

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO



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

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO”

TESIS QUE PRESENTA
IBT. FRANCISCO PEREZ DURAN

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESOR:
D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

CO-ASESOR
D.C. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

MORELIA, MICH., Marzo de 2020

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

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 del Dr. Alejandro Bravo Patiño.

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.

Este trabajo fue parcialmente financiado por la CIC-UMSNH 2018-2019. También, fue auspiciado por CONACYT Ciencia Básica (A1-S-43236) y CONACYT Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular.

Además, agradecemos el apoyo que consistió en la Beca Nacional CONACYT 2018-1 (No. de becario 704023) y la beca de movilidad nacional 2019-1 para realizar la estancia de investigación en el centro de investigación biomédica de occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social.

AGRADECIMIENTOS PARTICULARES

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

A mi profesora, Dra. Rosa Elvira Nuñez, a quien agradezco inmensamente por todo su apoyo y enseñanzas durante estos 5 años. Porque sin ella, nada de esto hubiera sido posible, agradezco toda su confianza, paciencia y por sobre todo la amistad que me ha brindado. Su orientación durante mi formación académica ha sido lo que me ha permitido llegar hasta aquí.

Al Dr. Marcos Cajero por sus enseñanzas y apoyo brindado desde el primer día que llegué al CMEB, en especial por los regaños de todos los días.

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

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

Al Dr. Víctor Baizabal, cuyos consejos siempre me permitieron mantener un objetivo claro.

A la maestra Ana Patricia Orozco, quien me obligó a adentrarme en este mundo de la investigación científica. Agradezco inmensamente su orientación y apoyo.

A mis amigos y compañeros del CMEB, particularmente a Raúl Sánchez y Aracely Nava. Que fueron los primeros compañeros que compartieron conmigo sus conocimientos. A todas aquellas personas que pasaron por el CMEB y que tuve la oportunidad de conocer y convivir durante su estadía por estas instalaciones.

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

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

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

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

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

CONTENIDO

ABSTRACT	10
RESUMEN	12
ANTECEDENTES	14
1. Distribución geográfica e importancia económica de PRRSV	14
1.1 Epidemiología	16
1.2. Cuadro clínico de PRRSV	16
1.3. Transmisión	17
1.4. Células diana	18
1.5. Agente etiológico	19
2.- Mecanismos de evasión de la respuesta inmune de PRRSV	22
2.1. Evasión de la respuesta inmune innata mediada por proteínas no estructurales	22
2.2.- Evasión de la respuesta inmune innata por desregulación de la expresión de interferones y citocinas	23
2.3. Evasión de la respuesta inmune adaptativa mediada por la proteína de nucleocápside	23
2.4- Evasión de la respuesta inmune adaptativa mediada por anticuerpos no neutralizantes	24
3.- Proteína GP5 de PRRSV	25
4.- La proteína GP5 y su participación en inducción de anticuerpos neutralizantes	26
5.- Respuesta inmune antiviral mediada por anticuerpos	27
6.- Respuesta inmune antiviral mediada por células	29
7.- Epítomos de GP5 y respuesta inmune antiviral	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Ratones	35
Péptidos	36
Anticuerpos	36
Imject® Maleimide Activated BSA	37

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Imject® Freund's Adjuvants	38
Kit para ensayo de ELISA para péptidos	39
Obtención de muestras sanguíneas	39
Inmunización	40
Obtención de células blancas en sangre total	40
Serología	41
1.-Anticuerpos totales	41
2.-Anticuerpos específicos	41
Análisis de hematocrito de leucocitos y eritrocitos	42
Inmunotipificación de poblaciones celulares	43
Análisis estadístico	44
RESULTADOS	45
Análisis Bioinformático de péptidos	45
Seguimiento del peso corporal de los ratones	45
Evaluación de inmunoglobulinas G totales	46
Evaluación de Inmunoglobulinas G específicas de péptido	48
Evaluación de poblaciones celulares	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	59

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución global de PRRSV.....	15
Figura 2. Vías de transmisión del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio.	18
Figura 3. Esquema de un virión de PRRSV	20
Figura 4. Puntos de inhibición por parte de las proteínas no estructurales.....	22
Figura 5. Inhibición de la diferenciación de células nativas a linfocitos T helper.....	24
Figura 6. Representación de las regiones de la proteína GP5	26
Figura 7. Activación de linfocitos B por presentación de antígeno a linfocitos T.....	29
Figura 8. Activación de linfocitos T por células presentadoras de antígeno.	31
Figura 9.- Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida	38
Figura 10.- Esquema de acoplamiento del péptido a la placa de forrado	39
Figura 11. Peso corporal de ratones	46
Figura 12. Concentración de Inmunoglobulinas G totales (IgG´s) en sueros de ratones ..	47
Figura 13.- Concentración de IgG´s anti-péptidos en sueros de ratones.....	49
Figura 14. Concentración de Leucocitos totales y hematocrito	50
Figura 15. Poblaciones celulares y porcentajes de Linfocitos B y Linfocitos T	52

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Anticuerpos acoplados a fluorocromos.....	43
Tabla 2. Protocolos de estandarización para citometría.....	44
Tabla 3. Secuencias antigénicas obtenidas de IEDB	45

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab Anticuerpo

APC Células Presentadoras de Antígeno

BSA Albumina de Suero Bovino

CRP Complejo Respiratorio Porcino

DPI Días post-inmunización

GP Glicoproteína

HP Altamente Patógeno

IEDB Immuno Epitope Data Base

Ig Inmunoglobulina

IL Interleucina

INF Interferón

KDa Kilo Dalton

MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Nsp Proteína No Estructural

ORF Marco de Lectura Abierto

PBS Buffer de Fosfatos Salino

PI Post-inmunización

PRRS Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

PRRSV Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

TNF Factor de Necrosis Tumoral

Tc Linfocitos T Citotóxicos

Th Linfocitos T Cooperadores

ABSTRACT

The PRRSV virus is a reemergent pathogen that causes enormous economic losses over the world. PRRSV is endemic and generates repetitive outbreaks that become more aggressive than the original outbreaks. GP5 protein is the structural protein from PRRSV virus envelope, it participates in the virus recognition of the target cell and it has been associated to the neutralizing antibodies induction. In addition, GP5 protein participates in the evasion of the host's immune response. GP5 is an insoluble protein, this characteristic complicates the study of the entire protein. Nowadays, little is known about the role of epitopes from GP5 protein in the protective immune response mediated by antibodies and cells. Therefore, to know the role of the epitopes from GP5 protein and to explore their possible immunomodulatory function, we selected two peptides from GP5 protein through *in silico* prediction, one of them has a T lymphocyte recognition epitope (GP5-T) and the other has a B lymphocyte recognition epitope (GP5-B). The goal of this study was to investigate the epitopes participation in humoral and cellular immune response *in vivo*. The specific and total antibodies against peptides were analyzed, at 15 days of reimmunization scheme intervals, for 45 days. The results showed that both peptides increased total antibodies production for each reimmunization. However, only GP5-B group showed a strong and sustained specific antibodies response, which suggested that GP5-B peptide was capable to induce memory B lymphocytes. Moreover, total (leukocytes total counting) and specific cell response activation (Flow cytometry) were evaluated. The cellular immune response was evaluated in a control group, vehicle (BSA) group and 45 days after immunization group. Data showed a significant increase of total leukocytes in GP5-T experimental group compared versus control group. Furthermore, the specific cellular response was evaluated, particularly the response mediated by activated B lymphocytes (CD19+/CD80+), activated T lymphocytes (CD4+/CD44+), and activated T cytotoxic lymphocytes (CD8+/CD44+). Data showed that only GP5-B peptide increased significantly activated B Lymphocytes, compared versus the control group and

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

vehicle. On the other hand, only GP5-T was capable to increase activated T cytotoxic lymphocytes, compared to vehicle and control group. Finally, active T helper Lymphocytes contribution were evaluated, due to their participation in T and B Lymphocytes differentiation and activation. Data showed that activated T helper lymphocytes populations increased in both experimental groups and the vehicle group (BSA carrier protein). These data suggested T helper Lymphocytes participation in the cellular immune response against GP5-T, GP5-B peptides and BSA.

In conclusion, we proposed that GP5-T and GP5-B peptides from GP5 protein regulate the host immune response, both humoral and cellular.

Key Words:

Peptide, Epitope, Antibodies, Neutralizing, Immunization.

RESUMEN

El virus del PRRS (PRRSV) es un patógeno reemergente que causa cuantiosas pérdidas económicas en todo el mundo. PRRSV se encuentra de forma endémica y genera brotes reincidentes que llegan a ser más agresivos que los brotes originales. La proteína GP5 es una proteína estructural presente en la envoltura del PRRSV, la cual participa en el reconocimiento del virus a la célula blanco y se ha asociado a la inducción de anticuerpos neutralizantes. GP5 es una proteína insoluble, esta característica dificulta el estudio de la proteína completa. Además, la proteína GP5 participa en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. A la fecha se conoce poco sobre el papel que desempeñan los epítomos de la proteína GP5 en la inducción de una repuesta inmune protectora mediada por anticuerpos y células. Por lo tanto, para conocer el papel de los epítomos de la proteína GP5 y además explorar su posible función inmunomoduladora, nosotros seleccionamos dos péptidos a partir de la proteína GP5 a través de predicción in silico, uno de ellos posee un epítomo de reconocimiento a Linfocitos T (GP5-T) y otro con un epítomo de reconocimiento a linfocitos B (GP5-B). El objetivo de este estudio fue determinar la participación de dichos epítomos en la respuesta inmune celular y humoral en un modelo in vivo. Se analizó la respuesta inmune mediada por anticuerpos totales y específicos contra dichos péptidos en un esquema de reinmunización a intervalos de 15 días, durante un periodo de 45 días. Los resultados indicaron que ambos péptidos aumentaron la producción de anticuerpos totales en cada reinmunización. Sin embargo, solo el grupo del péptido GP5-B mostró una respuesta fuerte y sostenida de anticuerpos específicos, lo que sugirió que el péptido GP5-B fue capaz de inducir linfocitos B de memoria. Además, se evaluó la activación de la respuesta celular total (conteo total de leucocitos) y específica (citometría de flujo). La respuesta inmune celular se evaluó en un grupo control sin inmunización, grupo vehículo (BSA) y el día 45 pos-inmunización. Los datos mostraron un aumento significativo de leucocitos totales en el grupo inmunizado con el péptido GP5-T, comparado con el grupo control. Después, la respuesta celular específica fue evaluada, particularmente la mediada por linfocitos B activos (CD19+/CD80+),

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

linfocitos T activos (CD4+/CD44+) y linfocitos T citotóxicos activos CD8+/CD44+. Los datos mostraron que solamente el péptido GP5-B aumentó la activación de linfocitos B, con respecto al grupo control y vehículo. Por otro lado, solamente GP5-T fue capaz de aumentar linfocitos T citotóxicos activos, comparado con el grupo control y vehículo. Finalmente, se evaluó la contribución de los Linfocitos T cooperadores activos, porque participan en la diferenciación y activación de los linfocitos B y T. Los datos mostraron que las poblaciones de linfocitos T cooperadores activos aumentaron en ambos grupos experimentales y el grupo vehículo (proteína acarreadora BSA). Estos datos sugieren la participación de los linfocitos T cooperadores en la respuesta inmune celular contra los péptidos GP5-T, GP5-B y BSA.

En conclusión, nosotros proponemos que los péptidos GP5-B y GP5-T de la proteína GP5 regulan la respuesta inmune del hospedero, tanto humoral como celular.

Palabras Clave:

Péptido, Epítipo, Anticuerpos, Neutralizantes, Inmunización.

ANTECEDENTES

1. Distribución geográfica e importancia económica de PRRSV

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) se describió por primera vez en los Estados Unidos de América (USA) a finales de los ochenta como enfermedad misteriosa del cerdo o enfermedad de oreja azul debido al desconocimiento de su etiología. A principios de los noventa también se describió en Los Países Bajos, en donde fue aislado y caracterizado por primera vez (Arias *et al*, 2011; Dortmans *et al*, 2019). Este virus es ahora conocido como el genotipo europeo. Un segundo aislamiento ocurrió en 1991 en USA y se conoce como genotipo americano.

Los aislados americano y europeo comparten una identidad genómica de hasta 60%, por lo que se dividieron en genotipo 1 o europeo y genotipo 2 o americano. En 2006 se aisló un tercer genotipo altamente patógeno, denominado HP-PRRSV que surgió en China; el cual, mediante análisis filogenético, se asignó al genotipo 2 o americano. Sin embargo, el HP-PRRSV es clínicamente más agresivo que su homólogo americano y presenta una mayor mortalidad en lechones (Han *et al*, 2017; Tian *et al*, 2007).

En México, el PRRS se reportó en 1992, aunque se sospecha que pudo aparecer en el país durante la década de los ochenta y confundirse con la enfermedad de las orejas azules.

El PRRSV se encuentra ampliamente distribuido en México, con reportes en Estado de México, Puebla, Sonora, Yucatán y Nuevo León (Batista *et al*, 2004; Macías *et al*, 2006; Martínez- Barroso *et al*, 2002; Salinas-Meléndez *et al*, 2008; Sierra *et al*, 2000). Sin embargo, no existen reportes exactos de su epidemiología ni de costes económicos de todo el país (López-Heydeck *et al*, 2015). Recientemente fue declarado patógeno emergente e incluido en las demandas fundamentales para el desarrollo agropecuario nacional. La primera demanda estableció el desarrollo de biológicos de nueva generación para el tratamiento y prevención de enfermedades

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

asociadas al virus PRRSV (Hernández *et al*, 2013; Heydec *et al*, 2013; SAGARPA, 2017).

El PRRS es una de las enfermedades con mayor prevalencia en la industria porcina, encontrándose de forma endémica en la mayoría de los países con grandes explotaciones porcinas (Figura 1). La enfermedad ocasiona cuantiosas pérdidas económicas que ascienden hasta 663 millones de dólares por año solo en USA durante 2013 (Montaner-Tarbes *et al*, 2019; Pileri, 2016).

En Europa, las pérdidas económicas se estimaron en 650,090 euros. Sin embargo, existe escasa información acerca del impacto bajo condiciones de campo, haciendo complicada la tarea de cuantificar exactamente los costos totales del impacto económico (Montaner-Tarbes *et al*, 2019).

