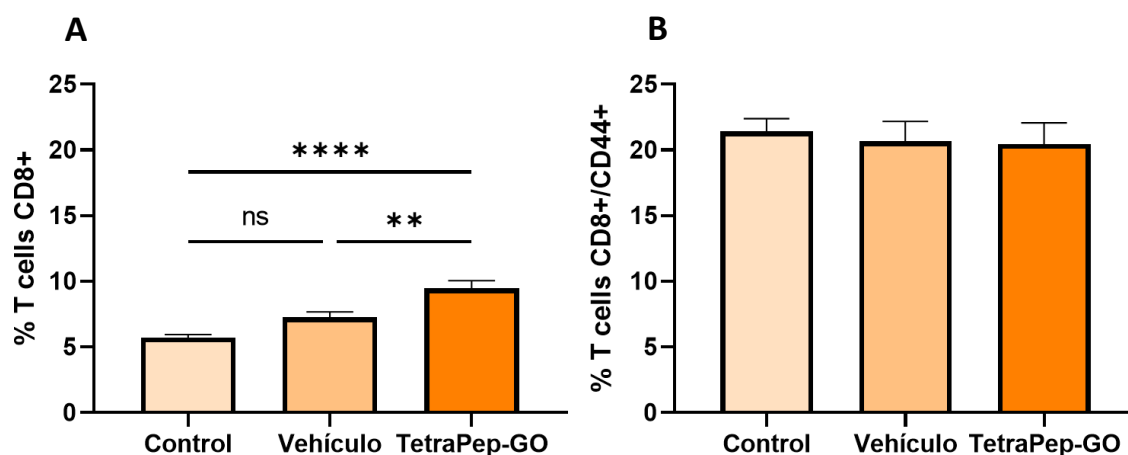


Figura 18. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T (CD8+) en sangre total de ratones inmunizados con TetraPep-GO. **(A)** % de linfocitos T citotóxicos (CD8+) **(B)** % de linfocitos T activados (CD8+/CD44+). Las gráficas muestran el error estándar de la media ($\pm$ S.E.M) con $n=7$. Los valores de P se obtuvieron analizando los datos con una prueba de Anova de una vía con poshoc de Tukey. ** $P \leq 0.005$; *** $P < 0.0001$; NS (no significativo) $P > 0.05$.

10.5.- Valores de citocinas relacionadas con la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 en ratones inmunizados con TetraPep-GO

Para determinar los estados de diferenciación de linfocitos a un perfil Th1 y Th2, las concentraciones de citocinas se cuantificaron en muestras de suero recolectadas a las 24 h y 48 h posteriores a la inmunización. Los ratones inmunizados con TetraPep-Go, no mostraron una concentración sérica estadísticamente significativamente de las citocinas: IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6 y TNF- α con respecto a los grupos control y vehículo, tanto a las 24 h como a las 48 h posteriores a la inmunización (Figuras 19A-19L).

