



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DESCRIPCIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN INMUNOLÓGICOS**  
**INDUCIDOS POR VACUNAS RECOMBINANTES ESPECÍFICAS CONTRA**  
**CEPAS DE VIRUS DE PRRS MEXICANAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

**Gabriela Patricia Vera Rueda**

**Tutor**

René Álvaro Segura Velázquez (FMVZ-UNAM)

**Comité Tutor**

José Iván Sánchez Betancourt

FMVZ-UNAM

Jacquelynnne Brenda Cervantes Torres

Instituto de Investigaciones Biomédicas



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.

**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 está 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.

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo a mi padre, que siempre soñó verme con mi título de Maestría y ya no lo logró. Gracias por estar siempre para mí, para guiarme y orientarme y sobre todo, por hacerlo con amor y sabiduría. Así también a mi madre que sigue caminando conmigo, y a mi hermana, el amor de mi vida y a mis sobrinas, mi motor e inspiración.

Con dedicatoria especial, a Gabriel, que a lo largo de estos 2 años y en contra de todo, me ha seguido amando y apoyando. Gracias por tu paciencia y comprensión, por animarme a seguir con mis estudios y por estar para mí cuando te he necesitado.

Dedico este trabajo a quien considero un mentor, al Dr. René Segura, por ser paciente y honesto. Por no soltarme al realizar este trabajo y ser considerado en todo momento y circunstancia.

A la Dra. Jacquelynne Cervantes, por todas sus enseñanzas, por llevarme de la mano, paso a paso, por resolver todas mis dudas. Si de alguien he aprendido en este tiempo ha sido de usted y espero seguirlo haciendo.

Al Dr. Iván Sánchez, gracias por su voto de confianza para realizar este trabajo.

Finalmente, dedico este trabajo a todas y cada una de las personas que lo hicieron posible, a pasados, presentes y futuros estudiantes e investigadores, a los que dieron la primera pauta, a los que trabajaron junto conmigo y a los que vendrán.

Han sido dos años increíbles de aprendizaje en todos aspectos, y he sido una persona muy feliz y plena al dedicarme a este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A la UNAM y en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus puertas durante la licenciatura y ahora, la Maestría.

Al Laboratorio del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las facilidades prestadas.

Al Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al Dr. Sergio Rosales Mendoza y a la Dra. Dania Olivia Govea Alonso del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, UASLP, por el apoyo en la realización de determinados experimentos del proyecto.

A la MVZ Georgina Díaz Herrera de la Unidad de Modelos Biológicos del IIB, UNAM por el apoyo en el manejo y mantenimiento de los animales de experimentación.

Los resultados son parte del proyecto de CONACYT de Ciencia Básica No. 254244

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías CONACYT por la beca otorgada durante los estudios.

# DESCRIPCIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN INMUNOLÓGICOS INDUCIDOS POR VACUNAS RECOMBINANTES ESPECÍFICAS CONTRA CEPAS DE VIRUS DE PRRS MEXICANAS

## **RESUMEN**

Desde su aparición, el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino ha provocado grandes pérdidas económicas en la porcicultura a nivel global. Las vacunas activas atenuadas comerciales disponibles en el país, no proporcionan una protección útil, especialmente contra cepas genéticamente heterólogas. Por lo cual, el enfoque para el desarrollo de vacunas ha cambiado. En el presente estudio se probó la inmunogenicidad de las proteínas no estructurales NSP1 y NSP11 del virus de PRRS, así como de péptido 40 de la proteína estructural GP5. Se evaluó la respuesta humoral y la capacidad proliferativa de las células T. Se inmunizaron ratones Balb/cAnN con los antígenos mencionados y con la vacuna comercial y se tomaron muestras de suero y de bazo para su evaluación. Los resultados muestran que la proteína NSP11 fue la más inmunogénica, incluso más que la vacuna. La proteína NSP1 también resultó ser inmunogénica, no así el péptido 40.

Estos datos proporcionan bases para el desarrollo de vacunas recombinantes que pueden ser utilizados para controlar la enfermedad de manera más eficaz y segura.

**Palabras clave:** *PRRSV, vacunas recombinantes, respuesta inmune, proteínas no estructurales*

# DESCRIPTION OF THE IMMUNE MECHANISMS OF ACTION INDUCED BY SPECIFIC RECOMBINANT VACCINES AGAINST MEXICAN PRRS VIRUS STRAINS

## **ABSTRACT**

Since its appearance, the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus has caused great economic losses in pig farming globally. The commercial live attenuated vaccines available in the country do not provide useful protection, especially against genetically heterologous strains. Therefore, the approach to vaccine development has changed. The present study tested the immunogenicity of the non-structural proteins NSP1 and NSP11 of the PRRS virus, as well as of peptide 40 of the structural protein GP5. The humoral response and the proliferative capacity of the T cells were evaluated. Balb / cAnN mice were immunized with the mentioned antigens and with the commercial vaccine, and serum and spleen samples were taken for evaluation. The results show that the NSP11 protein was the most immunogenic, even more so than the vaccine. The NSP1 protein also turned out to be immunogenic, but peptide 40 was not. These data provide the basis for the development of recombinant vaccines that can be used to control the disease more effectively and safely.

**Keywords:** *PRRSV, recombinant vaccines, immune response, non-structural proteins*

## CONTENIDO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>VIII</u>
<u>LISTA DE CUADROS</u>	<u>IX</u>
<u>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN, EL VIRUS DE PRRS</u>	<u>1</u>
<u>RESPUESTA INMUNE</u>	<u>4</u>
RESPUESTA INMUNE INNATA DIRIGIDA CONTRA PRRSV	4
MACRÓFAGOS	5
NK Y CÉLULAS T $\gamma\delta$	7
CÉLULAS DENDRÍTICAS	8
RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA	10
PRRS Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	12
<u>VACUNAS</u>	<u>15</u>
VACUNAS COMERCIALES	15
VACUNAS EXPERIMENTALES	15
<u>ANTECEDENTES</u>	<u>19</u>
<u>CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	<u>25</u>
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26



<u>CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>27</u>
<u>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</u>	<u>35</u>
<u>EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO</u>	<u>35</u>
<u>EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO</u>	<u>53</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>55</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>64</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>65</u>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Organización del genoma de PRRS</i>	2
<i>Figura 2. Ciclo de replicación del virus de PRRS</i>	4
<i>Figura 3. Vías de señalización para la producción de IFN tipo I y las expresiones génicas estimuladas por IFN</i>	14
<i>Figura 4. Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la Vacuna Comercial de PRRS</i>	35
<i>Figura 5. Optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la Vacuna</i>	36
<i>Figura 6. Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína NSP11 del PRRSV</i>	38
<i>Figura 7. Optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la NSP11</i>	39
<i>Figura 8. Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína NSP1 del PRRSV</i>	40
<i>Figura 9. Identificación de los niveles de IgG específicos inducidos en ratones inmunizados con la vacuna de PRRS, con dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización</i>	43
<i>Figura 10. Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la proteína NSP11 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante, 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización</i>	44
<i>Figura 11. Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la proteína NSP1 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización</i>	46
<i>Figura 12. Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con el Péptido 40 de la proteína estructural GP5 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización</i>	47
<i>Figura 13. Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg la proteína NSP11 en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el antígeno de la vacuna del virus de PRRS</i>	48

<i>Figura 14. Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg la proteína NSP1 en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el antígeno de la vacuna del virus de PRRS</i>	49
<i>Figura 15. Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg de la vacuna comercial en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con la proteína NSP11</i>	50
<i>Figura 16. Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg de la vacuna comercial en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con la proteína NSP1</i>	51
<i>Figura 17. Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la vacuna del virus de PRRS, con dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el Péptido 40 de la proteína GP5 del virus de PRRS</i>	52
<i>Figura 18. Proliferación de las células T obtenidas de bazo de ratones inmunizados con la proteína NSP1, NSP11 y la vacuna comercial de PRRS, estimulados in vitro con solo medio, su respectivo inmunógeno o ConA, durante tres días</i>	54

## **LISTA DE TABLAS**

<i>Tabla 1. Grupos formados con los inmunógenos candidatos a vacuna</i>	28
<i>Tabla 2. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para el antígeno de la vacuna de PRRS (Ingelvac MLV®)</i>	30
<i>Tabla 3. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para la proteína</i>	30
<i>Tabla 4. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para la proteína</i>	31
<i>Tabla 5. Condiciones probadas para estandarizar el ELISA para el péptido 40</i>	31
<i>Tabla 6. Grupos de animales empleados para la evaluación de la respuesta proliferativa</i>	32
<i>Tabla 7. Índices de seroconversión de los distintos antígenos utilizados</i>	63

## LISTA DE CUADROS

*Cuadro 1: Resumen de las condiciones para la estandarización de péptido 40. Las diluciones del suero se representan en la primera fila, mientras que las diluciones del conjugado se representan en la primera columna*\_\_\_\_\_41

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

<b>PRRS</b>	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
<b>PRRSV</b>	Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>nm</b>	nanómetros
<b>GP</b>	glicoproteína
<b>kb</b>	kilobases
<b>ORF</b>	marco de lectura abierto
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>nsp</b>	proteína no estructural
<b>M</b>	proteína de membrana
<b>N</b>	proteína de la nucleocápside
<b>CD</b>	grupos de diferenciación (clusters of differentiation)
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico complementario
<b>RTC</b>	complejo de replicación y transcripción
<b>ARNm sg</b>	ARNm guiado monocatenario (single-stranded guided RNA)
<b>NK</b>	células asesinas naturales (natural killer cells)
<b>INF</b>	Interferón
<b>Th</b>	Células T cooperadoras (T helpers)
<b>PAM</b>	macrófagos alveolares pulmonares
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral
<b>IRF</b>	Factor regulador de interferón (Interferon regulatory factor)
<b>PRRSV-2</b>	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino 2
<b>PRRSV-1</b>	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino 1

<b>HP-PRRS</b>	cepa de PRRSV altamente patógena de China
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>IL</b>	Interleucina
<b>dpi</b>	días post infección
<b>BAL</b>	lavado bronquioalveolar
<b>hpi</b>	horas post infección
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>MLV</b>	Vacuna de virus vivo modificado (modified live vaccine)
<b>DC</b>	células dendríticas
<b>cDC</b>	células dendríticas convencionales
<b>moDC</b>	células dendríticas derivadas de monocitos
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>NFκβ</b>	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>Nab</b>	anticuerpos neutralizantes
<b>ADE</b>	mejora dependiente de anticuerpos
<b>NNA</b>	anticuerpos no neutralizantes
<b>Mab</b>	anticuerpo monoclonal neutralizante
<b>NS</b>	suero neutralizante
<b>NNS</b>	suero no neutralizante
<b>JAK-STAT</b>	Janus Quinasa señal transductora y activadora de transcripción (Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription)
<b>STAT</b>	señal transductora y activadora de transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription)
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CREB (CPB)</b>	proteína de unión del elemento de respuesta a AMPc(AMPc)

	response element-binding)
<b>ISGF</b>	factor del gen estimulado por interferón
<b>PCV2</b>	Circovirus Porcino Tipo 2
<b>LTB</b>	subunidad de enterotoxina B lábil
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>hAdV</b>	vectores adenovirales de humano
<b>rAd</b>	adenovirus recombinante de replicación defectuosa
<b>CDR</b>	regiones determinantes de complementariedad
<b>DMZC</b>	Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
<b>NSP1</b>	Proteína no estructural 1 (non structural protein 1)
<b>NSP11</b>	Proteína no estructural 11 (non structural protein 11)
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
<b>UMB-IIB</b>	Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas
<b>µg</b>	microgramos
<b>µl</b>	microlitros
<b>mL</b>	mililitros
<b>µM</b>	micromolar
<b>SSI</b>	solución salina fisiológica
<b>Ab</b>	anticuerpos
<b>MDA</b>	anticuerpos homólogos de origen materno
<b>TTD</b>	dominio N-terminal

<b>NendoU</b>	Endoribonucleasa Específica de Nidovirus
<b>ISRE</b>	Elemento de respuesta estimulado por interferón
<b>ISG</b>	Genes estimulados por interferón
<b>TRIM</b>	Proteínas de la familia de motivos tripartitos (Tripartite Motif family)
<b>T1</b>	Tiempo 1
<b>T2</b>	Tiempo 2
<b>T3</b>	Tiempo 3
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>RMPI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>CICSaB</b>	Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina
<b>SLP</b>	San Luis Potosí
<b>D.O.</b>	densidades ópticas
<b>CD4+</b>	linfocitos T cooperadores
<b>CD8+</b>	linfocitos T citotóxicos
<b>MHC-I</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (Major Histocompatibility Complex)



## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN, EL VIRUS DE PRRS

---

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) ha sido una de las enfermedades porcinas de mayor impacto económico en todo el mundo durante más de tres décadas. Se estima que el costo anual en la industria porcina de los Estados Unidos es al menos de \$600 millones al año [1]. El agente etiológico, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés) es un virus ARN de cadena única de sentido positivo envuelto, que pertenece al orden de los Nidovirales, familia *Arteriviridae*, [2]. El PRRSV tiene dos genotipos bien reconocidos: Tipo 1, o tipo europeo (prototipo Lelystad) y Tipo 2, o tipo norteamericano (prototipo VR-2332). El virión de PRRS parece ser una partícula aproximadamente esférica u ovalada de 50 a 60 nm de diámetro [3]. El ARN del genoma viral está empaquetado por proteínas de la nucleocápside. Alrededor de ésta, las glicoproteínas de superficie (GP) y las proteínas de membrana se insertan en la bicapa lipídica para formar las partículas de virión. El ARN del genoma de PRRSV es una molécula de cadena positiva, poliadenilada en 3', de aproximadamente 15 kb de longitud, que contiene 11 marcos de lectura abiertos conocidos (ORF). El gen de la replicasa consiste en los grandes ORF 1a y 1b, que están situados en las tres cuartas partes proximales del extremo 5' del genoma policistrónico (Figura 1). En contraste con la región ORF1b más conservada, el tamaño de ORF1a es bastante variable debido a la hipervariabilidad en la región central de la proteína no estructural 2 (nsp2) [4]. Las regiones ORF1a y ORF1b codifican dos grandes poliproteínas no estructurales, pp1a y pp1ab, y la expresión de esta última depende de una señal de desplazamiento del marco ribosomal -1 en la región de superposición ORF1a / ORF1b. Tras su síntesis a partir de la plantilla de ARNm genómico, las poliproteínas pp1a y pp1ab replicasa se procesan en al menos 14 proteínas no estructurales (nsp) por 4 proteínas codificadas en ORF1a que residen en nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$ , nsp2 y nsp4. El extremo 3' del genoma viral contiene ocho genes relativamente pequeños, y estos genes tienen secuencias terminales 5' y 3' que se superponen con los genes vecinos (Figura 1), con la excepción de ORF4 /

ORF5 de PRRSV de tipo 2. Estos genes codifican cuatro glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2a, GP3, GP4 y GP5), tres proteínas de membrana no glicosiladas (E, ORF5a y M), y una proteína de nucleocápside (N) [2].

Existe una gran variedad y diversidad de cepas de PRRS a nivel mundial. En México las cepas aisladas entre 2016 y 2017 pertenecen, según la clasificación reportada por Shi y colaboradores en el 2010, a los linajes 1, 5 y 8 dentro de los nueve reportados a nivel mundial; donde la mayoría de las cepas aisladas en diferentes regiones del país se encuentran agrupadas en el linaje 8 [5].

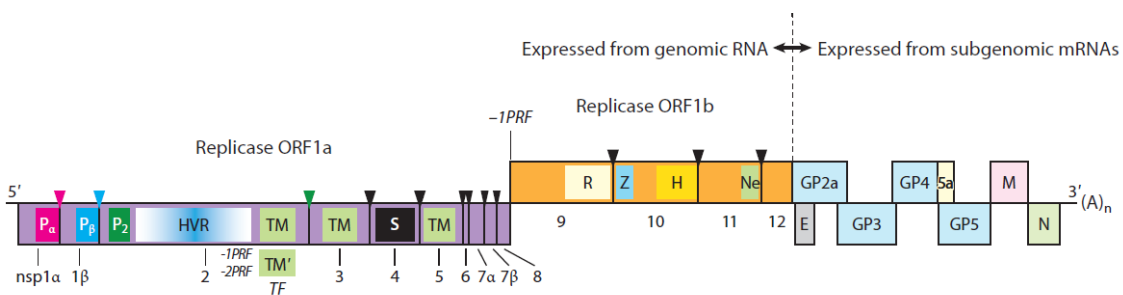


Figura 1. Organización del genoma de PRRS

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System Joan K. Lunney, et. al. 2016

Los cerdos son el único huésped natural conocido de PRRSV; además, tiene un tropismo muy restringido para las células del linaje monocítico. El macrófago alveolar porcino completamente diferenciado sirve como un objetivo celular primario para la infección por PRRSV [6]. Las células dendríticas también son compatibles con la replicación del virus [7]. De manera experimental, entre las diferentes líneas celulares analizadas, solo la línea celular MA-104 de riñón de mono verde africano y los derivados, como MARC-145, son totalmente permisivos para la replicación *in vitro* de PRRSV [8].

## Replicación

El PRRSV ingresa a las células huésped a través de la endocitosis mediada por clatrina estándar. El genoma viral se libera en el citosol después de la acidificación del endosoma y la fusión de la membrana [9]. La entrada viral mediada por el receptor se ha estudiado ampliamente y se ha determinado que

CD163 es el principal receptor que media la internalización viral y el desmontaje [10]. Se sabe que la sialoadhesina (CD169) puede servir como receptor para mediar la internalización viral a través de la interacción con los ectodominios de heterodímero GP5 / M [11]. Sin embargo, en ratones knockout del gen CD169 se demostró que no se requiere una sialoadhesina intacta (CD169) para la inserción y/o la internalización del PRRSV [12]. Mediante la selección de una biblioteca de ADNc de macrófagos porcinos para determinar la función del receptor, se identificó a CD163, un miembro de la familia rica en cisteína del receptor *scavenger*, como un factor clave en el inicio de la infección por PRRSV. La sobreexpresión de CD163 hace que una variedad de líneas celulares no permisibles sean susceptibles a la infección por PRRSV [13]. Dos proteínas estructurales menores, GP2a y GP4, se determinaron como proteínas de unión viral que median la entrada del virus en las células huésped susceptibles al interactuar con CD163.

Tras la entrada de endocitosis mediada por receptor y desensamblaje, la traducción del genoma produce poliproteínas replicasa pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas se escinden mediante proteinasas internas virales para generar al menos 14 proteínas no estructurales, que se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC). El RTC primero se involucra en la síntesis de ARN de cadena negativa para producir tanto ARN de una sola hebra de longitud completa como de cadena subgenómica (sg). Posteriormente, los ARNm sg sirven como plantillas para la síntesis de los ARNm sg de cadena positiva necesarios para expresar los genes de proteínas estructurales que residen en el cuarto proximal 3' del genoma. Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides que se envuelven al brotar de membranas intracelulares lisas. Los nuevos viriones se liberan de la célula utilizando la vía exocítica (Figura 2).

