



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Construcción de un sistema de expresión para la proteína N del
virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) en *E. coli* y
caracterización antigénica en ensayos inmunoabsorbentes**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. Marco Antonio Barrera Aldana

TUTOR PRINCIPAL

DR. José Francisco Rivera Benítez, INIFAP

COMITÉ TUTORAL

DR. Humberto Ramírez Mendoza, FMVZ-UNAM
DR. José Iván Sánchez Betancourt, FMVZ-UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A las personas más especiales e importantes de mi vida y que hacen que todo valga la pena:

A mis padres: *Lucas Barrera Cruz y Natalia Aldana Rueda.*

A mis hermanos: Martin, Ricardo, Román, Cecilia Marlen y Jazmín.

¡Gracias por su apoyo incondicional!

¡Si tienes una gran familia, tienes una gran vida!

AGRADECIMIENTOS

Estoy feliz y agradecido con Dios. Todo lo que he logrado ha sido a través de él; me da la fortaleza para vivir y disfrutar cada día.

El agradecimiento más especial es para mis padres y mis hermanos, quienes siempre me han apoyado a lo largo de mi vida y en cada paso que doy como persona y como profesionalista. ¡Gracias por todo su apoyo, su amor, su paciencia y su confianza...los amo mucho, son lo más maravilloso que tengo en la vida!

Al Dr. José Francisco Rivera Benítez por permitir integrarme a su proyecto y equipo de investigación, por compartir todos sus conocimientos, por orientarme y darme sus consejos para mejorar en todos los ámbitos como profesionalista.

Al Dr. Luis Gómez Núñez por su apoyo en el laboratorio por compartir sus conocimientos y por estar pendiente del avance en mi proyecto de investigación.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza quien fue parte fundamental en el desarrollo de mi investigación y por compartir sus conocimientos y su valiosa experiencia.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por formar parte de mi comité tutorial y por procurar que siempre adquiriera nuevos conocimientos.

Agradezco al Dr. José Luis Cerriteño Sánchez por compartir sus conocimientos y habilidades, y enseñarme todas las técnicas de laboratorio necesarias para la realización de mi investigación.

A la MVZ. Karla castillo Cervantes por su ayuda en todo momento para realizar actividades dentro y fuera del laboratorio.

Al MVZ. Manuel Zapata Moreno por su ayuda en el desarrollo de mi investigación.

A mi jurado evaluador por revisar mi tesis y por la retroalimentación para mejorar y finalizar mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-MA INIFAP).

El financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación fue otorgado por INIFAP No. 13592932977 “Desarrollo y validación de pruebas para la detección de anticuerpos y antígeno del virus de la diarrea epidémica porcina” y CONACYT PDCPN2014-01. No. 249177 “Desarrollo y evaluación de productos de diagnóstico y un biológico para el control y la prevención de la diarrea epidémica porcina”.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Transmisión de la DEP.....	11
2.2 Patogénesis.....	11
2.3 Signos clínicos.....	12
2.4 Lesiones.....	13
2.5 Epidemiología.....	13
2.6 Agente etiológico.....	14
2.6.1 Ciclo de replicación.....	15
2.6.2 Proteína N.....	16
2.6.2.1 Características estructurales de la proteína N.....	16
2.6.2.2 Funciones de la nucleocápside.....	17
2.7 Estudios realizados con la proteína N del virus de diarrea epidémica porcina... ..	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	22
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína N.....	24
7.2 Distribución de epítomos.....	24
7.3 Diseño de oligonucleótidos.....	25
7.4 Amplificación del ORF del gen N de vDEP.....	25
7.5 Clonación en vector de resguardo pJET 1.2/Blunt.....	26
7.6 Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	26
7.7 Subclonación en vector de expresión pET SUMO.....	28
7.8 Secuenciación.....	28
7.9 Inducción de la expresión de la proteína N.....	28
7.10 Análisis de la expresión de la proteína N por PAGE-SDS y <i>Western blot</i>	29

7.11	Extracción de fragmentos proteicos y purificación de la proteína N recombinante.	31
7.12	Análisis de muestras serológicas.	32
7.13	Ensayo inmunoenzimático recombinante indirecto (ELISA indirecto).	32
7.14	<i>Western blot</i> de muestras serológicas.	33
8.	RESULTADOS	34
8.1	Análisis <i>in silico</i> de la proteína N.	34
8.1.1	Sitios potenciales de glicosilación.	34
8.1.2	Regiones hidrofóbicas.	34
8.1.3	Hidrofilicidad, índice antigénico e índice de superficie.	35
8.2	Distribución de epitopes.	36
8.3	Diseño de oligonucleótidos.	37
8.4	Amplificación del ORF del gen N de vDEP.	38
8.5	Clonación en vector de resguardo pJET.	39
8.6	Subclonación en pET SUMO	41
8.7	Secuenciación.	43
8.8	Inducción de la expresión de la proteína N.	44
8.9	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	44
8.10	<i>Western blot</i> .	45
8.11	Purificación de la proteína N recombinante.	46
8.12	ELISA indirecto.	47
8.13	<i>Western blot</i> de muestras serológicas.	52
9.	DISCUSIÓN.	55
10.	CONCLUSIÓN.	60
11.	REFERENCIAS.	61

RESUMEN

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad entérica aguda de los cerdos, causada por un coronavirus, afecta de forma más severa a los cerdos neonatos, alcanzando una morbilidad y mortalidad de hasta el 100%. En México hay una limitada disponibilidad, mejora y adaptación de técnicas para el estudio de la enfermedad, por lo que el objetivo del estudio fue generar un sistema de expresión para la proteína N del vDEP en el sistema de expresión de *E. coli* y emplear la proteína purificada para llevar a cabo estudios serológicos. Para comprobar la capacidad antigénica de la proteína recombinante N se analizó la respuesta humoral (IgG e IgM) de dos grupos de cerdos (G1-Sin inmunidad y G2-Con inmunidad) mantenidos bajo condiciones de aislamiento durante 21 semanas post infección con el vDEP, empleando un ELISA indirecto y *Western blot*. Mediante el mismo procedimiento, se analizaron las proteínas S y M del vDEP producidas previamente. Se obtuvo una proteína purificada de 70 kDa. Se analizaron 234 sueros mediante ELISA indirecto, detectando anticuerpos IgG e IgM desde la primera semana post infección (spi) y manteniéndose hasta las 21 spi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo. En el G2-CI se detectaron anticuerpos IgG e IgM desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir para IgG en la primera spi y una tendencia a incrementar a través del tiempo para IgM. Por medio de *Western blot* se confirmó la cinética de producción de anticuerpos (IgG) al detectar la proteína N del vDEP con un peso de 70 kDa, lo que coincide con los resultados del ELISA indirecto. La amplia duración y detección de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína N del vDEP en muestras de suero, proporciona información oportuna sobre la exposición y la respuesta inmune en cerdos en crecimiento, siendo una herramienta importante para la vigilancia, prevención y control de la enfermedad.

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea (PED) is an acute enteric disease of pigs, caused by a coronavirus; it affects more severely the neonate pigs, reaching a morbidity and mortality of up to 100%. In Mexico there is limited availability, improvement and adaptation of techniques for the study of the disease, so the objective of the study was to generate an expression system for the N protein of the vDEP in the *E. coli* expression system and to use the purified protein to carry out serological studies. To verify the antigenic capacity of the recombinant protein N, the humoral response (IgG and IgM) of two groups of pigs (G1-Without immunity and G2-With immunity) maintained under isolation conditions for 21 weeks post-infection with the PED virus was analyzed. An indirect ELISA and *Western blot* were used. Using the same procedure, the previously produced DEPV proteins S and M were analyzed. A purified protein of 70 kDa was obtained. 234 sera were analyzed by indirect ELISA, detecting IgG and IgM antibodies from the first week post infection (wpi) and maintaining up to 21 wpi in the group 1, observing a tendency to increase over time. In the group 2 IgG and IgM antibodies were detected from the first sampling, a tendency to decrease for IgG in the first wpi and a tendency to increase over time for IgM was observed. Through *Western blot* the kinetics of antibody production (IgG) was confirmed by detecting the N protein of DEPV with a weight of 70 kDa, which coincides with the results of the indirect ELISA. The long duration and detection of IgG and IgM antibodies against the N protein of DEPV in serum samples, provides timely information on the exposure and immune response in growing pigs, being an important tool for the surveillance, prevention and control of the disease.

1. INTRODUCCIÓN.

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad viral no zoonótica de los cerdos, causada por un coronavirus y caracterizada por ocasionar diarrea acuosa y pérdida de peso en cerdos de todas las edades. Afecta de forma más severa a los cerdos neonatos, alcanzando una morbilidad y mortalidad de hasta el 100%, conforme aumenta la edad la mortalidad disminuye. Se trata de una enfermedad infectocontagiosa que se transmite principalmente por ruta fecal y oral. En términos clínicos, se asemeja a otras formas de gastroenteritis porcina con signos como anorexia, vómito, diarrea y deshidratación. La prevención y el control se centran en una bioseguridad estricta y en la detección temprana. No existe tratamiento específico para la enfermedad (OIE 2014).

La presentación clínica de la infección por el virus de la DEP (vDEP) en cerdos puede variar en gravedad y puede no distinguirse de otras causas de diarrea. Los signos clínicos dependen de la edad de los cerdos, la exposición previa, el estatus inmunológico de los cerdos y la presencia de infecciones secundarias. Dado que los signos de la infección por vDEP son clínica y patológicamente indistinguibles de los causados por el virus de gastroenteritis transmisible, deltacoronavirus porcino, rotavirus; por bacterias (*Clostridium spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Brachyspira spp.*, *Lawsonia intracellularis*, etc.) o por parásitos (*Isospora suis*, *Cryptosporidium spp.*, *nematodes*, etc.), el diagnóstico de la DEP no puede realizarse únicamente con base en los signos clínicos y lesiones histopatológicas. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial para confirmar la presencia de vDEP y/o sus antígenos debe realizarse en el laboratorio para obtener un diagnóstico definitivo. Una variedad de métodos de detección del vDEP, incluyen pruebas de inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (IHC), hibridación *in situ*, microscopía electrónica, aislamiento viral, ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y varias técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para la detección de anticuerpos de vDEP, se utilizan anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), ELISA y pruebas de neutralización viral (OIE 2014; Lee, 2015).

Respecto a los ensayos ELISA existen diseños diferentes, con técnicas de tipo indirecto, competitivo o de bloqueo. Pueden estar basados en antígenos completos o en proteínas recombinantes del vDEP (N, S o M) expresadas en bacterias y, por lo general, las sensibilidades y especificidades que se les asocian son elevadas. Las muestras sobre las que se pueden emplear estas técnicas de detección indirecta incluyen suero, leche, calostro, heces o fluidos orales y pueden estar dirigidas frente a inmunoglobulinas de diferentes subtipos, IgM, IgG o IgA (Diel et. al, 2016).

Las proteínas recombinantes son obtenidas en células distintas a las que se producen naturalmente a partir de la expresión de genes clonados. Pueden expresarse utilizando sistemas procariotas (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), sistemas eucariotas (levaduras, células de insecto y células de mamífero) o sistemas in vitro. El sistema de *E. coli* es el hospedador de primera elección para la expresión de proteínas recombinantes, ya que estas células pueden manipularse fácilmente, se cultivan de forma económica y crecen rápidamente. En los últimos años, se han desarrollado nuevas cepas, vectores y etiquetas para superar las limitaciones de este sistema, que incluyen sesgo de codones, formación de cuerpos de inclusión, toxicidad, inactividad proteica, inestabilidad del ARN mensajero y falta de modificación postraduccional (Baolei y Che Ok, 2016).

La producción de proteínas recombinantes permite obtener: proteínas animales en organismos fácilmente cultivables, grandes cantidades de proteína, de una forma más fácil y sobre todo reproducible, en comparación con el obtenido por extracción a partir de su fuente natural y proteínas libres de patógenos y otros riesgos potenciales. Hasta el momento, se han utilizado varios sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes del vDEP, tales como células de mamífero, plantas transgénicas, levaduras y *E. coli*. A pesar de la ausencia de modificaciones postraduccionales (tales como fosforilación, acetilación y glicosilación), la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* tiene muchos beneficios significativos sobre otros sistemas de expresión en términos de costos, facilidad de uso y escala, además de que podrían ser útiles en la implementación de un ensayo de diagnóstico (Da-Chuan et. al, 2016).

Recientemente, se ha desarrollado un ELISA indirecto basado en la proteína S1 recombinante para detectar anticuerpos anti-vDEP. Este método es una herramienta útil, sensible y específica para la detección de anticuerpos IgG e IgA anti vDEP-S en muestras de suero y calostro (Gerber et. al, 2014). La expresión de la proteína S1 truncada de vDEP en el sistema de *E. coli* produjo anticuerpos monoclonales que reaccionaron con vDEP en el ensayo de anticuerpos fluorescentes.

En otro estudio, se evaluó la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por diarrea epidémica porcina de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) basado en la proteína recombinante de nucleocápside (N) generada en *Escherichia coli*, obteniendo buenos resultados (Hou et. al, 2007).

En México no existe ningún estudio relacionado con la producción de proteína N recombinante de vDEP, desde que se detectó en el país en el año 2013. Con la producción de una proteína recombinante se puede apoyar en el diagnóstico, vigilancia y prevención de la enfermedad y en el estudio de las nuevas cepas virales. Por lo tanto, el presente estudio, tiene como objetivo generar un sistema de expresión para la proteína N del virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) en *E. coli*, el cual fue obtenido en brotes de la DEP en México y emplear la proteína purificada para llevar a cabo estudios serológicos con cepas virales circulantes en el país.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Transmisión de la DEP.

La infección por el vDEP entre los cerdos se produce principalmente por vía fecal-oral directa o indirecta. La transmisión aérea también puede desempeñar un papel en la diseminación del vDEP bajo ciertas condiciones (Alonso et. al, 2014). El vDEP puede entrar principalmente en las granjas por heces o vómitos y fuentes contaminadas del medio ambiente a través de cerdos clínica o subclínicamente infectados, tráileres (transporte de cerdos, estiércol o alimentos), personas (propietarios de cerdos o visitantes, tales como profesionistas o conductores de tráileres, en ropa de trabajo y calzado contaminados), o animales salvajes y aves (Saif et. al, 2012; Lowe et. al, 2014).

Después de un brote agudo (epidémico), el vDEP puede: a) desaparecer; b) permanecer en la unidad de parto debido a un manejo inadecuado de la higiene (por ejemplo, desinfección inadecuada y bioseguridad deficiente); c) persistir en los cerdos en las unidades de destete o crecimiento-finalización, en estas etapas el virus se encuentra circulando, causando diarreas leves después del destete con tasas de mortalidad muy bajas. En este estado endémico, si los cerdos recién nacidos no pueden obtener inmunidad materna suficiente de sus madres debido a la vacunación incompleta de la cerda o a un rendimiento defectuoso de la lactancia debido a la mastitis o agalactia, el virus que circula en la granja infectará a los lechones susceptibles, que sirven de fuente de recurrencia de los brotes epidémicos, mismos que conducen a una alta mortalidad de cerdos (Park et. al, 2011).

2.2 Patogénesis.

El vDEP infecta y se replica principalmente, en los enterocitos (vellosidades intestinales) del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). La infección resulta en la destrucción del epitelio intestinal con posterior acortamiento de las vellosidades, causando diarrea acuosa que dura aproximadamente una semana. Otros signos clínicos incluyen vómito, anorexia y fiebre. Cerdos de todas las

edades son susceptibles, pero los signos son más graves en lechones lactantes de menos de una semana de edad con tasas de mortalidad que a menudo se aproxima al 100%. Las tasas de mortalidad en cerdos destetados son mucho más bajas (1-3%), mientras que la mortalidad no se ha observado en cerdos de engorde (Li et. al, 2016). Aunque las razones por las que vDEP causa una enfermedad más grave en lechones lactantes en comparación con los cerdos destetados no se han aclarado por completo, la regeneración más lenta de enterocitos en cerdos neonatales puede ser un factor importante (Moon et. al, 1973).

2.3 Signos clínicos.

El vDEP puede infectar cerdos de todas las edades, causando diarrea acuosa y vómito acompañado de anorexia y depresión. La morbilidad se aproxima al 100% en los lechones, pero puede variar en cerdas. El período de incubación del vDEP es de aproximadamente 2 días, variando de 1 a 8 días, dependiendo de las condiciones de campo o experimentales. El intervalo entre el inicio y el cese de los signos clínicos es de 3-4 semanas (Saif et. al, 2012). La excreción por la vía fecal del vDEP va de las 48 horas hasta las cuatro semanas. La gravedad de la enfermedad y la tasa de mortalidad es inversamente asociada con la edad de los cerdos (Shibata et. al, 2000). La infección por vDEP en lechones de hasta 1 semana de edad causa diarrea acuosa intensa y vómitos durante 3-4 días, seguida de grave deshidratación y desequilibrio electrolítico que conduce a la muerte. La mortalidad en promedio es del 50%, a menudo se aproxima al 100% en los lechones de 1 a 3 días de edad. En los animales más grandes, incluidos los cerdos de destete-crecimiento-engorda-finalización, los signos clínicos son autolimitados, en la primera semana después de la aparición de la enfermedad. Sin embargo, la infección puede afectar el crecimiento de los cerdos. Las cerdas pueden o no tener diarrea y a menudo manifiestan signos depresivos y anorexia. Si las cerdas paridas pierden su camada, pueden sufrir trastornos reproductivos, como agalactia o retraso del celo (Lee, 2015).