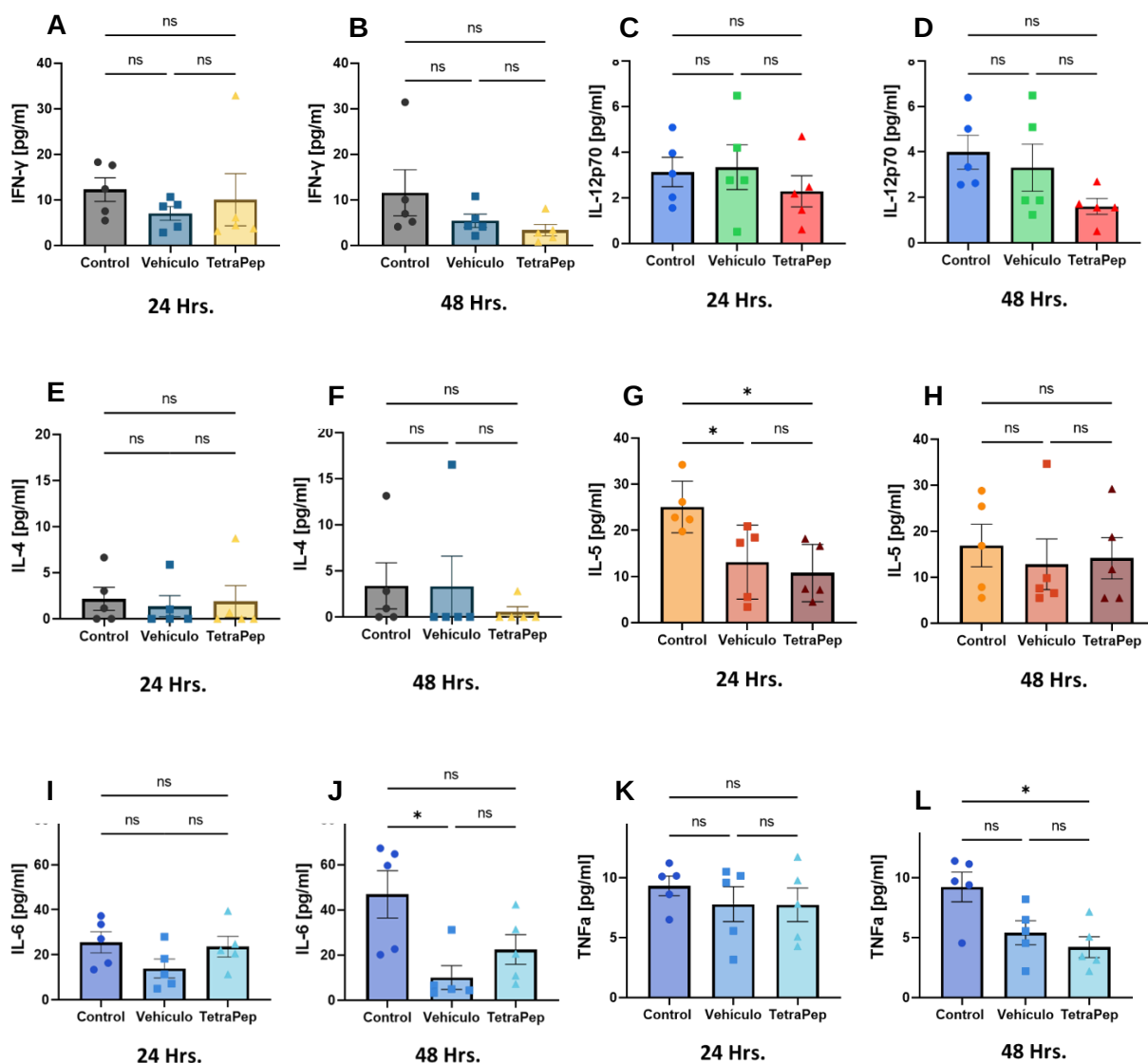


Figura 19. Valores de las citocinas: IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6 y TNF- α en sueros de ratones inmunizados con TetraPep-GO. Para la determinación simultanea de citocinas, los sueros de los ratones se recolectaron a las 24 h y 48 h posteriores a la inmunización. (A) IFN- γ (24 h), (B) IFN- γ (48 h), (C) IL-12p70 (24 h), (D) IL-12p70 (48 h), (E) IL-4 (24 h), (F) IL-4 (48 h), (G) IL-5 (24 h), (H) IL-5 (48 h), (I) IL-6 (24h), (J) IL-6 (48 h), (K) TNF- α (24 h). Las gráficas muestran el error estándar de la media ($\pm$ S.E.M) con n=5. Los valores de P se obtuvieron analizando los datos con una prueba de Anova de una vía con poshoc de Tukey. *P $\leq$; NS (no significativo) P 0.05.

11.- DISCUSIÓN

La medida de contención más eficaz en el manejo de la enfermedad ocasionada por el PRRSV, es la vacunación. Desde hace algunas décadas se han utilizado las vacunas clásicas, entre ellas están las vacunas con virus inactivados y las vacunas con virus atenuados (MLV), siendo esta última, el tipo de vacuna más empleada por los productores porcícolas. En el contexto de bioseguridad, la vacuna con el virus completo representa un riesgo en la reversión de la virulencia del virus y además no confiere protección inmunológica frente a cepas heterólogas. Se han probado vacunas de ADN, vacunas de subunidades o vacunas con vectores virales, pero su potencial como reemplazos de las vacunas MLV contra el desarrollo del PRRS, sigue siendo incierto en el contexto de eficacia (Nan *et al.*, 2017)