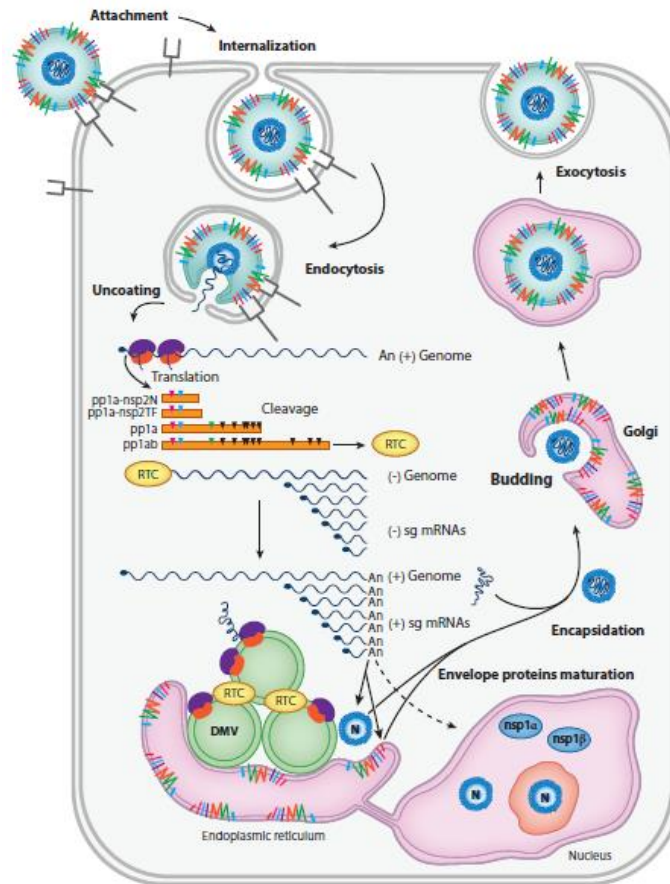


Figura 2. Ciclo de replicación del virus de PRRS

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System Joan K. Lunney, et. al. 2016

## RESPUESTA INMUNE

### Respuesta Inmune Innata dirigida contra PRRSV

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en contra de una infección; en el caso de PRRSV, los macrófagos presentes en pulmón, así como las células dendríticas, son cruciales para prevenir la invasión del virus al torrente sanguíneo e inducir una respuesta inmune adaptativa protectora.

Típicamente, el PRRSV provoca una respuesta innata deficiente, que se asocia a una eliminación viral incompleta en la mayoría de los cerdos, lo cual depende de diferentes factores como son la edad y el estado inmunológico en el que se encuentren los cerdos al momento de la infección [14, 15]; además, ciertas cepas de PRRSV inducen la supresión de la actividad citotóxica de las células NKs y

disminuyen la secreción de citocinas de la respuesta innata [16]. Por otra parte, la infección por PRRSV típicamente es pobre inductora de interferones tipo 1 y los niveles de éstos se mantienen bajos a lo largo del curso de la infección, lo cual se ha notado en cerdos que han sido infectados por diferentes aislados. Esto demuestra que PRRSV modula la respuesta inmune innata a través de la desregulación de la función de las células NKs y la producción de INF1 [17]. Por otra parte, nuevos estudios han mostrado como las nuevas cepas altamente virulentas tienen la capacidad de modular de manera diferente la respuesta inflamatoria hacia una respuesta Th1 en el pulmón [18].

## **Macrófagos**

Los macrófagos alveolares porcinos (PAM, por sus siglas en inglés) se han estudiado ampliamente durante la infección por PRRSV como el objetivo celular primario del virus.

La clasificación de los macrófagos, según su estado de activación, se ha definido en términos generales como M1 y M2, Los macrófagos M1 (también denominados macrófagos activados clásicamente) se caracterizan por responder a Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), lipopolisacárido y/o Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), producen citocinas proinflamatorias, destrucción directa de patógenos intracelulares por medio de fagocitosis de células infectadas y promueven un entorno Th1 local. Los macrófagos M2 (también conocidos como macrófagos activados alternativamente) representan un fenotipo más diverso y se caracterizan por su participación en las respuestas inmunes tipo 2. El cambio a un fenotipo M1 o M2 se ha asociado con un control transcripcional específico [19]. Se ha demostrado que el IRF5 del factor de transcripción controla el fenotipo M1 en estudios humanos y murinos, y dicta la producción de citocinas proinflamatorias en estas células [20]. Los macrófagos son altamente plásticos y, durante la enfermedad inflamatoria pulmonar, son capaces de ajustar su actividad y desarrollar fenotipos mixtos en respuesta al microambiente local. Es importante destacar que los datos que definen el paradigma M1 / M2 se basan

principalmente en estudios *in vitro* que utilizan monocitos aislados de sangre periférica y se debe tener cuidado al extrapolar la actividad fenotípica de estos estudios de cultivo celular al estado de activación durante la progresión de la enfermedad y dentro de las vías respiratorias de los pacientes.

Los macrófagos infectados con PRRSV están funcionalmente comprometidos de muchas maneras, incluyendo la producción de citocinas [21, 22] y su polarización [23]. Recientemente, se han mostrado los datos que utilizan diferentes aislamientos de PRRSV-2 los cuales sugieren que la polarización de los macrófagos modula la infección por PRRSV [21]. La expresión de citocinas antivirales fue significativamente mayor en los macrófagos M1 que en los macrófagos M2 o en los controles no polarizados, y la replicación del PRRSV (CH-1a) altamente patogénica (HP) (HuN4) y PRRSV clásica (CH-1a) se vio afectada significativamente en los PAM M1 [23]. Además, en la infección HP PRRSV PAM (JXwn06), los genes que participan en las vías de señalización relacionadas con el IFN, las citocinas proinflamatorias, la fagocitosis, presentación y el procesamiento del antígeno disminuyeron significativamente, lo que indica la función aberrante de los PAM durante la infección [24]. En particular, durante la infección temprana por cepas HP, la regulación negativa del IFN $\beta$  parece estar mediada por una inhibición postranscripcional a través de la regulación positiva de los miRNAs celulares. Esta inhibición es mayormente inducida por cepas HP cuando se compara con una cepa de baja patogenicidad (LP) [25]. Durante la infección temprana, se ha informado que el PRRSV-2 induce la expresión y la secreción del ARNm de IL1 $\beta$  de manera dependiente del tiempo y la dosis, según lo mediado por la vía TLR4/MyD88 y por la vía NLRP3 [26, 27]. El efecto inhibitorio apareció solo en la infección tardía, donde los niveles de mRNA pro-IL1 $\beta$  y procaspasa-1 y la proteína IL1 $\beta$  madura disminuyeron al nivel del grupo de infección simulada. Se ha reportado que un antagonista de IL1 $\beta$ , la nsp11, y su actividad endoribonucleasa, son los responsables de mediar este efecto [26].

## **NK y células T $\gamma\delta$**

Pocos trabajos han estudiado las células NK y T $\gamma\delta$  durante la infección por PRRSV. En un estudio canadiense que utilizó una infección experimental con PRRSV-2 (LHVA-93-3), el grupo de Magar investigó la persistencia del virus en la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos y las amígdalas. Los autores discriminaron entre diferentes subconjuntos de células T CD8+, y también entre células NK. Definieron las células NK como CD2+ CD8low y MIL4+, y no se modificaron significativamente en el bazo y la sangre durante la infección, a pesar de un aumento transitorio en el bazo a 3 días post infección (dpi), seguido de una disminución gradual hasta 60 dpi. Sin embargo, las células NK rara vez se presentaron en las amígdalas y en los ganglios linfáticos mediastínicos, y aumentaron solo a los 3 días pi. Por lo tanto, parece que las células NKs no se modificaron significativamente durante la infección por PRRSV-2 [28].

Con el prototipo VR-2332 en lechones libres de gérmenes, la proporción de células T $\gamma\delta$  y NK disminuyó en el lavado bronquioalveolar (BAL) y solo aumentó el subconjunto de CD2+ CD8 $\alpha$ + T $\gamma\delta$ . Los ganglios linfáticos traqueobronquiales y mesentéricos no mostraron diferencias en las frecuencias de NK y T $\gamma\delta$ , pero el subconjunto CD2+ CD8 $\alpha$ + aumentó junto con una disminución proporcional en el subconjunto CD2-CD8 $\alpha$ - [29].

En otro estudio en que cerdas jóvenes fueron inoculadas experimentalmente dos veces con PRRSV-2 MN-30100 y se monitorizaron las subpoblaciones de linfocitos, la proliferación específica de antígeno y la producción de IFN $\gamma$  se observó que tras la exposición primaria a PRRSV, el porcentaje de células T $\gamma\delta$  circulantes periféricas aumentó desde el día 14 hasta el día 70, y luego disminuyó hasta niveles similares del porcentaje del grupo control a los 120 días. Las células T $\gamma\delta$  respondieron a la infección por PRRSV significativamente cuando se compararon con CD4+ en una etapa temprana y fueron las principales productoras de IFN $\gamma$  en todo el estudio [30].

Más recientemente, la interacción entre células NK y PAM infectados con PRRSV se investigó *in vitro*. El ensayo de citotoxicidad de NK se realizó utilizando células NK enriquecidas como células efectoras y PAM infectados con PRRSV-1 de Lelystad como diana. La citotoxicidad de NK contra los PAM infectados con PRRSV disminuyó, desde las 6 horas post-infección (hpi) hasta las 12 hpi. El PRRSV inactivado por UV también suprimió la actividad de NK, pero mucho menos que el PRRSV infeccioso, y la incubación conjunta con PAM infectados inhibió la degranulación de las células NK. Al usar el sobrenadante de PAM infectados, los datos mostraron que el efecto supresor del PRRSV en la citotoxicidad NK no estaba mediado por factores solubles [31]. Sucesivamente, Cao *et al.*, todavía consideró la participación de las células NK y  $\gamma\delta$  durante un estudio de vacunación con una vacuna MLV recombinante que se incorporó con el gen porcino IL15 o IL18 fusionado a una señal que puede anclar las citocinas a la membrana celular. En este caso, la inmunización mejoró las respuestas de las células NK y  $\gamma\delta$  y confirió una protección mejorada contra el desafío heterólogo (NADC20) [32].

Incluso con un número limitado de estudios, los datos indicaron que la interacción de las células NK y  $\gamma\delta$  durante la infección por PRRSV se altera con un efecto supresor de NK y la modulación de las células  $\gamma\delta$  durante el curso de la infección. En particular, esto es relevante cuando se considera que las células  $\gamma\delta$  son una fuente importante de IFN $\gamma$  durante la infección por PRRSV.

### **Células Dendríticas (DC)**

El papel de las DC en una infección por PRRSV ha sido controvertida en la última década, debido principalmente a los diferentes sistemas de generación de DC *in vitro* y la variabilidad intrínseca del virus.

DC convencional (cDC) y DC derivada de monocitos (moDC)



Se han utilizado varios virus PRRSV-1 y 2 al infectar DC, lo que muestra cómo los diferentes resultados también están relacionados con las diferentes cepas y la multiplicidad de infección (MOI) utilizada en el sistema *in vitro*. En general, existe un claro acuerdo en la comunidad científica con respecto a la capacidad del PRRSV de infectar productivamente moDC (células dendríticas derivadas de monocitos) *in vitro*, a pesar de las divergencias cinéticas que están relacionadas con los diferentes MOI y el tiempo empleado [33, 34, 35, 36, 37, 38] y la varianza entre moDC inmaduros y maduros [39] o los niveles de proliferación de ciertas cepas de PRRSV [40].

Los datos inconsistentes con respecto a la infección por PRRSV de otros subconjuntos de DC son notables cuando se consideran DC pulmonar y traqueal primarias. De hecho, una publicación reciente que usa DC pulmonar primaria, que se generó con tratamiento enzimático y con un fenotipo DC poco claro, mostró que el virus PRRSV-1 Lelystad (LV) podía infectar DC pulmonar de manera más eficiente en cerdos de la raza Duroc que en aquellos de raza Pietrain [41]. Por otro lado, estudios de Loving *et al.*, en el 2007 resultados más recientes de Resendiz *et al.*, Y Bordet *et al.*, en el 2018, se demostró que la DC primaria pulmonar y traqueal no puede soportar la replicación de PRRSV-1 y 2 [34, 35, 42, 43]. En el estudio realizado por Loving *et al.*, las DC de pulmón se generaron mediante separación por gradiente de densidad y la selección de CD11c+, y el desafío con la cepa PRRSV-2 NADC-8 no los infectó [35]. En el estudio de Bordet *et al.*, PRRSV-1 LV, Flanders13 y Lena no infectaron, *in vivo* o *in vitro*, a las células dendríticas pulmonares cDC1, cDC2 y moDC solo alguna infección residual fue observada [42]. Siguiendo la misma línea de resultados, cDC1 y cDC2 traqueales no fueron susceptibles a PRRSV-2 CIAD008 [43].

Finalmente, los estudios más recientes sobre la interacción entre DC y PRRSV se han centrado en las vías intracelulares y el transcriptoma. Chen *et al.*, muestran la participación de diferentes proteínas virales en la expresión de CD83. Se ha descrito que CD83 y las proteínas virales (N, nsp1, nsp10) afectan al promotor CD83 de una manera dependiente del tiempo y la dosis a través de las vías de

señalización de NFkB y Sp1. PRRSV estimula la expresión de ARNm de Sp1 y NFkB y NSp1 $\alpha$  deteriora la función de moDC que libera CD83 soluble. La infección por PRRSV inhibe la expresión de TAP1 y ERp57 (proteínas del complejo MHC) mediante la inducción de CD83 soluble y una capacidad deteriorada para estimular la proliferación de T [44,45].

### **Respuesta Inmune Adquirida**

La infección con PRRSV estimula una respuesta de anticuerpos entre 7 y 9 días post infección (dpi) pero sin evidencia de protección contra la infección por PRRSV. Los anticuerpos neutralizantes séricos (NAbs) aparecen más tarde, típicamente > 28 dpi [46, 47]. Los ensayos de suero comerciales típicamente miden anticuerpos anti-proteína N; éstos aparecen temprano pero no neutralizan y no se correlacionan con la protección [48, 49]. Los esfuerzos más recientes han demostrado que los anticuerpos anti-nsp también aparecen temprano después de la infección [50, 51].

Los posibles mecanismos responsables de producción retardada de los NAbs incluyen los efectos de protección de los glucanos de la glicosilación ligada a N [52]; presencia de un epítipo de señuelo inmunodominante en GP5 río arriba del epítipo neutralizante [53]; potenciación dependiente de anticuerpos de la entrada viral en células diana [54]; supresión de las respuestas inmunes innatas [55]; y prevención del desarrollo del repertorio de células B normales [56].

La infección mejorada y la replicación del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en presencia de anticuerpos específicos se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, un fenómeno conocido como mejora dependiente de anticuerpos (ADE). Se considera que ADE es un obstáculo significativo para el desarrollo de vacunas efectivas para muchos virus para los cuales se ha informado ADE, ya que los anticuerpos específicos de virus de origen materno o aquellos conferidos por la vacunación pueden facilitar la entrada del virus en las

células objetivo, lo que a veces resulta en una mayor gravedad de la enfermedad [54].

La inmunidad a través de la exposición natural o la vacunación proporciona solo una protección limitada contra el desafío secundario. La producción de niveles protectores de NAb generalmente requiere múltiples vacunas o infecciones repetidas. Además, las NAb suelen ser homólogos o específicos para la cepa viral componente de la vacuna, con títulos menores/nulos de anticuerpos neutralizantes heterólogos [57, 58]. Robinson *et al.*, [59] encontraron que los sueros de cerdas previamente infectadas contra diversas cepas de PRRSV tenían altos niveles de NAb. En la actualidad, la identificación de epítomos específicos de NAb está en curso; por ejemplo, Lee y colaboradores. [60] exploraron la inmunización utilizando una forma doble hipoglicosilada inactivada de GP5 con un adyuvante, dando como resultado una reducción de las lesiones pulmonares y la carga de ARN viral, e indujo títulos más altos de NAb en cerdos con virus homólogos. Tribble *et al.*, [61] han identificado un aminoácido único en la proteína M asociado con una amplia actividad de neutralización.

Se sabe que después de la infección de los cerdos con el PRRSV, hay un rápido aumento de los anticuerpos no neutralizantes (NNA) específicos para el PRRSV, mientras que los NAb son detectables después de 3 semanas de la infección [53].

Para caracterizar los epítomos neutralizantes, seleccionaron los fagos de una biblioteca de presentación de fagos de 12 aminoácidos utilizando el anticuerpo monoclonal neutralizante anti-PRRSV (MAb) ISU25-C1. Además, los fagos portadores de péptidos reconocidos por anticuerpos de cerdo con alto título de seroneutralización se aislaron después de restar de la biblioteca los clones que se unen al suero de cerdo anti-PRRSV sin actividad neutralizante. En su estudio, identificaron dos epítomos localizados en el ectodominio de PRRSV GP5. Uno de estos epítomos, lo llamaron epítomo B, el cual fue reconocido tanto por la neutralización de MAb ISU25-C1 como por el suero neutralizante de cerdos (NS)

pero no por el suero no neutralizante de cerdos (NNS), lo que indica que es un epítopo neutralizante [53]. El epítopo B es secuencial, se conserva entre aislamientos y no es inmunodominante. Los anticuerpos dirigidos contra él se detectan en el suero, en tiempos tardíos después de la infección. En contraste, el otro epítopo, al que llamaron epítopo A, resultó ser hipervariable e inmunodominante. Los anticuerpos contra él aparecieron temprano después de la infección con PRRSV. Este epítopo fue reconocido por NNA porcino, pero no se reconoció por neutralizar MAb ISU25-C1 o suero porcino NA, lo que indica que no está involucrado en la neutralización por PRRSV. Concluyeron entonces que, durante la infección con PRRSV, el epítopo A puede actuar como un señuelo, provocando la mayoría de los anticuerpos dirigidos a GP5 y retrasando la inducción de NAb contra el epítopo B durante al menos 3 semanas [53].

### **PRRS y Modulación de la Respuesta Inmune**

Las células NK son células linfoides de la respuesta innata que ayudan a la eliminación inespecífica de cualquier célula infectada por virus. En los cerdos más jóvenes, las células NK son de tamaño pequeño a mediano y carecen de gránulos intracelulares adecuados [62]. Así, a pesar de tener una mayor frecuencia de células NK, estos lechones tienen una actividad citotóxica reducida por parte de estas células. Se ha demostrado que la infección con ciertas cepas de PRRSV induce una supresión significativa de la actividad citotóxica de las células NK [63, 64]. Sorprendentemente, esto se notó desde el día dos pi [65] y continuó durante tres a cuatro semanas [63]. Otro estudio observó una actividad reducida de las células NK con aislamientos de campo (MN184 y NM 1-18-2), la cepa de la vacuna viva modificada adaptada en laboratorio (MLV) (VR2332) y MLV-PRRS administrada por vía parenteral o intranasal; esos cerdos también tenían niveles bajos de secreción de IFN $\alpha$ . La reducción en la citotoxicidad de células NK inducida por PRRSV es independiente de la frecuencia de las células NK [63, 66] porque, a pesar del hecho de que la frecuencia de las células NK volvió a niveles normales después de unas pocas semanas de infección por PRRSV, eso no cambió su función citotóxica suprimida, lo que sugiere que PRRSV moduló la

actividad citotóxica de las células NK [63]. La regulación de la función de las células NK durante las infecciones virales está coordinada por múltiples citocinas, principalmente Interferones tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ) [67]. La actividad citolítica basal deteriorada de las células NK, a pesar de la presencia de números normales de células NK, está mediada a través de la vía STAT1.