2.4 Lesiones.

Las lesiones macroscópicas se limitan al tracto gastrointestinal y se caracterizan por estómago distendido lleno de leche cuajada, paredes intestinales delgadas y transparentes con acumulación de líquidos amarillentos. Las características histológicas distintivas de la infección por vDEP incluyen enteritis atrófica difusa grave, hinchazón de enterocitos vellosos superficiales con vacuolación citoplásmica leve, necrosis de enterocitos dispersos seguida de desprendimiento y contracción de la lámina propia subyacente que contiene células apoptóticas (Lee et. al, 2015). Las vellosidades intestinales se reducen a dos tercios o más de su longitud original (la proporción de la altura de las vellosidades a la profundidad de la cripta cambia a menos de 3:1 en los cerdos afectados) con la extensión de la patología dependiendo de la etapa del proceso de infección o enfermedad (Jung et. al, 2014).

2.5 Epidemiología.

La enfermedad entérica de los cerdos reconocida a principios de los años setenta en Europa se describió inicialmente como "diarrea viral epidémica" y ahora se denomina "diarrea epidémica porcina (DEP)". Se determinó, a finales de los años setenta, que el coronavirus denominado virus de la DEP (vDEP) era el agente etiológico de esta enfermedad. Desde entonces, se ha notificado la enfermedad en Europa y Asia, pero los brotes más graves se han producido predominantemente en los países productores de cerdos asiáticos. Más recientemente, el vDEP apareció por primera vez a principios de 2013 en los Estados Unidos, lo que causó alta morbilidad y mortalidad asociada con la DEP, afectando notablemente la producción de cerdos en los Estados Unidos y extendiéndose a Canadá y México. Poco después, las epidemias de DEP a gran escala se repitieron en la industria del cerdo en Corea del Sur, Japón y Taiwán. Estos brotes recientes y la reaparición global de la DEP requieren atención urgente y una comprensión más profunda de la biología del virus y de los mecanismos de patogenia (Lee, 2015).

En México, el Servicio Nacional de Salud, Seguridad Alimentaria y Calidad de los Alimentos (SENASICA) desarrolló un muestreo epidemiológico en cerdos de finalización, engorda, reproductores y animales de traspatio que exhibían signos clínicos. En la investigación realizada entre agosto de 2013 y mayo de 2014, 2309 muestras fueron analizadas por PCR en tiempo real, de las cuales el 30% fueron positivas (Trujillo et. al, 2016).

2.6 Agente etiológico.

El agente etiológico de la DEP, es un virus ARN envuelto, es miembro del género *Alfacoronavirus* dentro de la familia *Coronaviridae*, está clasificado en la familia *Arteriviridae* en el orden *Nidovirales*. El genoma de vDEP tiene aproximadamente 28 kb de longitud con una cap 5', una cola poliadenilada 3' y comprende una región no traducida (UTR) 5', contiene al menos 7 marcos de lectura abiertos (ORF1a, ORF1b y ORF2-6), y una UTR 3'. Los dos ORFs grandes 1a y 1b ocupan los dos tercios proximales 5' del genoma que codifican las proteínas no estructurales (nsps). La traducción del ORF1a produce una poliproteína replicasa (pp) 1a, mientras que el ORF1b se expresa mediante un desplazamiento de marco ribosomal-1 (RFS), que extiende C- terminalmente pp1a en pp1ab. Estas pp1a y pp1ab se escinden posterior a la traducción por proteasas internas generando 16 productos finales de procesamiento, denominados nsp1-16. Los restantes ORFs en la región del genoma proximal 3' codifican cuatro proteínas estructurales expresadas a partir del respectivo conjunto anidado 3'-co-terminal de mARNs subgenómicos (sg): la proteína glicosilada spike (S) de 150-220 kDa, proteína de membrana (M) de 20-30 kDa, proteína de la envoltura (E) de 7 kDa, proteína de la nucleocápside (N) de 58 kDa y un gen accesorio ORF3 (Lee, 2015).

El genoma del vDEP está encapsulado por las proteínas N, formando una estructura de bobina larga y helicoidal que se envuelve en una envoltura lipídica que contiene tres proteínas estructurales asociadas a la superficie, S, M y E. Los viriones envueltos son aproximadamente esféricos y pleomórficos con un diámetro comprendido entre 95 y 190 nm, incluyendo las proyecciones S trimerizadas,

ampliamente espaciadas, en forma de disco, que miden de 18-23 nm de longitud. El vDEP es sensible al éter y al cloroformo, es estable a 4-50 °C y se inactiva completamente a valores de pH superiores al intervalo de pH 4-9. Por lo tanto, es inactivado por varios desinfectantes ácidos o alcalinos (Lee, 2015).

2.6.1 Ciclo de replicación.

El vDEP se une a través de la proteína spike a la pAPN (aminopeptidasa porcina N). La región N-terminal del dominio S1 de la proteína spike de vDEP es importante para reconocer el receptor de pAPN. La penetración y la liberación ocurren después de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática mediada por la proteína S. Después del desnudamiento del virus, el genoma viral se libera en el citoplasma y se traduce inmediatamente para producir replicas pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas se escinden proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales (nsps) que comprenden el complejo de replicación y transcripción (RTC), que primero se emplea en la síntesis de ARN de cadena negativa utilizando ARN genómico. Se producen ambas hebras de longitud completa y de longitud subgenómica (sg) y se utilizan para sintetizar ARN genómico de longitud completa y mARNs subgenómicos. Cada mARN subgenómico se traduce para producir sólo la proteína codificada por el ORF positivo 5' del mARN subgenómico. Las proteínas S, E y M de la envoltura se insertan en el RE y se anclan en el aparato de Golgi. La proteína N interactúa con el ARN genómico recién sintetizado para formar complejos helicoidales de ribonucleoproteínas (RNP). El virus de la progenie se ensambla por brotación de la RNP preformada en el compartimiento intermedio RE-Golgi (ERGIC) y luego se libera por la fusión de tipo exocitosis de vesículas de pared lisa que contienen viriones con la membrana plasmática (Figura 1). Los virus pueden ajustar la actividad de los factores celulares o vías de señalización para beneficiar su propia multiplicación en las células hospedadoras (Lee, 2015).

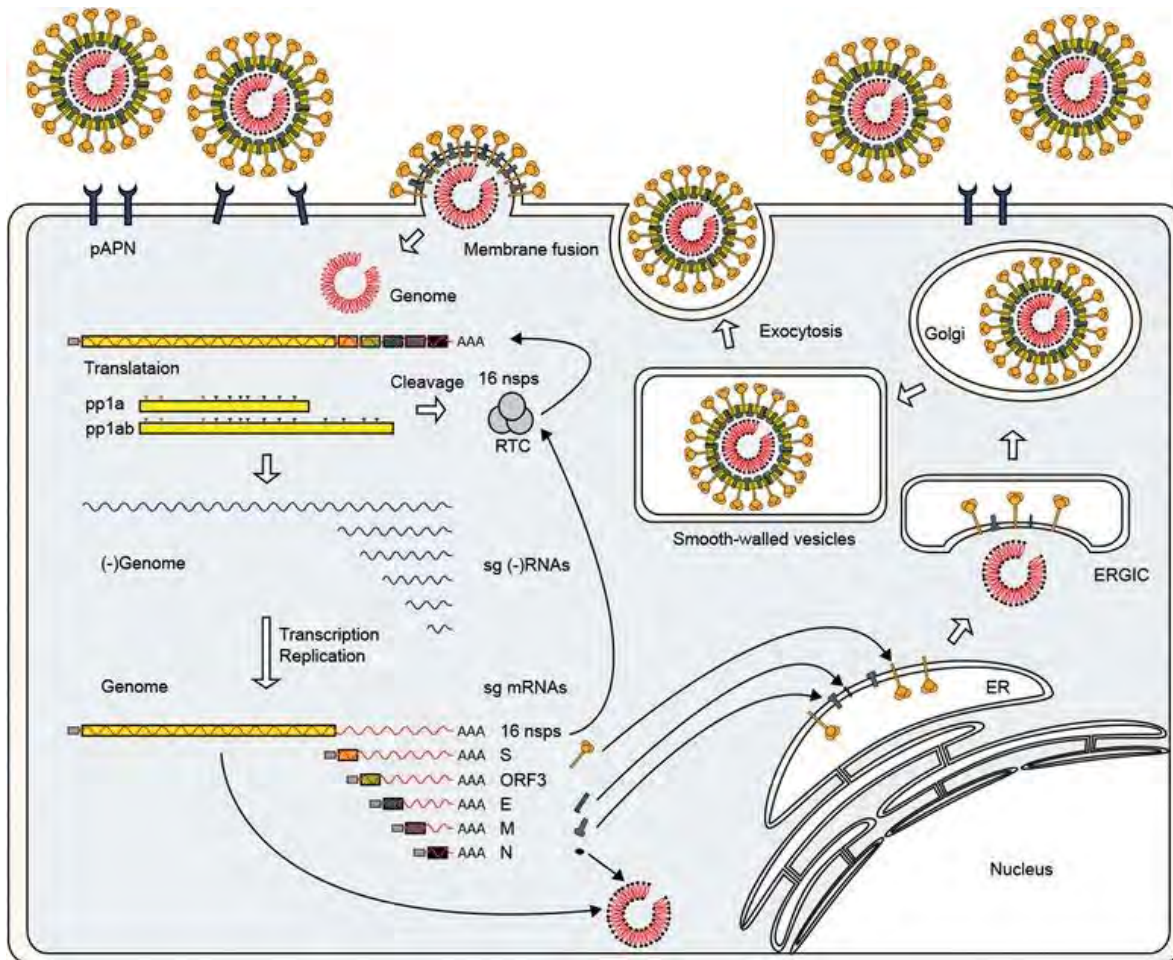


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de replicación del vDEP

2.6.2 Proteína N

2.6.2.1 Características estructurales de la proteína N.

Comparaciones realizadas entre las secuencias de aminoácidos, han demostrado que la proteína N de los Coronavirus (CoV) posee tres dominios distintos y altamente conservados: dos regiones estructurales plegadas independientemente, el dominio N terminal (NTD / dominio 1) y el dominio C-terminal (CTD / dominio 3), que están separados por una región central intrínsecamente desordenada (dominio de unión a ARN / dominio 2); los tres dominios, se ha demostrado en diferentes CoV, sirven para unirse al ARN viral (Chang et, al, 2015). Debido a su alta carga positiva y naturaleza flexible, hay evidencia de la importancia funcional de las regiones intrínsecamente desordenadas en las proteínas para modular la

transcripción, la traducción y las modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y señalización celular (Dyson y Wright, 2005).

El CTD es hidrofóbico, rico en hélices alfa. Este dominio también se denomina dominio de dimerización porque contiene residuos responsables de la autoasociación para formar homodímeros, así como homo-oligómeros a través de un mecanismo de intercambio de dominios. La oligomerización de la proteína N es necesaria para producir una conformación estable porque en su forma monomérica, el CTD se pliega en una conformación extendida con una gran cavidad en su centro, por lo que es inestable. La autoasociación de la proteína N se ha observado en muchos virus y se requiere para la formación de la cápside viral que protege el genoma viral (Surjit et. al, 2004). El fuerte carácter electrostático de los residuos de lisina y arginina cargados positivamente indica que la unión se basa en interacciones entre la proteína con carga positiva y el ácido nucleico con carga negativa. Al mantener los dominios de unión de ARN muy próximos al CTD, es posible la formación de un gran centro de nucleocápside helicoidal (Chen et, al, 2007).

2.6.2.2 Funciones de la nucleocápside.

El papel principal de la proteína N de CoV es empaquetar el genoma viral en complejos largos y flexibles de ribonucleoproteína helicoidal (RNP) llamados nucleocápsides o cápsides. La nucleocápside protege el genoma y garantiza su replicación oportuna y transmisión segura. Durante el ciclo de replicación del virus, múltiples copias de la proteína N interactúan con las moléculas de ARN, lo que indica un papel para la proteína N en la transcripción y traducción del virus (De Haan y Rottier, 2005).

Los viriones de CoV contienen tres proteínas de envoltura, M, E y S, y una nucleocápside viral, que consiste en ARN genómico y proteína N, dentro de la envoltura viral. El ensamblaje de viriones CoV no solo requiere la dimerización de la proteína N de CoV y la asociación con el ARN genómico viral para formar RNPs, sino también las interacciones proteína-proteína entre las cuatro proteínas estructurales, así como una envoltura de membrana del hospedador obtenida del

sitio de gemación. Los CoV adquieren su envoltura lipídica mediante la gemación de la nucleocápside a través del retículo endoplasmático (ER): membranas del compartimiento intermedio de Golgi (ERGIC) (López et. al, 1994).

Se ha propuesto que la formación de un complejo viral replicasa-transcriptasa de iniciación en el extremo 3' del genoma requiere proteína N para unir ARN genómico a la replicasa recién traducida a través de su interacción con la proteína no estructural 3 (nsp3). Teniendo en cuenta que el inicio de la síntesis de cadena negativa es el primer paso tanto en la replicación genómica como en la transcripción, es probable que esta interacción N-nsp3 sea importante en ambos procesos de síntesis de ARN. También se ha propuesto que la proteína N mantiene la transcripción en curso a lo largo de la infección (Hurst et. al, 2010).

Las proteínas chaperonas del ARN ayudan al plegamiento apropiado de los ácidos nucleicos. La actividad de chaperonas se ha postulado como una actividad general de la proteína N de todos los CoV y que esta misma actividad aumenta la síntesis de ARN (Zuniga et. al, 2010).

La desregulación del ciclo celular es una estrategia común adoptada por muchos virus ARN. La proteína N modula el ciclo de la célula hospedadora permitiendo al virus utilizar las materias primas celulares para la replicación de su genoma, el ensamblaje y la gemación de las partículas de la progenie (Surjit et. al, 2006).

La proteína N juega un papel importante en la patogénesis viral. Los coronavirus parecen haber desarrollado mecanismos para inhibir la respuesta inmune innata del hospedador, incluida la respuesta del interferón (IF), un componente principal de la inmunidad innata. La proteína N es uno de los tres antagonistas del interferón β (IF β), siendo ORF3b y ORF6 los otros dos, y la inhibición de la síntesis de IF β por la proteína N se debe a la inhibición de IRF-3 y NF-kB, dos de los factores de transcripción necesarios para la expresión del gen IF (Lu et. al, 2011).

2.7 Estudios realizados con la proteína N del virus de diarrea epidémica porcina.

El virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) es un coronavirus altamente contagioso que causa diarrea grave y muerte, particularmente en lechones recién nacidos. En un estudio, se realizó la caracterización de epítomos en la proteína N del vDEP. Se generaron dos anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos para la proteína N de una cepa vDEP, FJzz1/2011, se confirmó que los residuos 18-133 (designado NEP-D4) y los residuos 252-262 (designado NEP-D6) fueron los epítomos reconocidos por MAbs PN-D4 y PN-D6, respectivamente. El análisis de la secuencia reveló que estos dos epítomos estaban altamente conservados entre las cepas del vDEP, pero eran significativamente diferentes de otros miembros de la subfamilia *Coronavirinae*. El análisis de *Western blot* demostró que podían ser reconocidos específicamente por antisueros del vDEP, pero no podían ser reconocidos por antisueros de vGET. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) confirmaron que no hubo reacción cruzada entre estos dos MAbs y vGET. Estos dos nuevos epítomos y sus MAbs afines podrían servir para el desarrollo de ensayos diagnósticos precisos para la DEP (Wang et. al, 2016).

En otros estudios, se evaluó la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por DEP, en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) basado en la proteína de nucleocápside recombinante (N) generada en *Escherichia coli*. El gen que codifica la proteína N se clonó y se expresó como una proteína de fusión con la etiqueta His. La proteína N recombinante migró a 48 kDa y reaccionó con el anticuerpo monoclonal específico mediante la etiqueta de seis histidinas en el ensayo de inmunotransferencia. El ELISA de proteína N recombinante (rnELISA) mostró especificidad del 98.7% entre (80) cerdos sin exposición al vDEP, y una sensibilidad del 98% entre (103) muestras clínicas con vDEP. Al probar 884 muestras de campo, se generó una concordancia general de 88.3% entre SN y r-nELISA. Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que la proteína de nucleocápside puede ser un antígeno útil para el serodiagnóstico de vDEP y también se sugirió que el ELISA es una prueba altamente sensible y específica para detectar anticuerpos contra vDEP (Hou et. al, 2007).

En otro experimento, el gen N del vDEP se amplificó por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos y se insertó en el vector de expresión pCold-I para construir un plásmido recombinante pCold-I-N. El plásmido recombinante se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) bajo inducción de IPTG. Posteriormente, se inmunizaron ratones hembra BALB/c con la proteína N recombinante purificada y se obtuvo una cepa de células de hibridoma denominadas 2B8 que secretaban anticuerpos monoclonales (MAb) anti-proteína N mediante técnica de hibridoma. El MAb reaccionó específicamente con el vDEP y se identificó mediante ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia indirecta. Este trabajo indicó que el MAb es una herramienta valiosa como reactivo de diagnóstico específico para la vigilancia epidemiológica del vDEP y su diagnóstico (Pan et. al, 2015).

Estudios previos han demostrado que la infección por el vDEP inhibe la síntesis del interferón tipo I (IFN) y la proteasa 2 similar a la papaina viral se ha identificado como un antagonista de IFN. En este estudio, se encontró que la proteína de nucleocápside (N) codificada por vDEP también inhibe la producción de IFN inducida por el virus Sendai, la expresión génica estimulada por IFN y la activación de los factores de transcripción como el factor IFN 3 (IRF3) y NF- κ B. También se encontró que la proteína N impide significativamente la activación del promotor de IFN- β determinada por el gen TBK1 o sus moléculas corriente arriba (RIG-I, MDA5, IPS-1 y TRAF3) pero no contrarresta su activación por IRF3. Un análisis detallado reveló que la proteína N de vDEP se une a TBK1 por interacción directa y que esta unión secuestra la asociación entre TBK1 e IRF3, que a su vez inhibe tanto la activación de IRF3 como la producción de IFN tipo I. se demostró un nuevo mecanismo desarrollado por vDEP para eludir la inmunidad antiviral del hospedador (Ding et. al, 2014).