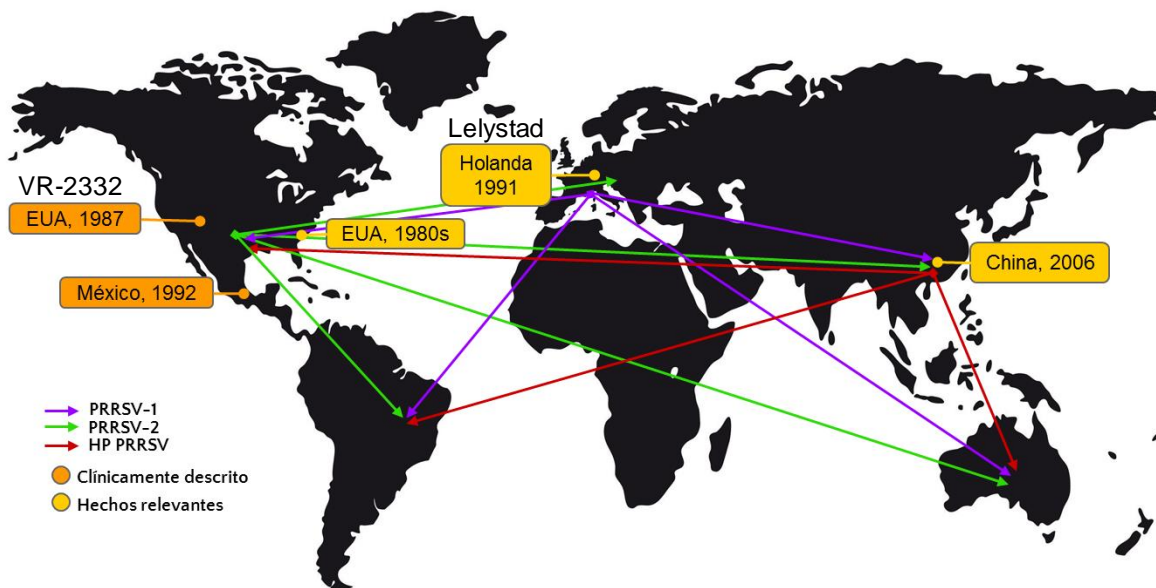


Figura 1. Distribución global de PRRSV. Diseminación de los genotipos de PRRSV por todo el mundo presumiblemente a través de importación y exportación de cerdos infectados. En los recuadros se observa la fecha de reportes de la enfermedad. Mientras que en líneas de color se indica la diseminación de los genotipos del virus en todo el mundo. Modificado de Cano, 2012.

1.1 Epidemiología

Desde la aparición del PRRSV a la fecha, los tres genotipos virales se han diseminado a todo el mundo. En Europa se pueden localizar el genotipo 1, 2 y HP siendo prevalente el genotipo 1. En Asia se pueden encontrar los genotipos 1, 2 y HP siendo de gran impacto el HP PRRSV. Desde su primera aparición, el HP PRRSV provocó severos signos clínicos en cerdos jóvenes y adultos, afectando a más de 2 millones de cerdos, según datos epidemiológicos reportados por el Centro de Control de Enfermedades de China (CADC) (Tian *et al*, 2007).

En México, los datos de prevalencia son similares a los reportados en el resto del mundo, aunque el HP PRRSV no se ha reportado en México. Según estudios retrospectivos, la prevalencia nacional va de 20 a 70 % (Cajero *et al*, 2016; Macías *et al*, 2005; Sierra *et al*, 2000).

Según datos epidemiológicos que identifican al virus en granjas con diferente grado de tecnificación, la prevalencia del virus varía de acuerdo con el periodo estacional en que se obtienen las muestras. En el periodo invernal se presenta el mayor número de incidencias.

Algunos países con explotaciones porcinas se han reportado libres del síndrome: Australia, Suecia, Nueva Caledonia y gran parte de Sudamérica (Shi *et al*, 2010).

1.2. Cuadro clínico de PRRSV

El fuerte impacto económico relacionado con la infección por PRRSV es debido a la incidencia de enfermedades tanto de carácter reproductivo como respiratorio, dentro de las cuales se pueden destacar fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero, edema en parpados, conjuntivitis, anorexia y diarrea, con diferentes grados de neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis y linfadenopatias (López, 2015).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

En cerdas en etapa reproductiva, aumentan los índices de abortos, lechones momificados, mortinatos, nacidos débiles y repeticiones del celo. Las cerdas infectadas en el segundo tercio de la gestación presentan infertilidad generalizada que puede durar de 2 a 3 meses, afectando los índices productivos, el número de lechones vivos al nacimiento y la mortalidad antes del destete (Méndez, 1996).

En el orden reproductivo también son afectados los cerdos macho ya que durante la infección se presenta disminución de la libido y baja calidad del semen. Además, se ha reportado que el virus puede alojarse en las glándulas bulbo uretrales del aparato reproductor donde puede transmitirse a cerdas durante el coito o incluso contaminar muestras de semen para inseminación artificial (Christopher-Hennings *et al*, 1995; López *et al*, 2015).

Después de la infección inicial, el virus también favorece infecciones secundarias por otros virus y bacterias, que en conjunto forman el complejo respiratorio porcino (CRP o PRDC). El CRP agudiza los signos clínicos y llega a ser letal en cerdos de todas las edades (Hansen *et al*, 2010; Heydeck *et al*, 2013).

1.3. Transmisión

El PRRSV infecta a cerdos en todas las etapas de desarrollo, desde lechones hasta cerdos en etapa final. Sin embargo, solamente es letal en lechones, aunque esto último depende tanto del estado de salud del animal, como de los factores ambientales (López *et al*, 2015). La mayor parte de las pérdidas económicas se deben a que el virus afecta principalmente a cerdas gestantes y lechones en crecimiento (Holtkamp *et al*, 2013).

El virus se puede transmitir tanto de manera vertical atravesando la barrera placentaria, como de manera horizontal por contacto directo. Por contacto directo, la exposición al virus ocurre por vías respiratoria, oral, percutánea y seminal. Los

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

cerdos infectados excretan el virus en saliva, semen, heces, fluidos nasales y orofaríngeos (Figura 2) (Rathkjen, 2017).

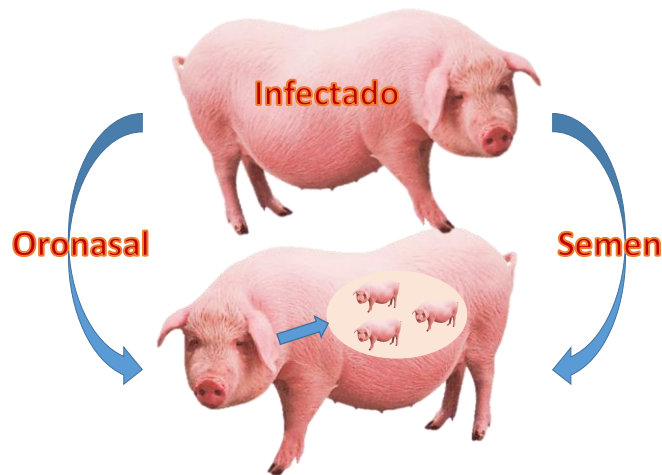


Figura 2. Vías de transmisión del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio. El virus se transmite por vía respiratoria a través de secreciones oronasales y por la vía reproductiva por semen; además, por vía vertical, atravesando la placenta en hembras gestantes infectando a los fetos. Modificado de <https://pigtecnica.wikispaces.com/PATOGENIA>

1.4. Células diana

El PRRSV posee un tropismo restringido de hospedero, la infección *in vivo* se da en monocitos sanguíneos, células dendríticas y macrófagos. Al entrar por la vía oronasal y genital, el virus penetra al epitelio nasal y tonsilar donde entra en contacto con células dendríticas, monocitos y macrófagos alveolares, las cuales son permisivas a la replicación viral (Xiao *et al*, 2010). Sin embargo, el virus al entrar en contacto con los monocitos, puede unirse e internalizarse mediante el receptor CD169 (Delputte *et al*, 2007). Los monocitos, al entrar en la circulación sanguínea y migrar a otros tejidos, favorecen la diseminación y replicación del virus en tejidos y órganos, tales como, tejido linfoide, placenta, corazón, timo, bazo, placas de Peyer, glándulas adrenales y otras células epiteliales (Lunney *et al*, 2016).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Los macrófagos alveolares son las células diana por excelencia, ya que expresan silohadesina (CD169) y el receptor CD163, este último se ha reconocido como el receptor determinante para la infección del virus. Otros receptores menos importantes son el sulfato heparan, la vimentina, entre otros menos descritos, tales como CD151 y *dendritic cell-specific intracelular adhesión molecul-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN; CD209) (Delrue *et al*, 2010; Provost *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2015; Du *et al*, 2017).

En ensayos *in vitro*, el virus es capaz de infectar células de riñón de mono verde africano, tales como las líneas celulares MA-104, MARC-145, CL2621 y SJPL porque poseen el receptor CD163 y CD169 (Breedam *et al*, 2010; Provost *et al*, 2012).

1.5. Agente etiológico

El PRRSV pertenece al orden de los *Nidovirales*, de la familia *Arteriviridae*. Es un virus con envoltura, de forma esférica con proyecciones y de un tamaño aproximado de hasta 60 nm de diámetro. Se trata de un virus con genoma de RNA monocatenario de sentido positivo, el cual es de aproximadamente 15 Kb con regiones no traducibles (UTR's) en los extremos 5' y 3' que se ha mencionado, mantienen funciones como elementos regulatorios del genoma (López *et al*, 2015).

Los genotipos europeo y americano muestran tan solo un 60% de identidad genómica. A las variantes de cada genotipo se denominan subtipos (Meng *et al*, 1995). Al ser un virus de RNA, presenta una alta tasa de mutación que va de $4.7-9.8 \times 10^{-2}$ sustituciones/sitio/año (Hanada *et al*, 2005), comparado con otros RNA virus como el virus de la influenza que presenta solo $4.27-5.16 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (Duffy *et al*, 2008; Jones *et al*, 2019).

El genoma consiste en 10 marcos de lectura abiertos (ORF's) de los cuales el ORF 1a y 1b abarcan hasta un 75% del genoma y codifican para 2 polipéptidos que, al

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

ser traducidos, sufren una autoproteólisis que conformará hasta 16 proteínas no estructurales (nsp). Las nsp son las responsables de la replicación y transcripción viral. Los ORF 2-7 codifican para proteínas estructurales que conforman la estructura del virión y son las proteínas pp1a, pp1b, GP2, E, GP3, GP4, GP5, M y N (Figura 3). Varias de éstas proteínas estructurales contienen epítomos inmunogénicos que podrían inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Vu *et al*, 2011; Triple *et al*, 2015; Vanhee *et al*, 2011)

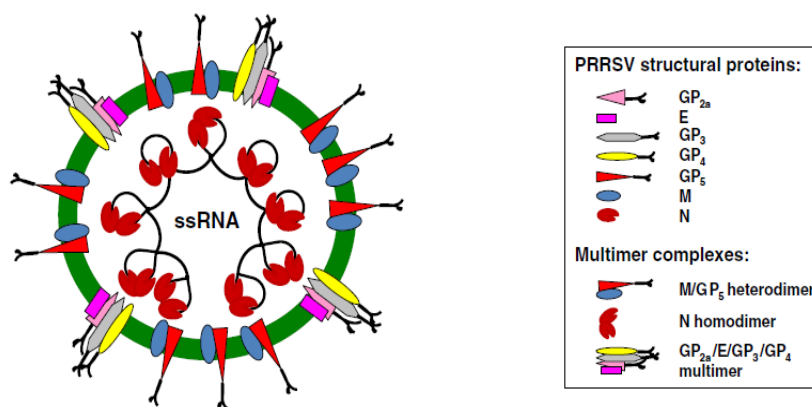


Figura 3. Esquema de un virión de PRRSV. En color verde se indica la membrana lipídica del virión. Por una parte, sobre la envoltura se encuentran los dos complejos proteicos de las proteínas estructurales. Por otra parte, al interior de la membrana se encuentra en color rojo, la proteína de nucleocápside N interactuando con el genoma de RNA de cadena sencilla. Modificado de Music, 2012

Las proteínas estructurales son de gran importancia para el reconocimiento virus-célula blanco, las cuales se describen a continuación.

GP2, 3 y 4 son proteínas glicosiladas estructurales de envoltura que forman un complejo heterotrimérico expuesto sobre la superficie del virus (Wissink *et al*, 2005). Las proteínas que componen el heterotrímero son codificadas por los marcos de lectura abierto ORF2a, ORF3 y ORF4, respectivamente (Breedam *et al*, 2010).

La glicoproteína GP2 tiene 256 aminoácidos y contiene un péptido señal en la región N-terminal que la dirige y ancla a la membrana lipídica de la envoltura viral, seguido de un ectodominio o región externa a la membrana, una hélice transmembranal y

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

un endodominio o región interna a la membrana. Esta proteína interactúa con el receptor CD163 (López-Heydeck *et al*, 2015).

GP3 es una proteína de 254 aminoácidos, aunque su topología no es clara, algunas predicciones la posicionan como la proteína más glicosilada y se sugiere que está anclada a la membrana por ambos extremos N- y C- terminales. También se ha reportado que posee un epítipo de neutralización (Ren *et al*, 2014).

GP4 es la proteína de menor tamaño sobre la envoltura con un tamaño de 178 aminoácidos y, al igual que GP2, contiene un péptido señal, seguido de un ectodominio y una región transmembranal en forma de hélice. Igualmente, interactúa directamente con el receptor CD163 y posee epítipos neutralizantes (Vanhee *et al*, 2011). La interacción de estas proteínas se da a través de enlaces no covalentes y la falta de cualquiera de estas proteínas puede dar inestabilidad al virion (Breedam *et al*, 2010). Estas proteínas también interactúan con la proteína no glicosilada E, la cual se ha sugerido actúa como un canal iónico que acidifica el endosoma tardío durante el proceso de internalización del virus a la célula (Lee *et al*, 2006).

Una de las proteínas más estudiadas es la glicoproteína GP5. Se ha demostrado que induce anticuerpos neutralizantes y que es indispensable en la unión del virus a su célula blanco porque es necesaria para la conformación circular del virión (López *et al*, 2015; Wang *et al*, 2016; Murthy *et al*, 2015).

GP5 forma un heterodímero con la proteína M; este heterodímero actúa como ligando del receptor CD169 de macrófagos y es el más abundante. La interacción entre este heterodímero con CD169 actúa como moléculas accesorias que favorecen la actividad entre el heterotrímero y el receptor CD163, lo que facilita la internalización del virus a la célula. Por otra parte, aunque el complejo heterotrimerico constituye la minoría de proteínas estructurales, es el esencial para la unión e internalización del virus y la proteína N, la cual conforma la cápside del virión (Thaa *et al*, 2013; Zhang & Yoo, 2015).

2.-Mecanismos de evasión de la respuesta inmune de PRRSV

2.1. Evasión de la respuesta inmune innata mediada por proteínas no estructurales

Durante el proceso de traducción del RNA viral se forman nsp, las cuales tienen la capacidad de inhibir la cascada de señalización que activará la transcripción de RNA's mensajeros que codificarán para las citocinas que participan en la respuesta inmune innata.