La infección por PRRSV es un inductor deficiente de IFN $\alpha$ , y su nivel permanece bajo a lo largo del curso de la infección, como se ha visto en cerdos infectados con distintos aislados de campo [68, 69]. Se ha demostrado que la estimulación de IFN $\alpha$  *in vitro* está regulada a la baja principalmente por proteínas no estructurales virales (nsp1, 2, 4, 11) [70]. En un estudio que incluyó 50 cerdos infectados con PRRSV mantenidos en condiciones de campo, la secreción de niveles bajos de IFN $\alpha$  temprano coincidió con la detección de viremia en la mayoría de los cerdos a los 2 dpi [65]. Para establecer la enfermedad clínica, el PRRSV modula la inmunidad innata del huésped a través de la desregulación de la función de las células NK y la producción de IFN $\alpha$ .

Los Arterivirus parecen haber evolucionado para escapar de la vigilancia inmune del huésped y suprimir la respuesta antiviral. El sistema de IFN tipo I es un componente clave de la inmunidad innata y representa las primeras líneas de defensa contra la infección por virus [71]. Posteriormente, las acciones antivirales de la expresión del gen estimulado por IFN (ISG) contribuyen al estado antiviral de las células [72]. Sin embargo, para PRRSV, la producción de IFN es insignificante en células infectadas, y el virus parece suprimir la cascada de IFN [73]. La base molecular para la supresión de IFN por PRRSV se ha explorado recientemente y al menos cinco proteínas virales se han identificado como un antagonista de IFN, que incluye cuatro proteínas no estructurales (nsp1 $\alpha$ , nsp1 $\beta$ , nsp2 y nsp11) y una proteína estructural (nucleocápside, N) [74,75] .

Diversos estudios han acentuado a nsp1 $\alpha$  y nsp1 $\beta$  como moduladores de IFN tipo 1 para PRRSV, y la inhibición tanto de la producción de IFN y la vía de señalización JAK-STAT (Janus Quinasa señal transductora y activadora de

transcripción) en células infectadas por virus y células de genes transfectados [74, 75]. Tanto la vía de producción de IFN mediada por IRF3 como la mediada por NF- $\kappa$ B se ven afectadas por nsp1 $\alpha$  y nsp1 $\beta$  [76, 77, 78]. Se ha demostrado que PRRSV nsp1 $\alpha$  reduce la actividad de NF- $\kappa$ B [63], y también nsp1 $\alpha$  degrada la proteína de unión al elemento sensible al AMP (CREB) (CBP) de una manera dependiente de proteasoma, lo que lleva a la supresión de la producción de IFN [79]. Por el contrario, el PRRSV nsp1 $\beta$  degrada karyopherin- $\alpha$ 1 (KPNA1) y bloquea la translocación nuclear del factor 3 del gen estimulado por interferón (ISGF3) [80, 81].

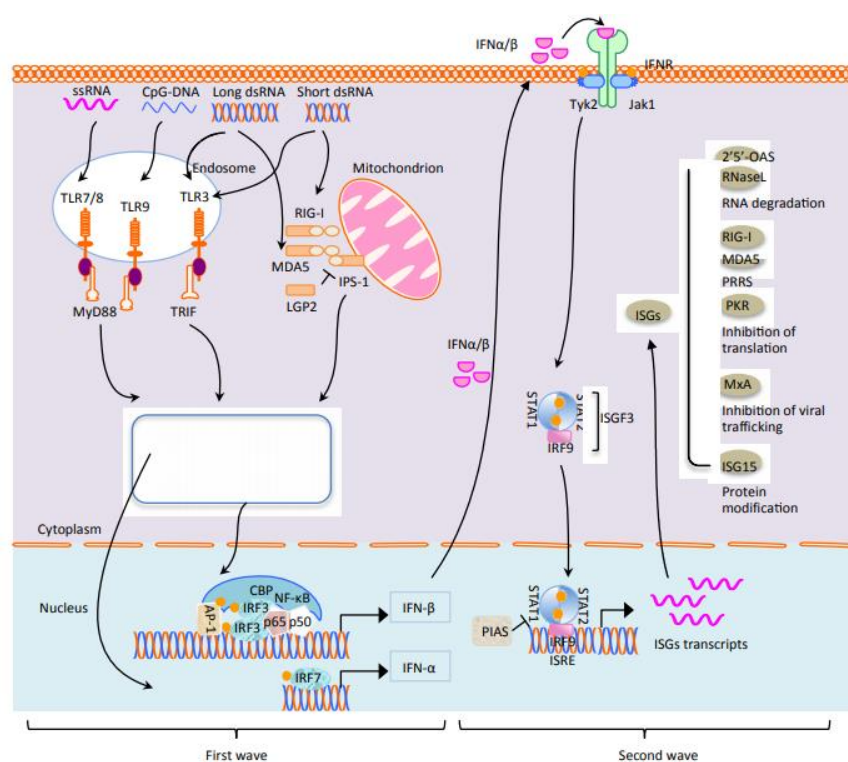


Figura 3. Vías de señalización para la producción de IFN tipo I y las expresiones génicas estimuladas por IFN. El círculo gris indica la cadena de ubiquitina unida a lisina-48 que conduce a la degradación de las proteínas. El círculo amarillo indica fosforilación. Tomado de Calvert and Yoo, 2012 [82]. Para su explicación, vea el texto.

El ARN bicatenario, el ARN monocatenario y el ADN CpG son reconocidos por TLR3, TLR7 / 8 y TLR9, respectivamente, en los endosomas, lo que conduce a la dimerización de los receptores y al reclutamiento de TRIF o MyD88. La estimulación da como resultado el ensamblaje de complejos de señalización y el inicio de cascadas de señalización que conducen a la fosforilación y activación de

IRF3 / IRF7, NF- $\kappa$ B y AP-1. Una vez activados, estos factores de transcripción se translocan al núcleo y, junto con la CBP, inducen la transcripción de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . La activación de RIG-I / MDA5 por ARN viral puede ser inhibida por LGP2. Tanto RIG-I como MDA5 activan IPS-1 a través del dominio CARD. IPS-1 luego induce vías de señalización que resultan en la activación de IRF3, IRF7 y NF- $\kappa$ B a través de diferentes adaptadores y quinasas. La señalización IPS-1 también implica probablemente la cascada de MAP quinasa para la activación de AP-1. La señal nuclear de IRF3 / IRF7, NF- $\kappa$ B y AP-1 es similar a la de TLR. Una vez que IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  se secretan extracelularmente fuera de la célula después de la producción, se unen a los receptores de IFN en sí mismo (autocrino) o células vecinas (paracrino), la quinasa JAK1 asociada al receptor se fosforila y se activa para reclutar STAT1 y STAT2 a través de su Dominio SH2 para fosforilación. Los STAT1 y STAT2 fosforilados se separan de los receptores de IFN y se asocian entre sí para formar complejos ISGF3 junto con IRF9. ISGF3 luego se somete a translocación nuclear y se une a ISRE para inducir la transcripción de cientos de ISG (Figura 3) [82].

## **VACUNAS**

### **Vacunas comerciales**

Existen distintas vacunas comerciales, las más utilizadas en México y el mundo, se caracterizan por usar al virus completo de PRRS, ya sea un virus activo modificado, atenuado o inactivado. Este tipo de vacunas han demostrado proteger a los cerdos ante el desafío contra virus homólogos, sin embargo, son muy reactivas y la mayor preocupación es su reversión a virulencia, además de que, al haber viremia de campo en la producción, existan mecanismos de recombinación entre los virus [83]. Además, la protección otorgada por estas vacunas de virus completo, no otorgan protección ante el desafío contra virus heterólogos [84]. También se ha visto que la respuesta que inducen es tardía, lo que confiere una protección parcial al momento de que los animales enfrentan al virus de campo [85].

## **Vacunas experimentales**

Las vacunas experimentales de PRRS se basan principalmente en vacunas subunitarias, en donde se expresan proteínas estructurales en vectores [86], algunos ejemplos son:

### *Sistema de expresión en baculovirus*

Se han usado sistemas de baculovirus recombinantes para expresar proteínas estructurales de PRRSV como posibles vacunas subunitarias, pero la efectividad de tales vacunas en cerdos es limitada [87]. Un baculovirus recombinante que expresa simultáneamente la proteína GP5 del PRRSV marcada con histidina y la proteína de la cápside PCV2 indujo una respuesta de proliferación de linfocitos, niveles significativamente mayores de anticuerpos específicos de GP5 y de la cápside anti-PCV2, además de un aumento de los títulos de Nab en cerdos [87]. Junto con PRRSV GP5, un baculovirus recombinante que expresaba GP3 etiquetado con His6 indujo un aumento significativo en las respuestas humoral y de linfocitos en ratones, pero en cerdos la respuesta fue solo ligeramente mayor en comparación con una vacuna comercial inactivada [88]. Cuando las proteínas GP3, GP5 y N recombinantes expresadas en baculovirus se utilizaron, individualmente o en combinación, para inmunizar cerdas preñadas, las proteínas GP3 y GP5 confirieron 68% y 50% de protección contra la exposición a PRRSV, respectivamente, mientras que la proteína N no fue protectora [89]. Esta evaluación se basó, en el número de lechones sanos nacidos vivos, en el momento del destete [71]. La duración y el nivel de inmunidad limitados, y la incapacidad para inducir una protección heteróloga pueden limitar la efectividad de las vacunas de subunidades expresadas en baculovirus. Según los datos disponibles, el enfoque de la vacuna de subunidad basada en baculovirus no parece ser muy prometedor para el desarrollo de una vacuna eficaz contra el PRRSV.



### Sistema de expresión en plantas

Las plantas transgénicas proporcionan un sistema de vector alternativo rentable y escalable para la producción y el suministro de una vacuna contra PRRSV. Las proteínas GP5, M y N se han expresado de manera recombinante en plantas como el tabaco [90, 91], el plátano [92], el maíz [93], la semilla de soja [94] y la papa [95]. La subunidad de enterotoxina B lábil de *E. coli* (LTB) se coexpresó con la proteína GP5 del PRRSV como una proteína de fusión LTB-GP5 en hojas de plantas de tabaco. Los cerdos recibieron tres dosis por vía oral de LTB-GP5, desarrollando anticuerpos específicos para PRRSV [90]. Tras la exposición, los cerdos vacunados presentaron niveles significativamente más bajos de viremia, una carga viral menor en tejidos pulmonares y lesiones pulmonares menos graves en comparación con los cerdos alimentados con hojas de tabaco no modificadas [90]. La proteína GP5 de PRRSV también fue expresada en hojas de plátano transgénicas, y cuando se administró a cerdos, se indujo la producción de anticuerpos anti-PRRSV IgG e IgA en suero y saliva [92]. Tras el desafío, se observó una reducción significativa de la viremia y las cargas de ARN viral en los tejidos en cerdos inmunizados fueron menores en comparación con los animales del grupo control, que fueron alimentados con hojas de plátano [92]. Las vacunas experimentales a base de plantas tienen los mismos inconvenientes que las vacunas subunitarias expresadas en baculovirus; son estudios de eficacia limitada, ya que no se determinó si protegían ante un desafío heterólogo. Sigue sin conocerse si la alimentación oral repetida de hojas de plantas recombinantes inducirá tolerancia oral. Todavía existen obstáculos reglamentarios para la eventual concesión de licencias de vacunas de PRRSV basadas en plantas. Por lo tanto, aún quedan desafíos importantes para el desarrollo de una vacuna basada en plantas contra el PRRSV.

### Sistema de expresión en adenovirus

Las proteínas GP5, M y N de PRRSV se expresaron en células HEK-293 (células de embrión humano de riñón) utilizando vectores adenovirales de tipo 5 humano

(hAdV) que son defectuosos en la replicación. Los cerdos inoculados con la construcción hAdV/GP5 provocaron una respuesta de anticuerpos anti-PRRSV GP5 [96]. En otro estudio, la rAd defectuosa en la replicación que expresa las Vproteínas de fusión de PRRSV GP3-GP5, GP4-GP5 y GP3-GP4-GP5 se construyeron y usaron para inmunizar ratones. Cada grupo de ratones desarrolló niveles significativamente más altos de títulos de Nab anti-PRRSV y respuestas de proliferación linfocítica más fuertes en comparación con los ratones inmunizados con vectores rAd que expresan glicoproteínas virales individuales [97]. Desafortunadamente, no se informaron experimentos de inmunización similares con rAd en cerdos. Sin conocer la inmunogenicidad y la eficacia protectora de estas construcciones rAd en cerdos, es difícil evaluar el valor de este enfoque para el desarrollo de la vacuna PRRSV.

#### Sistema de expresión en poxvirus

Se han evaluado vectores poxvíricos para la administración de la vacuna PRRSV [98]. Ankara (MVA) del virus vaccinia modificado recombinante que expresa las proteínas GP5 y M del PRRSV individualmente (rMVA-GP5 y rMVA-M) o como una proteína de fusión GP5-M (rMVA-GP5-M) bajo el mismo promotor o por separado bajo dos promotores ( rMVA-GP5 /M) fueron construidos. Los ratones inoculados con rMVA-GP5-M provocaron fuertes respuestas celulares y humorales anti-PRRSV, pero los ratones inoculados con rMVA-GP5 y rMVA-M no indujeron ninguna respuesta detectable [98]. En otro estudio, se construyeron dos virus de la viruela aviar recombinante que expresan PRRSV GP3 y GP5 con o sin la expresión de IL-18 porcina (rFPV-ORF5-ORF3 y rFPV-IL-18-ORF5-ORF3) [99]. Los cerdos vacunados con rFPV-ORF5-ORF3 y rFPV-IL-18-ORF5-ORF3 desarrollaron anticuerpos anti-PRRSV específicos, así como respuestas de proliferación de anticuerpos y linfocitos T. De manera similar, los cerdos vacunados expuestos a PRRSV virulento tuvieron una temperatura corporal significativamente más baja, niveles más bajos de viremia y una carga de ARN viral menor en los ganglios linfáticos bronquiales en comparación con los controles no vacunados [99] . El nivel relativamente bajo de inmunidad y el nivel

insuficiente de protección, como se demostró en cerdos, disminuyeron el entusiasmo por un mayor desarrollo de estos vectores no replicantes como vacunas PRRSV.

### Vacunas de DNA

Las proteínas GP5 y M son proteínas estructurales que forman un heterodímero en su estado nativo y estas proteínas han sido el foco de muchos estudios de vacunas de ADN [86]. Se hicieron tres construcciones de ADN que expresan GP5 solo (pCI-ORF5), M solo (pCI-ORF6) o GP5 y proteínas M simultáneamente (pCI-ORF5 / ORF6) [84]. Los ratones vacunados con pCI-ORF5 / ORF6 provocaron respuestas de proliferación de linfocitos y anticuerpos Nab específicos que fueron mayores que los ratones vacunados con pCI-ORF5 o pCI-ORF6 [100]. Una vacuna candidata que contiene genes PRRSV GP5 y M (pSFV-ORF5m / ORF6) provocó anticuerpos específicos de Nab y respuestas proliferativas de linfocitos con protección parcial contra un ataque viral en cerdos [101], lo que indica la posible utilidad de este concepto. Las vacunas basadas en el ADN tienen el mismo inconveniente que los otros enfoques (subunitarias y vacunas vectorizadas no replicantes) en las que la naturaleza heterogénica del PRRSV no se abordó adecuadamente. El futuro de las vacunas de ADN PRRSV sigue siendo poco claro desde el punto de vista de la eficacia.

## **ANTECEDENTES**

La poca información con relación a la diversidad de cepas de PRRS circulantes en México aunado a la baja relación antigénica que guardan con las vacunas comerciales actualmente en uso y las cepas virales circulantes en campo evidenciada por la poca eficacia de estas vacunas, crearon la necesidad de buscar y aislar diferentes cepas de PRRSV circulantes en México, obtener la secuencia genética de las mismas, analizarlas y predecir epítopes “candidatos” para ser utilizados como antígenos en vacunas [102] con el fin de desarrollar

vacunas específicas capaces de combatir la infección de cepas que circulan específicamente en el país.

Los anticuerpos desempeñan un papel clave en el organismo huésped, ya que reconocen específicamente los antígenos y actúan directamente o desencadenan más respuestas inmunitarias contra él [103]. La unión de un anticuerpo a su blanco suele ser muy específica, lo que significa que un anticuerpo solo puede reconocer una cierta parte del antígeno. Se sabe que los anticuerpos interactúan con su objetivo a través de una parte definida de su estructura, llamada "parátipo", que consiste en aminoácidos contenidos en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El blanco, a su vez, también tiene una pequeña parte de su estructura, llamada "epítipo", que es reconocida por el parátipo [104, 105]. Por lo tanto, un epítipo es una pequeña secuencia de aminoácidos que permite la interacción con el parátipo a través de interacciones no covalentes (es decir, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, etc.). En principio, hay dos tipos posibles de epítipos: lineales y conformacionales. El primer tipo se caracteriza por aminoácidos que están muy cerca uno del otro en la secuencia de la proteína (generalmente entre una secuencia de 4 a 30 aminoácidos), mientras que el último contiene aminoácidos que están alejados entre sí en la estructura primaria, pero muy cerca de la estructura terciaria o cuaternaria [106, 107].

Desde al año 2012 a la fecha nuestro grupo de investigación ha obtenido diferentes aislados de virus de PRRS procedentes de distintas regiones de la República Mexicana con la finalidad de obtener su secuencia genética y su posterior caracterización y similitud entre las cepas circulantes en el país y con las cepas circulantes en todo el mundo [5]. Al menos se han obtenido 20 secuencias genéticas y su análisis filogenético indicó que se encuentran ubicados en 3 diferentes clados (o regiones) según la clasificación de Shi [108]. Por medio de estudios bioinformáticos, se hizo la predicción de epítopes con la finalidad de buscar la expresión de aquellos que puedan ser utilizados como componentes de una vacuna eficaz contra cepas de virus de PRRS circulantes en México [102].

En este sentido, para la predicción de los epítomos candidatos para el desarrollo de una vacuna con el uso de herramientas bioinformáticas y ensayos serológicos, se identificaron los epítomos conservados de la proteína GP5 de secuencias mexicanas del Betaarterivirus suid 2 y determinaron cuáles son los epítomos más antigénicos. Se obtuvieron un total de 183 secuencias: 20 obtenidas en el Laboratorio del DMZC, 162 más disponibles en el GenBank y la secuencia de referencia VR-2332 de la proteína (No. De acceso U87392). Las secuencias fueron analizadas en una serie de pasos con diferentes programas bioinformáticos disponibles en la web. El primer paso del análisis fue el alineamiento de las 183 secuencias para la identificación de las zonas conservadas y las zonas variables dentro de las secuencias utilizadas [102].

Con el análisis de toda la información obtenida, se eligieron nueve secuencias distribuidas dentro de la proteína sin considerar los dominios transmembranales. Como segundo paso, para cada una de las nueve secuencias se analizaron sus variantes, es decir, las mutaciones que presentaba esa misma región en las 183 secuencias estudiadas. Al final, de las nueve secuencias, con sus respectivas mutaciones resultaron 66 epítomos diferentes para ser analizados [102].

### **Elección de epítomos**

De manera muy general, para la elección de los epítomos candidatos se tomaron en consideración los siguientes criterios:

- 1) La región candidata dentro de todas las secuencias debe de estar conservada. Esto se considera importante, ya que al elegir zonas conservadas se estará asegurando que cubra la diversidad genética de PRRS en México.
- 2) Al menos tres programas de predicción de epítomos deben de estimar la misma región.
- 3) El punto de corte para los epítomos arrojados debe de ser mayor a 0.7, ya que, en un punto más bajo, las predicciones pueden ser incorrectas.
- 4) El índice antigénico debe ser significativo.

Al final del análisis exhaustivo solo cuatro epítomos cumplieron las características mencionadas anteriormente. Estos epítomos tienen un grado de conservación  $\geq$  al 95%, con lo que se cumple lo descrito por el autor Welner *et al.*, 2017 en utilizar epítomos altamente conservados.