El vDEP se replica en el citoplasma de las células infectadas, pero su proteína nucleocápside (N) se localiza específicamente en el nucléolo. El mecanismo de translocación nuclear y la asociación de la proteína N con componentes nucleolares particulares, era desconocido. En este estudio, se confirmó que una fosfoproteína (nucleofosmina nucleolar: NPM1) interactúa y co-localiza con la proteína N en el nucléolo. Los estudios de unión *in vitro* indicaron que aa 148-294

de N y aa 118-188 de NPM1 son necesarios para la unión. Curiosamente, la importación de proteína N en el nucléolo es independiente de la capacidad de NPM1 para transportarse entre el núcleo y el citoplasma. Además, la sobreexpresión de NPM1 promueve la replicación del vDEP, mientras que la caída de NPM1 suprime esta actividad. Además, la unión de la proteína N a NPM1 la protege de la degradación proteolítica por caspasa-3, lo que conduce a una mayor supervivencia celular. En este estudio se demostró una interacción específica de la proteína N con la proteína de la célula hospedadora NPM1 en el nucléolo. Los resultados sugieren posibles vínculos entre las estrategias virales para la regulación de las actividades de persistencia celular, posiblemente a través de una interacción de la proteína N con NPM1 que impide su escisión proteolítica y mejora el mantenimiento celular, promoviendo finalmente la replicación de vDEP (Shi et. al, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la limitada disponibilidad, mejora y adaptación de técnicas para el estudio de la diarrea epidémica porcina que permitan conocer algunas características específicas de la enfermedad en México, como la producción de anticuerpos posterior a la infección, la distribución del virus dentro de las células, el tropismo tisular y la seroprevalencia en el territorio nacional, es necesario generar alternativas que ayuden a resolver estas problemáticas. Dentro de las mejores opciones, se encuentran las proteínas recombinantes que han dado resultados importantes en la producción de antígenos y anticuerpos específicos.

4. HIPÓTESIS.

La producción de la proteína N del virus de diarrea epidémica porcina en el sistema de expresión de *E. coli* generará una proteína antigénica capaz de ser reconocida por anticuerpos específicos generados contra cepas circulantes en México, generando una herramienta de diagnóstico útil en el estudio de la enfermedad en el país.

5. OBJETIVO GENERAL.

Generar un sistema de expresión para la proteína N del virus de diarrea epidémica porcina (vDEP) en el sistema de expresión de *E. coli* y emplear la proteína purificada para llevar a cabo estudios serológicos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Recuperar el marco de lectura abierto (ORF) del gen de la proteína N del virus de diarrea epidémica porcina (vDEP) a partir de muestras de animales infectados.
- b) Clonar el gen N en el sistema de expresión pETSUMO.
- c) Generar una cepa de *E. coli* sobreproductora de la proteína N.
- d) Purificar la proteína N recombinante.
- e) Valorar la antigenicidad de la proteína en ensayos de ELISA indirecto y western blot.

f) Determinar la curva de producción de anticuerpos contra la proteína N durante infecciones experimentales en cerdos por periodos prolongados post-infección con el vDEP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Análisis *in silico* de la proteína N.

El ORF de la proteína N de la cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1) fue traducido a su secuencia aminoacídica mediante el programa Editseq de DNASTAR. Posteriormente, mediante el servidor NetNGlyc 1.0-DTU CBS se analizó la presencia de modificaciones postraduccionales para identificar sitios potenciales de glicosilación y su posición. Para determinar la presencia de regiones transmembranales se utilizó el servidor TMHMM v.2.0, con el objetivo de descartar regiones que se intercalaran en las membranas y presentaran resistencia a la solubilización, generando problemas en la recuperación de la proteína.

Algunas propiedades bioquímicas importantes de la proteína N se estimaron mediante el programa Protean para determinar el perfil de hidrofiliidad, el índice de antigenicidad de Jameson Wolf y la probabilidad de superficie de Emini. Mediante Protean se determinó la probabilidad que tiene la proteína N del vDEP cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1) de presentar regiones hidrofóbicas o hidrofílicas, con el método de Jameson-Wolf se identificaron las regiones que presentan determinantes antigénicos potenciales de la estructura de la proteína y por medio del método de Emini se determinó la probabilidad de que la proteína se encuentre en la superficie, quede expuesta y se produzcan epítomos superficiales.

7.2 Distribución de epítomos.

Mediante la herramienta *predicting antigenic peptides* del sitio electrónico <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl> de la Universidad Complutense Madrid, se determinó la distribución de sitios antigénicos de la proteína N del vDEP cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1). Se analizó la distribución de los epítomos con mayor potencial inmunogénico a lo largo de la secuencia de la proteína, las secuencias de los epítomos, incluido el aminoácido de inicio y final.

7.3 Diseño de oligonucleótidos

Empleando el programa Primer select se diseñaron oligonucleótidos para clonar en fase el marco de lectura abierto (ORF) de la proteína N del vDEP proveniente de la cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1), en el vector de expresión pET-SUMO. Los oligonucleótidos fueron analizados para ser de tamaños similares (longitud de pares de bases) entre ellos, un porcentaje de Guanina-Citosina arriba del 40% , temperatura de desnaturalización ($^{\circ}\text{Tm}$) alrededor de 60°C y una $^{\circ}\Delta\text{G}$ mayor -9 Kcal/mol para evitar la formación de dímeros y horquillas, determinando que los oligonucleótidos fueran adecuados para amplificar el producto deseado. Se verificó que los oligonucleótidos alinearan mínimo con un 95% de las secuencias reportadas en el NCBI para la proteína N de vDEP.

Se empleó el sistema de expresión pET SUMO ya que produce una proteína soluble en *E. coli*, utiliza una modificación pequeña de tipo ubiquitina (SUMO), para permitir la expresión, purificación y generación de proteínas nativas en *E. coli*, incrementa la expresión de proteínas recombinantes y aumenta la solubilidad de proteínas parcialmente insolubles.

7.4 Amplificación del ORF del gen N de vDEP

Para la amplificación del ORF del gen N de vDEP, se prepararon los oligonucleótidos a partir del stock para obtener una concentración de 10 pmol/ μl . Se llevó a cabo la PCR a partir de ADNc viral sintetizado previamente, considerando gradientes de 58 , 60 , 62 , 64 , 66 y 68°C , para determinar la temperatura óptima de hibridación. Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% , utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb , esperando obtener un producto de 1328 pb.

Posterior a la electroforesis, se realizó la purificación de ADN a partir de banda mediante el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del

fabricante. Del ADN purificado se realizó electroforesis en gel de agarosa para verificar que la purificación fuera adecuada.

7.5 Clonación en vector de resguardo pJET 1.2/Blunt

Con el objetivo de clonar una única copia del gen de la proteína N y de esta forma evitar problemas con la posterior expresión, debido a la alta tasa de mutación en extractos virales, se procedió a clonar en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt. Este sistema se utiliza para clonar eficientemente los productos de PCR que presentan extremos tanto cohesivos como romos. Los productos de PCR generados con extremos romos se ligan directamente al vector de clonación. Para los productos de PCR con extremos cohesivos, una enzima termoestable agrega una base nitrogenada antes de la ligadura llevándose a cabo la conversión en extremos romos del ADN. Mediante este paso se consiguió dar estabilidad a la secuencia de interés. La ligación del ADN purificado al vector de resguardo pJET se realizó mediante kit de clonación (CloneJET PCR Cloning Kit de Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.6 Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*.

Previo a la transformación de *E. coli* se prepararon placas de agar LB (Luria-Bertani) con antibiótico (ampicilina para pJET y kanamicina para pET-SUMO) y un precultivo de células en caldo LB. El procedimiento para la preparación de células competentes se realizó de la siguiente forma:

- 1) Se tomaron 30 μ l del precultivo de *E. coli* crecido a 37°C toda la noche.
- 2) Se inocularon 25 ml de caldo LB y se dejaron crecer a 37°C en agitación (250 rpm) hasta 0.35 UA (aproximadamente a las 3 horas de crecimiento).
- 3) Se transfirió el caldo a un tubo falcon de 50 ml estéril y se colocaron en hielo por 10 minutos.
- 4) Se centrifugaron a 4100 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 5) Se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida por 1 minuto para eliminar las trazas de cultivo.

- 6) Se resuspendió el pellet en 15 ml de solución $MgCl_2$ -CaCl (80 Mm MgCl, 20 Mm $CaCl_2$ fría).
- 7) Se centrifugó a 4100 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 8) Se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida por 1 minuto para eliminar las trazas de solución.
- 9) Se resuspendió en 1 ml de solución 0.1 M de $CaCl_2$ fría. Se pasó a un tubo de 1.8 ml.

La transformación se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se tomaron 200 μ l de las células competentes y se pasaron a un tubo de 1.8 ml.
- 2) Se adicionó un volumen no mayor a 10 μ l y no más de 50 ng de ADN de transformación y se resuspendió.
- 3) Se colocó en hielo por 10 minutos.
- 4) Posteriormente, fueron colocadas en baño maría a 42°C por 90 segundos.
- 5) Se transfirieron rápidamente en hielo por 1-2 minutos.
- 6) Se adicionaron 800 μ l de caldo LB y se dejaron crecer a 37°C por 45 minutos.
- 7) Se transfirieron 200 μ l del cultivo a una placa de agar con antibiótico. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta evaporar el líquido.
- 8) Se incubaron a 37°C por 12-16 horas.

A partir de las células transformantes se obtuvieron colonias y se colocaron en tubos falcon de 15 ml con caldo LB y antibiótico. Se incubaron en agitación a 37°C toda la noche. Se realizó la extracción de plásmidos mediante el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante y se corrió electroforesis de los productos purificados para verificar que la ligación al vector de resguardo (pJET) o de expresión (pET SUMO) y la transformación se hayan realizado correctamente. Las células Top 10 se utilizaron para resguardar y propagar los plásmidos de interés, mientras que las células BL21 (DE3) para la transformación y expresión de la proteína.

A los plásmidos purificados se les realizó PCR y digestión enzimática para asegurar que el inserto se había ligado en el vector. Los plásmidos que

presentaban las características de interés fueron seleccionados, amplificados por PCR y purificados.

7.7 Subclonación en vector de expresión pET SUMO.

El ADN purificado de la clonación en pJET fue utilizado para realizar la ligación del al vector de expresión pET SUMO mediante kit de clonación (Champion PET SUMO Protein Expression System, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se realizó una PCR utilizando el oligonucleótido reverso del vector (R-T7) y el delantero del gen N (D-NDEP) para verificar que el inserto de la proteína N se encontrara ligado en el sentido correcto en el vector pET SUMO y que fuera funcional para la expresión en células BL-21.

7.8 Secuenciación.

Para confirmar la clonación correcta del gen N del vDEP en el vector de expresión pET SUMO, se secuenció uno de los plásmidos por el método de Sanger, para conocer la secuencia de nucleótidos del inserto de la proteína.

7.9 Inducción de la expresión de la proteína N.

La inducción de la expresión de la proteína N se realizó con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), que es un análogo no hidrolizable de la lactosa, disparándose la transcripción del operón de expresión *lac*. El átomo de azufre (S) en el IPTG crea un enlace covalente no hidrolizable por la bacteria, lo que evita que el IPTG sea degradado progresivamente tras su adición y mantiene así su concentración constante en el medio.

Los pasos para la inducción fueron los siguientes:

- a) Se prepararon placas de agar LB con Kanamicina y se colocó un precultivo de la cepa de expresión BL-21 (DE3) en caldo LB.
- b) Se preparó un cultivo de células competentes a partir del precultivo.

- c) Se realizó la transformación de células BL21 con los plásmidos seleccionados que tenían la orientación correcta del inserto. Se pusieron a crecer en las placas de agar.
- d) A partir de las transformantes se obtuvieron tres colonias de cada caja y se colocaron en tubos falcon de 15 ml con caldo LB y kanamicina. Se incubaron los nueve precultivos a 37°C toda la noche.
- e) A partir de los precultivos se prepararon cultivos en medio LB y se incubaron hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 a 600 nm.
- f) Se indujo la expresión de los cultivos con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 2 mM durante 16 horas.
- g) Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de los paquetes celulares para verificar que las clonas habían sobreexpresado la proteína. Se utilizó un marcador de peso molecular para proteínas (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder/Invitrogen).

7.10 Análisis de la expresión de la proteína N por PAGE-SDS y Western blot.

El análisis de la expresión de la proteína N se realizó mediante *Western blot* con el objetivo de identificar específicamente la proteína N en los extractos celulares. La técnica consistió en tres etapas: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido y finalmente, visualización mediante inmunodetección de proteínas con el uso de anticuerpos. La técnica se desarrolló de la siguiente manera:

1. Las muestras de proteína N se mezclaron con buffer reductor 1X: 1 µl de buffer por cada 3 µl de proteína y se pusieron a hervir por 10 minutos.
2. Se cargaron las muestras de la proteína N (en condiciones reductoras) en geles de PAGE-SDS y se corrió electroforesis.
3. Se cortó la membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) al tamaño del gel y se marcó la parte por donde se transfiere.
4. Se sumergió la membrana en metanol por 30 segundos. Se lavó en agitación constante con agua Milli Q por 5 minutos.
5. Se lavó el gel y la membrana en buffer de transferencia frío en agitación por 10 minutos.

6. Se humedeció por capilaridad 2 piezas de papel filtro en buffer de transferencia frío.
7. Se colocó en el equipo para Western blot 1 pieza de papel filtro sin presencia de burbujas.
8. Se colocó la membrana sobre el papel filtro. Se puso el gel de poliacrilamida sobre la membrana sin que quedaran burbujas.
9. Se colocó otro papel filtro sobre el gel eliminando las burbujas.
10. Se cerró el equipo y se programaron las siguientes condiciones de transferencia: a) límite de amperaje=0.5, b) voltaje=24 volts, c) tiempo=50 minutos.
11. Al finalizar la transferencia, se lavó la membrana con agua Milli-Q en agitación por 10 minutos.
12. Se lavó la membrana en TBS-Tween (mezcla de buffer fosfato salino con tris y Tween 20) por 10 minutos.
13. Se colocó la membrana en rojo de ponceau por 3 minutos para visualizar las proteínas. Se lavó con agua Milli Q para desteñir.
14. Se puso la membrana en solución TBS-Tween+5% de leche descremada toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó con agua Milli-Q.
15. Se colocó el anticuerpo contra la etiqueta de histidinas de la proteína (anticuerpo primario anti-histidinas producido en ratón): 1 µl en 10 ml de TBS-Tween con 5% de leche descremada y se incubó la membrana por 2 horas en agitación.
16. Se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween por periodos de 10 minutos.
17. Se colocó el anticuerpo secundario (anti-anticuerpos de ratón): 1 µl de anticuerpo en 10 ml de TBS-Tween con 5% de leche descremada y se incubó la membrana por dos horas en agitación.
18. Se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween por periodos de 10 minutos.
19. Se preparó solución de revelado: 10 mL PBS + 12 mg DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate) + 300µl peróxido de hidrógeno.
20. Se adicionó la solución de revelado directamente en la membrana hasta observar el color marrón que indica la reacción.

21. Se agregó agua Milli-Q directamente en la membrana para detener la reacción.

7.11 Extracción de fragmentos proteicos y purificación de la proteína N recombinante.

Se realizó la extracción los fragmentos proteicos mediante el rompimiento de células con un homogenizador GAULIN (8,000 PSI/15 min). Luego se hizo un lavado con urea 8 M en solución Tris-HCl 50 mM y se llevó a cabo la solubilización en sarcosyl al 10%.

La purificación de la proteína N se llevó a cabo por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) utilizando una resina de níquel (HiTrap™ IMAC HP/GE Healthcare) en un equipo AKTA prime plus. El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se manejaron las siguientes condiciones: a) volumen de trabajo: 5 ml de resina, b) flujo de trabajo: 1 ml/minuto, c) presión=0.5 pascales. Las etapas realizadas fueron las siguientes:

1. Se lavó la resina, utilizando agua Milli Q, EDTA 0.2 M, y NaOH 0.5 M
2. Se activó la resina con NiCl 0.2 M.
3. Se cargó la muestra de la proteína N (cuerpos de inclusión solubles).
4. Se colocó buffer de lavado (solución de Tris-Hcl 50 mM con 30 mM de imidazol).
5. Se colocó buffer de elución (solución de Tris-Hcl a 50 mM + imidazol a 500 Mm) para obtener las fracciones de proteína recombinante.
6. Se dializó la proteína N purificada en una membrana tubular de celulosa (Spectra/Por® molecularporous membrane tubing/ Spectrum Labs, Inc). Se colocó en agitación (30 rpm) en 1 litro de solución de Tris 5mM y en refrigeración (4°C). La solución de Tris se cambió 3 veces con intervalos de una hora.

Después de la diálisis, se corrió electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y western blot para identificar específicamente la proteína recombinante N de vDEP ya purificada. Se determinó la concentración de proteína obtenida por el método de Bradford.

7.12 Análisis de muestras serológicas.

Para comprobar la capacidad antigénica de la rN-vDEP se analizó la respuesta humoral (IgG e IgM) durante la infección con el vDEP con un ELISA indirecto. Las muestras de sueros utilizadas, fueron obtenidas de un estudio previo en el que se realizaron muestreos sanguíneos, semanales y quincenales, durante 21 semanas post infección (spi), a dos grupos de cerdos mantenidos bajo condiciones de aislamiento. El grupo 1 fue constituido por nueve cerdos de seis semanas de edad sin inmunidad previa (G1-SI), el grupo 2 consistió en nueve cerdos con inmunidad previa (G2-CI). Ambos grupos fueron infectados de forma experimental con la cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1), a las seis semanas de edad. Mediante el mismo procedimiento se analizaron las proteínas recombinantes S y M del vDEP, obtenidas en estudios previos.