Las nsp que participan en este mecanismo son nsp1, nsp2, nsp4, nsp11 y la proteína estructural N. La actividad de estas proteínas se puede presentar durante la primera hora de la infección (Huang *et al*, 2015). Por un lado, el grupo de nsp; nsp1, nsp2, nsp4 y nsp11 inhiben las vías de MyD88, TRIF, RIG-I y MDA 5. Ocasionando que no se presente expresión de citocinas proinflamatorias ni la expresión de interferones (Figura 4) (Ke *et al*, 2016).

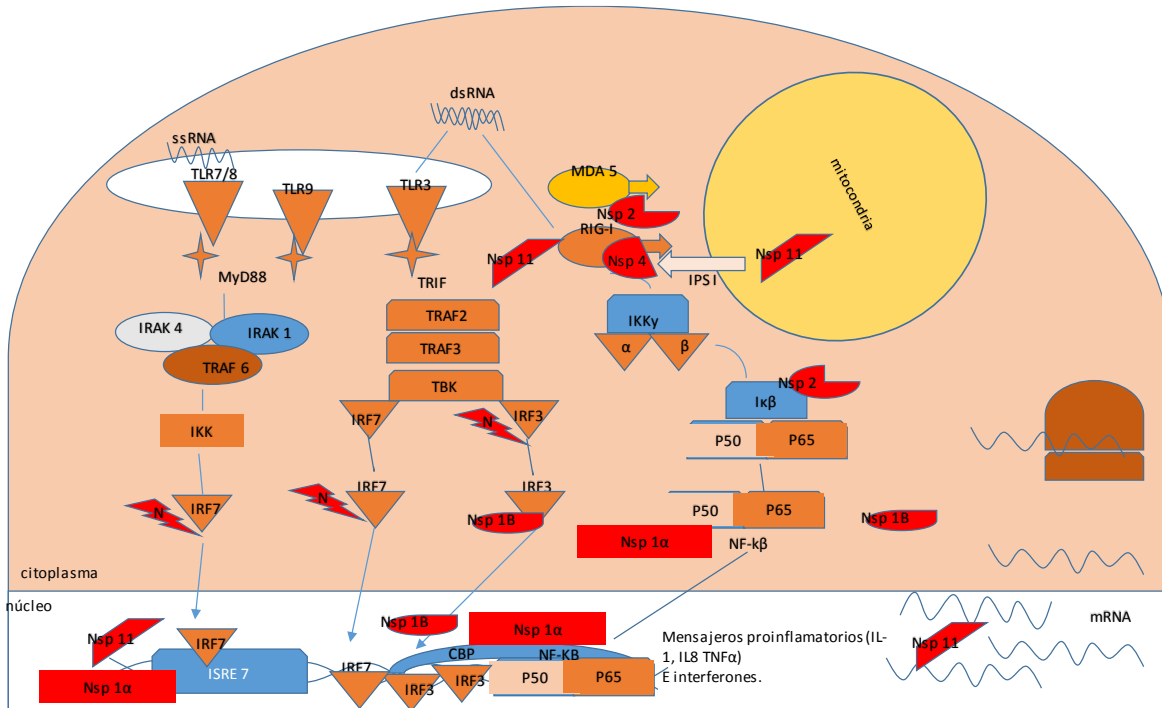


Figura 4. Puntos de inhibición por parte de las proteínas no estructurales del virus PRRSV. En rojo se muestran las proteínas que obstruyen las vías de señalización. Modificado de Ke, 2017.

2.2.- Evasión de la respuesta inmune innata por desregulación de la expresión de interferones y citocinas

El mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata consiste en desmontar la respuesta innata mediada por la regulación de la expresión de citocinas que favorecen una respuesta inflamatoria y en la regulación de la expresión de interferones (Figura 4). A través de la actividad de la nsp1, esta se transloca a elementos *cis* en el núcleo, donde impide que elementos de transcripción se unan a sus elementos de respuesta. Por otra parte, la nsp11 posee capacidad de RNAasa y al translocarse al núcleo, degrada específicamente RNA's mensajeros maduros de las citocinas e interferones de tipo I. De manera que, la supresión de la expresión de interferones resulta ser la mayor estrategia del PRRSV para modular la defensa antiviral del hospedero (Montaner-Tarbes *et al*, 2019).

2.3. Evasión de la respuesta inmune adaptativa mediada por la proteína de nucleocápside

Por otra parte, la proteína N es capaz de inducir la producción de IL-10. Esta interleucina tiene la capacidad de regular negativamente la respuesta adaptativa al inducir la diferenciación de linfocitos T vírgenes a linfocitos T reguladores, los cuales poseen propiedades inmunosupresoras (Figura 5) (Nedumpun *et al*, 2018).

Además, se ha reportado que posee la capacidad de disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86), en el proceso de presentación de antígenos (Flores-Mendoza *et al*, 2009). También, disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC II) sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). De modo que impide la presentación de antígenos a los linfocitos T, de manera que, propicia la inactividad de la respuesta mediada por células (Ke *et al*, 2016).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

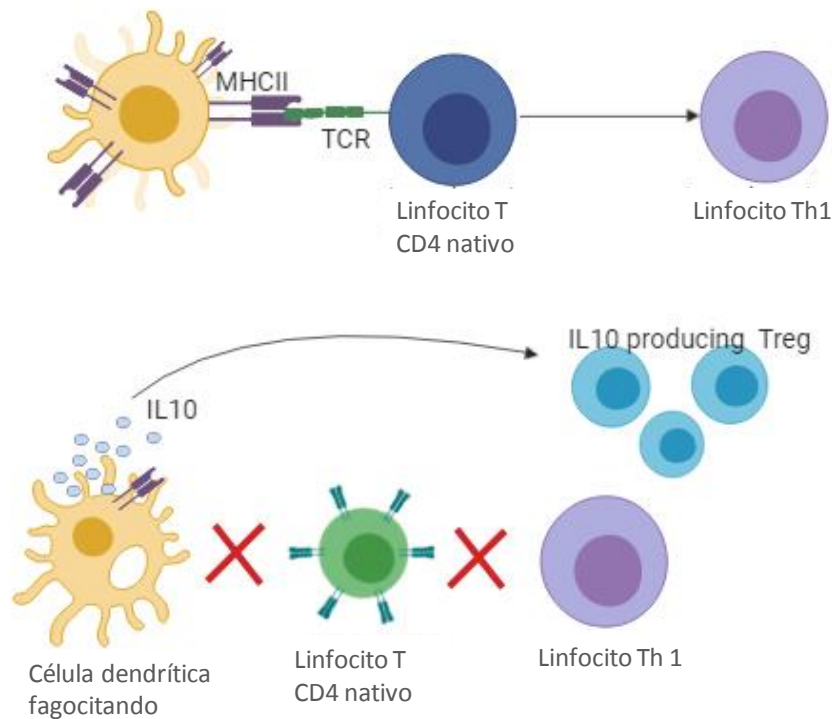


Figura 5. Inhibición de la diferenciación de células vírgenes a linfocitos T helper. En rojo se muestran los procesos inhibidos por el incremento en la producción de IL10 tras la entrada del virus a la APC. Modificado de Hawrylowics, 2005.

2.4- Evasión de la respuesta inmune adaptativa mediada por anticuerpos no neutralizantes

Una región inmunodominante localizada entre los aminoácidos 27-30 del ectodominio de la proteína GP5 posee un epítipo señuelo, el cual, durante la infección temprana, induce una fuerte respuesta inmune mediada por anticuerpos que no son neutralizantes (Ostrowski *et al*, 2002). Éstos anticuerpos pueden ser nocivos ya que tienen un efecto opsonizante que favorece su reconocimiento por los fagocitos a través de un receptor a fracción cristalizante (FcR) (Vidarsson *et al*, 2014). Dicho receptor se encuentra en la membrana celular sobre la superficie del fagocito y facilita la internalización del virus para su destrucción. Sin embargo, el virus aprovecha este proceso de internalización de los fagocitos para infectarlos y replicarse (Roques *et al*, 2013; Thaa *et al*, 2013).

3.-Proteína GP5 de PRRSV

GP5 es la mayor glicoproteína estructural de PRRSV, es considerada un blanco importante de anticuerpos neutralizantes, los cuales aparecen de manera tardía en la infección (Popescu *et al*, 2017). Tiene un tamaño de 200 aminoácidos (aa) y un peso molecular de aproximadamente 25 KDa, la cual facilita la interacción del virus con su célula blanco. La secuencia completa consta de 3 regiones: el ectodominio, el dominio transmembranal de 70 aa (63- 135) y el endodominio (135-200) (Figura 6).

En el ectodominio se localiza un péptido señal que es el responsable de la localización de GP5 en la envoltura viral y un epítipo señuelo (37-44) que induce a la producción de anticuerpos no neutralizantes. En el ectodominio también se localiza una región hipervariable donde se presenta la mayor variabilidad entre secuencias de diferentes tipos y subtipos del virus, por esta razón, dicha región es comúnmente secuenciada para realizar análisis filogenético y clasificar los aislados de PRRSV. Se ha sugerido que la alta variabilidad entre cepas del virus PRRSV dificulta que las vacunas comerciales brinden protección cruzada contra cepas silvestres heterólogas. También, en el ectodominio de la proteína GP5 se encuentran sitios de glicosilación como: las asparaginas 30 y 33 dentro de la región hipervariable y las asparaginas 44 y 51 altamente conservadas entre cepas del virus, es entre la región hipervariable y la asparagina 44 donde se ha reportado el probable epítipo de neutralización que podría ser reconocido por linfocitos B (Popescu *et al*, 2017; Thaa *et al*, 2013).

Adyacente al ectodominio entre los residuos 63 y 135 se encuentra una región hidrofóbica transmembranal, la cual presenta 3 plegamientos dentro de la bicapa lipídica que constituye la envoltura.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Por último, en el extremo C-terminal entre los residuos 135 a 200 se encuentra el endodominio o región al interior de la membrana, en el cual se ha reportado un probable epítipo de reconocimiento a linfocitos T (Dokland, 2010; Thaa *et al*, 2013).

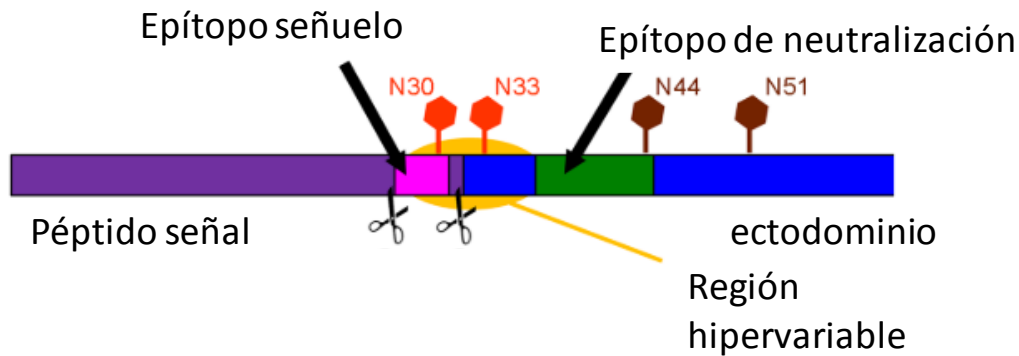


Figura 6. Representación de las regiones de la proteína GP5. En púrpura se muestra el péptido señal, en azul la región del ectodominio. Entre el ectodominio y el péptido señal, se muestra en violeta el epítipo señuelo, seguido de la región hipervariable en amarillo y el epítipo de neutralización en color verde. Modificado de Thaa 2013.

Finalmente, la proteína GP5 se encuentra formando un complejo heterodimérico con la proteína M a través de puentes disulfuro. Dicho complejo es esencial para el ensamblaje del virión ya que 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).

4.- La proteína GP5 y su participación en inducción de anticuerpos neutralizantes

En modelos animales experimentales, se han encontrado anticuerpos circulantes contra PRRSV detectables a 5-7 días post-infección (DPI), los cuales corresponden a IgM y alcanza su máximo nivel al día 14, declinando a niveles indetectables al día 42. Por su parte, la concentración de IgG alcanza un máximo a 21-42 DPI, sin embargo, estos anticuerpos no corresponden a anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos neutralizantes son una poderosa herramienta de la respuesta inmune antiviral, porque reconocen epítipos presentes en las proteínas del virus a

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

través de una secuencia denominada parátopo que se encuentra en la región hipervariable del anticuerpo. Al darse el reconocimiento de la proteína por parte del anticuerpo, este anticuerpo se une al virus de manera que inhibe la internalización del virus a la célula blanco. El mecanismo de neutralización puede ser por bloqueo de la proteína viral de unión a la célula (ligando), o bien, a través de la inhibición de cambios conformacionales necesarios de las proteínas virales para liberar el genoma del virus dentro de la célula (Abbas *et al*, 2008; López *et al*, 2004).

Se ha reportado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra GP5 son detectados al día 28 post-infección (PI) tanto en PRRSV tipo I (europeo), como en el PRRSV tipo II (americano), aunque también se han detectado anticuerpos neutralizantes dirigidos contra GP4 y M, éstos parecen ser de menor significancia biológica comparados con los que se producen contra GP5 (Loving *et al*, 2015; Mateu & Díaz, 2008).

La presencia de anticuerpos neutralizantes es crucial para para la respuesta inmune contra infecciones virales. Se ha mostrado que proteínas homólogas a GP5 de otros virus, tales como el virus elevador de lactato deshidrogenasa del ratón y el virus de la arteritis equina, también inducen anticuerpos neutralizantes (Snijder *et al*, 2013).

La importancia de GP-5 de PRRSV en la inducción de anticuerpos neutralizantes es sustentada por la identificación de un probable epítopo de neutralización de 9 aminoácidos localizado en la posición N-terminal de la proteína entre los residuos 37-45 (Du *et al*, 2017).

5.-Respuesta inmune antiviral mediada por anticuerpos

Las células que participan en la respuesta antiviral mediada por anticuerpos son los linfocitos B, los cuales pueden ser estimulados por un agente viral a través de un receptor IgM en la membrana del linfocito. El receptor de linfocitos B (BCR) posee cierta especificidad a algún componente estructural en la superficie del virus, es decir, la célula reconoce al virus al identificar algún epítopo que sea complementario al parátopo en su receptor de la célula. Al identificar el epítopo, la célula endocita al

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

virus y lo procesa para presentarlo a los linfocitos T cooperadores a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) y la molécula co-estimuladora CD80 que se presenta en el estado activo de linfocito B y participa en la interacción con las moléculas co-estimuladoras del receptor de células T (TCR) del linfocito T CD4+. Además, este receptor CD80 sirve como marcador de células B de memoria (Bar-Or *et al*, 2001).