Una vez identificados los epítomos candidatos, se seleccionaron para ser evaluados por ensayos serológicos (ELISA) utilizando 100 sueros de cerdos provenientes de Jalisco, Guanajuato, Sonora, Michoacán y Yucatán con la finalidad de saber cuál o cuáles epítomos son mayormente antigénicos para las cepas circulantes en México. Para este fin, los epítomos fueron sintetizados como péptidos lineales para utilizarse como antígeno de placa (“péptidos epitópicos”). Posteriormente se estandarizó, para cada uno de los péptidos epitópicos seleccionados, un ELISA de tipo indirecta para evaluar la antigenicidad de cada uno de ellos [102].

Los péptidos seleccionados fueron:

#### *Péptido epitópico 1*

El epítomo 1 se encuentra localizado en la región C- terminal, con lo cual, según la descripción de la proteína, este epítomo no se encuentra expuesto, se tiene una buena detección de anticuerpos dirigidos hacia el epítome y tiene un grado de conservación del 99.4%.

#### *Péptido epitópico 3*

El epítomo 3 se encuentra localizado en la región C- terminal, con lo cual, según la descripción de la proteína, este epítomo no se encuentra expuesto; se logra una detección de anticuerpos para este epítome y cuenta con un grado de conservación del 97.7%.

#### *Péptido epitópico 35*

El epítomo 35 se encuentra localizado en la región del ectodominio de la proteína GP5, con lo cual se encuentra expuesto en el virión y abarca un aminoácido que

está N-glicosilado. En este epítope, se pudo tener una detección un poco más alta de anticuerpos, lo cual puede estar asociado a que se encuentra expuesto. Tiene un grado de conservación del 94.8%.

#### *Péptido epitópico 40*

El epítope 40 se localiza en el ectodominio de la proteína GP5 con lo cual está expuesto, además abarca un aminoácido glicosilado en N51. Se tiene una detección de anticuerpos mayor que el resto, siendo éste el de valor más alto. Esto puede deberse a que se encuentra expuesto en la proteína y es un blanco importante para los anticuerpos del huésped y tiene un grado de conservación del 96.8%.

Por otra parte, las proteínas no estructurales NSP1 y NSP11 se eligieron como candidatos para el desarrollo de una vacuna recombinante debido a que generan anticuerpos desde etapas tempranas de la infección y persisten durante la misma y cuentan con mecanismos de evasión del virus, como la inhibición de la síntesis de IFN de tipo I, principalmente.

Para el proceso de clonación de estas dos proteínas no estructurales, lo primero que se requería era el material genético del virus, por lo cual se hizo la diferenciación de macrófagos a partir de sangre periférica de cerdos para infectarlos con VR 2332 (cepa de referencia para la vacuna comercial) y obtener una cantidad suficiente de virus vacunal. A partir de esto se obtuvo RNA para amplificar los fragmentos específicos de las proteínas NSP1 y NSP11 por PCR punto final para ver que funcionaran. Después se hizo el proceso de clonación en un vector (plásmido de bacteria), al cual se le agregaron enzimas de restricción. Se llevó a cabo un proceso de digestión para abrir el vector y pegar el fragmento de cada una de las proteínas (uno para NSP1 y otro para NSP11). Una vez que se obtuvo la nueva construcción, se transfectó a células competentes para la expresión y después se purificó para poder obtener las proteínas [110].

Con la finalidad de comprobar la antigenicidad de las proteínas NSP1 y NSP11 se desarrolló un ELISA específico para cada uno de ellos. Una vez estandarizada la prueba, se obtuvieron 100 sueros de diferentes regiones del país, en donde 50 sueros eran positivos a PRRS (determinado por el KIT ELISA UNAM) y los otros 50 eran negativos, de tal forma que se pudiera evaluar la antigenicidad de los péptidos y proteínas candidatos, y los resultados indicaron que la sensibilidad de estos antígenos es mayor, ya que se reconocieron sueros positivos para estas proteínas que en un principio habían sido negativos para el ELISA UNAM [109].



## CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### JUSTIFICACIÓN

Si bien existen vacunas comerciales disponibles en México para ayudar en el control del PRRS, continúan habiendo inquietudes acerca de la seguridad de las vacunas MLV (virus activo modificado). Las vacunas activas modificadas actuales solo están etiquetadas para su uso en hatos porcinos positivos para PRRS, y no se recomiendan para hatos que nunca han sido expuestos al virus de campo. Además, existe un creciente impulso para considerar la eliminación o erradicación regional del PRRSV, que requerirá vacunas que no puedan propagarse a los no vacunados, así como persistir dentro de los rebaños durante largos períodos de tiempo. Se podrían utilizar vacunas de PRRSV inactivadas, pero tales vacunas deben ofrecer una eficacia más robusta y una protección cruzada heteróloga más amplia que la actual generación de vacunas de PRRSV.

En México, las vacunas comerciales son vacunas importadas, que son generadas con distintas cepas, las cuales, la mayoría de las veces, no coinciden con las cepas circulantes en México. Como ya se mencionó con anterioridad, la inmunidad a través de la exposición natural o la vacunación proporciona solo una protección limitada contra el desafío secundario. La producción de niveles protectores de NAb generalmente requiere múltiples vacunas o infecciones repetidas. Además, las NAb suelen ser específicas para la cepa de la vacuna (homóloga), con títulos menores/sin títulos de anticuerpos neutralizantes (heterólogos) [27, 28]. Ante este panorama, el desarrollar una vacuna cuya formulación sea la utilización de antígenos provenientes de cepas de PRRS circulantes en México, es de vital importancia, ya que de esta forma se asegura de que la protección generada por la inmunización sea contra estas cepas y al momento del desafío en campo, la respuesta sea favorable. El generar una vacuna recombinante con epítomos inmunogénicos, en la que la respuesta

humoral y celular generada sea segura, es decir, no exista viremia y los efectos secundarios de ésta, supone la vacuna ideal, ya que se tendría la eficacia y seguridad que se busca en la industria porcina.

## **HIPÓTESIS**

Una vacuna recombinante contra PRRSV compuesta de antígenos específicos de las cepas circulantes en México induce una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular efectiva.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Describir la respuesta inmune inducida por los antígenos componentes del prototipo de vacuna recombinante del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV).

### **Objetivos específicos**

1. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por las proteínas no estructurales 1 y 11 y los péptidos de GP5 en modelo murino.
2. Evaluación de la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por las proteínas no estructurales 1 y 11 y los péptidos de GP5 en modelo murino.

## CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

---

### **PARA EL OBJETIVO 1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO.**

#### **Animales y esquema de inmunización**

Se emplearon ratones de la cepa BALB/cAnN, originarios de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (UMB-IIB), hembras de entre 6-8 semanas de edad, que se mantuvieron dentro del bioterio durante el experimento, con acceso a comida y agua ad libitum. El número de aprobación otorgado por el Subcomité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE) para este trabajo es SICUAE.MC-2021/3-1.

Con la finalidad de realizar la descripción de la respuesta inmune humoral y celular que inducen los péptidos y proteínas no estructurales del PRRSV se formaron los siguientes grupos de estudio: el grupo 1 fue inmunizado con la proteína NSP11; el grupo 2 fue inmunizado con la proteína NSP1, el grupo 3 con el antígeno de la vacuna comercial (Ingelvac MLV®) y el grupo 4 con el péptido 40. Cada grupo fue administrado en presencia o ausencia del adyuvante Montanide™ ISA 70 y empleando distintas dosis del antígeno como se muestra en la Tabla 1.

Los ratones recibieron dos inmunizaciones por vía subcutánea en la base de la cola administrando un volumen final de 200  $\mu$ L por ratón, con un lapso de tiempo de 15 días entre cada una de ellas. Para la preparación de los inmunógenos con adyuvante, se tomó la cantidad correspondiente del antígeno disuelto, 1 o 10  $\mu$ g en el caso de las proteínas NSP1 y NSP11, y 10 o 100  $\mu$ g en el caso del péptido

40, en volumen final de 100  $\mu$ L de SSI que posteriormente se mezcló con 100  $\mu$ L del adyuvante Montanide. En el caso de los grupos que no recibieron adyuvante se tomó la cantidad de antígeno correspondiente a la dosis a recibir disuelto en volumen final de 200  $\mu$ L de SSI. En el caso del grupo control, se administraron 200  $\mu$ L de SSI por ratón.

Tabla 1. Grupos formados con los inmunógenos candidatos a vacuna

Dosis en $\mu$ g	Con adyuvante (Montanide ISA 70)			Sin adyuvante		
	1	10	100	1	10	100
NSP 11	5	5			5	5
NSP 1	5	5			5	5
Vacuna Comercial	5	5			5	5
Péptido 40		5	5		5	5
Control	-	-	-	-	-	-

### Toma de muestras

Previo al manejo de los ratones, todos fueron marcados en la oreja para la correcta identificación individual de cada uno de ellos. Se obtuvo sangre antes de iniciar el ensayo y posteriormente en intervalos de quince días a partir de la primera inmunización para determinar la presencia en suero de anticuerpos (Ab) específicos contra cada uno de los inmunógenos empleados.

La primera toma de muestra se realizó un día antes de la primera inmunización (denominado basales); la segunda toma de muestra se realizó un día antes de recibir la segunda dosis (15 días posteriores a la primera inmunización; tiempo 1 (T1)); la tercera toma de muestra se realizó a los 30 días posteriores a la primera inmunización (tiempo 2, T2) y una cuarta toma de muestra se realizó a los 45 días

posteriores a la primera inmunización (y 30 días posteriores a la segunda inmunización; tiempo 3 (T3)).

### **Estandarización de ensayo de ELISA para evaluar la respuesta inmune humoral**

Para realizar la descripción de la respuesta inmune humoral inducida por los distintos inmunógenos en ratones conforme a la Tabla 1, se determinaron los niveles de anticuerpos a través de un ELISA indirecto sensibilizando la placa de 96 pozos con cada uno de los péptidos o proteínas candidatos a componentes de la vacuna.

El primer paso a seguir fue realizar la estandarización de las condiciones de cada uno de los ELISA siguiendo la siguiente metodología. Se sensibilizó con el antígeno correspondiente, ya sea el de la vacuna, las proteínas NSP11 y NSP1, o el péptido 40, los cuales se diluyeron para alcanzar la concentración deseada en una solución de buffer de carbonatos (3.8 g de  $\text{NaHCO}_3$  + 1.92 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; pH=9.6). En cada caso se evaluaron distintas condiciones de antígeno, suero y conjugado como se muestra en la Tabla 2. En general, se comenzó sensibilizando las placas con distintas concentraciones del antígeno en cuestión y se incubó durante 18 horas a 4°C. Pasado ese tiempo se hicieron 3 lavados con 250  $\mu\text{L}$ /pozo de solución Tween al 0.3% (preparado con PBS 1x y Tween 20). El siguiente paso fue bloquear la placa 200  $\mu\text{L}$ /pozo de solución PBS-BSA al 1% y su posterior incubación a 37°C durante una hora. Transcurrido el tiempo, se repitieron los 3 lavados descritos anteriormente y se procedió a colocar distintas diluciones de los sueros basales y de los sueros procedentes de ratones inmunizados con el antígeno correspondiente; en este sentido, se emplearon los sueros del tiempo T2 (100  $\mu\text{L}$ /pozo) durante 1 hora a 37°C. Después de este tiempo se volvió a lavar 3 veces con 250  $\mu\text{L}$ /pozo de solución Tween al 0.3% y se colocó el conjugado anti-ratón IgG acoplado a fosfatasa alcalina (AP) hecho en cabra (ZyMax™ Cat. 81-6522) en la dilución correspondiente en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ /pozo, diluyendo el anticuerpo secundario en una solución PBS-BSA al 1%

(preparado con albúmina de suero bovino, BSA por sus siglas en inglés y solución PBS 1x) y se incubó a 37°C durante una hora. Cumplido el tiempo, se lavó la placa 3 veces con 250 µL/pozo de solución Tween al 0.3%. Finalmente, se colocó el sustrato de fosfatasa (Sigma-Aldrich Cat. S094), el cual se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1 pastilla de 5 mg de para-nitrofenilfosfatasa por cada 5 ml de diluyente). El diluyente utilizado es una solución buffer de dietanolamina. Para determinar el tiempo de lectura, se realizaron cinéticas de tiempo realizando lecturas en diferentes intervalos de tiempo desde los 5 minutos hasta los 30 minutos, para poder detectar los anticuerpos sin que se detectara respuesta inespecífica en los pozos control (BLANCO). Las distintas condiciones evaluadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para el antígeno de la vacuna de PRRS (Ingelvac MLV®)

Sensibilización	0.1 µg/pozo		1 µg/pozo									
Diluciones del suero (grupo con adyuvante)	1:100	1:50	1:100	1:50	1:50	1:25	1:25	1:50	1:100	1:25	1:50	1:100
Diluciones del conjugado	1:10 000		1:10 000		1:2500		1:5000			1:7500		

En el caso de las proteínas no estructurales NSP1 y NSP11 las condiciones para la estandarización del ELISA son descritas en las Tablas 3 y 4, siguiendo la metodología anteriormente mencionada.

Tabla 3. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para la proteína NSP11

Sensibilización	1 µg/pozo		0.1 µg/pozo								
Diluciones del suero (grupo con adyuvante)	1:100	1:50	1:100	1:200	1:100	1:200	1:100	1:200	1:100	1:200	
Diluciones del conjugado	1:2500		1:2500		1:5000		1:5000			1:7500	

Tabla 4. Condiciones probadas para la estandarización del ELISA para la proteína NSP1

Sensibilización	0.1 µg/pozo		
Diluciones del suero (grupo con adyuvante)	1:100		
Diluciones del conjugado	1:2500	1:5000	1:7500

Para estandarizar el ensayo de ELISA empleando el péptido 40 asociado a la placa se emplearon las condiciones de la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones probadas para estandarizar el ELISA para el péptido 40

	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:500	1:600	1:750	1:800	1:1000	1:2500	1:5000
1:2000	X	X										
1:4000	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
1:5000		X	X	X	X	X	X	X				
1:7500				X	X	X	X	X				
1:10,000						X		X				

\*Las diluciones del suero se representan en la primera fila, mientras que las diluciones del conjugado se representan en la primera columna.

\*\*La cruz en rojo representa las condiciones que se decidió utilizar para correr los resultados de todos los sueros obtenidos.

## **PARA EL OBJETIVO 2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO.**

Para realizar la evaluación de la respuesta proliferativa se tomó en cuenta los resultados obtenidos de la respuesta humoral, y se inmunizaron ratones con la dosis que indujo los mejores niveles de anticuerpos para cada proteína, quedando conformados como se ilustra en la Tabla 6. Los ratones fueron inmunizados en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSab) en San Luis Potosí, S.L.P., ya que en el IBB no había ratones disponibles debido a la cuarentena por la pandemia. Los ratones recibieron dos dosis en un intervalo de 15 días y después de quince días de recibir la segunda inmunización, los ratones se sangraron a blanco y se obtuvieron los bazos con la finalidad de evaluar la

respuesta inmune celular inducida por los distintos tratamientos y comparándolos entre ellos utilizando citometría de flujo como metodología de evaluación.

Para esto, se utilizó el marcador Cell Trace Far Red™ (Invitrogen Cat. C34572) para medir la proliferación inducida por cada uno de los tratamientos; además, las células fueron marcadas con los anticuerpos para linfocitos  $\alpha$ -CD4 (eBioscience™ clona GK1.5) y  $\alpha$ -CD8 (Biolegend® clona Ly-2) y se capturaron en el citómetro Attune NxT ubicado en la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Tabla 6. Grupos de animales empleados para la evaluación de la respuesta proliferativa

Grupos	Adyuvante Montanide ISA 70	
	-	+
SSI	3	
NSP1 (10 $\mu$ g/ratón)	3	3
NSP11 (10 $\mu$ g/ratón)	3	3
Vacuna (10 $\mu$ g/ratón)	3	3

\*Los inmunógenos se administraron en dos ocasiones con un intervalo de quince días entre cada uno, preparándose conforme a lo descrito anteriormente.

### Obtención de bazo

A cada ratón se le realizó la dislocación cervical como método de eutanasia previo a la extracción del bazo. El siguiente paso fue retirar el pelaje de los animales cercano a la zona de incisión en el costado izquierdo del animal, y se realizó una desinfección con etanol al 70%, introduciendo finalmente al animal dentro de la campana de flujo laminar. Bajo técnica aséptica, se realizó una incisión vertical de aproximadamente 1.5 cm en el cuadrante abdominal superior izquierdo, justo por debajo de las costillas. Cuidadosamente se extrajo el bazo, tratando de eliminar la mayor cantidad de tejido conectivo y/o adiposo que estuviera adherido a él. El



bazo se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 ml (Falcon®) con 2 ml de medio de transporte Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640 Sigma-Aldrich Cat. R7388) adicionándole 1% penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich P4333). Las muestras fueron tomadas en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSab) en San Luis Potosí, S.L.P. y transportadas en hielo a la Ciudad de México para ser procesadas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el Departamento de Inmunología.

### **Ensayo de proliferación celular de esplenocitos**

Una vez recibidos los bazos, éstos se transfirieron a otro tubo con 3 mL de medio RPMI (Cat. 22400 GIBCO). El siguiente paso fue macerar cada bazo sobre una caja petri de 35 mm con malla nylon de 150 µm empleando el émbolo de una jeringa. La suspensión celular se transfirió a tubos cónicos de 15mL y se colocaron en hielo hasta su centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se tiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 3 mL de solución de lisis de eritrocitos. A continuación, se incubaron durante 5 minutos en hielo, agitando constantemente, para después adicionar medio RPMI sin suplementar (3 veces el volumen de la solución de lisis). Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 mL de RPMI suplementado (Cat. 22400 GIBCO) con 1% de Penicilina-Estreptomicina, 10% suero fetal bovino. Finalmente se realizó el conteo de las células en la cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:1 con azul tripano dentro de la campana.

Una vez que las células se contaron, un total de  $6 \times 10^6$  esplenocitos por cada ratón se tiñeron con el colorante Cell Trace Far Red (Molecular Probes) a una concentración final de 1 µM en 100 µL durante 20 minutos a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se adicionó medio RPMI con suero fetal frío para detener la reacción y las suspensiones celulares se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Finalmente, las células se ajustaron a  $2.0 \times 10^6$  células/mL con RPMI suplementado.

Se realizó el cultivo celular en placas de 24 pozos, colocando 1 mL de la suspensión celular de cada ratón por triplicado y a cada pozo se adicionó 1 mL del medio del cultivo que contenía el tratamiento para estimular. Para cada tratamiento se utilizó como control positivo de proliferación, Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich Cat. C5275) en concentración 2.5 µg/mL. En el caso del control negativo, únicamente se colocó el medio de cultivo y como muestra experimental el propio antígeno con el cual fueron inmunizados los ratones en concentración 10 µg/mL. En el caso del grupo control, cada ratón fue estimulado con NSP1, NSP11 o vacuna comercial.

Las placas se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 días. Posteriormente para recuperar las células las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se colocaron sobre hielo y se recuperaron los sobrenadantes de cultivo en tubos cónicos con tapa de 1.5 ml (tipo eppendorf) los cuales se encontraban previamente etiquetados y se resguardaron a -70°C. A cada pozo se le adicionó 100 µL de PBS con 5% de suero fetal y se pasaron a una placa de 96 pozos para su tinción con los anticuerpos anti-CD4-FITC o anti-CD8 PerCP-Cy5.5 durante 20 minutos a 4°C. Las células finalmente se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS con 1% formaldehído para ser capturadas en el citómetro Attune NxT.