7.13 Ensayo inmunoenzimático recombinante indirecto (ELISA indirecto).

Para determinar la curva de producción de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína N recombinante, así como para las proteínas S y M recombinantes, durante infecciones experimentales en cerdos por periodos prolongados post-infección con el vDEP se desarrolló la técnica de ELISA indirecto. Los pasos para la realización de la técnica se explican a continuación:

1. Se sensibilizó una microplaca de 96 pozos con 100 ng de proteína recombinante (N, S o M) por pozo en un volumen de 100 μ l. La proteína se mezcló con buffer de carbonatos 0.05M (pH 9.6) y agua Milli Q.
2. Se mantuvo la microplaca a 4° C durante 16-18 horas.
3. Se lavó 3 veces con 250 μ l de PBS + Tween (0.05%) por pozo.
4. Se bloqueó con 100 μ l de leche al 5% (20 ml de PBS+Tween al 0.05% y 1 gr de leche) por pozo.
5. Se incubó la microplaca por 2 horas a 37° C.
6. Se lavó 3 veces con 250 μ l de PBS + Tween (0.05%) por pozo.
7. Se colocó el suero problema diluido 1:100.
8. Se incubó la microplaca 1 hora a 37° C.
9. Se lavó 3 veces con 250 μ l de PBS + Tween (0.05%) por pozo.

10. Se diluyó el anticuerpo+HRP secundario (anti IgG o anti IgM de cerdo) 1:7500 en leche con PBS+Tween (0.05%). Se agregó 100 µl de la mezcla a cada pozo.
11. Se incubó la microplaca 1 hora a 37° C.
12. Se lavó 3 veces con 250 µl de PBS + Tween (0.05%) por pozo.
13. Se agregaron 100 µl de solución de revelado a cada pozo.
14. Se colocó la microplaca en la oscuridad hasta observar la coloración azul (10 minutos).
15. Se detuvo la reacción agregando 100 µl de ácido sulfúrico 2M a cada pozo.
16. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 450 nm.

7.14 Western blot de muestras serológicas.

Para confirmar la producción específica de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes N, S y M del vDEP se probaron los sueros por *western blot* (cuatro muestras por cada 3 semanas pos infección). Los pasos para el desarrollo de la técnica fueron explicados previamente en el punto **7.10**, excepto los pasos número doce, catorce y dieciséis que se describen a continuación:

12. Se colocó la membrana en rojo de ponceau por 3 minutos para visualizar las proteínas. Se lavó con agua Milli Q para desteñir y se cortó la membrana por carriles individuales.
14. Se colocó cada muestra de suero diluido 1:100 en TBS-Tween con 5% de leche descremada con su respectiva membrana y se incubaron por 2 horas en agitación.
16. Se colocó el anticuerpo secundario (anti-anti IgG de cerdo): 1:10000 µl en TBS-Tween con 5% de leche descremada y se incubaron las membranas por dos horas en agitación.

Se utilizó un marcador de peso molecular para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder/Thermo Scientific™)

8. RESULTADOS

8.1 Análisis *in silico* de la proteína N.

8.1.1 Sitios potenciales de glicosilación.

Al analizar la presencia de modificaciones postraduccionales, se observó que la proteína N de vDEP posee siete sitios potenciales de glicosilación, que se ubican en las posiciones 123, 157, 169, 198, 202, 208 y 264 (Figura 2).

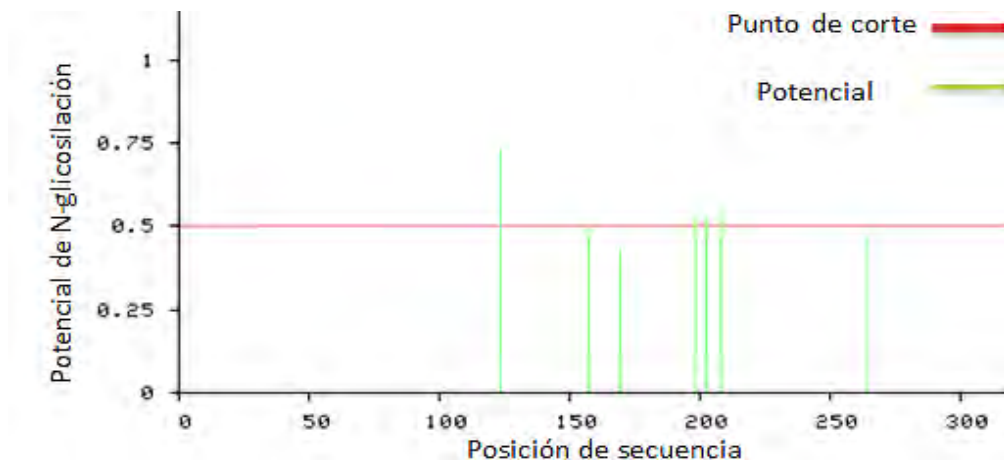


Figura 2. Sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína N. (---) Punto de corte para presencia de N-glicosilación (---), sitio potencial de glicosilación en la secuencia aminoacídica.

Como se observa en la figura anterior, el potencial de N-glicosilación (líneas verdes verticales) de tres sitios no sobrepasa el punto de corte (línea roja horizontal), tres sobrepasan ligeramente y solamente un sitio de glicosilación presenta un potencial de glicosilación arriba de 0.5. Se consideró que la proteína N del vDEP cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1) no es glicosilada. Esta proteína se puede expresar en *E. coli*, ya que esta bacteria no lleva a cabo modificaciones como la glicosilación.

8.1.2 Regiones hidrofóbicas.

Se determinó que la proteína N del vDEP cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank: KY828999.1) no presenta sitios transmembranales (Figura 3).

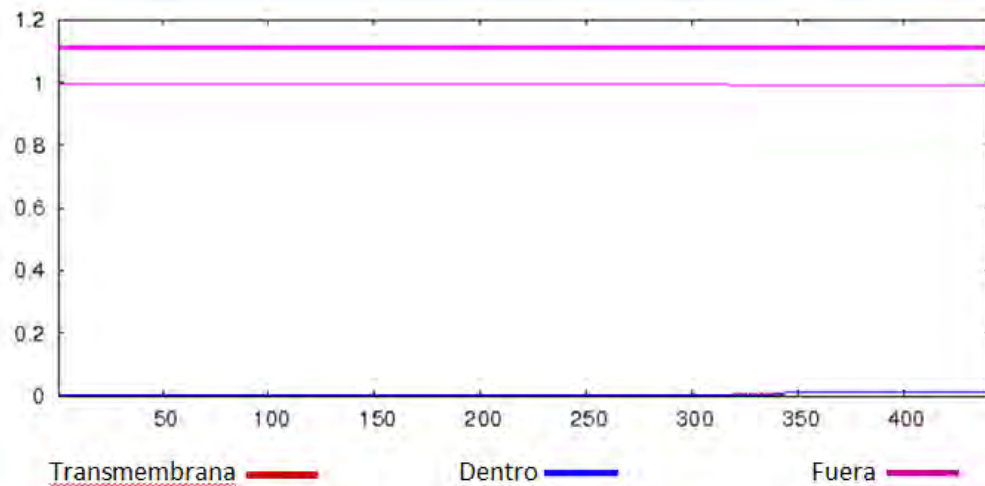


Figura 3. Regiones transmembranales de la proteína N del vDEP (Cepa Michoacán/2013).
 (---) Sitios transmembrana. (---) Sitios dentro de la membrana. (---) Sitios fuera de la membrana.

En la gráfica anterior se presenta una sola región de la proteína que tiene una probabilidad muy baja de estar dentro de la membrana (línea color azul), mientras que la mayor parte de la proteína tiene probabilidad muy alta de estar fuera de la membrana (línea color violeta). No se observan sitios transmembranales (línea roja). Como no hay regiones hidrofóbicas se determinó que se puede expresar la proteína completa en *E. coli*

8.1.3 Hidrofilicidad, índice antigénico e índice de superficie.

Se analizaron las principales propiedades bioquímicas de la proteína N del vDEP.

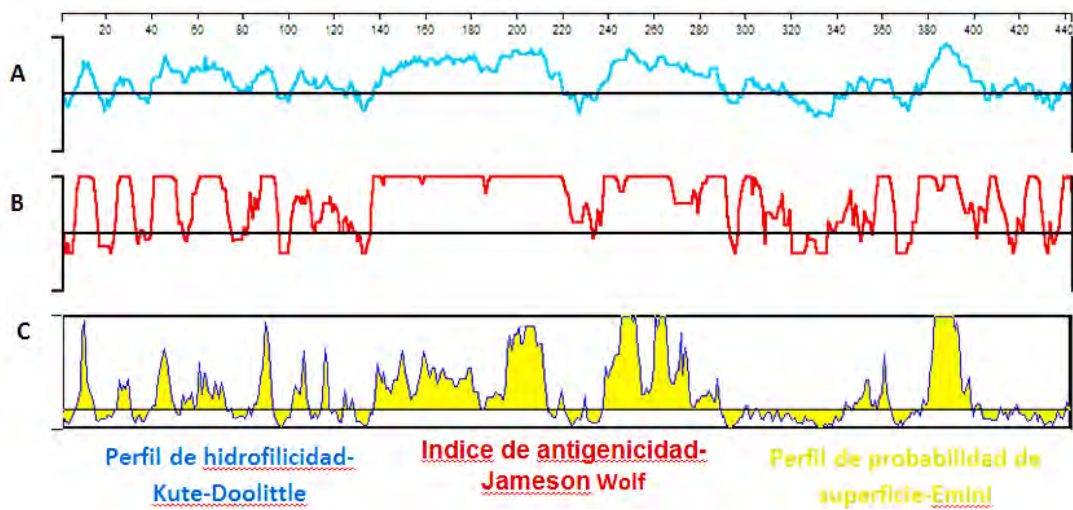


Figura 4. Perfil de hidrofiliicidad-Kute-Doolittle (A), índice de antigenicidad-Jameson Wolf (B) y Perfil de probabilidad de superficie-Emini (C) de la Proteína N del vDEP (Cepa Michoacán/2013).

En la figura 4A, la proteína N del vDEP se presenta con baja probabilidad de expresar regiones hidrofóbicas y que la mayor parte de la proteína resida en la superficie externa presentando regiones hidrofílicas. Las superficies hidrofílicas están relacionadas con menos cambios conformacionales de las proteínas unidas. La hidrofiliidad aumentada puede soportar la cascada de eventos celulares involucrada en la unión, migración y diferenciación tisular específica de las células. Mediante el método de Jameson-Wolf se identificaron los determinantes antigénicos potenciales de la estructura de la proteína. Los resultados aparecen como picos múltiples en la gráfica del índice antigénico (figura 4B), con cada pico significando un determinante antigénico potencial. Por medio del método de Emini se determinó la probabilidad de que la proteína se encuentre en la superficie, quede expuesta y la probabilidad de que se produzcan epítopes superficiales (figura 4C).

8.2 Distribución de epítopes.

La distribución de sitios antigénicos de la proteína N del vDEP se muestra en las Figuras 5 y 6.

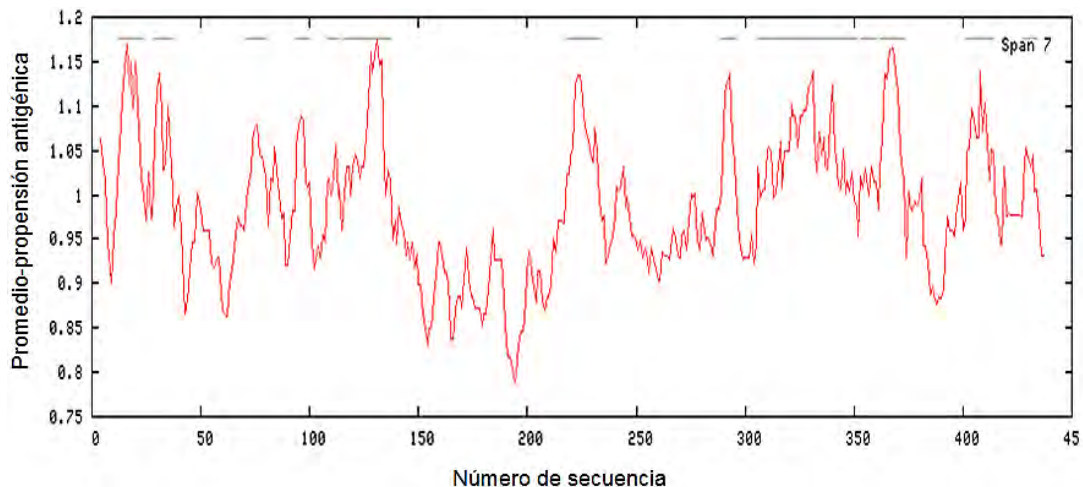


Figura 5. Distribución de epítopes de la proteína N del vDEP (Cepa Michoacán/2013).

	Inicio	Secuencia	Final
1	12	KRVPLSLYAPLRV	24
2	29	PLSKVLANN	37
3	71	SNWHFYLLGT	80
4	94	GVFWVAK	100
5	108	TNLGVRK	114
6	116	SEKPIIPNFSQQLPSVVEIVEP	137
7	218	SRDDLVAVKDALKSL	233
8	289	NSVAACFG	296
9	306	DAEFVEKGV D A S G Y A Q I A S L A P N V A A L L F G G N V A V R E L A D S Y E I T Y	351
10	353	YKMTVPKS	360
11	362	PNVELLSQVDA	373
12	402	IYDDVGVPSDVTH	414
13	428	TAVEIIN	434

Figura 6. Secuencias de los epítopes de la proteína N del vDEP (Cepa Michoacán/2013).

En la parte superior de la gráfica (Figura 5) se puede observar la distribución de los 13 epítopes con mayor potencial inmunogénico (líneas horizontales color gris) a lo largo de la secuencia de la proteína. En el cuadro de la Figura 6 se muestran las secuencias de los 13 epítopes inmunogénicos potenciales de la proteína, así como el aminoácido del inicio y del final de cada epítope.

8.3 Diseño de oligonucleótidos.

Como se muestra en la Figura 7A, al realizar el análisis de los oligonucleótidos se determinó que el reverso contiene dos terminadores (TAG) para asegurar que la transcripción se detenga, se agregaron una G y una C al final del terminador para obtener el % de GC deseado, lo cual no desfasa el ORF de la proteína al entrar al vector de expresión. Por otro lado, la $^{\circ}\Delta G$ resultante para la formación de dímeros fue mayor a -9 Kcal/mol, determinando que estas estructuras no se llegarán a formar, por lo que son adecuados para su uso en PCR. Con una $^{\circ}\Delta G$ resultante mayor a -9 kcal/mol, la formación de horquillas no se dará, haciendo a los oligonucleótidos adecuados para amplificar el producto deseado. Los oligonucleótidos presentaron tamaños similares (longitud de pares de bases) entre ellos, $^{\circ}T_M$ muy similares de alrededor de $60^{\circ}C$ y su porcentaje de GC está arriba del 40% (Figura 7A). Alinean al 100% con más de 100 de las secuencias reportadas en el NCBI para la proteína N de vDEP. Una vez clonado en el vector

Como se muestra en la Figura 8, para cada ADNc se consideraron seis gradientes de temperatura, para determinar en cual se alineaban los oligonucleótidos. Se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y un control negativo (C-). Al realizar la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, no se obtuvieron productos del ADNc identificado como cDNA-1, del ADNc-3 se obtuvieron productos con bandas muy tenues y para el ADNc-2 se obtuvieron productos de 1328 pb con bandas fuertes, determinando que la temperatura a la cual se alinean los oligonucleótidos de manera óptima era a 62 °C. El producto purificado de ADN a partir de banda se corrió en gel de agarosa para verificar que la purificación fuera adecuada. Como se aprecia en la Figura 9, se obtuvo el producto esperado de 1328 pb. Se utilizó un marcador de 1 kb.

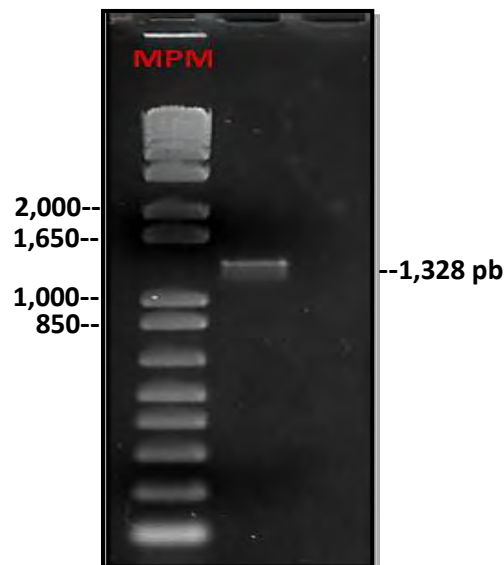


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de purificado de ADN.

8.5 Clonación en vector de resguardo pJET.

Mediante la ligación del ADN purificado al vector de resguardo pJET y la transformación de células TOP10 se obtuvieron varias colonias transformantes (Figura 10) en los cultivos. En el testigo negativo no hubo crecimiento de colonias, en el testigo positivo creció una gran cantidad de colonias.

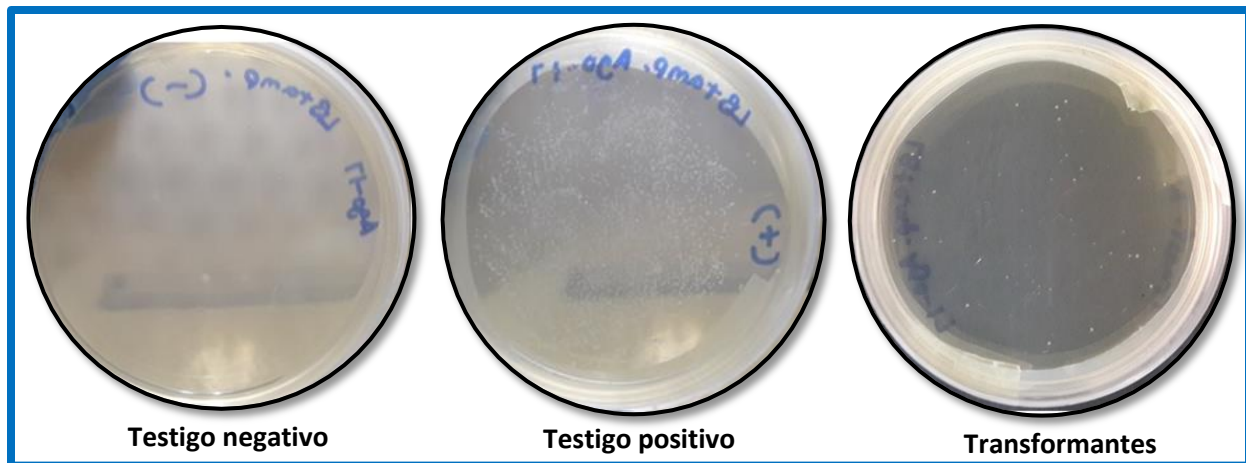


Figura 10. Transformación y cultivo de células Top 10.