El proceso de presentación activa al linfocito T cooperador y éste dispara una vía de señalización que lo diferencia a una célula efectora que secretará citocinas y expresará el marcador de diferenciación CD44. Este marcador está asociado a células T (CD4+ y CD8+) activas secretoras de INF γ , IL-17 y de linfocitos B de memoria, además se piensa que puede participar en la presentación de antígenos sustituyendo a la molécula co-estimuladora CD28 (Schumann *et al*, 2015). Por lo tanto, los linfocitos CD4+/CD44+ estimularán la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos y células B de memoria (CD19+CD80+).

Los anticuerpos producidos por las células plasmáticas en el primer contacto con el virus, corresponden a IgM, las cuales mantendrán la especificidad de la IgM original de la membrana de linfocito B a partir del cual se diferenció la célula plasmática. Después de un periodo entre 7 a 14 días, las IgM desaparecen y ocurrirá un cambio de clase de isotipo y aparecerán las IgG entre las 2 a 4 semanas, que son las Ig de más larga duración en el suero y además son las que adoptan la función de neutralizar al virus (IgG 1), evitando su internalización en las células blanco (Huber *et al*, 2006). Durante un segundo contacto con el mismo virus, serán las IgG las que aparezcan de forma rápida (3-5 días) y en títulos más altos que la primera infección debido a la presencia de linfocitos B de memoria (Figura 7) (Gutiérrez, 2010; Abbas, 2008).

Los anticuerpos y las células de memoria permanecerán en circulación durante años o incluso durante toda la vida del hospedero, de manera que cuando se presente

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

nuevamente el virus, estos anticuerpos y células de memoria tendrán una actividad rápida que impedirá la replicación del virus (Abbas, 2008).

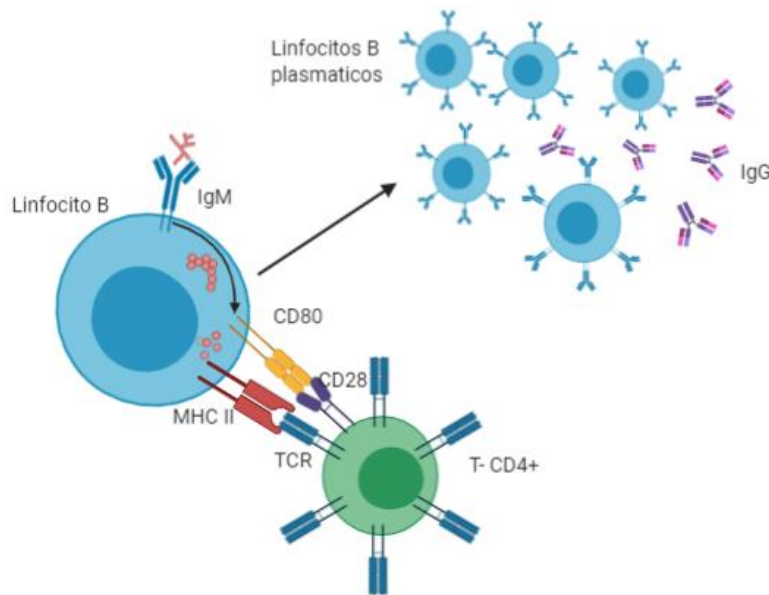


Figura 7. Activación de linfocitos B por presentación de antígeno a linfocitos T. En azul se observa un linfocito B con su BCR reconociendo un antígeno y presentándolo a un linfocito T CD4, el cual, mediante la interacción del TCR con el MHCII, activa al linfocito B para que se diferencie a linfocito T plasmático. Modificado de Abbas, 2008.

6.- Respuesta inmune antiviral mediada por células

La respuesta inmune adaptativa cuenta con células especializadas que participan ya sea mediante la secreción de citocinas o mediante la destrucción de las células infectadas. Las principales defensas del hospedero contra los virus incluyen la citotoxicidad y la producción de interferones y citocinas. Las células que median esta respuesta son los linfocitos T, de los cuales existen diversas subpoblaciones con funciones específicas cada una. Entre las más destacadas se encuentran los linfocitos T colaboradores CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+. La activación de los mecanismos de la respuesta mediada por células, así como su duración, depende de la persistencia del virus, su tropismo y su interacción con las células del huésped (Abbas, 2008).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

La actividad de los linfocitos T en la defensa del organismo consiste primeramente de una activación mediada por las células presentadoras de antígeno (APC). Estas células participan dentro de la respuesta inmune innata y se encuentran en epitelios en los sitios de entrada. Las APC, en un primer contacto con el agente viral, lo fagocitan y procesan mientras se desplazan a nódulos linfáticos donde presentan el antígeno procesado a los linfocitos mediante las moléculas del MHC II para activar linfocitos T CD4+ y la MHC I que activa a linfocitos T CD8+. Tras la presentación de antígenos por la APC, ambas poblaciones de linfocitos expresarán los marcadores de superficie CD44, en este proceso de presentación participan moléculas coestimuladoras, tales como el CD80 y CD86 (Figura 8). Una vez activados los linfocitos por la interacción con las APC, éstos sufren una expansión clonal y adoptan funciones efectoras. Por una parte, las células cooperadoras (CD4+/CD44+) secretarán interferón gamma (INF γ) y citocinas que favorecerán la activación y proliferación de linfocitos T citotóxicos (CD8+/CD44+), células Naturales asesinas y linfocitos B.

Por otra parte, los linfocitos T CD8+ tendrán la función de destruir las células infectadas con virus mediante la secreción de perforinas y granzima B, a través de la generación de poros sobre la membrana y la entrada de enzimas que destruirán el DNA de la célula, lo que conducirá a la apoptosis. Otro mecanismo de acción corresponde a la interacción del ligando FAS (Fas L) del linfocito CD8+ con el receptor de muerte celular en la célula blanco, lo cual da lugar a la activación de la apoptosis mediada por la vía de las caspasas (Gutiérrez, 2010), (Abbas, 2008). Al final de la infección viral, también se generan linfocitos T de memoria.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

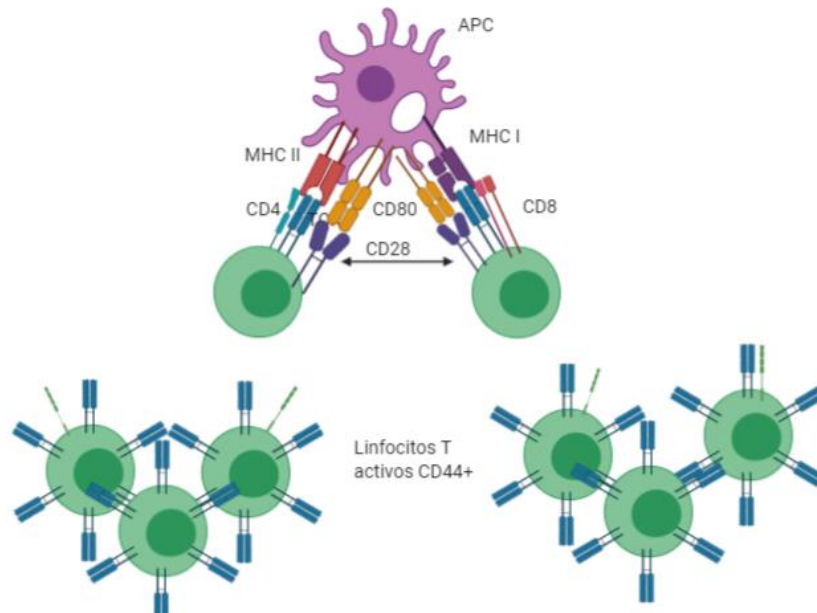


Figura 8. Activación de linfocitos T por células presentadoras de antígeno. En morado se encuentra una célula presentadora de antígenos, la cual, interactúa con los linfocitos T CD4 mediante su MHCII y con los linfocitos T CD8 mediante el MHC I y mediante las moléculas coestimuladoras CD80 en las APC con la molécula CD28 de los linfocitos. Tras la interacción de la APC con los linfocitos, ambas poblaciones de linfocitos sufren una activación que los inducirá a expresar el marcador de activación CD44. Modificado de Abbas, 2008.

7.- Epítopos de GP5 y respuesta inmune antiviral

En 2006 Charerntantanakul y colaboradores realizaron pruebas con péptidos derivados del ectodominio de la proteína GP5 mediante un ensayo de inmunización en cerdos. Se evaluó la respuesta inmune mediada por células y por anticuerpos, así como su capacidad para brindar protección en un reto contra una cepa virulenta de PRRSV. Los resultados mostraron que el grupo inmunizado solamente con los péptidos acoplados a toxina de cólera y sin adyuvante, no brindó protección en el reto contra la cepa virulenta ni tampoco indujo expresión de $\text{INF}\gamma$, por lo que no hubo respuesta mediada por células. Mientras que, en la evaluación de anticuerpos neutralizantes, solo 1 de 10 cerdos mostró presencia de anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, un grupo inmunizado con los péptidos y la vacuna atenuada potenció la expresión de $\text{INF}\gamma$ y la producción de anticuerpos neutralizantes, en este experimento los péptidos fueron usados como adyuvante para la vacuna.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Por otro lado, Vashisht y colaboradores en 2008 sintetizaron 96 péptidos de 13 aminoácidos a partir de la secuencia de la proteína GP5. Se evaluó su capacidad para favorecer la expresión de INF γ en células mononucleares de sangre periférica. Se inmunizaron cerdos y tras analizar su sangre a través del ensayo de ELISA, encontraron que dos péptidos contienen epítomos de reconocimiento a células T. Lo anterior basado en su capacidad de los péptidos de estimular la producción de interferón en comparación con los ensayos de los otros péptidos. Los péptidos inmunodominantes, se localizaron en la región transmembranal en los aminoácidos 117 a131 y en el endodominio en los aminoácidos 149 a 163.

Otro grupo de investigación (Prieto *et al.*, 2011), desarrolló una vacuna de subunidad basada en la proteína GP5 de una cepa del virus europeo, la cual fue expresada en *E. coli*. Se inmunizaron 6 cerdos con la proteína GP5 con adyuvante incompleto de Freund y se retó a otro grupo de 6 cerdos con una cepa de virus europeo sin inmunización previa. Al final del experimento se observó que el grupo inmunizado presentó signos clínicos más severos que el grupo retado sin inmunizar. Por lo anterior, los autores sugieren que la severidad de la enfermedad podría estar asociada a la concentración de anticuerpos no neutralizantes y la carga viral.

Por su parte, en 2013 Chen y colaboradores, realizaron ensayos en los cuales inmunizaron cerdos con una mezcla de péptidos sintéticos derivados de la proteína GP5 y GP4 que contenían probables epítomos de reconocimiento para linfocitos B y células T. En este ensayo se inmunizaron cerdos con refuerzos cada 14 días y se utilizó un fragmento de la proteína de choque térmico como adyuvante. Se observó un aumento en la respuesta inmune mediada por anticuerpos y por células. Se encontraron anticuerpos específicos contra los epítomos tanto en el grupo inmunizado con los péptidos como en el grupo con adyuvante. Los autores no mencionan si midieron anticuerpos neutralizantes. Además, se encontraron altos niveles de IL-12 y TNF α . Tras finalizar el experimento los cerdos fueron retados con una cepa virulenta de un HP-PRRSV y se encontró una baja viremia y disminución en las lesiones en los pulmones.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Todo lo anterior indica la complejidad de estudiar el virus en su forma completa, así como la dificultad de estudiar el papel de la proteína GP5 completa en la inducción de anticuerpos neutralizantes. El presente proyecto busca evaluar la respuesta inmune generada por epítomos de la proteína GP5, para determinar si las predicciones bioinformáticas pudieran facilitar la selección de regiones específicas dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína. De manera que, en conjunto, la evaluación de la respuesta mediada por anticuerpos y la tipificación de las poblaciones celulares, puedan funcionar como una prueba tamiz para determinar el grado de participación de los epítomos de la proteína en la regulación de la respuesta inmune. Adicionalmente, se busca determinar la posibilidad de analizar secuencias altamente conservadas con posibilidades de reconocimiento para diferentes genotipos.

Para llevar a cabo los experimentos se eligió la línea de ratones Balb/C que es una cepa de ratones albinos ampliamente utilizados en la investigación biomédica y especialmente en inmunología, debido a su fácil crianza y destaca su característica principal de responder a gran variedad de agentes patógenos. En inmunología son utilizados porque tienen una respuesta exacerbada a antígenos (Potter, 1985). Por lo tanto, la cepa de ratones Balb/C es un excelente modelo de inmunización utilizando los péptidos de la proteína GP5 del virus PRRS.

JUSTIFICACIÓN

La alta incidencia de infecciones virales en las piaras porcinas ocasiona grandes pérdidas económicas. La infección por el virus del PRRS afecta año con año a la producción mundial debido a que este virus se encuentra de manera endémica en la mayoría de los países con producción porcina.

La proteína GP5, una de las proteínas más importantes para el reconocimiento virus-célula hospedadora, posee epítomos neutralizantes; sin embargo, estudios sobre ésta solo se han enfocado en la proteína completa y en péptidos de GP5 tomados de forma aleatoria.

Por lo tanto, analizar la respuesta inmune inducida por fragmentos de dicha proteína en un modelo *in vivo*, permitirá generar conocimiento particularmente de la respuesta mediada por anticuerpos (específicos y totales) y por células (linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores). Esto podría contribuir al entendimiento de los epítomos inmunodominantes en esta proteína y generar conocimiento base para el desarrollo de inmunógenos eficaces contra esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Las subunidades GP5-T y GP5-B de la proteína GP5 del PRRSV son capaces de generar preferentemente la respuesta específica celular y humoral, respectivamente.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune específica contra dos subunidades de la proteína GP5 virus PRRS en un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar inmunoglobulinas (IgG) totales y específicas de antígeno en ratones inmunizados con subunidades proteicas (GP5-T y GP5-B) del virus PRRS.
2. Analizar el inmunofenotipo celular generado por la inmunización con subunidades proteicas (GP5-T y GP5-B) del virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Los ratones macho (Balb/C; Harlan, Indianapolis, IN) se mantuvieron bajo condiciones de temperatura controlada (22 ± 1 ° C) a una humedad del 50% en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h: 12 h y alimentación ad libitum (Purina Certified Rodent Chow) y agua. Todos los procedimientos siguieron el programa de Cuidado y Uso de Animales (NIH, USA) y la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO1999. Todos los procedimientos de inyección se realizaron con ayuda de un dispositivo de inmovilización y sin anestesia. Se registró el peso corporal cada 3 días.