En consecuencia, ha surgido la necesidad de emplear diferentes enfoques para desarrollar nuevas plataformas vacunales seguras y efectivas. Las construcciones de vacunas con varias regiones epitópicas podrían mejorar tanto la antigenicidad como la inmunogenicidad de las vacunas. Las vacunas basadas en epítomos cubren varios aspectos de gran relevancia para el desarrollo de una vacuna, ya que el empleo de porciones pequeñas de antígeno representa un enfoque óptimo de seguridad, así mismo, estas vacunas constan de un alto grado de especificidad, ya que están constituidas de determinantes antigénicos específicos para ser reconocidos por linfocitos B y T. Además, su manejo también representa una ventaja, ya que los péptidos se liofilizan y de esta manera se puede prescindir de la cadena de frío (Malonis *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue analizar la inmunogenicidad inducida por el candidato vacunal TetraPep-GO, que consta de 4 péptidos lineales (GP5-B, GP5-B3, GP5-T y GP5-T3), que contienen epítomos de reconocimiento para linfocitos B y T, debido a que hasta el momento no se ha reportado la propuesta de un biológico con las características de TetraPepGo.

Los péptidos lineales incluidos en TetraPep-GO, han sido evaluados tanto en modelos *in vitro*, como en modelos *in vivo* (Calderón-Rico *et al.*, 2024; (Perez-Durán *et al.*, 2024).

Particularmente en este trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida por los cuatro péptidos previamente evaluados de forma individual, de manera conjunta, en un modelo murino, tanto en el contexto de la respuesta mediada por anticuerpos totales (IgG), como en el contexto de la respuesta celular mediada por linfocitos T cooperadores CD4⁺ y linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Además, se llevó a cabo el seguimiento del peso corporal de los ratones como un indicador de salud, por lo que el aumento constante de peso con respecto al tiempo durante el experimento indica que los ratones se mantuvieron saludables, ya que, ganaron peso y este se mantuvo hasta los 80 dpi en los grupos inmunizados con el vehículo y con TetraPep-GO. Las infecciones y las vacunas generan dos olas de anticuerpos: la primera ola es generada por células plasmáticas tempranas de vida corta, listas para entrar en circulación sistémica, pero esta ola disminuye rápidamente después de la resolución de la infección. La segunda ola es generada por un número menor de células plasmáticas de vida más larga que brindan inmunidad de larga duración (Alter & Seder, 2020). En nuestro trabajo al evaluar IgG total en un curso temporal de los 0, 21, 42 y 80 dpi, se observó que en los grupos de ratones inmunizados con TetraPep-GO, la concentración de IgG total alcanzó su nivel más alto a los 42 dpi. Esta respuesta de anticuerpos se mantuvo hasta los 80 dpi, lo cual sugiere la presencia anticuerpos (IgG total) secretados por células plasmáticas de vida larga. Estos resultados se alinean con lo reportado recientemente en nuestro grupo de trabajo, donde, con la misma formulación de TetraPep-GO en un modelo murino, se detectaron LB activos a los 80 dpi. Dichos LB se asociaron con LB plasmocitoides de vida larga, que son las células efectoras secretoras de anticuerpos. Además, en el mismo trabajo se cuantificó la concentración de IgG1 e IgG2, reportando altos niveles, aún hasta los 80 dpi (Pérez-Duran *et al.*, 2024).

Por otro lado, se realizó la inmunotipificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, en donde se observó que en los grupos inmunizados con TetraPep-GO aumentó la cantidad de linfocitos T cooperadores activados (CD4⁺/CD44⁺⁺) a los 80 dpi con respecto a los grupos control y vehículo. Así mismo, se observó un aumento en la población de LTh asociados a memoria. Con respecto a los linfocitos T citotóxicos (LTc, CD8⁺), aunque se observó un aumento de linfocitos CD8⁺ totales, no se observó un