A partir de las transformantes se obtuvieron seis colonias, se incubaron y se realizó extracción. Se corrió electroforesis en gel de agarosa para verificar que las extracciones de los seis plásmidos fueron correctas. En la Figura 11 se observa la electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática y PCR de los seis plásmidos (1-6). Las enzimas utilizadas EcoRI y Xho1 liberan un fragmento de 864 pb que podemos apreciar para los plásmidos 2, 3 y 6, mientras que en la PCR se obtuvo el producto esperado de 1328 pb.

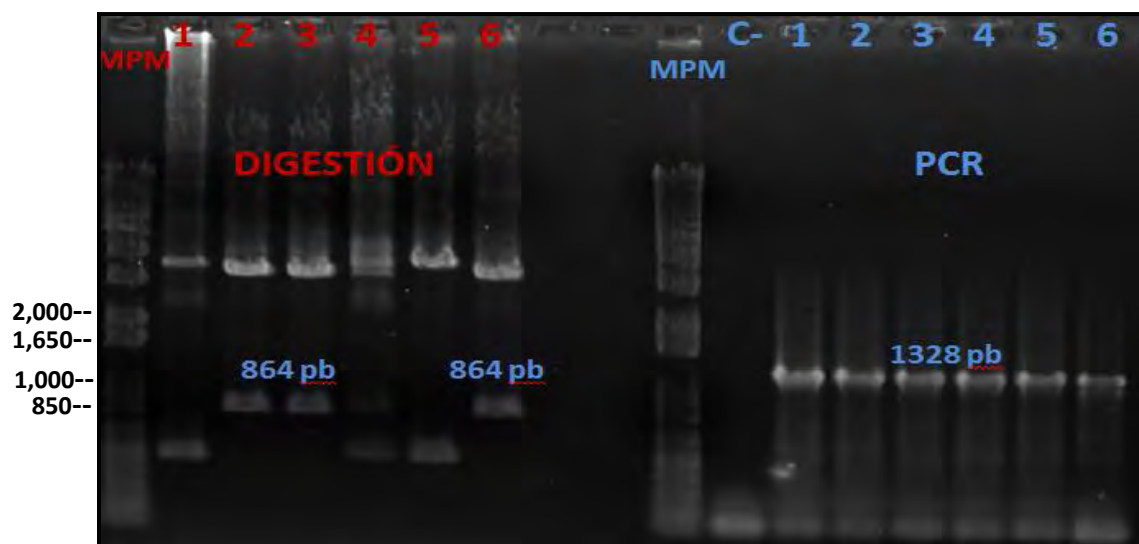


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de digestión enzimática y PCR de plásmidos.

De los resultados obtenidos en el paso previo, se seleccionó el plásmido número 2. En la Figura 12 se muestra la electroforesis en gel de agarosa del plásmido amplificado por PCR y purificado para asegurar que ambos procesos se habían realizado correctamente. En el gel se cargaron 5 y 10 μl por pozo del purificado. Se utilizó un marcador de 1 kb. El producto obtenido fue de 1328 pb como se esperaba.

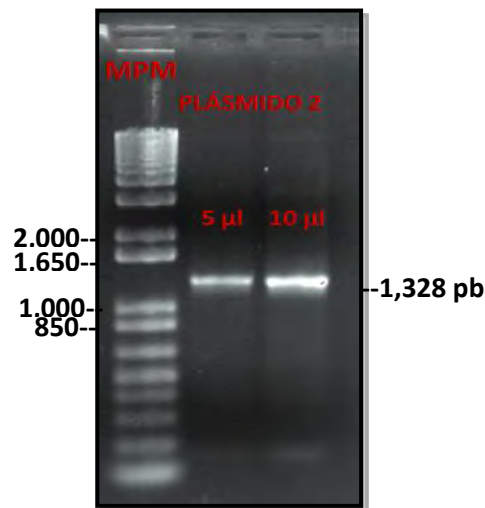


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de plásmido amplificado por PCR y purificado.

8.6 Subclonación en pET SUMO

Mediante la ligación del ADN purificado de la clonación en pJET al vector de expresión pET-SUMO y la transformación de células TOP10 se obtuvieron dos colonias transformantes (Figura 13) en los cultivos. Este paso se repitió obteniendo tres colonias más. En el testigo negativo no hubo crecimiento de colonias, en el positivo creció una gran cantidad de colonias.

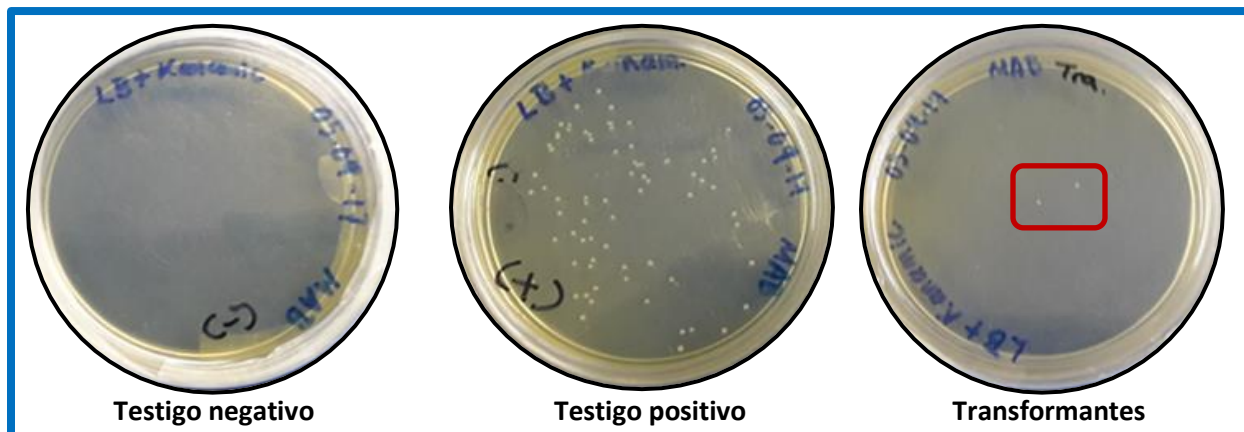


Figura 13. Transformación y cultivo de células Top 10.

A partir de las transformantes se colectaron las cinco colonias, se incubaron y se realizó la extracción de plásmidos. Se corrió electroforesis en gel de agarosa para verificar la extracción y purificación adecuada de los cinco plásmidos.

En las Figuras 14 y 15B se observa la electroforesis en gel de agarosa de la PCR y digestión enzimática de los cinco plásmidos purificados (1-5), respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb. En la PCR se obtuvo el producto esperado de 1328 pb para los plásmidos 3, 4 y 5. La enzima utilizada EcoRI liberó un fragmento de 864 pb que se puede apreciar para los plásmidos 3, 4 y 5. El sitio de corte de la enzima se muestra en la figura 15A que corresponde con el producto obtenido de la digestión. Estos resultados indican que el gen de la proteína N de vDEP se ligó en el vector de expresión pET-SUMO.

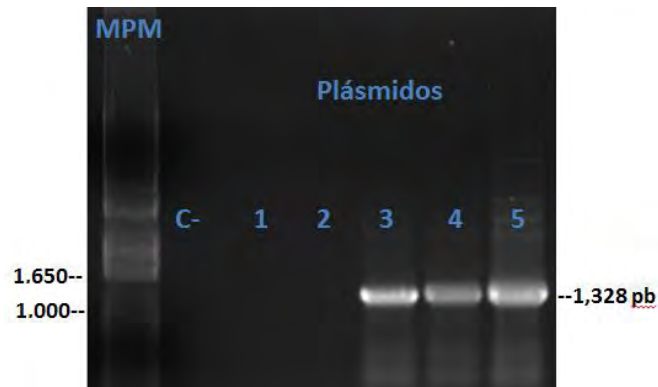


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de plásmidos purificados.

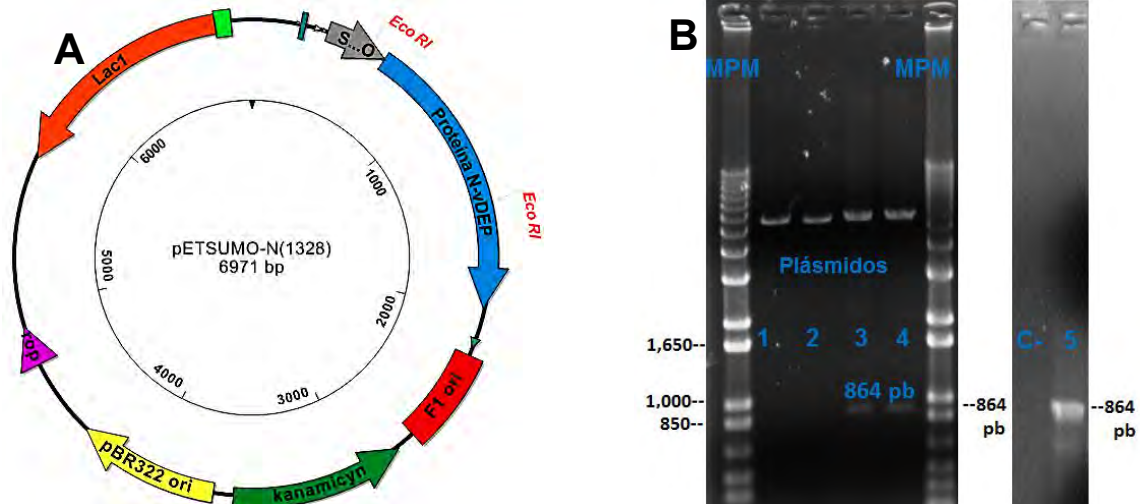


Figura 15. Digestión enzimática (EcoRI) y electroforesis en gel de agarosa de plásmidos purificados.

Se determinó que en los plásmidos 3, 4 y 5 el gen de la proteína N se ligó en el sentido correcto en el vector pET SUMO al obtener el producto esperado de 1328 pb (Figura 16). Para los plásmidos 1 y 2 la ligación no fue adecuada.

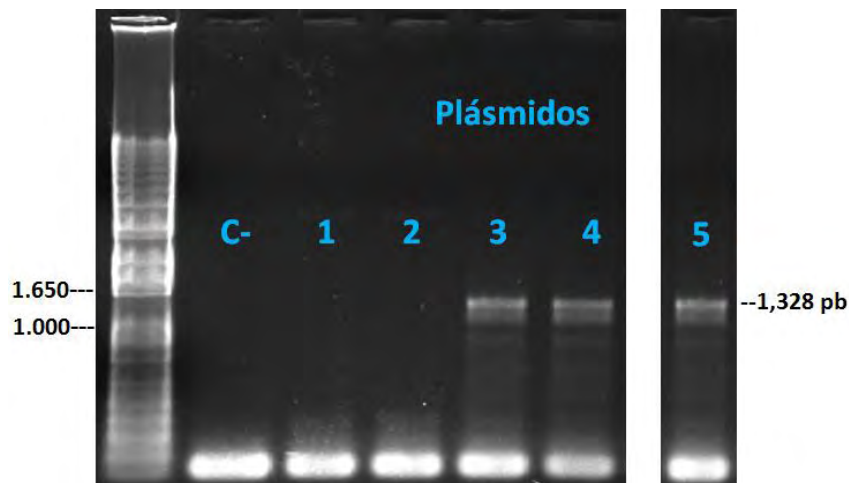


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos para verificar orientación correcta del inserto en el vector pET SUMO.

8.7 Secuenciación.

Los resultados de secuenciación muestran que la clonación fue correcta. Mediante las secuencias obtenidas en los electroferogramas se realizó un BLAST de nucleótidos y se determinó que el gen N del vDEP clonado en el vector de expresión pET SUMO presenta un 99% de identidad con todas las cepas reportadas en el NCBI. Las secuencias de los dos iniciadores abarcan prácticamente todo el inserto de la proteína N (Figura 17).

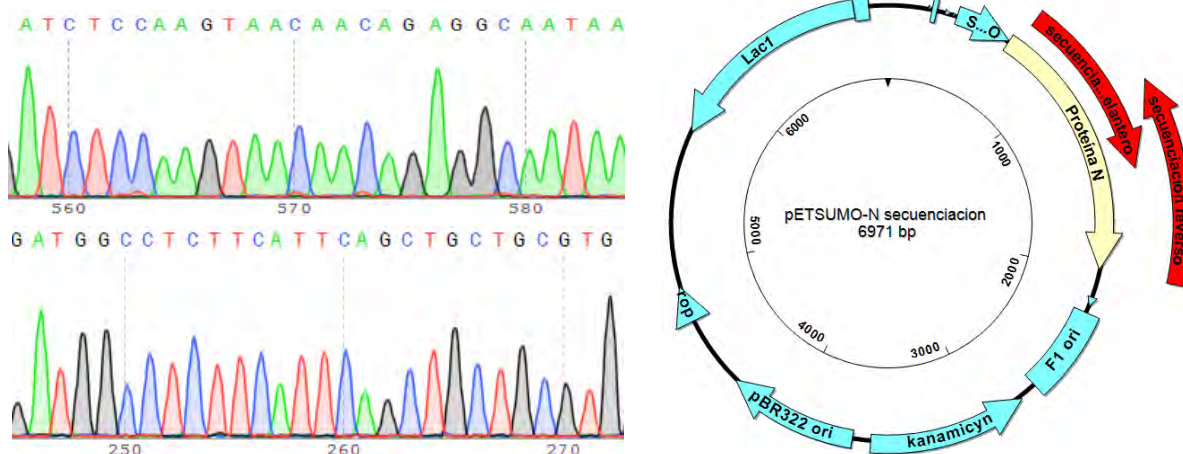


Figura 17. Secuenciación del gen N del vDEP clonado en el vector de expresión pET SUMO.

8.8 Inducción de la expresión de la proteína N.

Mediante la transformación y cultivo de células BL-21 con los plásmidos 3, 4 y 5 que tenían la orientación correcta del inserto se obtuvieron varias colonias de cada plásmido (Figura 18). En el testigo negativo no hubo crecimiento de colonias.

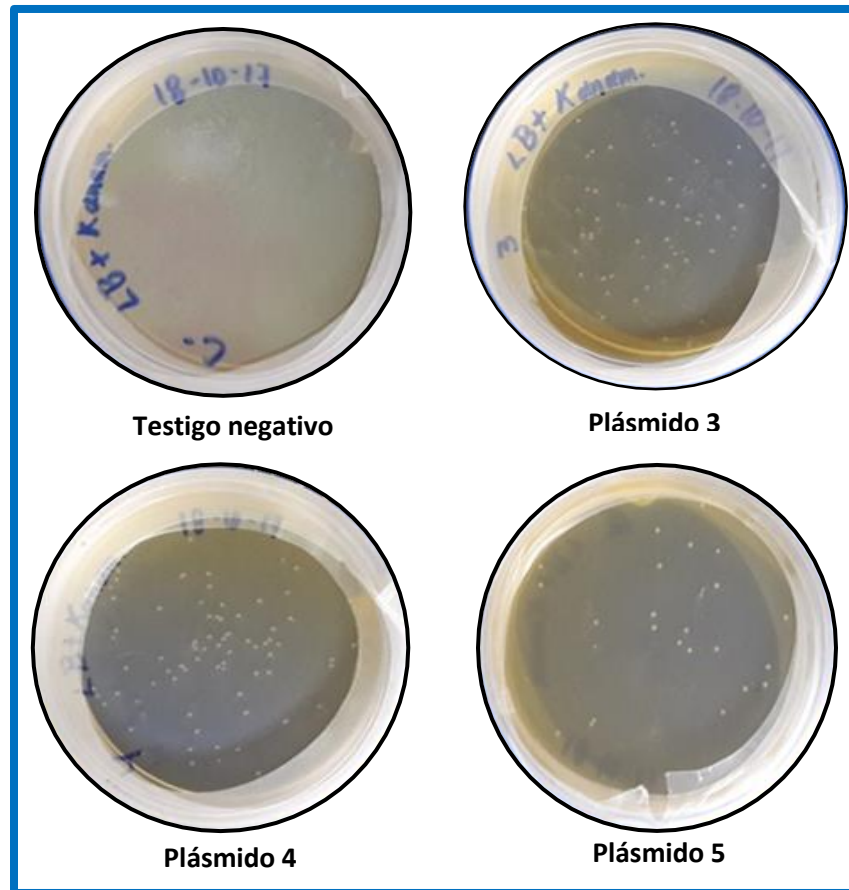


Figura 18. Transformación y cultivo de células BL-21.

8.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se determinó que todas las clonas sobreexpresaron la proteína N con un peso de 70 kDa (Figuras 19 y 20). La clona número 9 fue la que sobreexpresó mayor cantidad de proteína.

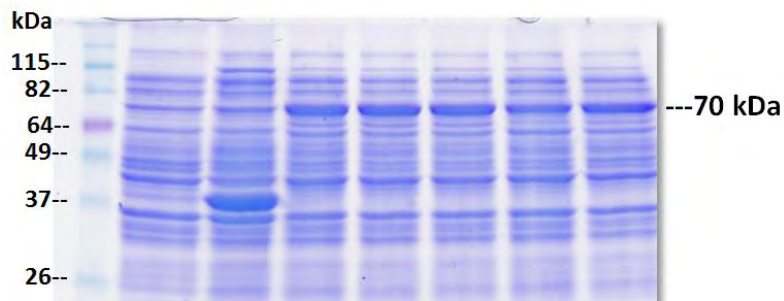


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: testigo negativo, Carril 3: testigo positivo, Carriles 4-8: clonas 1 a 5.