Se utilizaron animales de siete semanas de edad, se separaron en 3 grupos de manera aleatoria, de los cuales uno sirvió como control negativo, grupo Albumina de Suero Bovino (BSA), es decir, el acarreador del péptido y los grupos experimentales a los cuales se les inyectaron los péptidos acoplados a BSA.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea, con un volumen total de 120 µl por animal. Grupo control BSA: se utilizó la mezcla de 30 µl de DMSO (vehículo), 30 µl maleimida [1 mg/ml] (inject Maleide Activated BSA, de Thermofisher) conjugado según especificaciones del fabricante y 60 µl adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich 10 ml). Por otro lado, para el grupo experimental: se mezclaron 30 µl de péptido (1mg/ml), 30 µl de maleimida y 60 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma-aldrich). Se sustituyó el adyuvante completo por adyuvante incompleto de Freund en la administración de los refuerzos a los 15, 30 y 45 días.

Materiales biológicos

Péptidos

Las subunidades de GP5-B [1 mg/ml] y GP5-T [1 mg/ml] fueron obtenidas por síntesis química en la empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). Se diseñaron a partir de un análisis *in silico* utilizando los protocolos *B Cell Epitope Prediction Tools* y *T Cell Epitope Prediction Tools* de la *Immune Epitope Data Base* IEDB. EL péptido GP5-B cuenta con un peso molecular de 3.3 KDa y un tamaño de 30 aa. Mientras que el péptido GP5-T tiene un tamaño de 30 aa y un peso molecular de 3.6 KDa.

Anticuerpos

Goat anti-mouse IgG F(ab)₂– HRP es un anticuerpo secundario creado en cabra, el cual reacciona contra la IgG de ratón y está acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP), fue obtenido en SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. No. CAT: SC3697.

PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD3_e Antibody (145.2C11), es un anticuerpo monoclonal creado en hámster y conjugado a un fluoróforo, reacciona contra la proteína de superficie CD3 presente en todos los linfocitos T. fue obtenido de Biolegend, No. Cat; 100327

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

CD4 Monoclonal Antibody (RM4-5), Alexa Fluor 405 es un anticuerpo monoclonal creado en rata y conjugado a un fluoróforo, reacciona contra la proteína de superficie CD4, la cual está presente en linfocitos T cooperadores. Fue obtenido en Thermo Fisher Scientific, No. Cat: MCD0426.

Anti-CD8a-PE Antibody (53-6.7), es un anticuerpo monoclonal creado en rata y conjugado a ficoeritrina, reacciona contra la proteína de superficie CD8 presente en linfocitos T citotóxicos. Fue obtenido en Sigma-aldrich, No. Cat: SAB4700566.

CD19-PE Monoclonal Antibody (1D3), es un anticuerpo monoclonal conjugado a un fluoróforo, reacciona contra la proteína de superficie CD19 presente en linfocitos B periféricos. Fue obtenido en Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 50-102-52.

Anti-Human/Mouse CD44 (IM7) eFluor 450, es un anticuerpo monoclonal creado en rata y conjugado a ficoeritrina, reacciona contra la proteína de superficie CD44, la cual se presenta en linfocitos T activos. Fue obtenido de Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 48-0441-82.

Anti-Mouse CD80 (B7-1) eFluor 450, es un anticuerpo monoclonal creado en Hámster armenio y conjugado a un fluoróforo sintético eFluor, reacciona contra la proteína de superficie CD80, la cual se presenta en linfocitos B y todas aquellas células capaces de presentar antígeno. Fue obtenido de Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 48-0801-82.

Anti-mouse/human CD44 (IM7) PE, es un anticuerpo monoclonal creado en rata y conjugado a ficoeritrina, reacciona contra la proteína de superficie CD44, la cual se presenta en linfocitos T activos. Fue obtenido de Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 12-0441-82.

Imject® Maleimide Activated BSA

Imject Maleimide Activated BSA Kit fue adquirida de Thermo Scientific, no. Cat. 77112. La albumina de suero bovina se encuentra acoplada a un grupo imida el

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

cual reacciona con grupos sulfhídrico (SH) formando enlaces tior, mediante este enlace la BSA funge como acarreador del péptido.

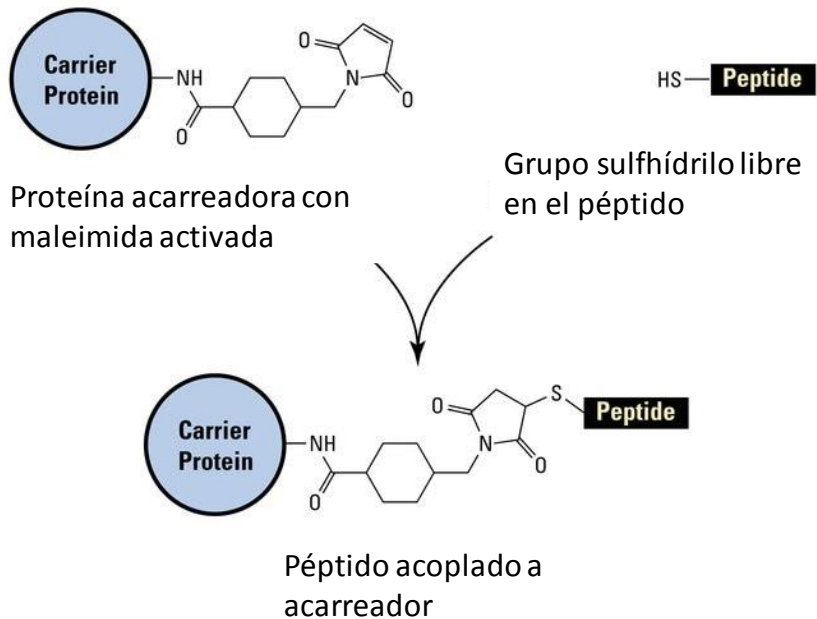


Figura 9.- Esquema de acoplamiento del péptido a la BSA-maleimida. Modificado de *Denovo biotechnology*, 2015.

Imject® Freund's Adjuvants

Los adyuvantes son estimuladores no específicos usados para aumentar la respuesta inmune al estar conjugados con un antígeno, estos son mezclados e inyectados con el antígeno para prevenir su catabolismo y ayudar a incrementar la respuesta inmune por la localización estable del antígeno durante un tiempo extendido.

Los adyuvantes de Freund (Thermo Scientific) producen una fuerte, larga y estable respuesta inmunogénica, la versión completa del adyuvante contiene células muertas de *Mycobacterium butyricum* para potenciar la respuesta inmune, mientras que la versión incompleta no contiene dichas células. El adyuvante completo (*Thermo Scientific Imject Freund's Complete Adjuvant*) se usó solo en la inyección

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

inicial y el incompleto (*Thermo Scientific Imject Freund's Incomplete Adjuvant*) en la reinmunización.

Kit para ensayo de ELISA para péptidos

Peptide Coating Kit es un kit que permite unir proteínas de bajo peso molecular o péptidos sintéticos que fuesen de difícil adsorción en placas comunes. Esta placa contiene un forro de carbodimida, la cual expone un grupo amino ($-NH_2$) libre y permite su unión con el grupo carboxilo ($-COOH$) libre en el péptido (Figura 10).

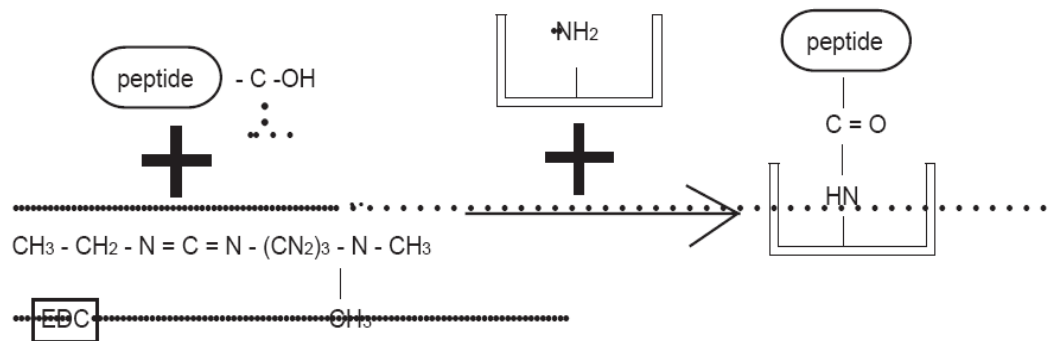


Figura 10.- Esquema de acoplamiento del péptido a la placa de forrado. La línea punteada indica el fondo de la placa forrada con carbodimida, el símbolo $+$ con la flecha indican un grupo amino (NH_2) libre que reaccionará con el extremo carboxilo del péptido. Tomado de Takara Bio Inc. Manual peptide coating kit.

Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de los ratones antes de inmunizar a través de punción de la vena lateral de la cola. La punción se realizó con agujas ultrafinas de 0.80 mm de diámetro, los ratones fueron sujetos en un dispositivo de inmovilización. La sangre completa se recolectó con pipetas Pasteur humedecidas con EDTA [500 mM] pH 8, con las que se obtuvo la sangre por capilaridad.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

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.

Inmunización

La inmunización se realizó vía subcutánea, los ratones fueron sujetos de la piel del dorso y la cola. Posteriormente se realizó el seguimiento de los ratones a través del tiempo, con tomas periódicas de muestra sanguínea cada 15 días durante un total de 45 días.

Esquema de inmunizaciones:

Día 0. Se obtuvo suero preinmune (control) y se realizó la primera inmunización con adyuvante completo de Freund en un volumen igual al dé cada péptido acoplado al acarreador.

Día 15. Se obtuvo suero de la 1ra. Inmunización y se sustituyó el adyuvante completo de Freund con adyuvante incompleto de Freund en la segunda inmunización con los péptidos acoplados al acarreador.

Día 30. Se obtuvo suero de la 2da. Inmunización y se inmunizó nuevamente con adyuvante incompleto de Freund y los péptidos acoplados al acarreador.

Día 45. Se obtuvo suero de la 3ra. Inmunización. Se procedió al sacrificio de los ratones para recuperar sangre periférica.

Los ratones se sacrificaron por decapitación y la sangre se recogió en tubos estériles con EDTA al final del experimento.

Obtención de células blancas en sangre total

Al finalizar el periodo de inmunización de los grupos control y experimentales, los ratones fueron sacrificados por decapitación y se recuperó la sangre periférica total (aproximadamente 600 µl por ratón), la cual fue mezclada con 6 ml de buffer de lisis de células rojas 1 X (Miltenyi Biotec 10 X, núm. Cat: 130-094-183), se mezcló por inversión durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm durante 6

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

minutos y se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en el volumen residual y se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1 X. Finalmente las muestras se centrifugarán a 2,000 rpm durante 6 minutos y se desechó el sobrenadante para resuspender las muestras en 3.7% de paraformaldehído diluido en PBS. Las muestras se almacenaron a 4°C para su análisis por citometría de flujo.

Serología

1.-Anticuerpos totales

El análisis serológico se realizó mediante la técnica Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) directo para cuantificar inmunoglobulinas G totales y ELISA indirecto para detectar anticuerpos específicos anti-GP5-B y anti-GP5-T.

Por una parte, la cuantificación de IgG total se realizó en placas de 96 pocillos de alta unión (EIA/RIA Plate, 96 well) de la marca COSTAR No. Cat. 3361. El protocolo consistió en realizar una curva de calibración con mouse anti-human IgG en una dilución 1:400 en las columnas 1 y 2, en las siguientes columnas se depositaron 99 µl de buffer de carbonatos y 1 µl de suero obtenido de las muestras de sangre y se dejó durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se realizó un bloqueo utilizando BSA [10 mg/ml] suspendida en PBS Tween 0.05% y se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente y en obscuridad. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% seguido de la adición del anticuerpo anti-mouse IgG-HRP con una dilución 1:1000 y se dejó 2 horas a temperatura ambiente y en obscuridad. Transcurrido el tiempo se volvieron a realizar 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se procedió a adicionar 100 µl de ABTS (sustrato para la reacción enzimática). Después de 15 minutos se realizaron lecturas a 415 nm en el microlector de placas de ELISA (BIO-RAD iMARK microplate Reader).

2.-Anticuerpos específicos

Por otra parte, la detección de anticuerpos específicos se realizó a través del kit Takara Peptide Coating Kit, No. Cat. MK100, según especificaciones del fabricante.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

El buffer de acoplamiento del kit activa el extremo carboxilo del péptido y permite su acoplamiento mediante un enlace peptídico con el grupo amino de la superficie de la placa (fornada de carbodimida). Posteriormente se adicionó el reactivo de bloqueo provisto en el kit, este reactivo bloquea las regiones del pocillo donde no se unieron los péptidos, de tal manera que impide que los anticuerpos del suero se unan inespecíficamente al fondo de la placa y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó el suero extraído del ratón (que contiene los Ab's). Los anticuerpos específicos se unen selectivamente al péptido fijado en la placa, de modo que al realizar un lavado se pueda retirar los anticuerpos no unidos. Posteriormente se adicionó el anticuerpo goat anti-mouse IgG F(ab)₂-HRP en dilución 1:1000 PBS Tween 0.05% para detectar y cuantificar los anticuerpos específicos.

Análisis de hematocrito de leucocitos y eritrocitos

En otros grupos de animales, control sin inmunizar y experimentales (GP5-T), se llevó a cabo un ensayo de hematocrito para cuantificar poblaciones celulares, una vez terminado el proceso de inmunización. Para este experimento en particular, se utilizó un volumen de sangre total de 1ml por animal, que correspondió al volumen total de sangre obtenida. El análisis incluyó la evaluación de leucocitos y eritrocitos totales.

Al final del proceso de inmunización a los 45 días, se realizó el sacrificio de los ratones por decapitación y se colectó la sangre total en tubos K2 7.2 mg EDTA. Se realizó, por una parte, la dilución de sangre con diluyente Hayem o Dacie para lisar células blancas y la muestra procesada fue sometida a análisis de serie roja (eritrocitos) en un hematímetro para especies pequeñas CELL-DYN Ruby versión de software 2.0ML. Por otra parte, se realizó el hematocrito de serie blanca, en el cual la sangre colectada de los ratones fue diluida con reactivo de Turk para lisar células rojas y poder cuantificar leucocitos totales en el hematímetro.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Inmunotipificación de poblaciones celulares

Se realizó citometría de flujo con aproximadamente 10,000 células en 500 µl de PBS por muestra, las cuales fueron evaluadas en el Citómetro de flujo (*Attune NxT acoustic focusing cytometer, Thermo Fisher Scientific*). Se realizó la inmunotipificación de las poblaciones celulares con la ayuda de anticuerpos acoplados a fluoróforos para detección de marcadores de superficie específicos de células B (CD19+) y células T tanto cooperadoras (CD4+) como citotóxicas (CD8+), así como marcadores de activación para cada población (CD80+ y CD44+ respectivamente).

Las células previamente obtenidas y almacenadas en refrigeración, fueron lavadas 2 veces con 2 ml de PBS 1x y centrifugadas por 5 minutos a 2,000 rpm, finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µl de PBS 1x al 0.5% de gelatina de cerdo a una concentración de 1×10^6 células/ml. Una vez resuspendidas se añadieron mezclas de anticuerpos acoplados y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad.