En el citómetro de flujo se capturaron 10,000 eventos de la región correspondientes a linfocitos en el gate FSC vs SSC y los resultados se analizaron con el programa FlowJo V10.

### **Estudio estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos de la respuesta humoral se realizó una ANOVA paramétrica seguida de una prueba t no pareada para la comparación de las medias utilizando el programa GraphPad Prism 7 con una  $p < 0.05$ . Para la respuesta proliferativa se empleó la misma estrategia, pero empleando una prueba no paramétrica.

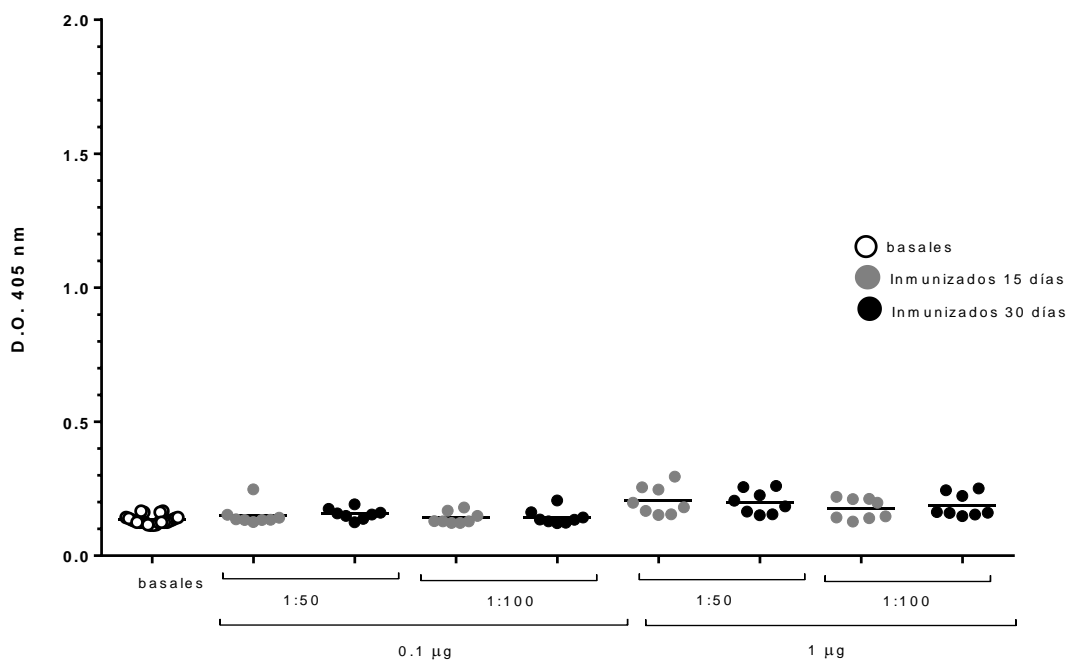
## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### DEL OBJETIVO 1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO.

#### Estandarización de ELISAS

##### Detección de Anticuerpos específicos contra la Vacuna Comercial

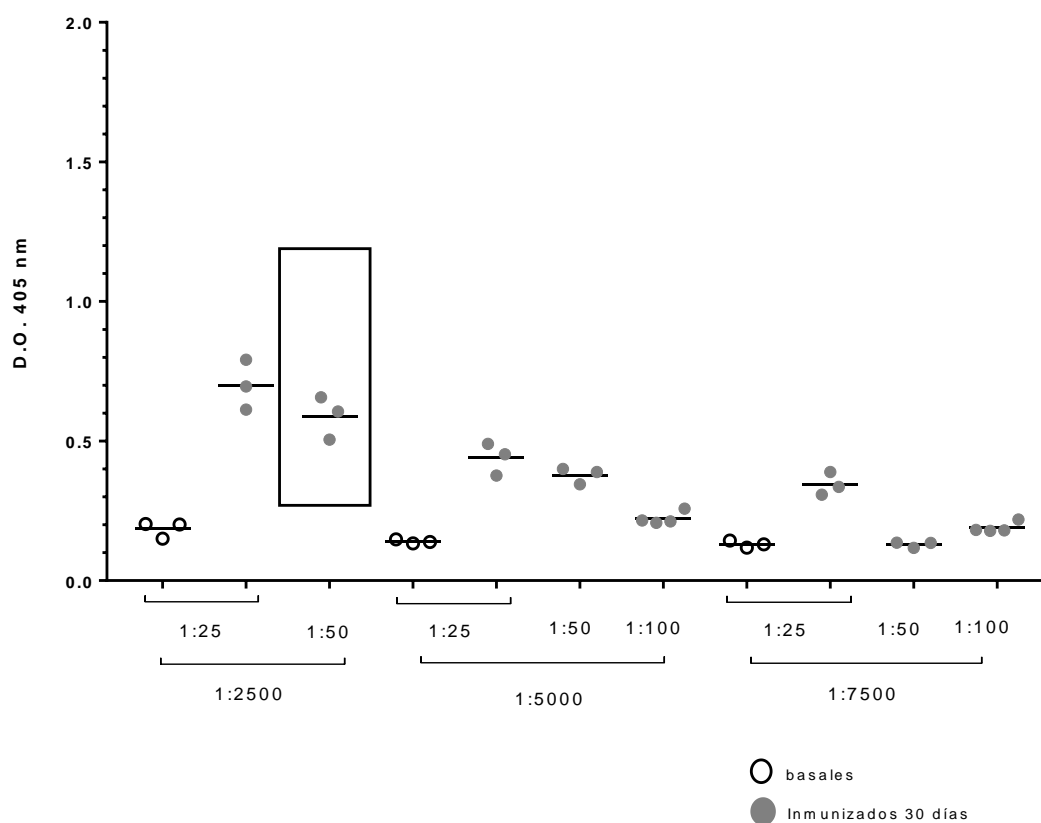
Para realizar la estandarización del ensayo de ELISA cuya finalidad es detectar anticuerpos inducidos por la vacuna, se empleó el antígeno de la vacuna comercial de PRRRS (Ingelvac MLV®), utilizando dos concentraciones de Antígeno para la sensibilización de las placas, 0.1 y 1 µg/pozo, las diluciones de suero probadas fueron 1:50 y 1:100 y el anticuerpo secundario se utilizó en dilución 1:10000.



**Figura 4.** Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la Vacuna Comercial de PRRSV

Como se muestra en la Figura 4, con ambas concentraciones de antígeno utilizadas para sensibilizar la placa, no se logró detectar densidades ópticas (D.O.) que sugirieran la detección de anticuerpos IgG, en ninguna de las concentraciones de sueros (1:50 ó 1:100) y del anticuerpo secundario (1:10000) utilizadas.

Al no detectar la respuesta de anticuerpos, se modificaron las condiciones variando la concentración del suero y las diluciones del conjugado. Para esto, se empleó la concentración de 1 µg/pozo del antígeno probando diferentes diluciones de suero (1:25, 1:50 y 1:100) y conjugado (1:2500, 1:5000 y 1:7500).



**Figura 5.** Optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la Vacuna

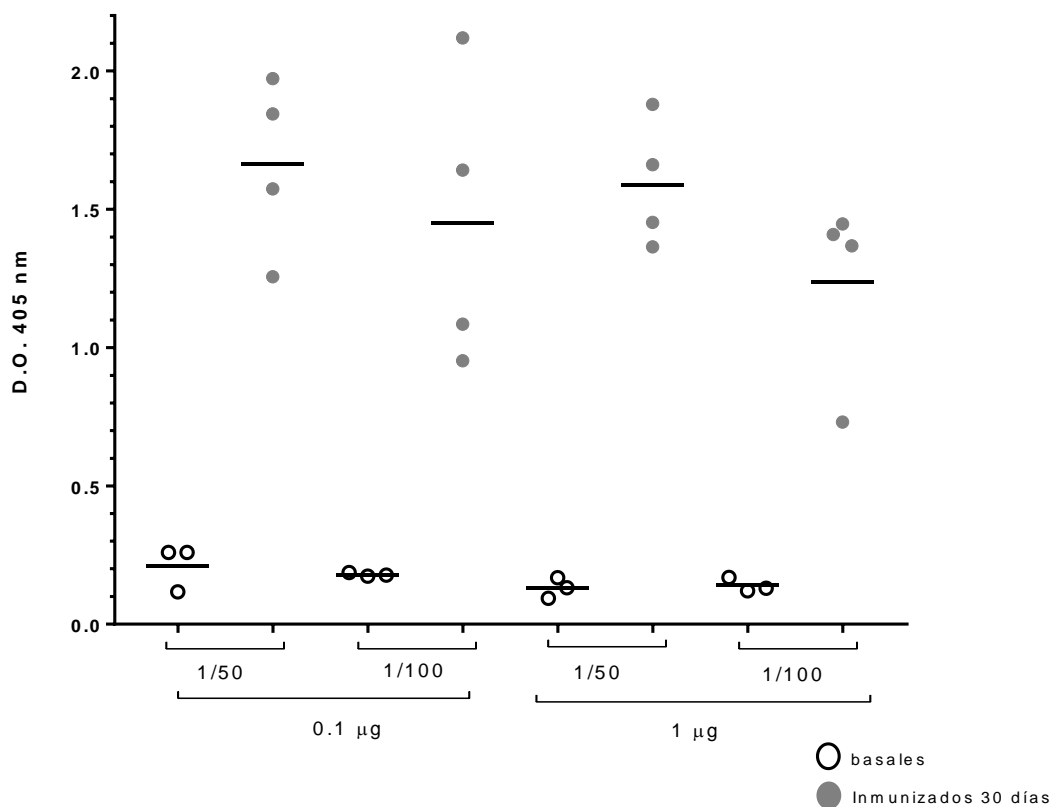
Como se puede observar en la Figura 5, las modificaciones realizadas, nos permite observar D.O. diferentes entre las distintas condiciones y sobre todo diferenciar la presencia de anticuerpos presentes en los sueros obtenidos 30 días

después de la primera inmunización en comparación a los anticuerpos presentes en los tiempos basales. Con la dilución del conjugado 1:2500 y los sueros a una dilución de 1:25 la D.O. promedio observada es de 0.7nm y con la dilución de suero 1:50 la D.O. promedio observada es de 0.6nm), . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la señal detectada entre las diluciones del suero empleada. Por otra parte, cuando modificamos la dilución del conjugado a 1:5000, la D.O. de los sueros basales es similar a la observada en la dilución de 1:2500; sin embargo, las D.O. detectadas en los sueros obtenidos 30 días posteriores a la inmunización, se observa que oscilan entre 0.4, 0.3 y 0.2, respuesta que se observa dependiente de la concentración del suero, que cambia de 1:25, 1:50 y 1:100, respectivamente. Con la dilución del conjugado 1:7500, las D.O. observadas en los sueros basales es similar a la observada en las dos diluciones de conjugado antes vistas. Cuando observamos las diferentes concentraciones de suero empleada para esta condición de conjugado, la mayor D.O. se observa cuando los sueros se encuentran a una concentración de 1:25, y decae a los niveles de los basales para las diluciones de 1:50 y 1:100 de suero. En todos los casos, las D. O. obtenidas en estas condiciones son menores a las primeras 2 condiciones probadas.

Considerando estos resultados, para determinar anticuerpos específicos inducidos por el uso de la vacuna comercial las condiciones utilizadas son de 1 µg/pozo de antígeno de la vacuna, suero en dilución 1:50, y conjugado en dilución 1:2500.

#### Detección de Anticuerpos específicos contra la Proteína NSP11

Para estandarizar las condiciones para detectar la respuesta inducida por la proteína NSP11, esta proteína se empleó en dos concentraciones diferentes para la sensibilización de las placas, 0.1 y 1 µg/pozo; en el caso de los sueros, estos se probaron en las diluciones de 1:50 y 1:100 y finalmente el anticuerpo secundario en dilución 1:2500.

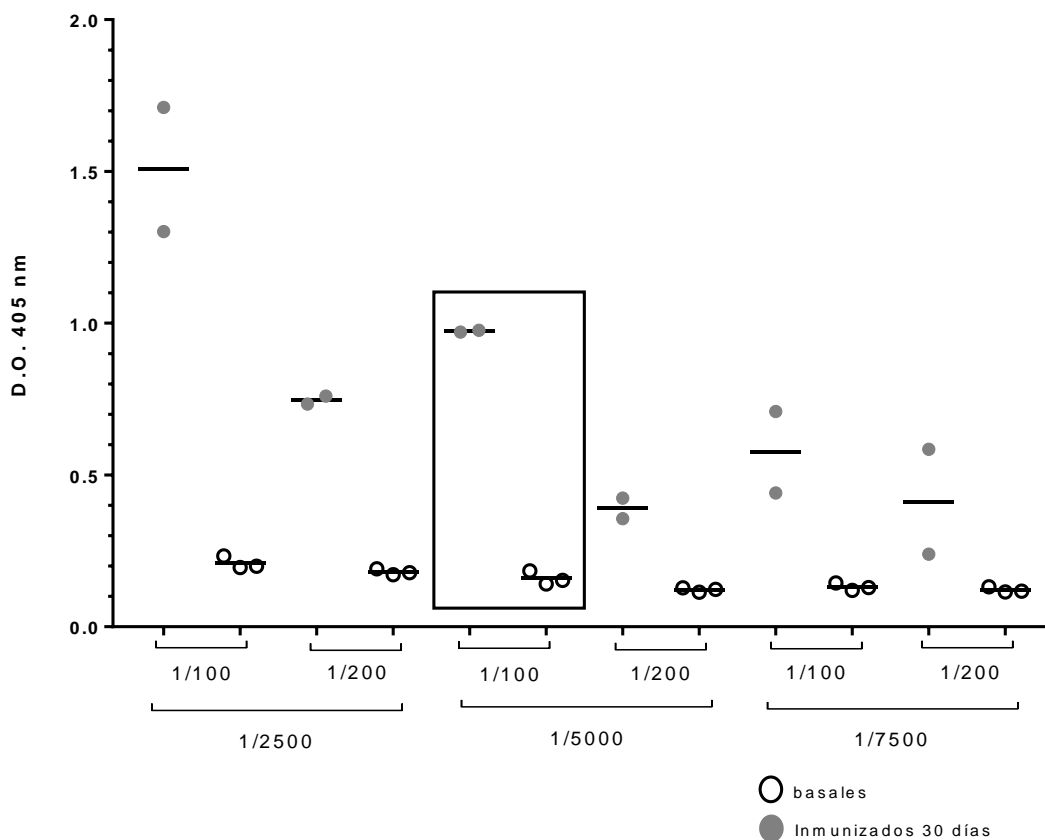


**Figura 6.** Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína NSP11 del PRRSV

Como se muestra en la Figura 6, al sensibilizar las placas con ambas concentraciones de antígeno, las densidades ópticas obtenidas, en promedio en cada condición son mayores de 1.2nm, en ambas concentración de sueros empleadas (1:50 o 1:100), utilizando una dilución de 1:2500 del anticuerpo secundario.

Al no observar diferencias significativas de la respuesta de anticuerpos al tiempo 2 (30 días), se evaluaron condiciones diferentes, modificando la concentración del suero y las diluciones del conjugado. Para lo cual se empleó la concentración de 0.1 µg/pozo del antígeno con las diluciones de suero 1:100 y 1:200, y el conjugado en las diluciones 1:2500, 1:5000 y 1:7500. Como se muestra en la Figura 7, se puede observar que al utilizar la dilución del suero 1:100 se detectan D.O. promedio por arriba de 0.9nm, utilizando la dilución del conjugado 1:2500 y 1:5000. Con la misma dilución del suero, y con la dilución del conjugado 1:7500,

la D.O. promedio fue de 0.57nm. Con la dilución del suero 1:200 pero modificando la dilución del conjugado a 1:2500, la D.O. promedio fue de 0.75nm; con la misma dilución del suero pero con la dilución del conjugado 1:5000 la D.O. promedio fue de 0.39nm y con la dilución del conjugado 1:7500 se observa un valor de 0.41nm.



**Figura 7.** Optimización de las condiciones del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la NSP11

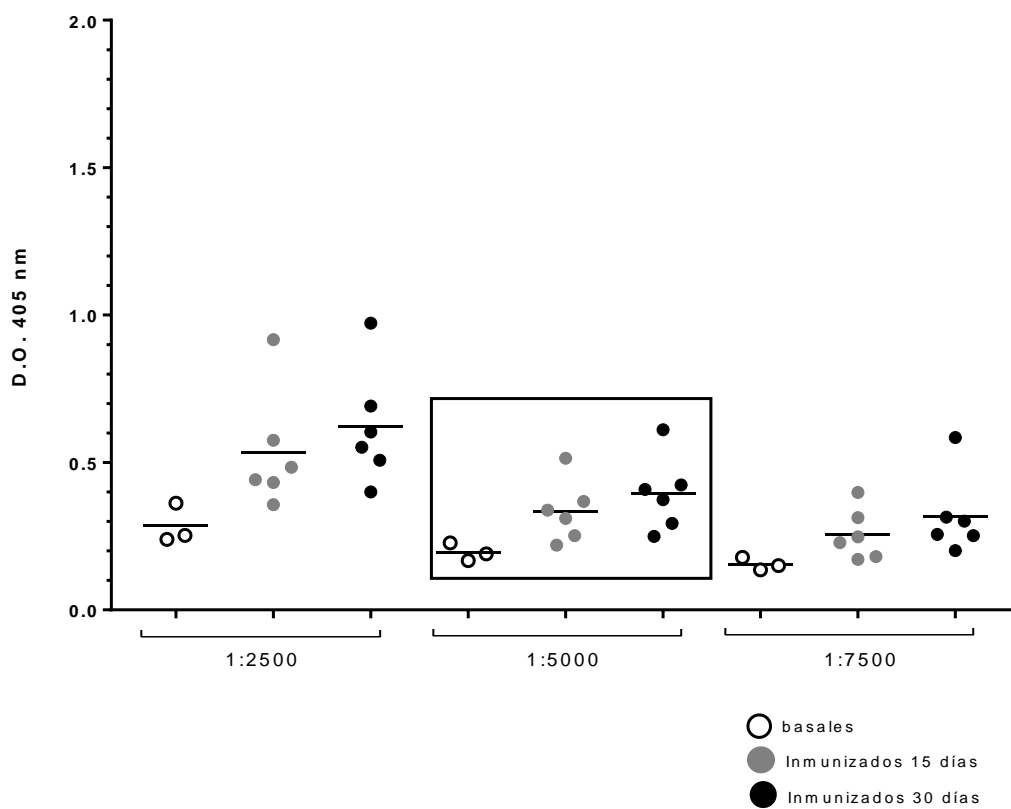
Con base en estos resultados, para determinar anticuerpos específicos de la NSP11 se decidió utilizar las condiciones de 0.1 µg/pozo de la proteína NSP11, suero en dilución 1:100, y conjugado en dilución 1:5000.

#### Detección de Anticuerpos específicos contra la Proteína NSP1

Para estandarizar la ELISA para detectar anticuerpos específicos contra la proteína NSP1 y con base a los resultados de la estandarización de la proteína NSP11, se empleó una concentración de 0.1 µg/pozo de NSP1 para la

sensibilización de la placa, una dilución de suero 1:100 y el anticuerpo secundario se probó en diluciones 1:2500, 1:5000 o 1:7500.