fenotipo de activación (CD8+/CD44+) en los ratones inmunizados con TetraPep-GO. Esto podría explicarse por el hecho de que, para poder observar una diferencia en la activación de CD8+, sería necesario realizar un ensayo de desafío frente a la cepa viral (Franzoni *et al.*, 2013). Tras la infección y la vacunación, los LT se diferencian en una población heterogénea de células efectoras que median la eliminación de patógenos. Un subconjunto de estos LT efectores posee la capacidad de sobrevivir y madurar hasta convertirse en LT de memoria que pueden proporcionar inmunidad a largo plazo. La actividad de los LT de memoria es crucial para el diseño de vacunas capaces de generar inmunidad basada en células T. Las células T CD4+ son esenciales en la formación de células T CD8+ de memoria tras la infección o la inmunización (Laidlaw *et al.*, 2016). Se ha informado un porcentaje mayor de linfocitos Th activados hasta los 45 dpi, con lo cual se sustenta el mantenimiento de esta población celular después de la inoculación con péptidos de GP5. DE la misma manera, el presente trabajo se encontró que hubo activación de LTh hasta los 80 dpi, correspondientes al fenotipo CD4+/CD44+++, el cual, se asocia a un fenotipo de memoria. Por lo tanto, estos datos coinciden y confirman la inducción de memoria inmunológica de largo plazo, mediada por LTh, a partir de la inoculación de ratones con péptidos de GP5; específicamente la formulación TetraPep-GO (Pérez-Durán, 2020).

Se conoce que la respuesta celular frente a antígenos virales induce la diferenciación de células T CD4 + y CD8 + secretoras de IFN- γ e IL-4, las cuales son citocinas que modulan las cascadas de señalización que dan lugar a procesos de diferenciación de Th1/Th2. La activación de Th1/Th2 puede contribuir a la reducción de las cargas virales y también podría prevenir significativamente la pérdida de peso corporal (Chung *et al.*, 2022). Así como IFN- γ e IL-4, existen diversas citocinas que participan en procesos de activación y diferenciación de linfocitos cooperadores. Con el objetivo de seguir estudiando la respuesta mediada por linfocitos T en ratones inmunizados con el candidato vacunal TetraPepGo, se cuantificó la concentración sérica de 6 citocinas (IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α) relacionadas con las respuestas de Th1/Th2 a las 24 y 48 hpi, en un modelo murino. En los grupos inmunizados con TetraPepGo no se observó diferencia significativa en el aumento de la concentración de ninguna de las citocinas evaluadas con respecto a los grupos control. Se ha informado que a partir

de las 6 h se puede detectar la secreción inducida por péptidos de IFN- γ e IL-4 *in vitro*, pero que se requieren 24 h para revelar la frecuencia completa de las células Th1 y Th2 específicas de antígeno proteico en un modelo murino (Duechting *et al.*, 2017). También, recientemente en un ensayo piloto se reportó que ratones inmunizados con una formulación de 4 péptidos derivados de proteínas del virus del sarampión con adyuvante incompleto de Freund y CpG, indujo una respuesta predominante de citocinas con sesgo a Th1 (IFN- γ e IL-4) hasta los 8 dpi (Quach *et al.*, 2024). Por otro lado, se reportó que al evaluar el perfil de citocinas séricas (IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α) en un modelo murino frente a 2 vacunas autorizadas de mRNA contra SARS-Cov2: ARNm BNT162b2 y ARNm-1273, con un esquema de inmunización de 5 semanas se observó un aumento significativo en la concentración del perfil de citocinas evaluadas hasta la semana 4 (Nakayama *et al.*, 2022).

Si bien, la inmunización con péptidos que contienen epítopos dirigidos para inducir respuestas celulares T y B es un enfoque para proponer nuevos candidatos vacunales, este enfoque aún carece de una caracterización más amplia de las respuestas celulares inducidas por péptidos en un modelo murino. Contrastando lo reportado en trabajos previos, con lo observado en este trabajo, se sugiere que el comportamiento atípico de la expresión las citocinas evaluadas, puede deberse principalmente al punto temporal de evaluación. Por lo que se sugiere para futuros ensayos realizar la evaluación del perfil de citocinas en puntos temporales más prolongados.

12.- CONCLUSIÓN

En conjunto los datos sugieren que, en modelo murino, la formulación Tetra-Pep-Go es segura e induce inmunogenicidad a largo plazo. Por lo tanto, en estudios futuros será viable evaluar en modelo de cerdos, la capacidad de protección que ofrece TetraPep-GO contra el desarrollo del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.