La combinación de anticuerpos se realizó tal como se muestra en la tabla 1.

Marcador (M)	Anticuerpo	Línea celular	Marcador de activación (MA)	concentración [µg/muestra] (M + MA)
CD3+	Anti-CD3-Percp-Cy5.5	Marcador general de linfocitos T		1
CD4+	Anti-CD4-AF 405	Linfocitos T cooperadores	CD44+	1+ 0.25
CD8+	Anti-CD8-PE	Linfocitos T citotóxicos	CD44+	2+0.25
CD19+	Anti-CD19-PE	Linfocitos B	CD80+	0.125+ 0.25

Tabla 1. Anticuerpos acoplados a fluorocromos. Anticuerpos usados para la detección específica de marcadores de superficie en células de sangre periférica. Las columnas muestran la población celular y su respectivo marcador de activación.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS 1x a las muestras y finalmente se decantó el sobrenadante para resuspender la muestra en 500 µl de PBS 1x para su análisis.

Adicionalmente se probaron modificaciones al protocolo establecido, tales como: tiempo de incubación y concentración de anticuerpos tabla 2.

	tiempo de incubación	anticuerpos	concentración [µg/muestra]
protocolo 1	1 hr.	Anti-CD3-Percp-Cy5.5	2
		Anti-CD4-AF 405	2
		Anti-CD8-PE	4
		Anti-CD19-PE	0.25
		anti-CD44	0.5
		anti-CD80-eFluor450	0.5
protocolo 2	2hrs.	Anti-CD3-Percp-Cy5.5	1
		Anti-CD4-AF 405	1
		Anti-CD8-PE	2
		Anti-CD19-PE	0.125
		anti-CD44	0.25
		anti-CD80-eFluor450	0.25
protocolo 3	2 hrs.	Anti-CD3-Percp-Cy5.5	2
		Anti-CD4-AF 405	2
		Anti-CD8-PE	4
		Anti-CD19-PE	0.25
		anti-CD44	0.5
		anti-CD80-eFluor450	0.5

Tabla 2. Protocolos de estandarización para citometría de flujo.

Análisis estadístico

Análisis de anticuerpos: Los datos representan la media de los promedios de tres mediciones diferentes de cada animal y se expresan como media ± S.E.M.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Immunotipificación: El análisis de datos de citometría de flujo fue realizado usando el paquete Flowjo v.10 software (Flowjo, Ashland, USA) y se expresan con media \pm S.E.M.

En ambos casos las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. Las diferencias con $P < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Se utilizó en software GraphPad PRISM V5.

RESULTADOS

Análisis Bioinformático de péptidos

Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de la proteína GP5 de PRRSV tipo II ID: ACB56974.1, de la cual se obtuvieron secuencias reportadas como altamente inmunogénicas en la *Immuno Epitope Data Base* (IEDB) tabla 1. A partir de estas secuencias obtenidas se diseñaron los péptidos del presente trabajo.

Epítipo de reconocimiento	Secuencia de aminoácidos
Linfocito B	LIYNLTLC
	NDSSSHLQ
	NDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDW
Linfocito T	KGRLYRWRSPVII
	RLYRWRSPVI

Tabla 3. Secuencias antigénicas obtenidas del análisis *in silico* en *Immuno Epitope Data Base*.

Seguimiento del peso corporal de los ratones

De la observación clínica en los ratones, no se observó daño a tejido en el sitio de inyección tanto en el grupo control como en los grupos experimentales a través del curso de este estudio.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

El peso corporal de los ratones experimentales fue registrado desde el día 0 hasta el día 45 PI. El peso en gramos se graficó a los 0, 15, 30 y 45 días (Figura 11). Los resultados muestran una ganancia de peso en los dos grupos inmunizados con GP5-B, GP5-T y el grupo control inmunizado con la proteína acarreadora BSA maleimida, respectivamente. El seguimiento del peso corporal de los ratones es indicador de salud, por lo que el aumento constante de peso a través de la duración del ensayo significa que los ratones se mantuvieron saludables.

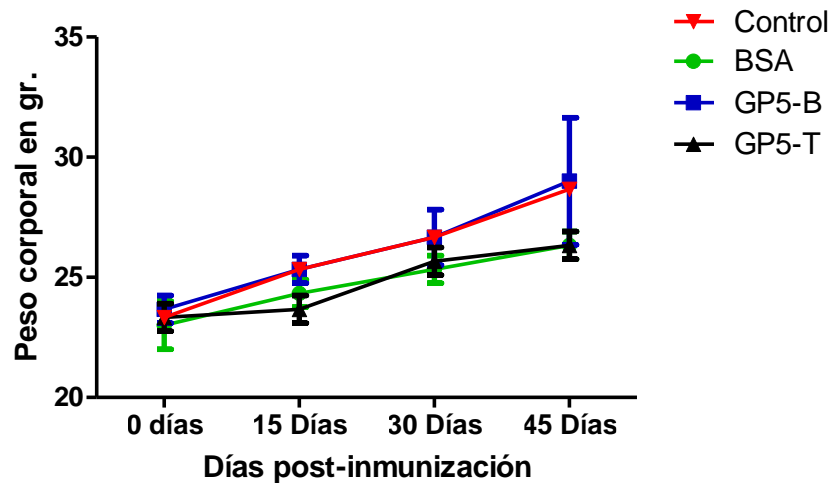


Figura 11. Peso corporal de ratones representado en gramos. El gráfico muestra los promedios de masa corporal de los sujetos pertenecientes al grupo control (n=5) y los grupos inmunizados con la proteína acarreadora BSA, GP5-B y GP5-T (n=6 en cada grupo), durante el desarrollo del tratamiento experimental. Los datos no presentan diferencia estadísticamente significativa, en todos los casos ($P \geq 0.05$) la comparación se realizó entre grupos en el mismo día de evaluación.

Evaluación de inmunoglobulinas G totales

En el grupo de animales inmunizados con el acarreador (BSA), la concentración de IgG's totales aumento significativamente en el día 15 PI comparado con el día 0 (preimmune). También se observó un aumento significativo al día 30 que se mantuvo hasta el día 45 (Figura 12A). En el grupo de animales inmunizados con el péptido GP5-B se observó un aumento estadísticamente significativo de IgG's totales a los 15 DPI, el cual se mantuvo en el día 30 PI y mostró un aumento significativo al día 45 (Figura 12B). En el grupo de animales inmunizados con el péptido GP5T, se

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

observó un aumento significativo de la concentración de IgG's al día 15 PI comparado con el día 0 y se mantuvo dicho aumento al día 30.

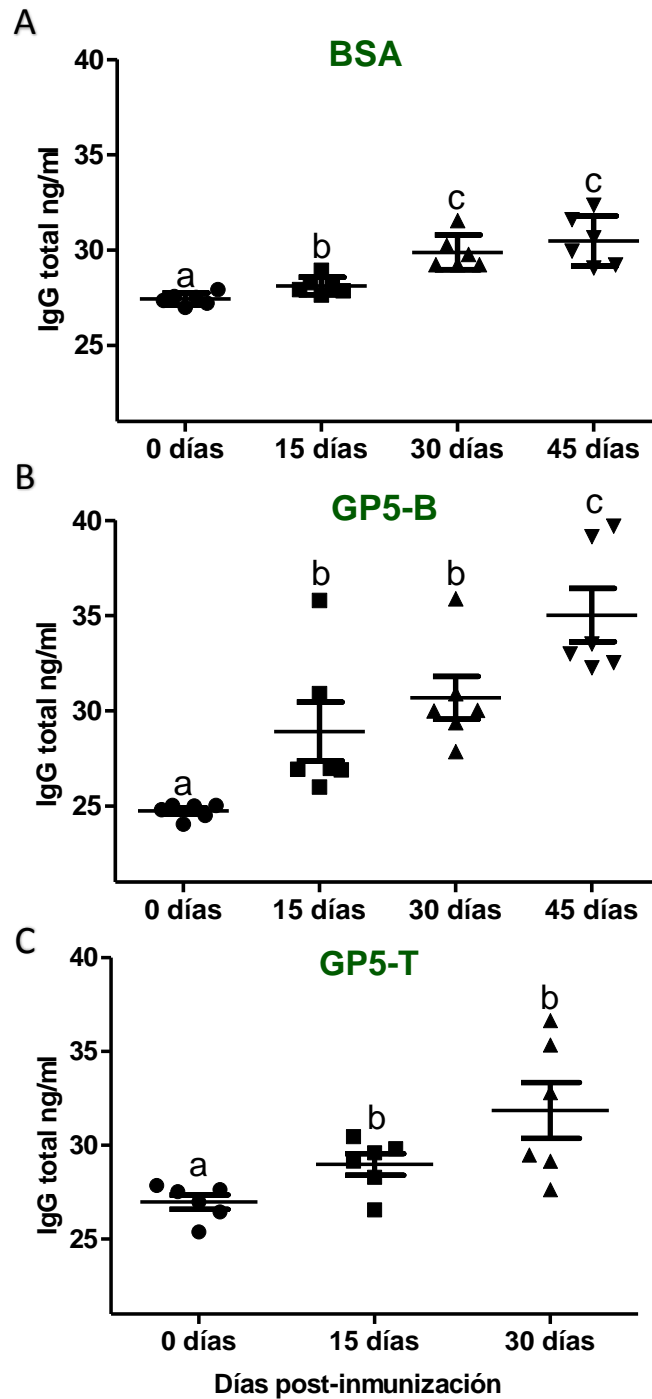


Figura 12. Concentración de Inmunoglobulinas G totales (IgG's) en sueros de ratones. El grafico muestra, (A) IgG's totales en el grupo control inmunizado con proteína acarreadora BSA. (B) IgG's totales en el grupo inmunizado con el péptido GP5-B. (C) IgG's totales en el grupo inmunizado con el péptido GP5-T. Análisis estadístico en grupos (n=5), (n=6) y (n=6) respectivamente. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Anova de una vía, prueba poshoc Tukey, los datos presentan \pm S.E.M.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

El análisis de los datos obtenidos de la cuantificación de IgG totales, muestra un aumento en la concentración en cada periodo de inmunización para los grupos control y experimentales. Lo anterior es un proceso esperado al inmunizar con una proteína acarreadora antigénica, tal como la BSA. Debido a que la evaluación de IgG's totales tuvo un comportamiento similar en los 3 grupos experimentales, se procedió a evaluar IgG's específicas de antígeno para dilucidar entre la respuesta dirigida al acarreador y la dirigida específicamente a los péptidos.

Evaluación de Inmunoglobulinas G específicas de péptido

En el grupo de animales inmunizados con el péptido GP5B, el análisis de anticuerpos específicos anti-GP5-B mostró un incremento significativo en el día 15 PI comparado con el día 0, también se observó un aumento en el día 30 comparado con el día 15 y finalmente un aumento significativo en el día 45 comparado con el día 30. Es decir, se observó aumento en la concentración de IgG's en cada periodo de evaluación del grupo experimental (Figura 13A). Lo cual sugiere la presencia de células de B activas productoras de anticuerpos específicos.

En contraparte, en el grupo de animales inmunizados con el péptido GP5T, la concentración de anticuerpos anti-GP5-T mostró diferencias estadísticamente en el día 15 comparado con el día 0. Se observó la disminución del título de anticuerpos al día 30 (Figura 13B).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

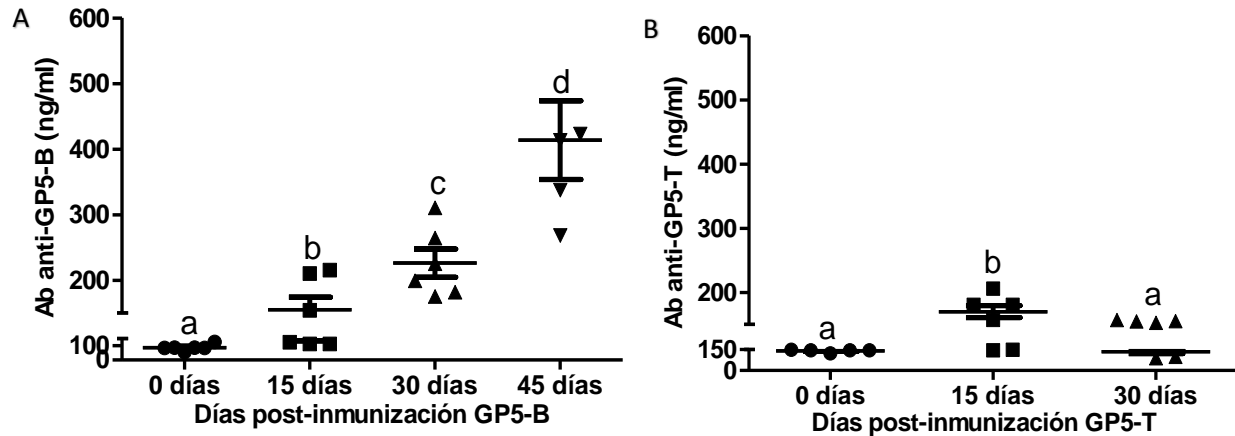


Figura 13.- Concentración de IgG's anti-péptidos en sueros de ratones. La concentración de IgG's fue evaluada periódicamente a los 0,15,30 y 45 DPI. (A) IgG específica anti-GP5-B. (B) IgG específica anti-GP5-T. Análisis estadístico (n=5) y (n=6) respectivamente. Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Los datos presentan \pm SD.

Evaluación de poblaciones celulares

Con la finalidad de evaluar de manera general el comportamiento de los leucocitos totales circulantes en los ratones inmunizados con el péptido GP5-T, se realizó un hemograma.