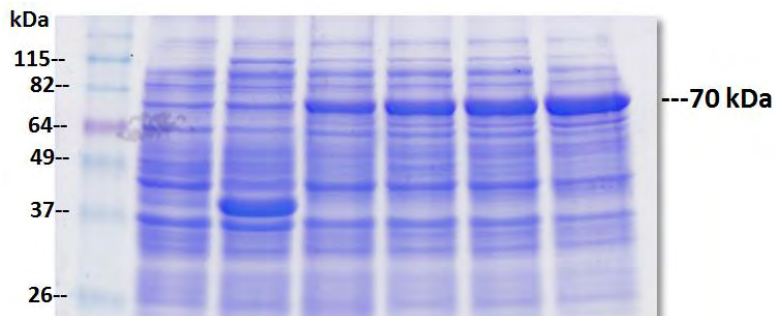


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: testigo negativo, Carril 3: testigo positivo, Carriles 4-7: clonas 6 a 9.

8.10 *Western blot.*

Mediante la técnica de *Western blot* se identificó específicamente la etiqueta de histidinas contenida en la proteína recombinante N del vDEP obtenida en los extractos celulares con un peso de 70 kDa (Figuras 21 y 22). Se determinó que la clona más eficiente fue la numero 9.

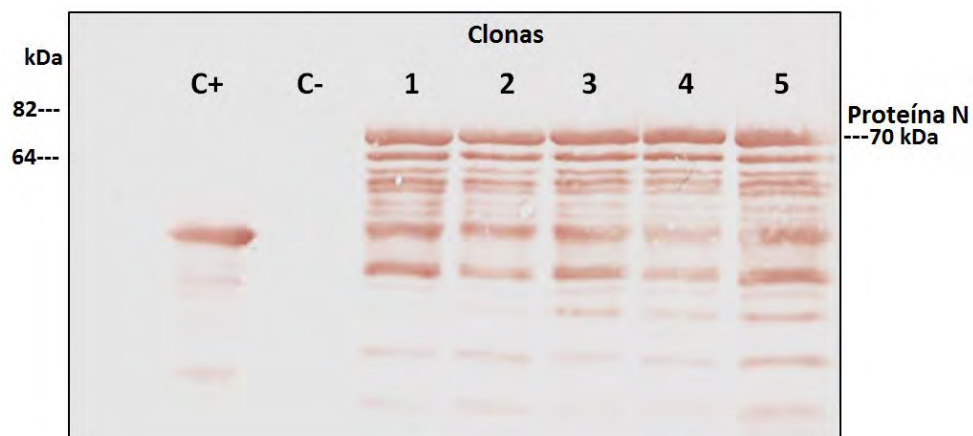


Figura 21. Transferencia e identificación específica de la etiqueta de histidinas contenida en la proteína recombinante N no purificada de vDEP en membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Clonas 1 a 5.

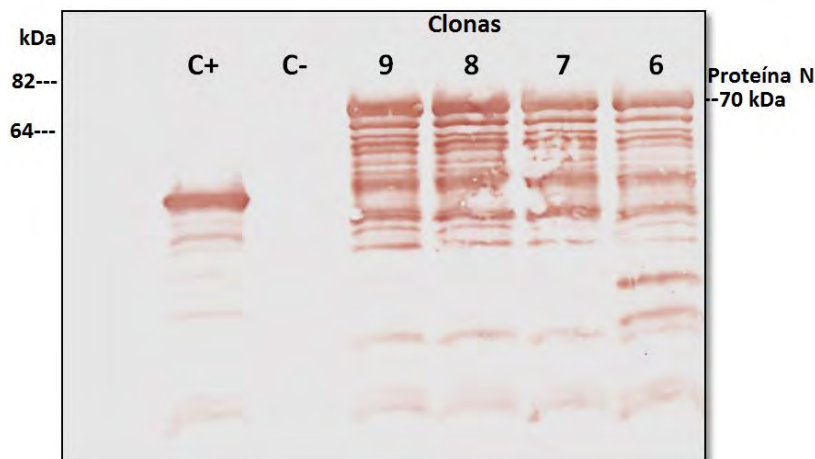


Figura 22. Transferencia e identificación específica de la etiqueta de histidinas contenida en la proteína recombinante N no purificada de vDEP en membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Clonas 9, 8, 7 y 6.

8.11 Purificación de la proteína N recombinante.

Se identificó específicamente la etiqueta de histidinas contenida en la proteína recombinante N del vDEP obtenida de la purificación por IMAC, con un peso de 70 kDa (Figura 23). La concentración determinada fue de 20.8 $\mu\text{g/ml}$

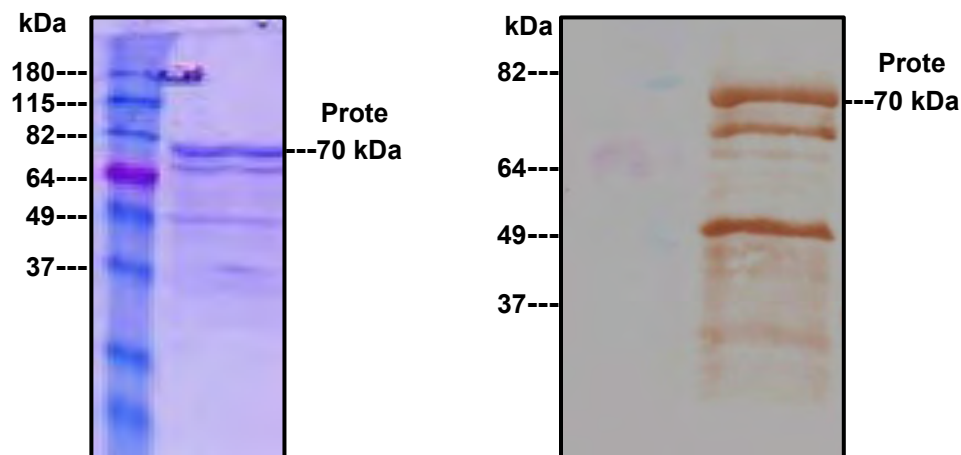


Figura 23. Transferencia e identificación específica de la etiqueta de histidinas contenida en la proteína recombinante N de vDEP purificada en membrana de PVDF.

8.12 ELISA indirecto.

Por medio de ensayos ELISA indirectos basados en las proteínas recombinantes N, S y M del vDEP se determinó la curva de producción de anticuerpos IgG e IgM. Se analizaron en total 234 sueros mediante el ELISA indirecto.

a) **Proteína N:** Se detectaron anticuerpos **IgG** desde la primera semana y hasta las 21 semanas post infección (pi) en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la primera semana pi y una ligera tendencia a incrementar hasta la semana 21 pi. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 11 pi en el G1-SI y en la semana 21 pi en el G2-CI (Figuras 24 y 25).

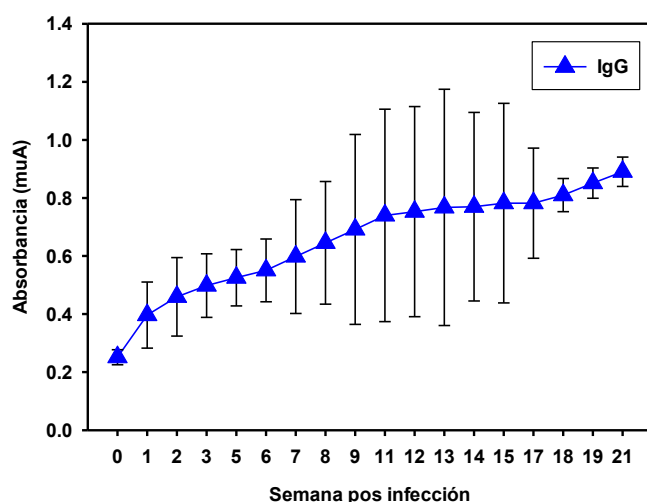


Figura 24. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **N** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

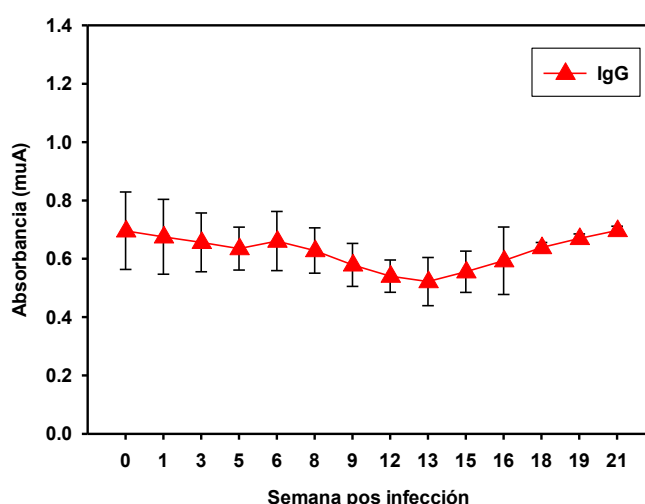


Figura 25. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **N** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

Se detectaron anticuerpos **IgM** desde la primera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a incrementar a través del tiempo. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 9 pi, en el G1-SI y en la semana 16 pi en el G2-CI (Figuras 26 y 27).

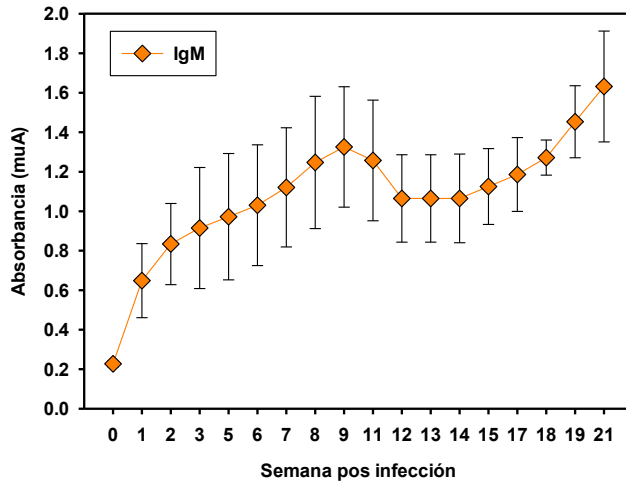


Figura 26. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **N** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

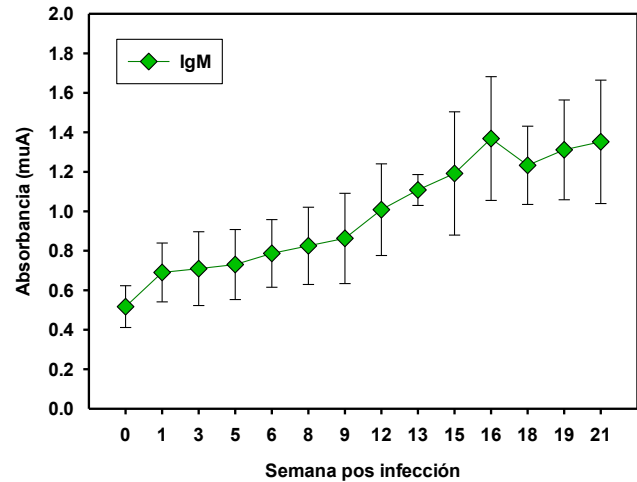


Figura 27. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **N** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

b) Proteína S: Se detectaron anticuerpos **IgG** desde la primera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo hasta la semana 13 pi, posteriormente se observa una tendencia a disminuir, que se mantiene hasta la semana 21 pi. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la segunda semana pi y una ligera tendencia a incrementar hasta la semana 21 pi. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 13 pi en el G1-SI y en la semana 1 pi en el G2-CI (Figuras 28 y 29).

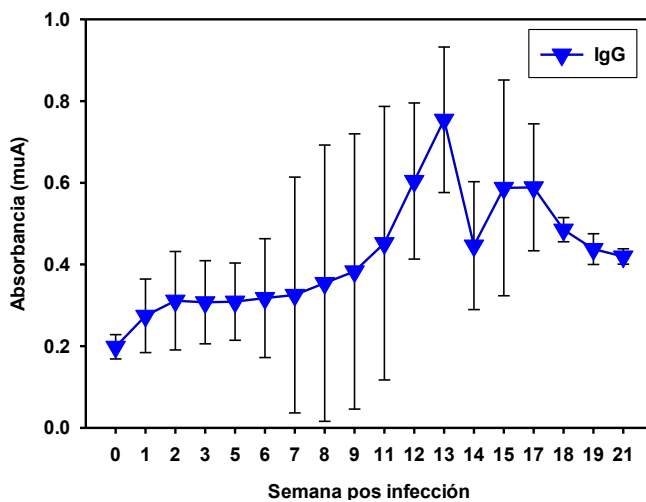


Figura 28. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **S** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

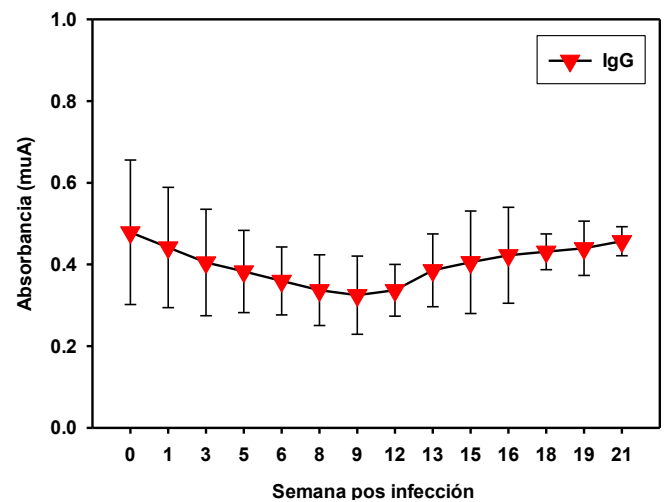


Figura 29. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **S** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

Se detectaron anticuerpos **IgM** desde la primera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo hasta la semana 13 pi, posteriormente se observa una tendencia a disminuir que se mantiene hasta la última semana de muestreo. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a incrementar a través del tiempo. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 13 pi en el G1-SI y en la semana 21 pi en el G2-CI (Figuras 30 y 31).

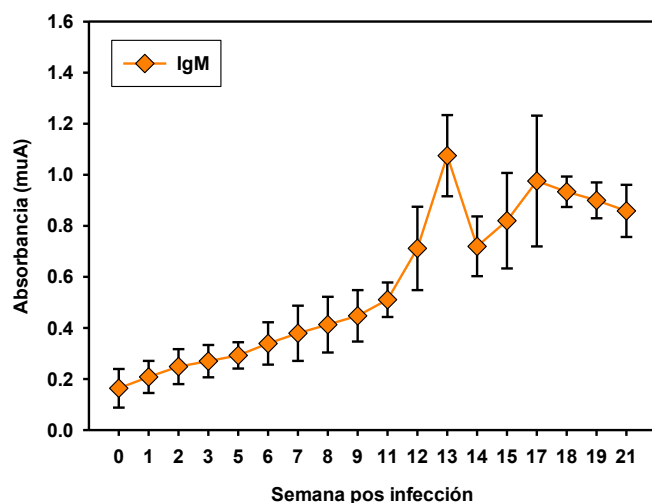


Figura 30. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **S** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

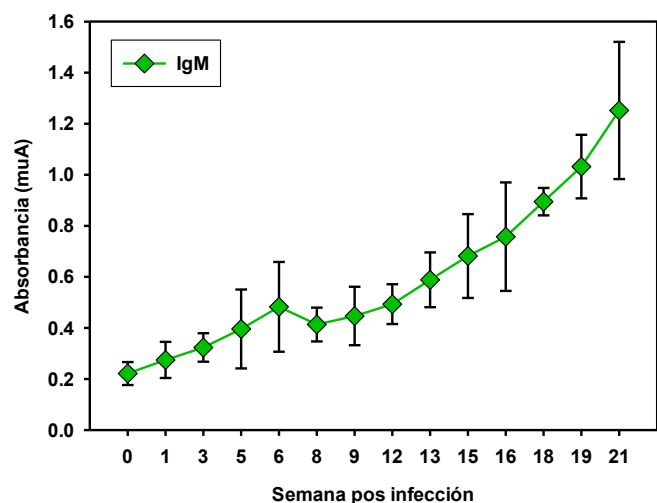


Figura 31. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **S** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

c) Proteína M: Se detectaron anticuerpos **IgG** desde la primera semana hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la primera semana pi y una tendencia a incrementar a partir de la semana 13 pi. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 14 pi en el G1-SI y en la semana 21 pi en el G2-CI (Figuras 32 y 33).