Como se muestra en la Figura 8, al utilizar la dilución de 1:2500 del conjugado se detectaron D.O. promedio de 0.6nm a los 30 días, y de 0.5nm a los 15 días. Con la dilución de 1:5000, se detectaron D.O. promedio de 0.33nm y 0.4nm en muestras de sueros obtenidos a los 15 y 30 días, respectivamente; finalmente con la dilución 1:7500 se detectaron D.O. promedio de 0.25nm y 0.31nm a los 15 y 30 días, respectivamente.



**Figura 8.** Establecimiento de condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína NSP1 del PRRSV

Con base en estos resultados se decidió utilizar para determinar anticuerpos específicos en contra de la proteína NSP1 las condiciones de 0.1 µg/pozo de la proteína NSP1, suero en dilución 1:100, y conjugado en dilución 1:5000.



## Detección de Anticuerpos específicos contra los Péptidos

Para la estandarización del ELISA con la finalidad de detectar anticuerpos específicos en contra de los péptidos, se decidió iniciar con el Péptido 40, ya que de los cuatro péptidos éste se encuentra expuesto. Se probaron diferentes condiciones para la estandarización de las ELISAS, las cuales se resumen en el siguiente cuadro:

	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:500	1:600	1:750	1:800	1:1000	1:2500	1:5000
1:2000	X	X										
1:4000	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
1:5000		X	X	X	X	X	X	X				
1:7500				X	X	X	X	X				
1:10,000						X		X				

**Cuadro 1:** Resumen de las condiciones para la estandarización de péptido 40. Las diluciones del suero se representan en la primera fila, mientras que las diluciones del conjugado se representan en la primera columna.

\*La cruz en rojo representa las condiciones que se decidió utilizar para correr los resultados de todos los sueros obtenidos.

En ninguna de las condiciones evaluadas se detectó la presencia de anticuerpos específicos contra el péptido 40. Incluso en el grupo de la dosis de 100 µg (dosis más alta empleada para la inmunización) con adyuvante no se observa la presencia de IgG's específicos contra el péptido. A pesar de esto, se decidió utilizar la dilución 1:500 de suero y 1:4000 de conjugado (condiciones marcadas con una cruz en rojo en el Cuadro 1\*) para realizar las ELISAS de todos los sueros de los ratones inmunizados con el péptido 40, debido a que fue bajo esas condiciones que no se detectó la señal de fondo, es decir, donde se detectó que los anticuerpos no están teniendo uniones inespecíficas a otras moléculas que no son el antígeno diana.

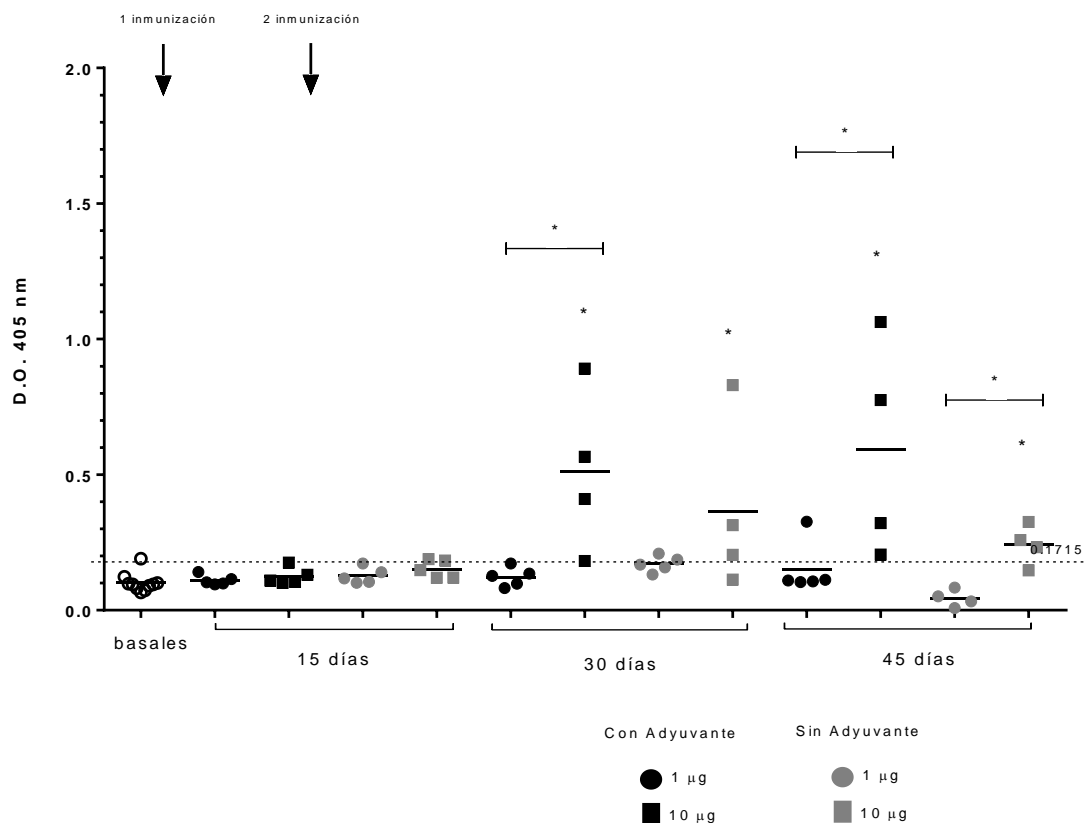
## **Determinación de los niveles de Anticuerpos Homólogos**

Después de tener estandarizado el ELISA específico para cada antígeno, se evaluó la capacidad inmunogénica humoral de cada uno de los diferentes candidatos a vacuna propuestos.

### Anticuerpos específicos inducidos por la vacuna

En la Figura 9 se muestra una línea punteada que corresponde al punto de corte para determinar la seroconversión de los ratones que recibieron la vacuna y que se obtuvo calculando el promedio de los basales y sumando dos desviaciones estándar a ese promedio.

Es evidente que se observan D.O. diferentes entre los distintos tiempos. Sin embargo, las D.O. de los sueros obtenidos 15 días posteriores a la inmunización son similares a las D.O. de los sueros en los tiempos basales (las D.O. promedio no superan el valor de 0.15nm), sin importar la dosis utilizada y si se utilizó o no adyuvante. De la misma manera, al tratarse de la dosis de 1µg/ratón, el promedio de las D.O. detectadas se encuentran en valores promedio de 0.16nm a los 30 días posteriores a la inmunización. Por otra parte, cuando modificamos la dosis a 10 µg en presencia de adyuvante, las D.O. de los sueros obtenidos a los 30 y 45 días posteriores a la primera inmunización se incrementaron, observándose valores promedio de 0.51nm y 0.59nm, respectivamente. Cabe notar que la seroconversión para este grupo fue de 100%. Finalmente, con la dosis de 10 µg sin adyuvante las D.O. observadas en los sueros obtenidos a los 30 y a los 45 días posteriores a la inmunización tienen valores promedio de 0.37nm y 0.24nm, respectivamente, con un porcentaje de seroconversión del 75%.

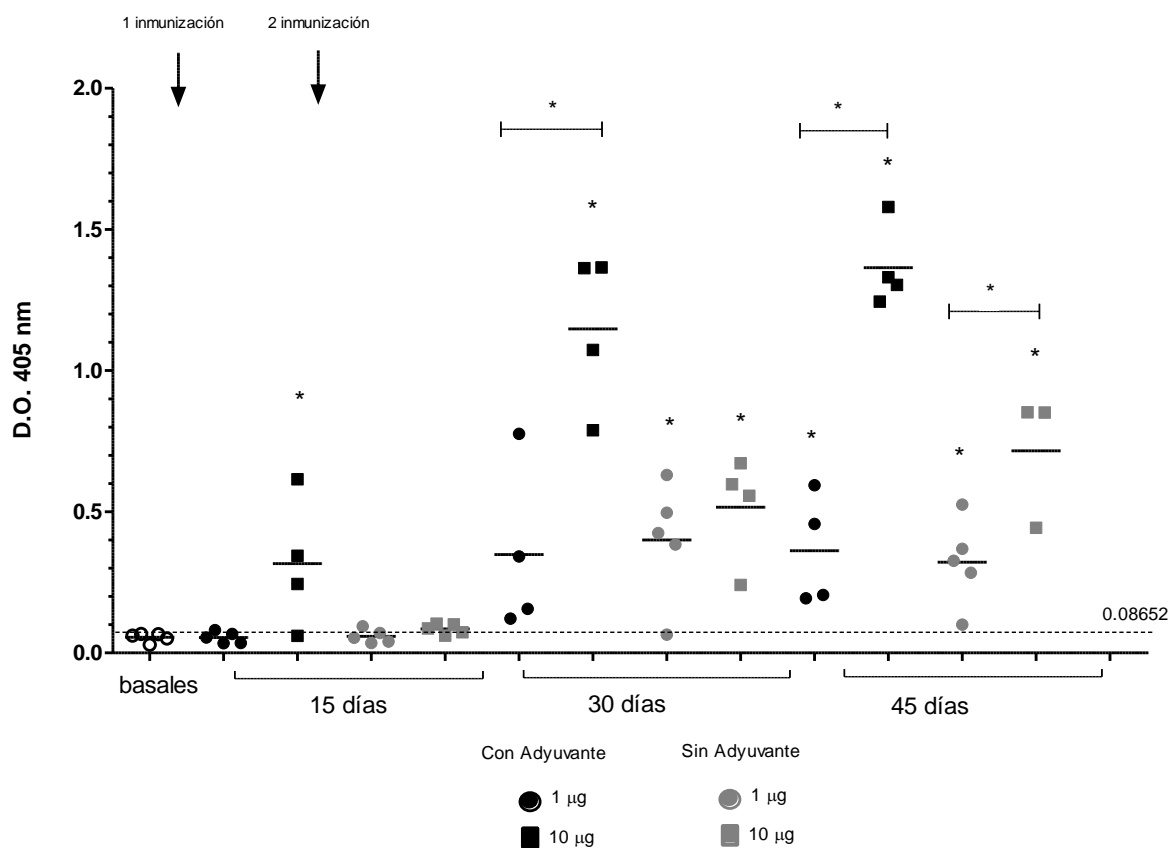


**Figura 9.** Identificación de los niveles de IgG específicos inducidos en ratones inmunizados con la vacuna de PRRS, con dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización. \*Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo inicial (basales). Las barras indican diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ )

### Detección de Anticuerpos específicos contra NSP11

Como se observa en la Figura 10, las D.O. detectadas en los sueros basales son similares a las D.O. observadas a los 15 días posteriores a la primera inmunización con valores promedio debajo del punto de corte (0.086nm), con excepción del grupo de ratones que recibió la dosis de 10 µg con adyuvante, en la cual se observa un valor promedio de 0.32nm con una seroconversión del 80%. Sin embargo, las D.O. obtenidas 30 días posteriores a la inmunización se incrementaron para todos los grupos. Con la dosis de 1 µg se detectan D.O. promedio de 0.34nm y 0.4nm con una seroconversión del 100 y 80% con adyuvante y sin adyuvante, respectivamente. Sin embargo en la dosis de 10 µg se

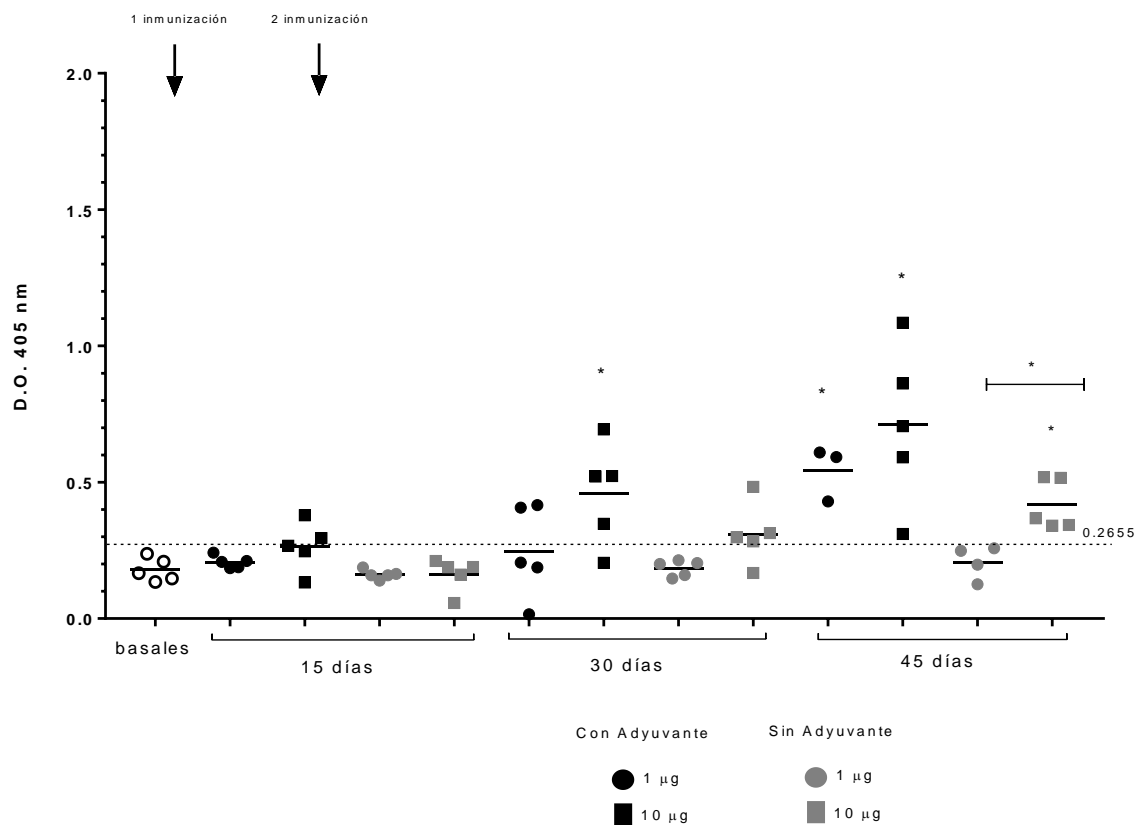
observan D.O. promedio de 1.15nm y 0.52nm con y sin adyuvante respectivamente, y una seroconversión en ambos casos del 100%. Al observar los anticuerpos específicos detectados en los sueros obtenidos a los 45 días posteriores a la inmunización, se detectan las mayores D.O, con la dosis de 10 µg con adyuvante se obtuvo una D.O. promedio de 1.37nm; esta dosis en ausencia de adyuvante obtuvo un valor promedio de 0.72nm. En el caso de las D.O. detectadas con la dosis de 1 µg, se observan valores promedio de 0.36nm y 0.32nm con adyuvante y sin adyuvante, respectivamente.



**Figura 10.** Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la proteína NSP11 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante, 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización. \*Diferencia estadística (p<0.05) con respecto al tiempo inicial (basales). Las barras indican diferencia significativa entre los grupos (p<0.05)

## Determinación de anticuerpos específicos contra la proteína NSP1

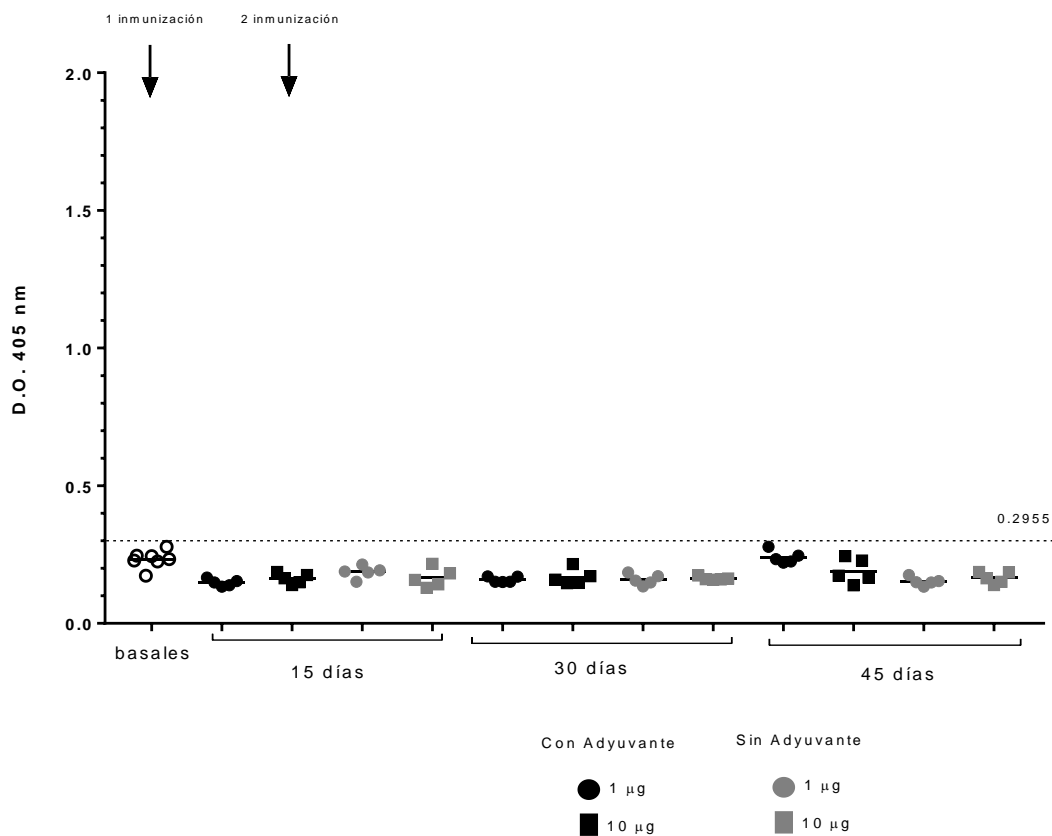
La Figura 11 muestra que las D.O. detectadas en los sueros basales son similares a las D.O. observadas a los 15 días posteriores a la primera inmunización con valores promedio por debajo del punto de corte (0.265nm) y una seroconversión del 40% solo para el grupo de ratones que recibió la dosis de 10  $\mu$ g con adyuvante. Sin embargo, en las D.O. obtenidas en los sueros de 30 días posteriores a la primera inmunización, se observa que la dosis de 1  $\mu$ g en presencia o ausencia de adyuvante no se indujo respuesta, obteniendo D.O. promedio de 0.25nm y 0.18nm, respectivamente. A diferencia de la dosis de 10  $\mu$ g en la cual se observa un ligero incremento de la respuesta con D.O. promedio de 0.46nm y 0.31nm, con adyuvante y sin adyuvante respectivamente, y en ambos casos una seroconversión del 80%. La inducción de anticuerpos se incrementa de forma significativa a los 45 días para los grupos que recibieron la proteína con adyuvante, obteniéndose un promedio de 0.54nm para la dosis de 1  $\mu$ g y de 0.71nm para la dosis de 10  $\mu$ g, con una seroconversión del 100% en ambos casos. La dosis de 10  $\mu$ g en ausencia de adyuvante mostró un ligero incremento, el cual fue significativo en los niveles de anticuerpos inducidos y una seroconversión del 100%. En el caso de las D.O. detectadas en el T3 con la dosis de 1  $\mu$ g sin adyuvante, se observan valores promedio de 0.21nm.



**Figura 11.** Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la proteína NSP1 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización. \*Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo inicial (basales). Las barras indican diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ )

#### Detección de anticuerpos específicos contra el péptido 40

En el caso del péptido 40, no se indujeron anticuerpos para ninguna de las dosis empleadas en ninguno de los tiempos evaluados, obteniéndose valores menores al punto de corte, como se observa en la Figura 12.