13.- PERSPECTIVAS

Como perspectivas para ensayos a futuro a partir de los datos obtenidos en este trabajo se propone:

- En un modelo murino, evaluar la inmunodominancia de los péptidos que conforman TetraPep-GO. Esto con la finalidad de identificar el péptido que está induciendo más fuerte y sostenidamente las respuestas de LT y LB.
- Aunque se ha informado que los perfiles de citocinas séricas se pueden observar desde las 6 h, en función a los datos obtenidos en el presente trabajo, se sospecha que además de que TetraPep-GO induce una respuesta mediada por células retardada, también podría estar induciendo una respuesta retardada en el contexto de citocinas. Por lo que se propone evaluar en murinos el perfil de citocinas en puntos temporales más tardíos.
- Para poder observar una diferencia en la activación de linfocitos T CD8+, se sugiere hacer un ensayo de desafío frente a la cepa viral en un modelo porcino.
- Para poder dilucidar a mayor profundidad el efecto de los adyuvantes sobre la inmunogenicidad, se sugiere hacer un ensayo comparativo entre grupos de ratones inmunizados con diferentes combinaciones de adyuvantes.

14.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	1er semestre	2do semestre	3er semestre	4to semestre
Delimitación del tema.	✓			
Revisión de bibliografía.	✓			
Toma de muestras (días 0, 21, 42 y 80).		✓	✓	
Inmunización de ratones (al día 0 y 21).		✓	✓	
Evaluación de anticuerpos totales. (IgG's)		✓	✓	
Estandarización de paneles de Ac's para Citometría de flujo		✓	✓	
Evaluación de poblaciones de linfocitos Th y Tc.			✓	
Evaluación de expresión de citocinas (IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-12)				✓

15.-BIBLIOGRAFÍA

- Alter, G., y Seder, R. (2022). The Power of Antibody-Based Surveillance. The New England journal of medicine.
- Álvarez, J., y Ruiz-Fons, F. (2013). Aplicaciones de la epidemiología en el control del PRRS.Suis, 99, 20-25.
- Calderon-Rico, F., Bravo-Patiño, A., Mendieta, I., Perez-Duran, F., Zamora-Aviles, A. G., Franco-Correa, L. E., Ortega-Flores, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2024). Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Viruses, 16(1). <https://doi.org/10.3390/v16010014>
- Calderon-Rico, F., Bravo-Patiño, A., Mendieta, I., Perez-Duran, F., Zamora-Aviles, A. G., Franco-Correa, L. E., Ortega-Flores, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2024). Glycoprotein 5-Derived Peptides Induce a Protective T-Cell Response in Swine against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Viruses, 16(1). <https://doi.org/10.3390/v16010014>
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W. M., Husmann, R. J., & Zuckermann, F. A. (2011). North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses Inhibit Type I Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells. Journal of Virology, 85(6), 2703-2713. <https://doi.org/10.1128/jvi.01616-10>
- Castillo A, Ramirez M. Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino: Una revisión del agente etiológico y su influencia en el comportamiento actual de la enfermedad. Rev Inv Vet Perú 2021; 32(1).
- Chareerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. World Journal of Virology, 1(1), 23-30. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.23>
- Chareerntantanakul, W., Platt, R., Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., & Roth, J. A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Veterinary Immunology and Immunopathology, 109(1-2), 99-115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.026>
- Chareerntantanakul, W., Platt, R., Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., & Roth, J. A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Veterinary Immunology and Immunopathology, 109(1-2), 99-115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.026>
- Charoenchanikran, P., Kedkovid, R., Sirisereewan, C., Woonwong, Y., Arunorat, J., Sittichareonchai, P., Sopipan, N., Jittimanee, S., Kesdangsakonwut, S., &