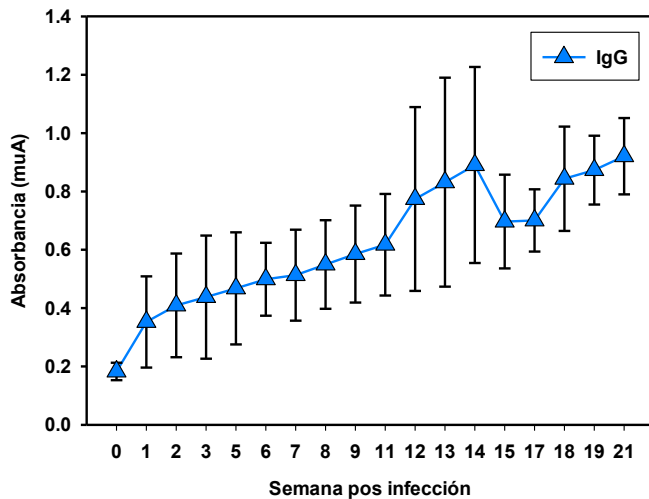


Figura 32. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **M** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

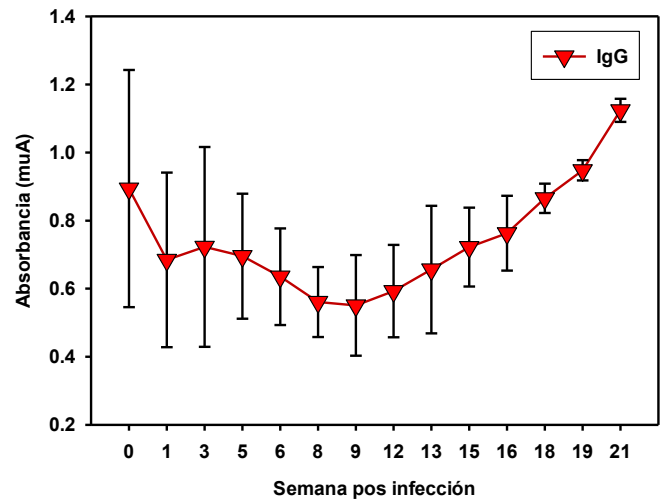


Figura 33. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgG** contra la proteína **M** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

Se detectaron anticuerpos **IgM** desde la primera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo, que se mantiene hasta el último muestreo. En el G2-CI se detectó respuesta serológica desde el primer muestreo, se observó una tendencia a incrementar a través del tiempo, manteniéndose hasta el último muestreo. En promedio la mayor densidad óptica se detectó en la semana 21 pi tanto para el G1-SI como para el G2-CI (Figuras 34 y 35).

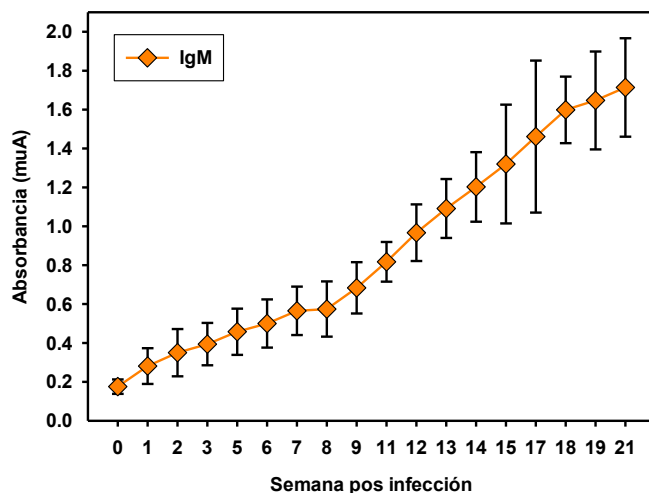


Figura 34. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **M** del vDEP por muestreo del grupo **G1-SI**.

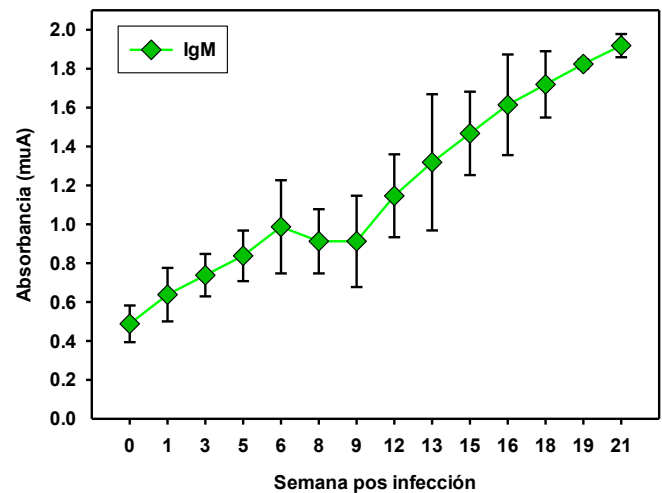


Figura 35. Media y desviación estándar de la detección de anticuerpos **IgM** contra la proteína **M** del vDEP por muestreo del grupo **G2-CI**.

En la figura 36 se observa que la producción de anticuerpos **IgG** de las proteínas N, S y M del vDEP tiende a incrementar, posterior a la infección en el G1-SI, mientras que para el G2-CI la producción de anticuerpos tiende a disminuir con la infección, manteniéndose de esa forma prácticamente hasta las 21 semanas pi, excepto para la proteína M que si presenta un incremento importante.

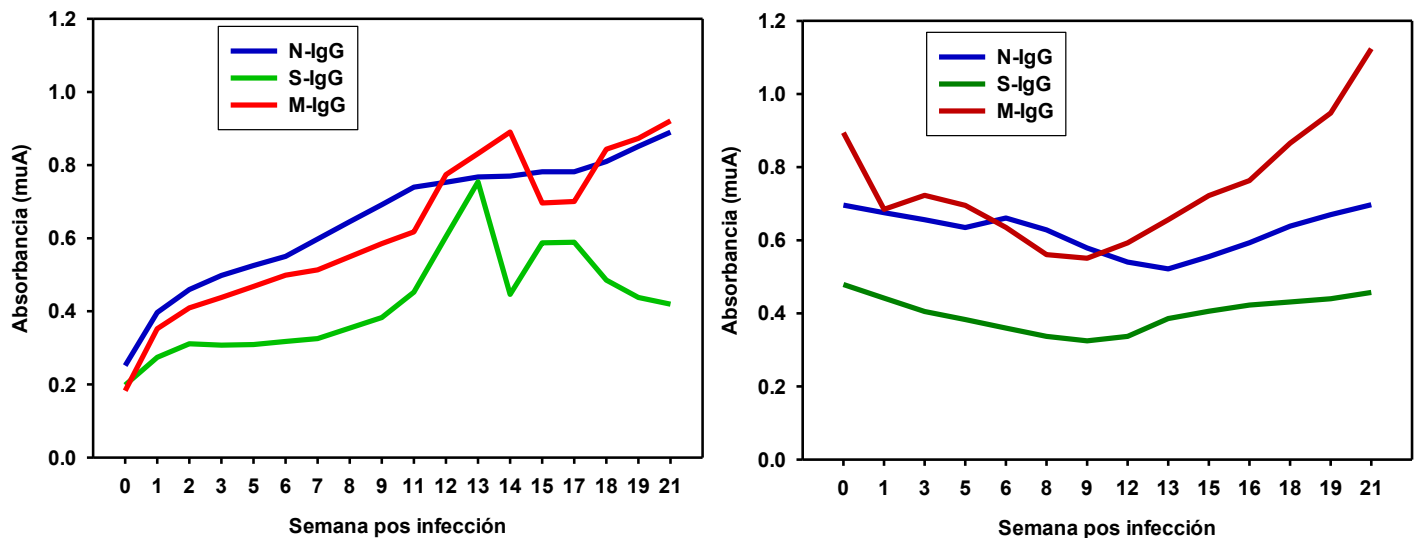


Figura 36. Media de la detección de anticuerpos **IgG** contra las proteínas N, S y M del vDEP por muestreo. Grupo **G1-SI** (izquierda) y grupo **G2-CIP** (derecha).

En la figura 37 se observa que la producción de anticuerpos **IgG** de las proteínas N, S y M del vDEP tiende a incrementar, posterior a la infección en el G1-SI y en el G2-CI manteniéndose de esa forma prácticamente hasta las 21 semanas pi, excepto para la proteína S del G1-SI que disminuye en los últimos muestreos.

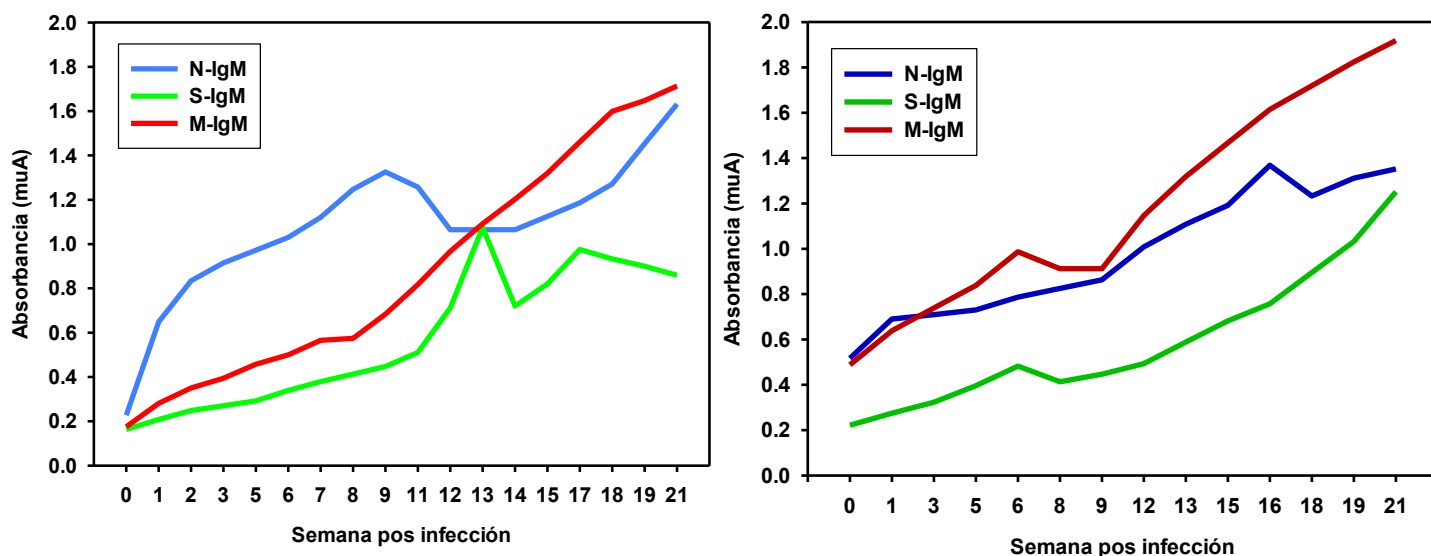


Figura 37. Media de la detección de anticuerpos **IgM** contra las proteínas N, S y M del vDEP por muestreo del Grupo **G1-SI** (izquierda) y grupo **G2-CIP** (derecha).

8.13 Western blot de muestras serológicas.

Se eligieron muestras serológicas de cada grupo de cerdos (**G1-SI** y **G2-CI**) para confirmar la producción de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes N (70 kDa), S (48 kDa) y M (39 kDa) del vDEP por *western blot*, a través del tiempo.

Se identificaron específicamente anticuerpos **IgG** de la proteína recombinante **N** del vDEP detectando bandas desde la tercera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando tendencia a incrementar a través del tiempo. En el G2-CI se detectaron anticuerpos desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la sexta semana pi y una tendencia a incrementar hasta la semana 21 pi. Las bandas con mayor intensidad se observan en la semana 21 pi en el G1-SI y en el G2-CI (Figura 38). Esto coincide con el resultado del ELISA indirecto.

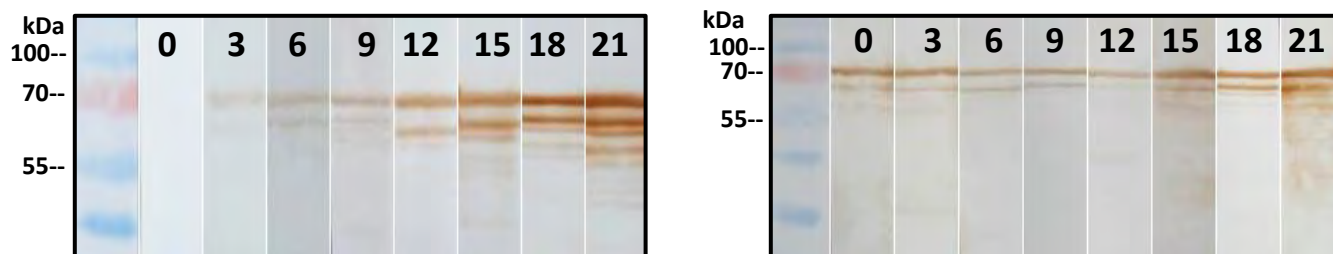


Figura 38. Identificación específica de anticuerpos de la proteína recombinante **N (70 kDa)** del vDEP por western blot. El número en la parte superior de la imagen corresponde con la semana pos infección de cada muestreo evaluado. Grupo **G1-SI** (izquierda) y grupo **G2-CIP** (derecha).

Se identificaron específicamente anticuerpos **IgG** de la proteína recombinante **S** del vDEP detectando bandas desde la tercera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando una tendencia incrementar a través del tiempo hasta la semana 15 pi, posteriormente se observa una tendencia a disminuir, que se mantiene hasta la semana 21 pi. En el G2-CI se detectaron anticuerpos desde el primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la tercera semana pi y no se muestra una tendencia bien determinada a incrementar, manteniéndose de esa manera hasta el último muestreo. Las bandas con mayor intensidad se observan en la semana 12 pi en el G1-SI y en las semanas 0 y 15 pi en el G2-CI (Figura 39). Corresponde con el resultado del ELISA indirecto mostrado anteriormente.

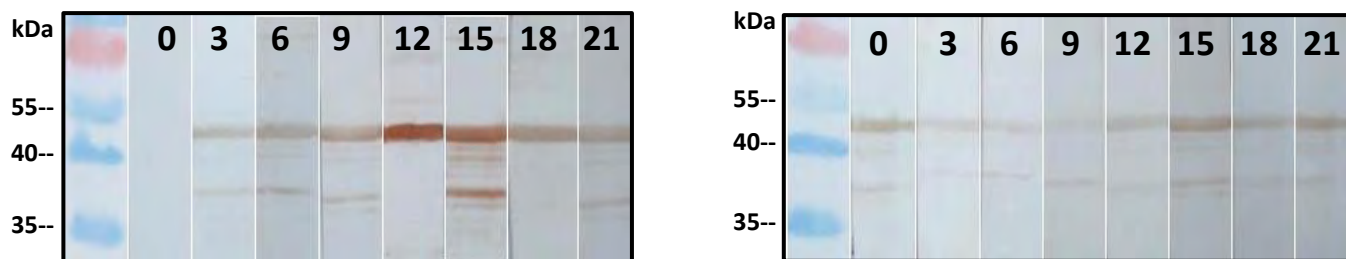


Figura 39. Identificación específica de anticuerpos de la proteína recombinante **S (48 kDa)** del vDEP por western blot. El número en la parte superior de la imagen corresponde con la semana pos infección de cada muestreo evaluado. Grupo **G1-SI** (izquierda) y grupo **G2-CIP** (derecha).

Se identificaron específicamente anticuerpos **IgG** de la proteína recombinante **M** del vDEP detectando bandas desde la tercera semana y hasta las 21 semanas pi en el G1-SI, observando una tendencia incrementar a través del tiempo que se mantiene hasta la semana 21 pi. En el G2-CI se detectaron anticuerpos desde el

primer muestreo, se observó una tendencia a disminuir la sexta semana pi y una tendencia a incrementar a partir de la semana 12 pi, manteniéndose hasta la semana 21 pi. Las bandas con mayor intensidad se observan en las semanas 12, 18 y 21 pi en el G1-SI y en la semana 21 pi en el G2-CI (Figura 40). Estos resultados confirman el resultado del ELISA indirecto.

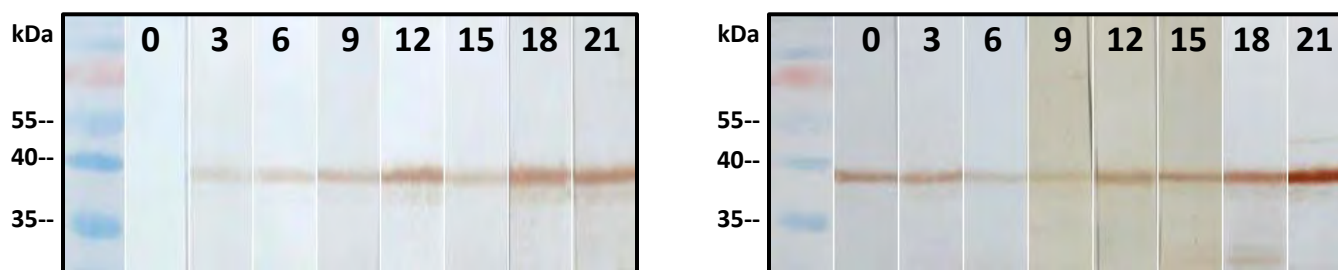


Figura 40. Identificación específica de anticuerpos de la proteína recombinante **M (39 kDa)** del vDEP por western blot. El número en la parte superior de la imagen corresponde con la semana pos infección de cada muestreo evaluado. Grupo **G1-SI** (izquierda) y grupo **G2-CIP** (derecha).

9. DISCUSIÓN.

La enfermedad de diarrea epidémica porcina (DEP) es una de las enfermedades infecciosas intestinales más graves, que ha representado una amenaza sustancial para la industria porcina en muchos países en los últimos años. El diagnóstico preciso en las diferentes etapas de la infección, juega un papel clave en la prevención de DEP. La proteína N de vDEP representa un agente esencial en la formación de la estructura nucleocápside del virus. La abundante expresión de proteína N en células infectadas con vDEP y la alta conservación entre las diferentes cepas de vDEP, la hacen bastante adecuada para su uso como objetivo para el diagnóstico de vDEP (Kim y Lee, 2014). Sin embargo, el desarrollo de herramientas de diagnóstico para DEP en México, no se han enfocado en esta proteína. La proteína N es una proteína nucleocápside fosforilada que se une al ARN genómico, que puede usarse como un blanco para el diagnóstico preciso y temprano de la infección por vDEP (Song et. al, 2016).