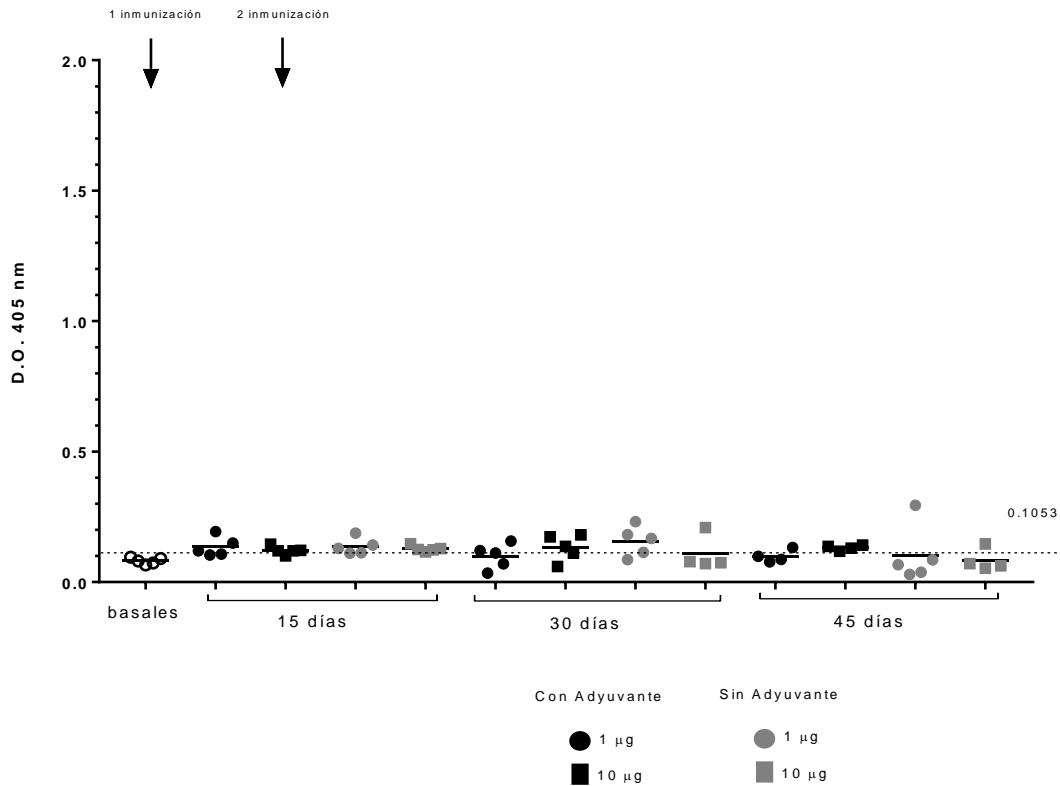
**Figura 12.** Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con el Péptido 40 de la proteína estructural GP5 del virus de PRRS, utilizando dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización

### Determinación de los niveles de anticuerpos Heterólogos

En esta sección se muestran los resultados obtenidos de los ELISAS empleando como antígeno asociado a la placa la vacuna y los sueros de los ratones inmunizados con NSP11, NSP1 o el Péptido 40. Por otro lado, se asoció a la placa las proteínas NSP1, NSP11 o el péptido 40 y se colocaron los sueros inducidos por la vacuna.

## Detección de Anticuerpos de la proteína NSP11 contra el antígeno de la vacuna

Al enfrentar los sueros de los ratones inmunizados con la proteína NSP11 contra el antígeno de la vacuna del virus de PRRS, las D.O. promedio detectadas no superan el valor de 0.2nm, como se observa en la Figura 13, sin importar cuál sea la dosis empleada.

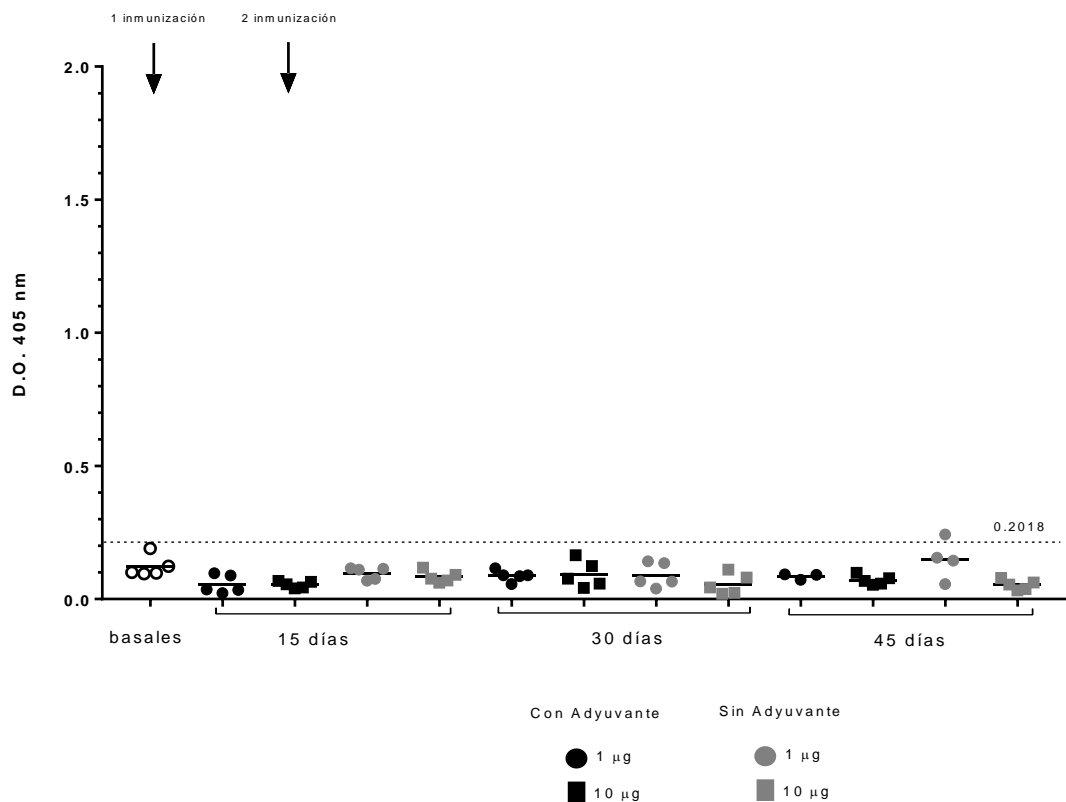


**Figura 13.** Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg la proteína NSP11 en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el antígeno de la vacuna del virus de PRRS.

## Detección de Anticuerpos de la proteína NSP1 contra el antígeno de la vacuna

Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína NSP1 no fueron reconocidos por el antígeno de la vacuna del virus de PRRS, en promedio las D.O. obtenidas no superan el valor de corte (0.201nm), resultados que se observan en la Figura 14.

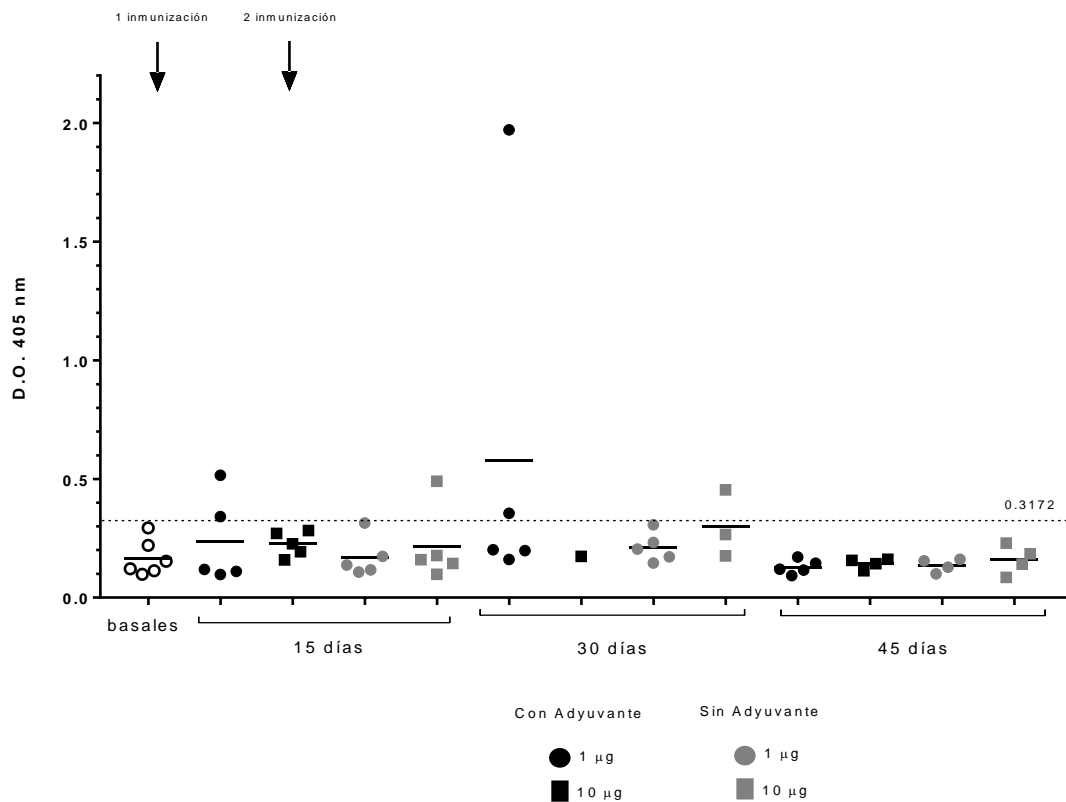




**Figura 14.** Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg la proteína NSP1 en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el antígeno de la vacuna del virus de PRRS

#### Detección de Anticuerpos vacunales contra el antígeno de la proteína NSP11

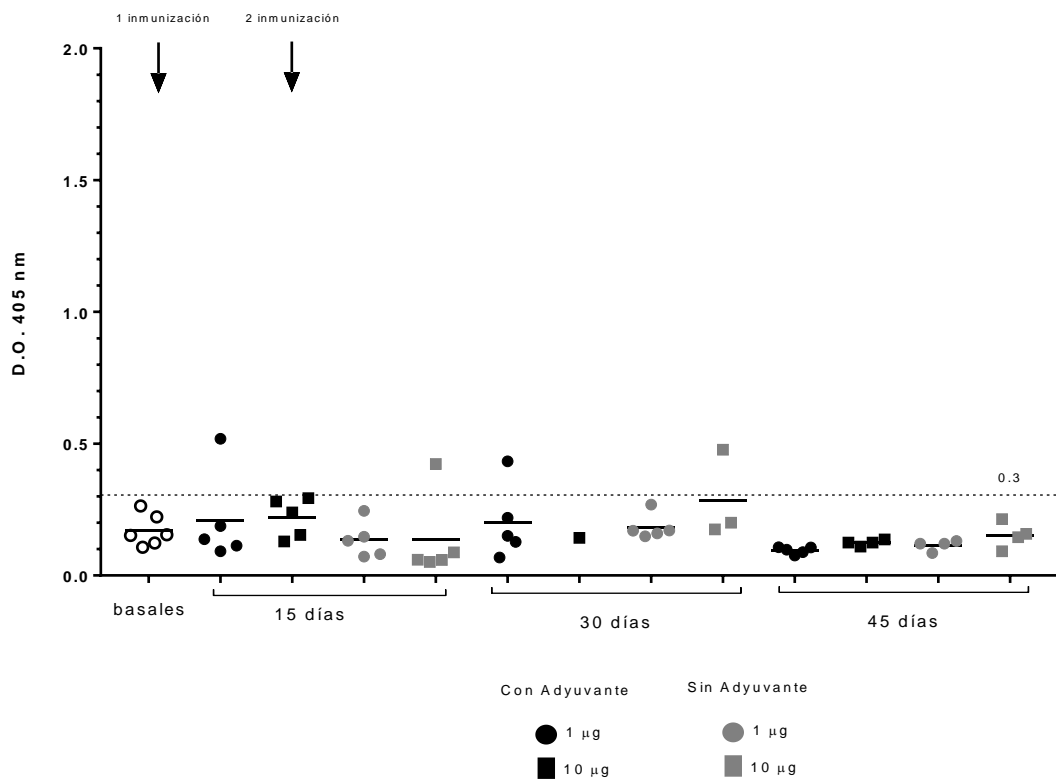
La Figura 15 muestra que las D.O. promedio detectadas para los sueros de ratones inmunizados con la vacuna comercial de PRRS no sobrepasan el valor de 0.31nm a excepción de 1 ratón que recibió la dosis de 1 µg con adyuvante a los 30 días posteriores a la primera inmunización, observándose una D.O. de 1.8nm. Asimismo, los 30 días posteriores a la primera inmunización y en la dosis de 10 µg sin adyuvante, un solo ratón supera el punto de corte con una D.O. de 0.5nm. En el tiempo T2 se observa este comportamiento para un solo ratón de los grupos de 1 y 10 µg con y sin adyuvante, respectivamente.



**Figura 15.** Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg de la vacuna comercial en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con la proteína NSP11

### Detección de Anticuerpos vacunales contra el antígeno de la proteína NSP11

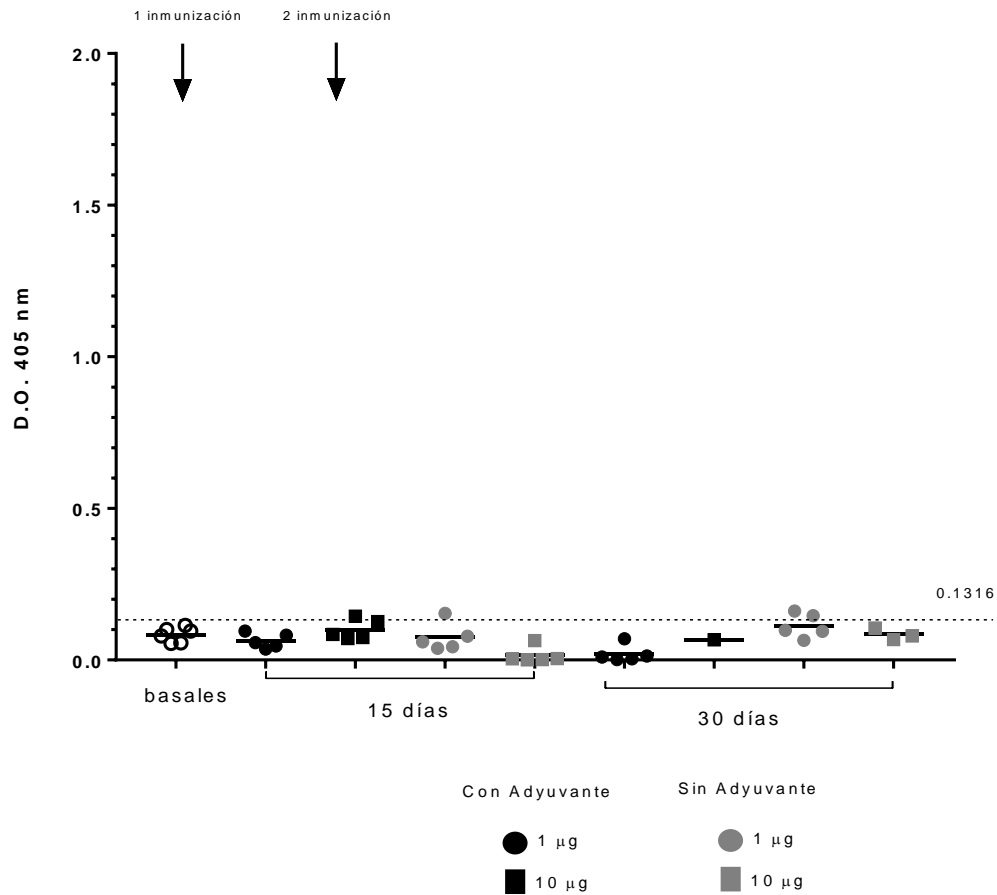
En la Figura 16 se observa un efecto similar a cuando se emplea la proteína NSP11, sólo un ratón de los grupos que recibieron 1 y 10 µg con y sin adyuvante, respectivamente, muestran D.O. por encima del punto de corte. Sin embargo, el suero del ratón que al T2 detectó una D.O. de 1.8 empleando a NSP11 en la placa (Figura 12), en estas condiciones experimentales muestra una D.O. de 0.43nm.



**Figura 16.** Identificación de la respuesta de IgG inducida en ratones inmunizados con 1 o 10 µg de la vacuna comercial en presencia o ausencia de adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con la proteína NSP1

Detección de Anticuerpos vacunales contra el antígeno del Péptido 40 de la proteína GP5 del virus de PRRS

En la Figura 17 se observa que las D.O. detectadas son muy similares a las de los sueros basales, ninguna de las D.O. promedio detectadas sobrepasan el valor del punto de corte.



**Figura 17.** Identificación de la respuesta de IgG en ratones inmunizados con la vacuna del virus de PRRS, con dosis de 1 y 10 µg, con adyuvante y sin adyuvante a los 15, 30 y 45 días después de la primera inmunización, con un refuerzo 15 días después de la primera inmunización, sensibilizando con el Péptido 40 de la proteína GP5 del virus de PRRS

## **DEL OBJETIVO 2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES 1 Y 11 Y LOS PÉPTIDOS DE GP5 EN MODELO MURINO.**

### **Determinación de la capacidad proliferativa de linfocitos**

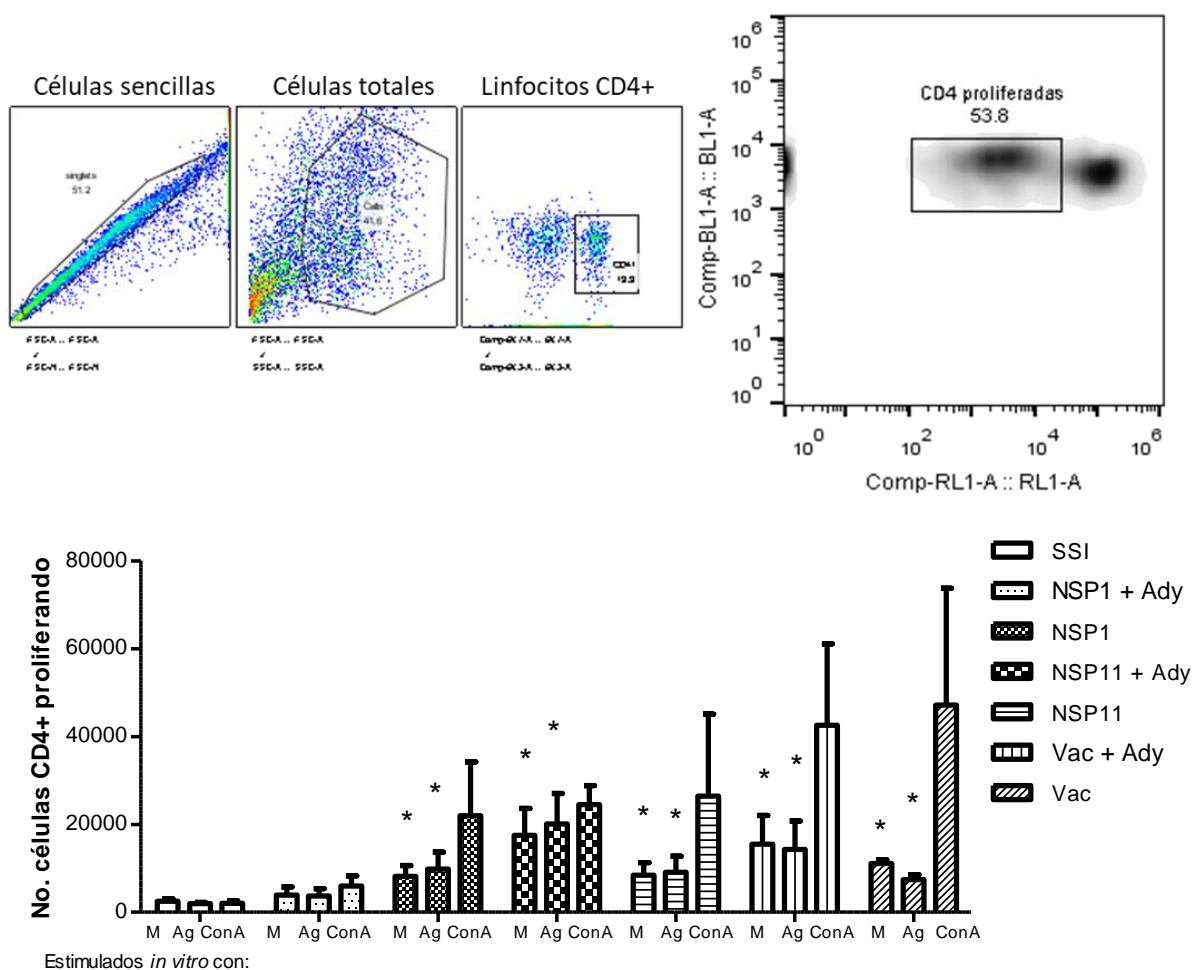
Para la evaluación de la respuesta proliferativa, se incubaron esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con las proteínas no estructurales NSP1 o NSP11, o la vacuna MLV o SSI y que fueron reestimulados *in vitro* con cada uno de su respectivo antígeno. La proliferación se siguió con el marcador Cell Trace y las células fueron cosechadas y posteriormente con anticuerpos específicos para linfocitos T. En la Figura 18 se puede observar en la parte superior la estrategia de análisis empleada, en la cual se consideraron las células sencillas (FSC-A vs FSC-H); partiendo de este conjunto de células, se seleccionaron las células correspondientes por su tamaño y complejidad a linfocitos en proliferación (FSC-A vs SSC-A), y de esta población se seleccionó aquellas células positivas para el marcador CD4+ o CD8+. De esta población se evaluó la pérdida del marcador Cell Trace empleado para determinar proliferación.