- Thanawongnuwech, R. (2016). Efficacy of Foster® PRRS modified live virus (MLV) vaccination strategy against a Thai highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) infection. *Tropical Animal Health and Production*, 48(7), 1351-1359. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1099-1>
- Charoenchanikran, P., Kedkovid, R., Sirisereewan, C., Woonwong, Y., Arunorat, J., Sitthichareonchai, P., Sopipan, N., Jittimanee, S., Kesdangsakonwut, S., & Thanawongnuwech, R. (2016). Efficacy of Foster® PRRS modified live virus (MLV) vaccination strategy against a Thai highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) infection. *Tropical Animal Health and Production*, 48(7), 1351-1359. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1099-1>
 - Chen, Z., Graham, S. P., Lamp, B., Montaner-Tarbes, S., Fraile, L., Del Portillo, H. A., & Montoya, M. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science* | www.frontiersin.org, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
 - Chen, Z., Graham, S. P., Lamp, B., Montaner-Tarbes, S., Fraile, L., Del Portillo, H. A., & Montoya, M. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science* | www.frontiersin.org, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
 - Cho, J. G., Dee, S. A., Deen, J., Guedes, A., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Collins, J. E., Murtaugh, M. P., & Joo, H. S. (2006). Evaluation of the effects of animal age, concurrent bacterial infection, and pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on virus concentration in pigs. *American journal of veterinary research*, 67(3), 489-493. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.3.489>
 - Chow Kang GJ, Ewing-Nelson SR, Mackey L, Schlitt JT, Marathe A, Abbas KM, S. S. (2015). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.051.PRRs>
 - Christianson, W. T., Chladek, D., Luijtz, E. A., & Den Besten, A. (1992). Antigenic comparison of Ielystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 134-138. <https://doi.org/10.1177/104063879200400203>
 - Cui, J., O'Connell, C. M., Smith, J. D., Pan, Y., Smyth, J. A., Verardi, P. H., & Garmendia, A. E. (2016). A GP5 Mosaic T-cell vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome virus is immunogenic and confers partial protection to pigs. *Vaccine Reports*, 6, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.vacrep.2016.11.003>
 - Das PB, D. P. (2010). The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *Journal of Virology*, 1731-1740.

- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Research*, 154(1-2), 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
- Duechting, A., Przybyla, A., Kuerten, S., & Lehmann, P. V. (2017). Delayed activation kinetics of Th2 and Th17 cells compared to Th1 cells. *Cells*, 6(3), 1-15. <https://doi.org/10.3390/cells6030029>
- Duran, F. P. (2017). Análisis de las propiedades funcionales de péptidos de la proteína gp5 del virus prrs que provoca el síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- Fadaka, A. O., Sibuyi, N. R. S., Martin, D. R., Goboza, M., Klein, A., Madiehe, A. M., & Meyer, M. (2021). Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. *Scientific Reports*, 11(1), 1-22. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99227-7>
- Franke ED, Hoffman SL, Sacci Jr JB, Wang R, Charoenvit Y, Appella E, et al. PanDR binding sequence provides T-cell help for induction of protective antibodies against Plasmodium yoelii sporozoites. *Vaccine* 1999;17(9- 10):1201-5
- Franzoni, G., Kurkure, N. V., Edgar, D. S., Everett, H. E., Gerner, W., Bodman-Smith, K. B., Crooke, H. R., & Grahama, S. P. (2013). Assessment of the phenotype and functionality of porcine cd8 t cell responses following vaccination with live attenuated classical swine fever virus (CSFV) and virulent CSFV challenge. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1604-1616. <https://doi.org/10.1128/CVI.00415-13>
- Gao, F., Jiang, Y., Li, G., Li, L., Zhang, Y., Yu, L., Zheng, H., Tong, W., Zhou, Y., Liu, C., Shan, T., Yu, H., Kong, N., Chen, P., & Tong, G. (2020). Evaluation of immune efficacy of recombinant PRRSV vectored vaccine rPRRSV-E2 in piglets with maternal derived antibodies. *Veterinary Microbiology*, 248(518), 108833. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108833>.
- Holtkamp, D. J., Kliebenstein, J. B., Neumann, E. J., Zimmerman, J. J., Rotto, H. F., Yoder, T. K., Wang, C., Yeske, P. E., Mowrer, C. L., & Haley, C. a. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72-84. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- Huang, Y. W., & Meng, X. J. (2010). Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research*, 154(1-2), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.020>
- Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure , replication and recombination : Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479-480, 475-486. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>