Se obtuvo sangre periférica de los dos grupos de animales para realizar el análisis de conteo de leucocitos y eritrocitos totales. El grupo control sin inmunización y el grupo experimental al día 45 PI con el péptido GP5-T. En la figura 14A se muestra el resultado del hematocrito de serie blanca (leucocitos) y Figura 14B el hematocrito de la serie roja (eritrocitos).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

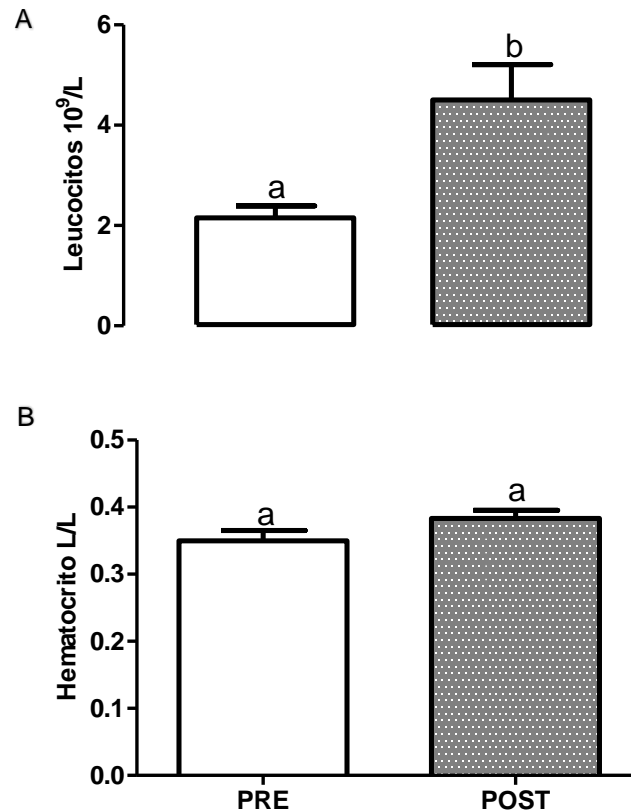


Figura 14. Concentración de Leucocitos totales y hematocrito. Leucocitos fueron aislados de sangre total en ratones a los 45 DPI y evaluados a través de biometría hemática. **A)** Leucocitos totales de animales pre (PRE) y pos inmunización /POST) (45 días). **B)** Hematocrito de serie roja en grupos pre y pos inmunización (45 días). Las letras diferentes representan diferencia estadística significativa. ($P < 0.05$). Los datos presentan \pm S.E.M. (n=4)

En la figura 14A, se observa un incremento del doble en la concentración de leucocitos circulantes entre el grupo control y PI, estadísticamente significativo. En la figura 14 B, se observa que el hematocrito de serie roja, no presenta cambios en la concentración.

A partir de esta observación, se analizó la respuesta inmune celular utilizando anticuerpos para determinar la activación de poblaciones específicas de linfocitos B y T.

Se realizó la inmunotipificación de linfocitos B y T, los cuales fueron evaluados en porcentaje de poblaciones celulares: Linfocitos B CD19+/CD80+; Linfocitos T cooperadores activos CD4+/CD44+ y linfocitos T citotóxicos activos CD8+/CD44+). Para lo cual se establecieron cuatro grupos experimentales: Grupo control (sin

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

inmunizar), grupo BSA (acarreador), grupo inmunizado con el péptido GP5B y grupo inmunizado con el péptido GP5T. Para la evaluación de la inmunidad celular los animales se sacrificaron al día 45 PI.

Los resultados mostraron que en el caso de los linfocitos B, en el grupo inmunizado con el péptido GP5-B aumentó el porcentaje de células activas (CD19+/CD80+) con respecto al grupo control sin inmunizar, el grupo inmunizado con vehículo (acarreador) y respecto el grupo inmunizado con el péptido GP5-T figura 15A.

Por una parte, se observó que el grupo vehículo presentó un incremento de linfocitos CD19+/CD80+ estadísticamente significativo con respecto al control, mientras que el grupo inmunizado con GP5-B presentó diferencia significativa de linfocitos CD19+/CD80+ con respecto al control, con respecto al grupo vehículo y con respecto al grupo GP5-T. Por otra parte, el grupo inmunizado con GP5-T tuvo un incremento significativo con respecto al control, sin embargo, no presentó diferencia contra el grupo vehículo (Figura 15 A), lo cual sugiere que el péptido GP5-B indujo activación de linfocitos B. Mientras que la respuesta observada tras la inmunización con el péptido GP5T, podría deberse a la proteína acarreadora.

Además, se evaluó la respuesta inmune mediada por células citotóxicas a través de la activación de linfocitos T citotóxicos activos (CD8+/CD44+) figura 15B. Los datos muestran que tras la inmunización incrementó el porcentaje de linfocitos T CD8 activos en todos los grupos con respecto al control no inmunizado. Los grupos BSA y GP5-B no muestran diferencias entre sí, pero si se observa diferencia con respecto al grupo inmunizado con GP5-T. Lo anterior sugiere que el péptido GP5-T indujo activación de linfocitos T citotóxicos. Mientras que el péptido GP5-B solo presentó activación que puede ser atribuible a la proteína acarreadora.

Finalmente se realizó la evaluación de linfocitos T cooperadores activos CD4+/CD44+ (Figura 15C). Los tres grupos inmunizados: vehículo, GP5-B y GP5-T presentaron diferencias significativas con respecto al control sin inmunizar, sin embargo, no hubo diferencia estadística entre ellos, lo cual sugiere que tanto GP5-

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

b como GP5-T tienen tanta capacidad para inducir activación de linfocitos T CD4+ como la proteína inmunogénica BSA.

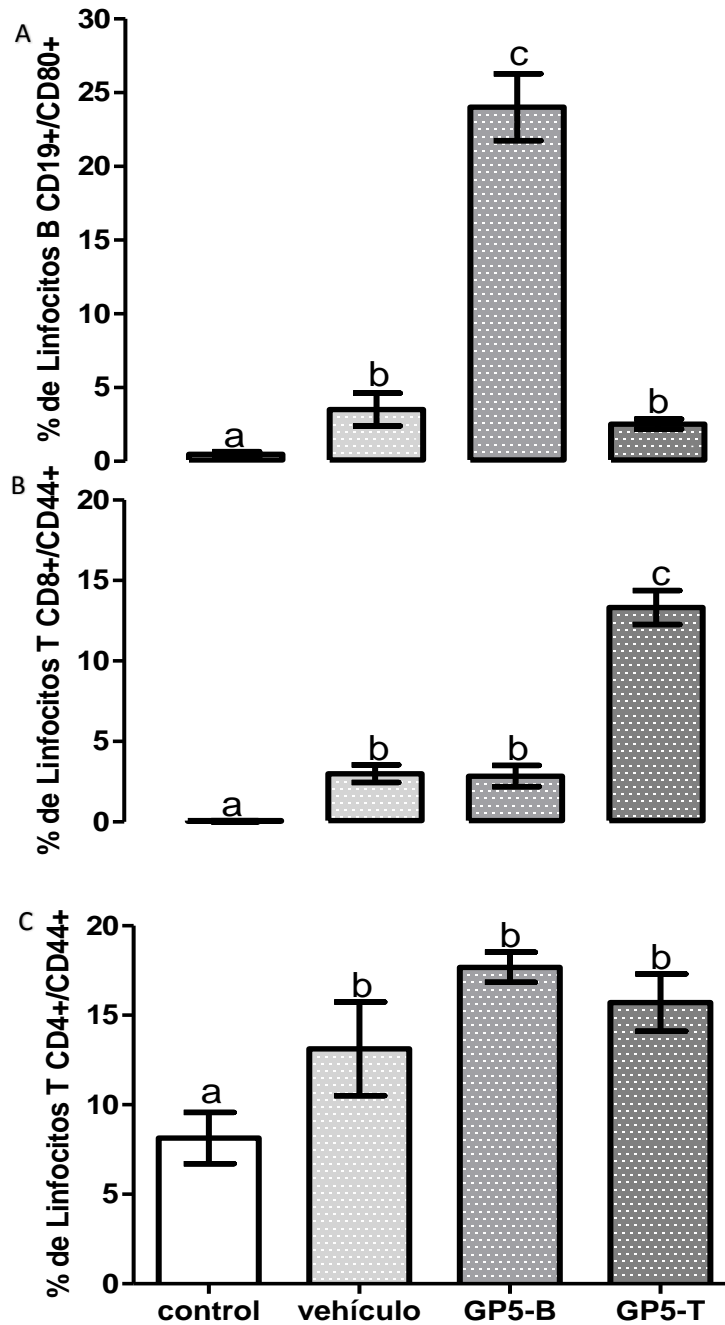


Figura 15. Poblaciones celulares y porcentajes de linfocitos B y linfocitos T CD8, CD4 activas (++) en sangre total de ratones inmunizados. Leucocitos aislados de sangre total en ratones a los 45 DPI. (A) Parte de las células aisladas fueron usadas para evaluar linfocitos B activos (CD19+/CD80+). (B) Otra parte de las células fue usada para evaluar linfocitos T CD8 activas y (C) linfocitos T CD4 activas. Análisis estadístico en grupos (n=5), (n=6) y (n=6) respectivamente. Las letras diferentes representan diferencias significativas (P < 0.05). Anova de una vía, prueba poshoc Tukey, los datos presentan \pm SEM.

DISCUSIÓN

El virus PRRS cobra relevancia por las afectaciones en la salud de los animales, lo que se traduce en grandes pérdidas económicas en la industria porcina. Una de las proteínas más estudiadas del virus es la proteína GP5, la cual, participa en el reconocimiento virus-célula hospedadora, y a la cual se le atribuye la estabilidad de la partícula viral y se ha sugerido que posee epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, GP5 es una proteína insoluble lo que hace difícil estudiarla en su forma completa. Además, induce anticuerpos no neutralizantes que son nocivos para el hospedero. Por lo tanto, en este trabajo se planteó analizar la respuesta inmune inducida por fragmentos de esta proteína en un modelo *in vivo*. Particularmente, se analizó la respuesta mediada por anticuerpos (específicos y totales) y por células (linfocitos B, linfocitos Tc y Th) contra dos péptidos, uno denominado GP5-B porque posee un epítomo de reconocimiento por linfocitos B y otro denominado GP5-T porque posee un epítomo de reconocimiento por linfocitos T. Esto nos permitió evaluar epítomos potencialmente inmunogénicos de la proteína GP5.

Los resultados de la inmunización con los péptidos GP5-B y GP5-T y la proteína acarreadora, mostraron un aumento significativo de los anticuerpos totales IgG a los 15 DPI mientras, a los 30 días se mantiene, después, a los 45 días se presentó un aumento en los títulos de IgG, el cual fue estadísticamente significativo. El comportamiento en el aumento de los títulos de IgG en la población se mantuvo también para el grupo inmunizado con el péptido GP5-T. El aumento en los títulos de anticuerpos en cada reinmunización, es un evento esperado, porque en el proceso de inmunización se utiliza un acarreador reportado como antigénico, tal como la BSA. Dado que los tres grupos muestran un comportamiento similar en la concentración de inmunoglobulinas G en cada periodo de evaluación, fue necesario diferenciar anticuerpos contra el acarreador de los anticuerpos específicos de antígeno.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Por lo tanto, se evaluó la concentración de anticuerpos específicos anti-GP5-B, en los cuales se observó que el grupo experimental tuvo un aumento creciente, estadísticamente significativo en cada reinmunización con respecto a la etapa preinmune, además de una respuesta potente y sostenida. Lo cual sugirió la presencia de linfocitos B activos de memoria. Esto concuerda con la respuesta mediada por anticuerpos específicos de antígeno de forma rápida y exacerbada en cada reencuentro con el antígeno. Se requieren experimentos adicionales para comprobar especificidad y capacidad neutralizante de los anticuerpos a través de ensayos de microneutralización. También serían útiles los ensayos de ELISA para la detección de IgG tipo 1, ya que este subtipo de IgG ha sido asociado a anticuerpos neutralizantes según estudios realizados en otros virus, tales como el virus de la influenza, el virus elevador de lactato deshidrogenasa murina y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (Huber *et al*, 2006) y HIV (Posner *et al*, 1991; Kadelca *et al*, 2018).

Por otra parte, también se evaluó la concentración de anticuerpos específicos anti-GP5-T, se observó un incremento estadísticamente significativo a los 15 DPI. Sin embargo, solo se observó este aumento a los 15 días, ya que a los 30 DPI disminuye el título de anticuerpos hasta el nivel de la etapa preinmune. Este comportamiento se atribuyó a que este péptido GP5-T posee únicamente el epítipo de reconocimiento para células T, por lo que, si bien es posible la aparición de anticuerpos específicos, se esperaba que la respuesta no fuera tan potente ni sostenida como en el caso del GP5-B.

En otro grupo de experimentos, se evaluó la respuesta inmune celular a través del conteo de leucocitos y eritrocitos, únicamente utilizando el péptido GP5-T. El propósito fue tener un primer indicio de la posible inducción de la respuesta celular contra el péptido.

Los resultados mostraron que los leucocitos totales aumentaron de manera significativa al día 45 PI. Mientras que los eritrocitos se mostraron sin cambios. Por lo tanto, estos datos sugirieron que el péptido GP5-T, podría estar favoreciendo la respuesta inmune adaptativa mediante la proliferación de los leucocitos.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Para corroborar esta hipótesis se realizaron análisis de inmunotipificación. Así, se hicieron los siguientes grupos experimentales: intactos, grupo vehículo e inmunización de manera independiente con el péptido GP5-B y GP5-T. Al final de las inmunizaciones se evaluó la respuesta celular.

Los resultados para el grupo experimental con el péptido GP5-B, en los que se marcó a los linfocitos B con el marcador de activación CD80+, mostraron hasta en un 30% de linfocitos CD19+/CD80+ por encima del grupo control sin inmunizar y hasta 25% más que la población de linfocitos B activos comparado con los grupos vehículo y GP5-T. Lo que demuestra la funcionalidad del péptido para la activación de linfocitos B.

También se realizó inmunotipificación de linfocitos T CD8+, usando como marcador de activación CD44+. Los resultados mostraron un porcentaje de linfocitos T CD8+/CD44+ similar al del grupo vehículo y sin diferencia significativa, lo cual, indica que este péptido no induce la activación de linfocitos T citotóxicos.

Además de la evaluación para linfocitos B y T CD8+ también se realizó evaluación de linfocitos T CD4+, ya que al ser células cooperadoras en la activación y diferenciación de las células que participan en la respuesta inmune adaptativa, estas deberían estar presentes en los 3 grupos inmunizados. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo entre el grupo GP5-B contra el grupo control sin inmunizar, aunque, no se presentó diferencia estadística con respecto al grupo vehículo ni GP5-T. La población de linfocitos T CD4+/CD44+ en el grupo GP5-B fue la que tuvo mayor porcentaje de activación con respecto al grupo sin inmunizar mientras que el grupo de BSA solo presentó una pobre activación de linfocitos T CD4+ con respecto al grupo control. Sin embargo, ambas fueron estadísticamente significativas con respecto al control, pero no hubo diferencias significativas entre ellas.

Los resultados para el grupo experimental con el péptido GP5-T, mostraron un incremento estadísticamente significativo de linfocitos B CD19+/CD80+ con respecto al grupo control. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos B no presentó

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

significancia con respecto al grupo vehículo, lo cual evidenció que este péptido no tiene la capacidad de inducir activación de linfocitos B (figura 15 A). Lo anterior concuerda con la hipótesis planteada en el presente proyecto ya que el diseño de este péptido fue con base en el epítipo de reconocimiento por células T. Por lo tanto, para evaluar la posible función del péptido GP5-T en activación de linfocitos T, se utilizó el anticuerpo anti-CD44, se realizó la inmunotipificación, donde se determinaron células doble positivas (CD8+/CD44+).