En el presente estudio se generó un sistema de expresión para la proteína N del vDEP, que se implementó en el desarrollo de ensayos ELISA indirecto y western blot para determinar la curva de producción de anticuerpos contra la proteína N durante infecciones experimentales en cerdos por periodos prolongados post-infección con el vDEP. Se recuperó correctamente el marco de lectura abierto (ORF) del gen de la proteína N del vDEP, a partir de muestras de animales infectados con la cepa PEDV/MEX/MICH/01/2013, obteniendo el producto esperado de 1328 pb, prácticamente igual a los resultados de Hou et, al (2007) y Pan et. al (2015) que recuperaron un ORF de 1326 pb. El sistema de expresión pET SUMO funcionó bien para clonar el gen N del vDEP, al obtener plásmidos recombinantes con el inserto de la proteína N en la orientación correcta. En general se ha observado que los sistemas de expresión procarióticos son eficientes para la clonación de genes del vDEP y construcción de plásmidos recombinantes (Hou et, al 2007; Pan et. al, 2015). Para la generación de *E. coli* sobreproductora de la proteína N del vDEP se utilizó la cepa BL21 (DE3) que es eficiente para el uso con sistemas de expresión basados en el promotor T7 bacteriófago. Las células BL21 (DE3) contienen el lisógeno DE3 lambda. En

general las cepas BL21 se han construido específicamente para una expresión de alto nivel de proteínas recombinantes. Estas cepas tienen dos atributos importantes que las hacen ideales para la expresión de proteínas: marcadores genéticos clave e inducibilidad de expresión proteica. Los marcadores genéticos más importantes ayudan al ARN y a las proteínas a acumularse a niveles altos sin degradación. La inducibilidad ayuda a minimizar los efectos tóxicos de algunas proteínas recombinantes. La cepa BL21 (DE3) es de las más utilizadas para la sobreexpresión de proteínas del vDEP (Gimenez-Lirola et. al 2017; Pan et. al, 2015). De acuerdo a diferentes estudios realizados, la proteína N del vDEP tiene un peso de 58 kDa (Lee, 2015). Hou et. al, 2007, Pan et. al, 2015 y Gimenez-Lirola et. al 2017, obtuvieron proteínas de 48.62, 55 y 50.4 kDa, respectivamente. En este estudio se produjo una proteína de aproximadamente 70 kDa debido al sistema de expresión empleado (pETSUMO), que utiliza una modificación pequeña de tipo ubiquitina (proteína SUMO de aproximadamente 12 kDa) que permite la expresión, purificación y generación de proteínas nativas en *E. coli*, incrementa la expresión de proteínas recombinantes y aumenta la solubilidad de proteínas parcialmente insolubles.

Después de la infección primaria con vDEP, los anticuerpos se detectan primero en el suero entre los días 6 y 14. En particular, las respuestas de anticuerpos generadas contra las proteínas N y S de vDEP, las dos principales proteínas estructurales del virus, presentan diferentes magnitudes y dinámicas. Mientras que los anticuerpos IgM específicos de N alcanzan el máximo en el día 7 pi, las respuestas IgM de S alcanzan su punto máximo en el día 14 pi, disminuyendo a los niveles previos a la infección entre los días 14 y 21 pi. Mientras que los anticuerpos IgG específicos para N y S se detectan por primera vez en el día 7 pi, con anticuerpos IgG anti-N que alcanzan su punto máximo el día 21 pi, y las respuestas IgG de S alcanzan su punto máximo en el día 14 pi. Los niveles de anticuerpos IgG de N y S comienzan a disminuir alrededor del día 21 pi, mientras que las respuestas N de IgG parecen mantenerse hasta 43 dpi (Diel et. al, 2016). En el presente estudio, después de la infección experimental con vDEP, los anticuerpos se detectaron primero en el suero en la primera semana. Mientras que

los anticuerpos IgM específicos de N alcanzan el máximo en la semana 9 pi en cerdos sin inmunidad previa y en la semana 16 pi en cerdos con inmunidad previa, las respuestas IgM de S alcanzan su punto máximo en la semana 13 pi en cerdos sin inmunidad previa y en la semana 21 en cerdos con inmunidad previa. Los anticuerpos IgG específicos para N y S se detectan por primera vez en la semana 1 pi, con anticuerpos IgG anti-N que alcanzan su punto máximo en la semana 11 pi en cerdos sin inmunidad previa y en la semana 21 en cerdos con inmunidad previa, y las respuestas IgG de S alcanzan su punto máximo en en la semana 13 pi en cerdos sin inmunidad previa y en la semana 1 en cerdos con inmunidad previa el día 14 pi. En general, se observó que la producción de anticuerpos IgG de las proteínas N, S y M del vDEP tiende a incrementar a través del tiempo en cerdos sin inmunidad previa, mientras que en cerdos con inmunidad previa tiende a disminuir. La producción de anticuerpos IgM tiende a incrementar en cerdos con y sin inmunidad previa.

La respuesta de anticuerpos IgG determinada en el presente estudio mediante un ELISA indirecto se logró prácticamente durante cinco meses pos infección, mientras que Stadler et al. (2018), detectaron anticuerpos IgG durante dos meses posterior a la aparición de los signos clínicos, mediante dos paquetes comerciales de ELISA, ambos basados en la proteína N del vDEP, en cerdos de engorda. Los lechones no seroconvirtieron de igual manera, por lo que se deben considerar las diferencias dependientes de la edad en la tasa de detección y la persistencia de los anticuerpos.

Gimenez-Lirola et. al (2017) detectaron anticuerpos IgG de las proteínas S, N y M de vDEP por primera vez entre 7 a 10 DPI y posteriormente durante 42 DPI. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos a las proteínas S fue el marcador más sensible de la infección temprana por vDEP y la mejor opción para la detección confiable de seropositivos débiles. En este estudio se detectaron anticuerpos de las proteínas N, S y M desde la primera semana hasta la semana 21 pos infección y se determinó que la mejor opción para la detección de la infección temprana y la persistencia del vDEP fueron las proteínas N y M en cerdos con y sin inmunidad

El sistema inmune del cerdo tiene la capacidad de reconocer proteínas específicas de vDEP y responder produciendo anticuerpos específicos. El desarrollo de ensayos para anticuerpos de vDEP es importante para detectar infecciones, confirmar la exposición previa al virus y controlar los niveles de inmunidad (Bjuström-Kraft et. al, 2016).

En general, la magnitud de la respuesta de un anticuerpo depende de la cantidad de antígeno presente en el sistema inmune. La proteína M es la proteína más abundante en la envoltura del virión, la proteína N es el antígeno de los coronavirus más abundante producido durante la infección y la proteína S forma las proyecciones en forma de corona de la superficie viral. Por el contrario, la proteína E está presente solo en pequeñas cantidades en las células infectadas y en la envoltura viral, lo que puede explicar su pobre antigenicidad (Gimenez-Lirola et. al 2017).

El diagnóstico diferencial de coronavirus entéricos porcinos se basa en métodos de detección directa de laboratorio, por ejemplo, métodos de PCR, inmunohistoquímica, hibridación in situ e inmunofluorescencia directa en tejidos. Los ensayos basados en anticuerpos juegan un papel importante en la detección de infección y en la evaluación de la inmunidad, pero la reactividad cruzada de anticuerpos entre coronavirus entéricos porcinos es una preocupación importante. En un estudio, se inocularon experimentalmente cerdos de siete semanas de edad (sin historial de infecciones) con cada uno de los coronavirus porcinos (PEDV, TGEV, PRCV y PDCoV) y se caracterizó la respuesta de anticuerpos IgG a polipéptidos recombinantes derivados de proteínas estructurales de vDEP (S, N, M y E) y a los viriones completos de vDEP utilizando un inmunoensayo multiplex basado en microperlas fluorescentes (FMIA) y un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de virus completo. La proteína S recombinante proporcionó la mejor sensibilidad diagnóstica, independientemente de la cepa vDEP, sin reactividad cruzada contra el virus de la gastroenteritis transmisible (vGET), el coronavirus respiratorio porcino (PRCV) o el antisuero porcino del deltacoronavirus (PDCoV). Las partículas de virus completo mostraron cierta reactividad cruzada con los antisueros vGET, mientras que la proteína N presentó cierta reactividad

cruzada con vGET. La proteína M presentó reactividad cruzada con los antisueros de vGET y PRCV. La proteína M presentó elevada reactividad cruzada con los antisueros de vGET y PRCV (Gimenez-Lirola et. al 2017). En el presente estudio se analizó la respuesta de anticuerpos IgG e IgM de las proteínas S, N y M de vDEP, considerando utilizar como mejores opciones las proteínas recombinantes N y S para llevar a cabo un diagnóstico más preciso.

En un estudio se identificó al menos un epítipo en la región N-terminal de la proteína N de vDEP y vGET que contribuye a presentar reactividad cruzada (Lin et. al, 2015). En el presente estudio, se produjo una proteína N de longitud completa. El truncamiento de la región N-terminal podría ayudar a evitar una posible reactividad cruzada (Song et. al, 2016).

10. CONCLUSIÓN.

La amplia duración y detección de la respuesta de anticuerpos IgG e IgM contra la proteína recombinante N del vDEP en muestras de suero, proporciona información oportuna sobre la exposición y la respuesta inmune en cerdos en crecimiento, siendo una herramienta importante para la vigilancia, prevención y control de la enfermedad, optimizando la salud en las poblaciones porcinas.

El diagnóstico rápido y preciso de la infección por PEDV es fundamental para la implementación de medidas efectivas de control de la enfermedad que ayuden a reducir el riesgo de diseminación. Por lo tanto, los ensayos de diagnóstico serológicos confiables proporcionan información valiosa sobre la exposición previa a vDEP y la prevalencia de la infección.

11. REFERENCIAS.

Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, et al. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res.* 2014;45:73.

Baolei Jia, Che Ok Jeon. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol.* 2016 Aug; 6(8): 160196. doi: 10.1098/rsob.160196

Bjstrom-Kraft J, Woodard K, Gimenez-Lirola L, Rotolo M, Wang C, Sun Y, Lasley P, Zhang J, Baum D, Gauger P, Main R, Zimmerman J. 2016. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs. *BMC Vet Res* 12:99. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0725-5>.

Chang, C.K.; Sue, S.C.; Yu, T.H.; Hsieh, C.M.; Tsai, C.K.; Chiang, Y.C.; Lee, S.J.; Hsiao, H.H.; Wu, W.J.; Chang, C.F.; et al. The dimer interface of the SARS coronavirus nucleocapsid protein adapts a porcine respiratory and reproductive syndrome virus-like structure. *FEBS Lett.* 2005, 579, 5663–5668.

Chen, C.Y.; Chang, C.K.; Chang, Y.W.; Sue, S.C.; Bai, H.I.; Riang, L.; Hsiao, C.D.; Huang, T.H. Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *J. Mol. Biol.* 2007, 368, 1075–1086.

Cima, G., 2013. Fighting a deadly pig disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243, 467-470.

Da-Chuan P, Do-Woon S, In-Seon K, Hui-Shan L, Seo-Ho O, Bijay S. Maharjan S, Yoon-Seok L, Jin-Duck B, Chong-Su C, Zhong-Shan H, Sang-Kee K, Yun-Jaie C. Trigger factor assisted soluble expression of recombinant spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 2016 May 4;16(1):39. doi: 10.1186/s12896-016-0268-7.

De Haan, C.A.; Rottier, P.J. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2005, 64, 165–230.

Diel DG, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes MHV, Christopher-Hennings J, Nelson EA. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological

and serological diagnostic methods. *Virus Res.* 2016 Dec 2;226:60-70. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.013. Epub 2016 May 14.

Ding Z, Fang L, Jing H, Zeng S, Wang D, Liu L, Zhang H, Luo R, Chen H, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J Virol.* 2014 Aug;88(16):8936-45. doi: 10.1128/JVI.00700-14. Epub 2014 May 28.

Dyson, H.J.; Wright, P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 197–208.

Gerber PF, Gong Q, Huang YW, Wang C, Holtkamp D, Opriessnig T. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. *Vet J.* 2014;202:33–6.

Gimenez-Lirola LG, Zhang J, Carrillo-Avila JA, Chen Q, Magtoto R, Poonsuk K, Baum DH, Piñeyro P, Zimmerman J. Reactivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Structural Proteins to Antibodies against Porcine Enteric Coronaviruses: Diagnostic Implications *J Clin Microbiol.* 2017 May;55(5):1426-1436. doi: 10.1128/JCM.02507-16. Epub 2017 Feb 15.

Hiscox, J.A.; Wurm, T.; Wilson, L.; Britton, P.; Cavanagh, D.; Brooks, G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J. Virol.* 2001, 75, 506–512.

Hou XL1, Yu LY, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol.* 2007 Jul 20;123(1-3):86-92. Epub 2007 Feb 20.

Hurst, K.R.; Ye, R.; Goebel, S.J.; Jayaraman, P.; Masters, P.S. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J. Virol* 2010, 84, 10276–10288.

Jung, K., Saif, L., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal.* doi:10.1016/j.tvjl.2015.02.017.

Jung K, Wang Q, Scheuer KA, Lu Z, Zhang Y, Saif LJ. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:662–5.

Kim, Y, Lee, C. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*. 460, 180–193 (2014).

Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J*. 2015 Dec 22;12:193. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2. Review

Lee S, Kim Y, Lee C. Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112. *Virus Res*. 2015;208:215–24.

Li W, van Kuppeveld FJ, He Q, Rottier PJ, Bosch BJ. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*. 2016 Dec 2;226:117-127. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.031. Epub 2016 Jun 15. Review. PMID: 27317167

Lin CM, Gao X, Oka T, Vlasova AN, Esseili MA, Wang Q, Saif LJ. 2015. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. *J Virol* 89:3332–3342. [https:// doi.org/10.1128/JVI.03196-14](https://doi.org/10.1128/JVI.03196-14).

Lopez, S.; Yao, J.S.; Kuhn, R.J.; Strauss, E.G.; Strauss, J.H. Nucleocapsid-glycoprotein interactions required for assembly of alphaviruses. *J. Virol*. 1994, 68, 1316–1323.

Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, et al. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection. *United States Emerg Infect Dis*. 2014;20:872–4.

Lu, X.; Pan, J.; Tao, J.; Guo, D. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* 2011, 42, 37–45.

Moon HW, Norman JO, Lambert G. Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine (TGE). I. Clinical signs and some mucosal dimensions in small intestine. *Can J Comp Med*. 1973;37:157–66.

OIE. Infección por el virus de la diarrea epidémica porcina. Ficha técnica.2014. <https://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>

Pan X1, Kong N, Shan T, Zheng H, Tong W, Yang S, Li G, Zhou E, Tong G. Monoclonal antibody to N protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2015 Feb;34(1):51-4. doi: 10.1089/mab.2014.0062.

Park CK, Lee KK, Lee C. PED past, present, and future. Proc Asian Pig Vet Soc Congr. 2011; S19–20.

Pensaert, M.B., de Bouck, P., 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Archives of Virology 58, 243-247.

Saif LJ, Pensaert MB, Sestack K, Yeo SG, Jung K. Coronaviruses. In: Straw BE, Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Diseases of Swine. Ames: Wiley-Blackwell; 2012. p. 501–24.

Shi D, Shi H, Sun D, Chen J, Zhang X, Wang X, Zhang J, Ji Z, Liu J, Cao L, Zhu X, Yuan J, Dong H, Wang X, Chang T, Liu Y, Feng L. Nucleocapsid Interacts with NPM1 and Protects it from Proteolytic Cleavage, Enhancing Cell Survival, and is Involved in PEDV Growth. Sci Rep. 2017 Jan 3;7:39700. doi: 10.1038/srep39700.

Shibata I, Tsuda T, Mori M, Ono M, Sueyoshi M, Uruno K. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. Vet Microbiol. 2000;72:173–82.

Shieh, Y.C.; Baric, R.S.; Woods, J.W.; Calci, K.R. Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 7130–7136.

Song Y, Singh P, Nelson E, Ramamoorthy S. 2016. A computationally designed serological assay for porcine epidemic diarrhea virus. J Clin Microbiol 54:2039 –2046. <https://doi.org/10.1128/JCM.00460-16>.

Stadler J, Moser L, Numberger J, Rieger A, Strutzberg-Minder K, Stellberger T, Ladinig A, Ritzmann M, Fux R. Investigation of three outbreaks of Porcine Epidemic Diarrhea in Germany in 2016 demonstrates age dependent differences in the development of humoral immune response. Prev Vet Med. 2018 Feb 1;150:93-100. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.12.012. Epub 2017 Dec 19.

Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., Burrough, E.B., Sun, D., Madson, D., Cooper, V.L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B.J., et al., 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 25, 649-654.

Surjit, M.; Liu, B.; Kumar, P.; Chow, V.T.; Lal, S.K. The nucleocapsid protein of the SARS coronavirus is capable of self-association through a C-terminal 209 amino acid interaction domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, *317*, 1030–1036.

Surjit, M.; Liu, B.; Chow, V.T.; Lal, S.K. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 10669–10681.

Trujillo-Ortega ME, Beltrán-Figueroa R, García-Hernández ME, Juárez-Ramírez M, Sotomayor-González A, Hernández-Villegas EN, Becerra-Hernández JF, Sarmiento-Silva RE. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Vet Res.* 2016 Jun 29;12(1):132. doi: 10.1186/s12917-016-0763-z.

Urbaneja, M.A.; Wu, M.; Casas-Finet, J.R.; Karpel, R.L. HIV-1 nucleocapsid protein as a nucleic acid chaperone: Spectroscopic study of its helix-destabilizing properties, structural binding specificity, and annealing activity. *J. Mol. Biol.* 2002, *318*, 749–764.

Wang K, Xie C, Zhang J, Zhang W, Yang D, Yu L, Jiang Y, Yang S, Gao F, Yang Z, Zhou Y, Tong G. The Identification and Characterization of Two Novel Epitopes on the Nucleocapsid Protein of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus *Sci Rep.* 2016 Dec 19;6:39010. doi: 10.1038/srep39010.

Wood, E.N., 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Veterinary Record* 100, 243-244.

Wurm, T.; Chen, H.; Hodgson, T.; Britton, P.; Brooks, G.; Hiscox, J.A. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J. Virol.* 2001, *75*, 9345–9356.

Zuniga, S.; Cruz, J.L.; Sola, I.; Mateos-Gomez, P.A.; Palacio, L.; Enjuanes, L. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 2010, *84*, 2169–2175.