- Kappes, M. A., Miller, C. L., & Faaberg, K. S. (2013). Highly Divergent Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Incorporate Multiple Isoforms of Nonstructural Protein 2 into Virions. *Journal of Virology*, 87(24), 13456-13465. <https://doi.org/10.1128/jvi.02435-13>
- Ke, H., & Yoo, D. (2017). The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design or PRRS virus. *Veterinary microbiology*, 209, 75-89.
- Kim, H., Kim, H. K., Jung, J. H., Choi, Y. J., Kim, J., Um, C. G., Hyun, S. Bin, Shin, S., Lee, B., Jang, G., Kang, B. K., Moon, H. J., & Song, D. S. (2011). The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virology Journal*, 8(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-323>
- Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 102-111. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>
- Lin, H., Ma, Z., Hou, X., Chen, L., & Fan, H. (2017). Construction and immunogenicity of a recombinant swinepox virus expressing a multi-epitope peptide for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Scientific Reports*, 7(March). <https://doi.org/10.1038/srep43990>
- Liu, D., & Chen, Y. (2024). Epitope screening and vaccine molecule design of PRRSV GP3 and GP5 protein based on immunoinformatics. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(3), 1-12. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18103>
- López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1), 69-89.
- Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Veterinary Immunology and Immunopathology Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. 167, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.032>
- Malonis, R. J., Lai, J. R., & Vergnolle, O. (2020). Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chemical Reviews*, 120(6), 3210-3229. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472>
- Malterer, M. B., Glass, S. J., & Newman, J. P. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 44(3), 735-745. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Mateu, E., & Diaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *Veterinary Journal*, 177(3), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.022>
- Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (1998). Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory

syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *American journal of veterinary research*, 59(12), 1540-1544.

- Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*, 6(FEB), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
- Murthy, A. M. V., Ni, Y., Meng, X., & Zhang, C. (2015). Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8382-8396. <https://doi.org/10.3390/ijms16048382>
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., & Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(3), 385-392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- Nieuwenhuis, N., Duinhof, T. F., & Van Nes, A. (2012). Papers: Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Veterinary Record*, 170(9), 225. <https://doi.org/10.1136/vr.100101>
- Oh, T., Kim, H., Park, K. H., Jeong, J., Kang, I., Yang, S., & Chae, C. (2019). Effectiveness of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PrrsvPRRSV) subunit vaccine against heterologous PRRSV-1 and PRRSV-2 challenge in late-term pregnant gilts. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 83(4), 248-254.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal (2021). https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/indexcontent/newlang/es
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). PRRS : the disease , its diagnosis, prevention and control. Group, June, 9-11.
- Perez-Duran, F., Calderon-Rico, F., Franco-Correa, L. E., Zamora-Aviles, A. G., Ortega-Flores, R., Durand-Herrera, D., Bravo-Patiño, A., Cortes-Vieyra, R., Hernandez-Morales, I., & Nuñez-Anita, R. E. (2024). Synthetic Peptides Elicit Humoral Response against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine. *Vaccines*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/vaccines12060652>
- Pérez-Duran. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO (2020). Tesis de maestría 1-66.
- Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on

- vaccination. *Veterinary Research*, 47(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>
- Piña, D. M. (2021). Estudio de la respuesta inmune adaptativa celular a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
 - Plotkin, S. A. (2023). Recent updates on correlates of vaccine-induced protection. *Frontiers in Immunology*, 13(January), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1081107>
 - Prieto, C., Martínez-Lobo, F. J., Díez-Fuertes, F., Aguilar-Calvo, P., Simarro, I., & Castro, J. M. (2011). Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) results in enhanced clinical disease following experimental challenge. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 189(3), 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.07.010>
 - Quach, H. Q., Ratishvili, T., Haralambieva, I. H., Ovsyannikova, I. G., Poland, G. A., & Kennedy, R. B. (2024). Immunogenicity of a peptide-based vaccine for measles: a pilot evaluation in a mouse model. *Scientific Reports*, 14(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69825-2>
 - Saadi, M., Karkhah, A., & Nouri, H. R. (2017). Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.009>
 - Salguero, F. J., Frossard, J. P., Rebel, J. M. J., Stadejek, T., Morgan, S. B., Graham, S. P., & Steinbach, F. (2015). Host-pathogen interactions during porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection of piglets. *Virus Research*, 202, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.026>
 - Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>
 - Sirohi, P. R., Gupta, J., Somvanshi, P., Prajapati, V. K., & Grover, A. (2022). Multiple epitope-based vaccine prediction against SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(8), 3347-3358. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1846626>
 - Song, C., Krell, P., & Yoo, D. (2010). Nonstructural protein 1 α subunit-based inhibition of NF- κ B activation and suppression of interferon- β production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 407(2), 268-280. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.025>
 - Tan, C., Zhu, F., Pan, P., Wu, A., & Li, C. (2023). Development of multi-epitope vaccines against the monkeypox virus based on envelope proteins using