Los resultados mostraron el aumento de la población de linfocitos T CD8+/CD44+, con respecto al control y hasta 4 veces más linfocitos T activos. Comprobando así la capacidad de este péptido para inducir una activación de células citotóxicas. Serán necesarios experimentos complementarios para demostrar la citotoxicidad de estas células activas, por ejemplo, mediante pruebas de citotoxicidad *in vitro* en co-cultivos celulares.

El resultado del análisis de linfocitos T cooperadores CD4+/CD44+ para el péptido GP5-T arrojaron un incremento estadísticamente significativo con respecto al control, sin embargo, no presentó diferencia con respecto al grupo vehículo ni el grupo GP5-B.

La presencia de linfocitos T cooperadores activos no mostró diferencia significativa entre los grupos vehículo, GP5-B y GP5-T entre ellos. Pero si se observó diferencia significativa de estos tres grupos con respecto al grupo sin inmunización, lo cual resulta interesante porque sugiere que los dos péptidos son inmunogénicos. Sin embargo, se sabe que para la activación de los linfocitos B y linfocitos T CD8+ no es absolutamente necesaria la participación de los linfocitos T CD4+, ya que los linfocitos B también tienen la capacidad de fagocitar y procesar antígenos. Estos antígenos son presentados a los linfocitos T CD4+, los cuales secretarán citosinas que favorecerán la proliferación del linfocito que le presentó el antígeno. Las nuevas clonas del linfocito B secretarán anticuerpos específicos de antígeno. De la misma manera los linfocitos T CD8+ pueden llegar a presentar activación a través de la presentación cruzada de antígenos, en donde, una célula dendrítica fagocita una célula infectada y durante la destrucción de estas células se puede dar el

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

procesamiento de proteínas citosólicas que serán presentadas a través del complejo de histocompatibilidad tipo 1 (MHC I) el cual reconoce y activa a linfocitos T CD8. Lo anterior, formaría parte de la explicación de las diferencias tan remarcada en linfocitos B y T citotóxicos entre los grupos inmunizados con los péptidos. Por lo tanto, se sugiere que la respuesta desplegada contra los péptidos GP5-B y GP5-T es diferente a la respuesta inducida por la BSA.

Para complementar estos resultados serán necesarios más ensayos que evalúen la expresión de citocinas a través de ELISA o a través del análisis de la proliferación de linfocitos *in vitro*.

Otros estudios han mostrado de manera similar, inducción de anticuerpos específicos a través de inmunización con péptidos diseñados conteniendo epítopos a células B, en los cuales se alcanzó protección en retos contra cepas letales. Particularmente, Terradas y colaboradores en (2011), lograron inducir protección parcial contra el virus de la fiebre porcina tras inmunizar cerdos domésticos con tres construcciones que contenían epítopos a células B de la glicoproteína E2 unidos a un epítipo de células T de la porción NS3, de tal manera que indujeron anticuerpos neutralizantes y células secretoras de IFN- γ .

Por otra parte, Stanekova y colaboradores en 2011, prepararon un candidato vacunal basado en un péptido de la glicoproteína HA2 gp del virus de influenza A. El desarrollo de este modelo vacunal fue a través de la selección de la región N-terminal de HA2 gp. Una región altamente conservada entre las diversas cepas de Influenza y se inmunizaron ratones para estudiar la capacidad de inducir una respuesta inmune contra su péptido. Tras la inmunización, los ratones fueron sometidos a un reto letal con cepas de H3N2 o H1N1 observando una supervivencia de hasta el 100% y se encontraron altos niveles de anticuerpos específicos contra el péptido.

Los resultados obtenidos aportan conocimiento nuevo que puede favorecer el desarrollo y optimización de modelos vacunales y desarrollos biológicos dirigidos selectivamente contra un epítipo en un agente viral. De tal manera que se pueda

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

avanzar en la formulación de vacunas mejoradas y superando a las vacunas clásicas que funcionan con modelos de virus o bacterias completos. Cabe destacar que en algunas vacunas de virus atenuados se ha reportado que los virus se pueden retornar a patógenos en estado silvestre. En las partículas caso de las proteínas de PRRSV, estas proteínas por si solas son capaces de inducir cierta inmunosupresión sobre el animal según lo reportado por Prieto y colaboradores en 2011. Nuestros resultados muestran que de manera específica podemos predecir a través de bioinformática ciertas secuencias de aminoácidos que nos permitan inducir una respuesta mediada por células o por anticuerpos.

CONCLUSIÓN

En conclusión, en el presente proyecto se encontró que los péptidos diseñados a partir de predicciones *in silico* de epítomos de reconocimiento a linfocitos T y B en la proteína GP5, lograron inducir la respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular de manera específica.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6a ed. Elsevier Saunders. Madrid, España.

Álvarez E, Fernández-García A, Prieto C, Martínez-Lobo J, Simarro I, & Castro, JM. (2006). Efficacy of a Spanish modified live virus vaccine against homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(3), 213–220.

Arias M, Barceló J, Muñoz A, Sánchez-Vizcaíno JM. (2011) Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino. Sánchez-Vizcaíno JM editor. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas [en línea]. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>

Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. (2004). Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *Journal of Swine Health and Production*, 12,170-174.

Breedam WV, Delputte PL, Gorp HV, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, & Nauwynck HJ. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91, 1659–1667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.020503-0>

Charentantanakul, 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>

Charentantanakul 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>

Chen C, Li J, Bi Y, Yang L, Meng S, Zhou Y, Liu W. (2013). Synthetic B- and T-cell epitope peptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with Gp96 as adjuvant induced humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 31(14), 1838–1847. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.049>

Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Benfield DA. (1995). Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Serum and Semen of Adult Boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7(4), 456–464. <https://doi.org/10.1177/104063879500700406>

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Delputte PL, Van-Breedam W, Barbé F, Van-Reeth K, & Nauwynck HJ. (2007). IFN- α treatment enhances porcine arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine arterivirus receptor sialoadhesin. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 27(9), 757–766. <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0001>

Delrue I, Van Gorp H, Van Doorselaere J, Delputte PL, & Nauwynck HJ. (2010). Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC Biotechnology*, 10, 48. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-48>

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>

Dortmans JCFM, ButerGJ, Dijkman R, Houben M, & Duinhof TF. (2019). Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016. *PLOS ONE*, 14(6), e0218481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218481>

Du T, Nan Y, Xiao S, & Zhao Q. (2017). Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends in Microbiology*, 25(12), 968–979. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.001>

Duffy S, Shackelton LA, & Holmes EC. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, 9(4), 267–276. <https://doi.org/10.1038/nrg2323>

Flores-Mendoza L, Silva-Campa E, Reséndiz M, Mata-Haro VA, Osorio F, & Hernandez J. (2009). Efecto del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en células dendríticas de cerdo derivadas de monocitos. *Veterinaria México*, 40(1), 39–54.

Gutiérrez JA. (2010). *Inmunología Veterinaria*. Editorial Manual Moderno. D.F., México.

Han J, Zhou L, Ge X, Guo X, & Yang H. (2017). Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, 209, 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.020>

Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, Hirose O, & Gojobori T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 22(4), 1024–1031. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi089>

Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, & Nielsen OL. (2010). An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.012>

Hawrylowicz CM. (2005). Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 202(11), 1459-1463. The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20052211>

Heydeck SML, Bravo GGH, Bernabé SL, Vargas ES, Torres AC, & De La Cruz Valdés F. (2013). Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 4(4), 469–488.

Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Haley C. (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 C, Zhang Q, & Feng W. (2015). Regulation and evasion of antiviral immune responses by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 202, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.014>

Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller LA, Keating R, Brown SA, McCullers JA. (2006). Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9), 981–990. <https://doi.org/10.1128/CVI.00156-06>

Jones S, Nelson-Sathi S, Wang Y, Prasad R, Rayen S, Nandel V, Pillai RM. (2019). Evolutionary, genetic, structural characterization and its functional implications for the influenza A (H1N1) infection outbreak in India from 2009 to 2017. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51097-w>

Kadelka C, Liechti T, Ebner H, Schanz M, Rusert P, Friedrich N, Yerly S. (2018). Distinct, IgG1-driven antibody response landscapes demarcate individuals with broadly HIV-1 neutralizing activity. *Journal of Experimental Medicine*, 215(6), 1589–1608. <https://doi.org/10.1084/jem.20180246>

Ke H, & Yoo D. (2017). The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design for PRRS virus. *Veterinary Microbiology*, 209, 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.014>

Lopez OJ, & Osorio FA. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(3), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

López-Heydeck SM, Alonso-Morales RA, Mendieta-Zerón H, & Vázquez-Chagoyán JC. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review | Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 6(1).

Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, & Zuckermann FA. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167, 1–14.

Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, & Renukaradhya GJ. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>

Mateu E, & Diaz I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *The veterinary journal*, 177, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.022>

Macías MJ, Plascencia G, Osorio F, Saavedra A, Reyes J, & Hernández J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). *Veterinaria México*, 37(2), 197–208. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Martínez-Barroso G, Williams JJ, Anzina-López A. (2002) Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino dentro de granjas porcinas del estado de Yucatán, México. *Veterinaria México*, 33(4),1-11.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, & Lum MA. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Archives of Virology*, 140(4), 745–755. <https://doi.org/10.1007/BF01309962>

Montaner-tarbes S, Portillo HA, Montoya M, & Graham SP. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV), *Frontiers in veterinary science*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>

Music N, & Gagnon C. (2010). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews*, 11(2), 135-163. <https://doi10.1017/S1466252310000034>

Murthy AMV, Ni Y, Meng X, & Zhang C. (2015). Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

respiratory syndrome virus (PRRSV). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8382–8396. <https://doi.org/10.3390/ijms16048382>

Nedumpun T, Sirisereewan C, Thanmuan C, & Techapongtada P. (2018). Induction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) - specific regulatory T lymphocytes Treg in the lungs and tracheobronchial lymph nodes of PRRSV-infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 216, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.014>

Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, & Lopez OJ. (2002). Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain. *Journal of Virology*, 76(9), 4241–4250. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4241-4250.2002>

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>

Popescu LN, Tribble BR, Chen N, & Rowland RRR. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology*, 209, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>.

Posner MR, Hideshima T, Cannon T, Mukherjee M, Mayer KH, & Byrn RA. (1991). An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 146(12), 4325–4332. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710248>

Potter M. (1985). History of the BALB/c family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 122, 1–5. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70740-7_1

Provost C, Jia JJ, Music N, Lévesque C, Lebel MÉ, del Castillo JRE, Gagnon CA. (2012). Identification of a new cell line permissive to PRRSV infection and replication, which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virology Journal*, 267(9).

Rathkjen PH, & Dall J. (2017). Control and eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 using a modified-live type 2 vaccine in combination with a load, close, homogenise model: an area elimination study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0270-z>

Roques E, Girard A, St-Louis MC, Massie B, Gagnon CA, Lessard M, & Archambault D. (2013). Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

expressed from replicating but nondisseminating adenovectors. *Veterinary Research*, 44(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-17>

SAGARPA. (2017). Demandas específicas del sector 2017-6. Fondo Sectorial de Investigación en Materias, Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos.

Salinas-Meléndez JA, Lara-Arias J, Flores-Andrade H, Ávalos-Ramírez R, Zárate-Ramos JJ, Riojas-Valdés V, Segura-Correa JC. (2008). Presencia de animales seropositivos al síndrome reproductivo y respiratorio porcino en Nuevo León. *Veterinaria México*, 39(2):215-221.

Schumann J, Stanko K, Schliesser U, Appelt C, & Sawitzki B. (2015). Differences in CD44 Surface Expression Levels and Function Discriminates IL-17 and IFN- γ Producing Helper T Cells. *PLoS ONE*, 10(7) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132479>

Shi M, Lam TTY, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RKH, Leung FCC. (2010). Phylogeny-Based Evolutionary, Demographical, and Geographical Dissection of North American Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Journal of Virology*, 84(17), 8700–8711. <https://doi.org/10.1128/jvi.02551-09>

Sierra N, Ramírez R, & Mota D. (2000). Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 3(5), 1–6. <https://doi.org/10.3823/1230>

Snijder EJ, Kikkert M, & Fang Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of General Virology*, 94(PART10), 2141–2163. <https://doi.org/10.1099/vir.0.056341-0>

Staneková Z, Király J, Stropkovská A, Mikušková T, Mucha V, Kostolanský F, & Varečková E. (2011). Heterosubtypic protective immunity against influenza A virus induced by fusion peptide of the hemagglutinin in comparison to ectodomain of M2 protein. *Acta Virologica*, 55(1), 61–67. https://doi.org/10.4149/av_2011_01_61

Tarradas J, Monsó M, Muñoz M, Rosell R, Fraile L, Frías MT, Ganges L. (2011). Partial protection against classical swine fever virus elicited by dendrimeric vaccine-candidate peptides in domestic pigs. *Vaccine*, 29(26), 4422–4429. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.095>

Thaa B, Sinhadri BC, Tievesch C, Krause E, & Veit M. (2013). Signal Peptide Cleavage from GP5 of PRRSV : A Minor Fraction of Molecules Retains the Decoy Epitope, a Presumed Molecular Cause for Viral Persistence. *Plos One*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065548>

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF. (2007) Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE* 2(6): e526. doi:10.1371/journal.pone.0000526

Tribble BR, Popescu LN, Monday N, Calvert JG, & Rowland RRR. (2015). A single amino acid deletion in the matrix protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus confers resistance to a polyclonal swine antibody with broadly neutralizing activity. *Journal of Virology*, 89(12), 6515–6520. <https://doi.org/10.1128/JVI.03287-14>

Vanhee M, Van Breedam W, Costers S, Geldhof M, Noppe Y, & Nauwynck H. (2011). Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine*, 29(29–30), 4794–4804. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.071>

Vashisht K, Goldberg TL, Husmann RJ, Schnitzlein W, & Zuckermann FA. (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>

Vidarsson G, Dekkers G, & Rispens T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Vu HLX, Kwon B, Yoon KJ, Laegreid WW, Pattnaik AK, & Osorio FA. (2011). Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *Journal of Virology*, 85(11), 5555–5564. <https://doi.org/10.1128/JVI.00189-11>

Wang PP, Dong JG, Zhang LY, Liang PS, Liu YL, Wang L, Song CX. (2016). Sequence and Phylogenetic Analyses of the Nsp2 and ORF5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boars from South China in 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/tbed.12594>

Wissink EHJ, Kroese MV, van Wijk HAR, Rijsewijk FAM, Meulenbergh JJM, & Rottier PJM. (2005). Envelope Protein Requirements for the Assembly of Infectious Virions of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, 79(19), 12495–12506. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12495-12506.2005>

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS
DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO

Xiao S, Jia J, Mo D, Wang Q, Qin L, He Z, Chen Y. (2010). Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS ONE*, 5(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011377>

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>