- immunoinformatics approaches. *Frontiers in Immunology*, 14(March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112816>
- Umitaibatin, R., Harisna, A. H., Jauhar, M. M., Syaifie, P. H., Arda, A. G., Nugroho, D. W., Ramadhan, D., Mardiyati, E., Shalannanda, W., & Anshori, I. (2023). Immunoinformatics Study: Multi-Epitope Based Vaccine Design from SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Vaccines*, 11(2), 1-21. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020399>
 - Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747-4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
 - Wang, R., Xiao, Y., Opriessnig, T., Ding, Y., Yu, Y., Nan, Y., Ma, Z., Halbur, P. G., & Zhang, Y. J. (2013). Enhancing neutralizing antibody production by an interferon-inducing porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain. *Vaccine*, 31(47), 5537-5543. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.023>
 - Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., & Murtaugh, M. P. (2004). The Level of Virus-Specific T-Cell and Macrophage Recruitment in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Pigs Is Independent of Virus Load. *Journal of Virology*, 78(11), 5923-5933. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5923-5933.2004>
 - Zamora, A. G. (2021). Estudio de la respuesta inmune humoral a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
 - Zeng, N., Wang, C., Liu, S., Miao, Q., Zhou, L., Ge, X., Han, J., Guo, X., & Yang, H. (2018). Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Gene Expression Profiles in Porcine Alveolar Macrophages in Response to the Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1538127>
 - Zhang, L. (2018). Multi-epitope vaccines: A promising strategy against tumors and viral infections. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(2), 182-184. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.92>
 - Zhang, Q., & Yoo, D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 177(3-4), 229-241. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.002>
 - Zhou, J. X., Xue, J. D., Yu, T., Zhang, J. B., Liu, Y., Jiang, N., Li, Y. L., & Hu, R. L. (2010). Immune responses in pigs induced by recombinant canine adenovirus 2 expressing the glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Research Communications*, 34(4), 371-380. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9364-7>

16.- ANEXOS

16.1 Reporte de similitud generado por el sistema Turnitin iThenticate

Sergio Molina Campos

Evaluación de la inmunogenicidad de un candidato vacunal multiepitópico derivado de la proteína GP5

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:455018703

Fecha de entrega

2 may 2025, 11:27 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

2 may 2025, 11:29 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Evaluación de la inmunogenicidad de un candidato vacunal multiepitópico derivado de la protel....pdf

Tamaño de archivo

2.3 MB

61 Páginas

15.422 Palabras

87.754 Caracteres

✓ iThenticate

Página 1 of 74 - Portada

Identificador de la entrega trn:oid::3117:455018703

✓ iThenticate

Página 2 of 74 - Integrity Overview

Identificador de la entrega trn:oid::3117:455018703

35% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Top Sources

33%  Internet sources

20%  Publications

0%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review



Replaced Characters

50 suspect characters on 19 pages

Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

16.2.- Formato de declaración de originalidad y uso de Inteligencia Artificial

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

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



A quien corresponda,

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

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

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Evaluación de la inmunogenicidad de un candidato vacunal multipéptido derivado de la proteína GP3 del virus PRRS.	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Sergio Molina Campos	1116679d@umich.mx
Director	Dra. Rosa Elvira Nafiez Anila	rosa.anila@umich.mx
Codirector	Dra. Ricarda Cortés Vieyra	ricarda.cortes@umich.mx
Coordinador del programa	Dr. Alejandro Bravo Patiño	alejandro.bravo@umich.mx

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

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

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



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

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Sergio Molina Campos
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán, 08 de abril del 2025