Cabe mencionar que no se obtuvo tinción para la población CD8+, por lo que solo se realizó el análisis de los linfocitos CD4+ proliferantes.

Con base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el número de células relativas en lugar del índice de proliferación. Esto considerando que en algunos de los grupos se observa que las células estimuladas con medio ya venían *per se* activadas debido a la inmunización. En la parte inferior de la gráfica 18, se observa este incremento significativo en el número de células relativas para los grupos que recibieron la proteína NSP11 y vacuna con o sin adyuvante, y para el grupo de ratones que recibió la proteína NSP1 sin adyuvante, cuando se estimularon con solo medio.

La gráfica muestra que la mayor proliferación ante un reestímulo con el mismo antígeno con el cual fueron inmunizados los ratones se tiene al inmunizarse con la

proteína NSP11 con adyuvante con un promedio de 20,086 células, superando aún el de la vacuna con adyuvante con un promedio de 14,321 células. Le sigue la NSP1 sin adyuvante con un promedio de 9,845 células, después NSP11 sin adyuvante con un promedio de 9,114 células, seguida de la vacuna sin adyuvante con un promedio de 7,444 células, y finalmente la NSP1 con adyuvante con un promedio de 3,708 células. Como grupo control está el grupo que fue inmunizado con SSI (solución salina fisiológica) con un promedio de 1,972 células.



**Figura 18.** Proliferación de las células T obtenidas de bazo de ratones inmunizados con la proteína NSP1, NSP11 y la vacuna comercial de PRRS, estimulados *in vitro* con solo medio, su respectivo inmunógeno o ConA, durante tres días.

## DISCUSIÓN

Actualmente, las vacunas activas atenuadas por pases en líneas celulares están reconocidas como la forma más eficaz de generar vacunas para la protección de los cerdos contra el PRRS. Sin embargo, el uso de estas vacunas ha sido limitado, debido al potencial de reversión de la virulencia de la cepa vacunal y a la posibilidad de recombinación de la cepa vacunal con cepas presentes en el cerdo vacunado. El virus atenuado en la línea celular muestra un número pequeño de mutaciones en comparación con la cepa parental, las cuales pueden revertirse fácilmente durante la replicación *in vivo* [110]. La alta frecuencia de mutación es una característica típica de los virus de RNA de replicación rápida como el PRRSV, que tiene una tasa de mutación extremadamente más alta (de 10 a 1000 veces) que otros virus de RNA conocidos [111].

Hasta el momento, existe una sola vacuna subunitaria para prevenir la enfermedad por el virus de PRRS en el mercado, tanto en cerdos de la línea de producción, como para las hembras [112, 113]. Sin embargo, no es utilizada en México, ya que no se vende en el país. Se trata de una vacuna que consiste en los ORF1b, ORF5, ORF6 y ORF7. Según los estudios que respaldan el uso de esta vacuna, hubo protección ante el desafío heterólogo en cerdos de la línea de producción, tanto contra PRRS-1 como PRRS-2 en los cerdos vacunados [112]. Esta vacuna fue probada también ante el desafío con HP-PRRSV (PRRSV altamente patógeno), y se concluyó que hubo protección [113]. Cabe mencionar que la vacuna contiene ORF tanto de PRRS-1 como de PRRS-2, y que solamente el ORF1b es el que codifica para las proteínas no estructurales. Es evidente que la vacuna funciona debido a todos sus componentes, siendo que también utiliza el ORF5 que codifica para la proteína estructural GP5. Con base en esta información, resulta de interés poder utilizar tanto las dos proteínas no estructurales como los péptidos de GP5 propuestos, con la finalidad de tener un efecto protector.

Para este trabajo se inmunizaron ratones para comprobar la inmunogenicidad de los candidatos propuestos. Para esto, se utilizó la vacuna comercial Ingelvac MLV®, con la finalidad de inducir una respuesta específica con una de las presentaciones comerciales existentes dentro del territorio nacional y a partir de la información que nos brinda, usarla como marco de referencia para comparar la respuesta que induce los antígenos seleccionados. En este sentido, existen reportes indicando que la vacuna comercial utilizada genera una fuerte respuesta de anticuerpos, destacando que estos resultados se lograron en lechones con altos niveles de anticuerpos homólogos de origen materno (MDA) en el momento de la vacunación [114]. En los ratones, se puede observar que al utilizar la vacuna se logró la respuesta esperada, notando que los grupos que indujeron mayor respuesta de anticuerpos, son únicamente los grupos que utilizaron la dosis de 10 µg por ratón, tanto con adyuvante como sin adyuvante. Es notorio que el antígeno utilizado en la vacuna comercial requiere de un segundo estímulo para generar la respuesta de anticuerpos específica y que esta respuesta, aunque se observa en los tiempos tardíos no es diferente entre ellos (30 vs 45 días después de la primera dosis) y se observa un mayor incremento con la presencia del adyuvante.

Con respecto a los antígenos propuestos en este trabajo, uno de los blancos seleccionados para generar la producción de anticuerpos específicos fue la proteína NSP11, debido a que ha demostrado jugar un papel determinante en la evasión de la respuesta inmune dirigida a PRRSV, ya que inhibe la producción de interferón tipo I (IFN-I) a través de diferentes mecanismos. En un estudio se demostró que NSP11 interactúa con STAT2 y la reduce, siendo el dominio N-terminal (NTD) de esta proteína el responsable de la degradación de STAT2 [115]. Por otra parte, también se ha descrito que NSP11 antagoniza la señalización de IFN tipo I al dirigirse a IRF9 a través de un mecanismo independiente de la actividad de la Endoribonucleasa Específica de Nidovirus (NendoU) que es importante para la replicación del virus y la supresión del sistema inmune innato del huésped [116]; de manera más específica, se ha descrito que inhibe la actividad promotora del elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) y la posterior transcripción de genes estimulados por IFN (ISG)



[117]. En este sentido se sabe que la NendoU codificada por la NSP11 es una Endoribonucleasa Específica de Nidovirus única de nidovirus que infecta a los vertebrados; por tanto, se convierte en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos antinidovirus donde se incluye al PRRSV. Ahora bien, tomando como referencia estas observaciones, consideramos que el contar como antígeno a NSP11 para generar anticuerpos específicos contra esta proteína, permitirá inhibir las funciones de evasión de la respuesta inmune atribuidos a ella. Existen estudios que nos alientan a validar esta hipótesis; está demostrado que la sobreexpresión de TRIM59 inhibe la infección por PRRSV en las células Marc-145, TRIM59 interactuó con el NSP11 [118] determinó que esta interacción se da mediante el dominio RING N-terminal en TRIM59 y el dominio NendoU C-terminal en nsp11, demostrado por proteómica) y la presencia o ausencia de TRIM59 es crucial para el éxito o fracaso de infección por parte de PRRSV [116]. Por el contrario, la disminución en la expresión de TRIM59 da como resultado una replicación mejorada de PRRSV en macrófagos alveolares pulmonares (PAM). Estas observaciones muestran que la generación de anticuerpos que reconozcan a NSP11 podría inhibir los mecanismos de evasión que utiliza PRRSV por esta vía. En este trabajo se demostró que el antígeno que generó una mayor inmunogenicidad, tanto en la respuesta humoral como en la proliferación de las células T CD4+ fue la inducida por la proteína recombinante NSP11. Cuando observamos los ensayos para la evaluación de la inmunidad humoral, es el único antígeno, de los cuatro utilizados, que 15 días después de la primera inmunización ya había logrado inducir una respuesta humoral detectable, esto se consiguió utilizando una dosis de proteína de 10 µg apoyada de un adyuvante. Con los grupos sin adyuvante, no existe diferencia entre las dos dosis a los 30 días, pero, a los 45 días, la dosis de 10 µg es significativamente más alta que la dosis de 1 µg. Considerando esto, es evidente que, a pesar de no utilizar adyuvante, la utilización de la proteína NSP11 a una dosis de 10 µg producen IgGs específicas que siguen siendo claramente detectadas a los 45 días y además se hace aún más evidente, que la respuesta inducida es dependiente de concentración de antígeno utilizado.

Otra proteína propuesta como blanco para ser utilizada como componente en una vacuna contra PRRSV buscando la generación de una respuesta específica en contra de ella es la proteína NSP1. Se ha pensado en su utilización debido a que se ha identificado como un potente antagonista de IFN; incluso, se ha demostrado que la subunidad nsp1 $\beta$  de NSP1 bloquea la exportación nuclear del ARNm del huésped como uno de los mecanismos para suprimir la producción de proteínas antivirales del huésped [119, 120, 121]. Esta importante función que juega la NSP1, buscando la evasión de la respuesta inmune innata, justifica ampliamente el inducir anticuerpos que se unan a ella esperando neutralizar su función evasiva. En este sentido, la respuesta que induce su utilización no es tan evidente, en cuanto a presencia de anticuerpos específicos que la reconozcan, como lo es la respuesta inducida por la proteína NSP11; sin embargo, si logra generar una respuesta específica e incluso, al igual que sucede con la mencionada NSP11, la respuesta es detectada desde los 15 días posteriores a la primera inmunización. Si bien, no todos los ratones inmunizados lograron seroconvertir con la primera inmunización, el 50% de los ratones desarrollaron una respuesta específica contra esta proteína, siendo dependiente de una mayor concentración de ésta y con la ayuda del adyuvante utilizado. Esta observación no es sorprendente pues, tanto el antígeno de la vacuna comercial como la proteína NSP11, mostraron generar una mejor respuesta con la ayuda del adyuvante; sin embargo, cuando observamos la respuesta inducida por la proteína NSP1 a los 45 días posteriores a la primera inmunización, se observa claramente que los ratones inoculados con esta proteína seroconvirtieron, lo que sugirió que su uso genera buenas perspectivas para el objetivo buscado (Figura 11). Claramente la respuesta generada por la proteína NSP1 es dependiente de su concentración y preferentemente requiere la ayuda de un adyuvante para obtener una respuesta inmune específica más robusta.

Ahora bien, el haber podido inducir una respuesta de anticuerpos específica contra cada uno de los antígenos utilizados (vacuna, NSP11 y NSP1) en ratones, nos brinda la posibilidad de demostrar porqué el uso de estas proteínas en la formulación de una vacuna puede ser más eficiente que la utilización del virus

completo. Como quedó demostrado, cuando el antígeno de la vacuna es utilizado para detectar anticuerpos específicos contra las proteínas, estos anticuerpos apenas son reconocidos, no habiendo una detección tan evidente de estos anticuerpos como lo es con los anticuerpos homólogos. Como se evidenció, el nivel de reconocimiento por parte del antígeno vacunal hacia anticuerpos inducidos por la proteína NSP11 es pobre (Figura 13), sin embargo, existen ratones que generaron una respuesta detectable desde los 15 días posteriores a la primera inmunización y este reconocimiento se mantiene al detectar anticuerpos a los 30 y 45 días posteriores a la primera inmunización, sin embargo, no aumenta la cantidad de estos anticuerpos detectados a través del tiempo. Esta observación se hace más evidente, cuando se trata de reconocer anticuerpos inducidos por la proteína NSP1 (Figura 14), en donde prácticamente no hay reconocimiento de los anticuerpos inducidos por esta proteína NSP1. La menor detección de anticuerpos heterólogos por parte del antígeno vacunal se puede explicar si entendemos que la vacuna utiliza el virus completo, y la respuesta que genera la vacuna está dirigido en su mayoría, a las proteínas de superficie del virus, que son las más susceptibles a sufrir cambios genéticos, lo que la hace poco efectiva en contra de cepas virales heterólogas a las que contiene la formulación de la vacuna. Sin embargo, el que exista el reconocimiento de anticuerpos específicos contra estas proteínas, que recordemos son proteínas no estructurales, nos indica que las proteínas si pueden generar una respuesta específica contra ellas y que de alguna manera pueden unirse al PRRSV, sin importar se trate de un virus homólogo o heterólogo ya que además de ser proteínas no estructurales, son ampliamente conservadas lo que hace muy promisorio su uso en cuanto al efecto esperado sin importar la cepa viral. Por otra parte, el que al antígeno viral detecte en tiempos tempranos los anticuerpos inducidos por la proteína NSP11 (aunque sea en baja intensidad) hace alentador su uso, ya que la utilización de esta proteína busca inducir anticuerpos que se unan a ella en el ciclo de infección del virus y de esta manera romper uno de sus mecanismos de evasión, que es la inhibición de la producción de interferones en la respuesta innata, así que la presencia de estos anticuerpos en tiempos

tempranos a la infección, podría lograr neutralizar la función de esta proteína e interferir en el éxito de infección del virus.

Todas estas observaciones son relacionadas a la respuesta humoral demostrada, que es inducida por los antígenos propuestos; sin embargo, se logró un primer acercamiento para intentar demostrar que también existe evidencia de la inducción de una respuesta inmune celular en el que puedan estar interviniendo las proteínas utilizadas. En este sentido, se evaluó un primer ensayo el papel que juegan las células CD4+ en las respuestas descritas. Se detectó que 45 días después de la primera inmunización, estas células logran proliferar ante su estímulo específico, lo que nos indica que se encuentran preparadas para responder eficientemente ante un re-estímulo específico, efecto ideal esperado genere una vacuna. Esto puede favorecer que la respuesta tanto celular citotóxica, como la humoral sea más rápida ante una infección, ya que estas células TCD4+ dirigen la respuesta inmune adaptativa, maximizando la eficacia destructora de los macrófagos y la proliferación de linfocitos T citotóxicos CD8+ y estimulando la proliferación de linfocitos B para luego inducir la producción de anticuerpos. Notablemente, en el grupo de células proveniente de ratones inmunizados con las proteínas NSP1, al ser re-estimuladas con su propio antígeno, proliferan de mejor manera aquellas que solo recibieron la proteína sin adyuvante, lo cual nos indica que la activación y proliferación de la célula es completamente atribuible al antígeno y no al adyuvante utilizado. Caso contrario sucede con las células provenientes de animales inmunizados con la proteína NSP11 con y sin adyuvante que, en este caso, existe una mayor proliferación cuando se estimulan las células provenientes del grupo que si recibió adyuvante. A pesar de ser de menor tamaño, la NSP11 tiene mejores cualidades inmunogénicas tanto humoral como celular, en comparación a las de NSP1 y el adyuvante exacerba esa respuesta específica; si comparamos las respuestas inducidas por NSP11 contra las inducidas por el antígeno vacunal, las de la proteína son mayores en niveles de anticuerpos inducidos. En cuanto a la capacidad proliferativa de las células CD4+ también son mayores en las células provenientes del grupo tratado con NSP11 que las de las células provenientes de

los animales inmunizados con antígeno vacunal ante sus respectivos estímulos lo que sugiere una mayor capacidad inmunogénica de la proteína NSP11 que del antígeno vacunal.

En resumen, se lograron establecer las condiciones para poder evaluar en ratones candidatos vacunales y vacunas comerciales ya disponibles en contra del virus de PRRS. Se evidencia que, en el caso de los antígenos propuestos, las proteínas y el antígeno vacunal, lograron desarrollar una respuesta inmune humoral detectada en diferentes momentos e intensidades, dependiendo del antígeno analizado. Como evidencia en cuanto al funcionamiento de nuestro modelo experimental son los resultados de la utilización del antígeno vacunal que se sabe genera una respuesta inmune específica; los ratones experimentales seroconvirtieron al 100% cuando el antígeno se utilizó con adyuvante y a un 75% cuando no se utilizó. El promedio máximo de anticuerpos específicos detectados inducidos por el antígeno vacunal fue de 0.6nm de densidad óptica. En el caso de los antígenos propuestos, la proteína NSP11 generó una seroconversión muy similar a la obtenida con el antígeno vacunal, (80 y 100% sin o con adyuvante, respectivamente), sin embargo, hubo una clara diferencia en el máximo promedio de anticuerpos específicos detectados que fue de 1.3 nm de D.O. y más importante aún, existió una clara seroconversión inducida por la primer inmunización, en comparación a la inducida por el antígeno vacunal, donde la seroconversión se detectó hasta los 30 días y esto después de una segunda dosis. Finalmente, al analizar la respuesta humoral de la proteína NSP1, fue un comportamiento similar al antígeno vacunal en cuanto a niveles de anticuerpos, pero con porcentajes de seroconversión del 100% con y sin adyuvante y más interesante aún, con ratones seroconvertidos desde la primera inmunización, observación muy importante porque nos indica una mejor inmunogenicidad permitiendo esperar que la respuesta inducida puede ser temprana, favoreciendo la finalidad buscada con su uso.

Todos estos resultados nos hacen ser optimistas para poder proponer el uso de estas dos proteínas, que cabe mencionar, se tienen plenamente estandarizada su

producción de manera recombinante, la cual puede transferirse para ser producidas a gran escala haciendo relativamente barata su producción.

**Tabla 7.** Índices de seroconversión de los distintos antígenos utilizados

dosis		VACUNA			NSP1			NSP11		
ADY	µg/ratón	15 días	30 días	45 días	15 días	30 días	45 días	15 días	30 días	45 días
Sin adyuvante	1	0/5	1/5 (0.2) †	0/4	0/5	0/5	0/5	1/5 (0.2)	4/5 (0.8)	5/5 (1)
	10	0/5	3/4 (0.75)	3/4 (0.75)	0/5	4/5 (0.8)	5/5 (1)	2/5 (0.4)	4/4 (1)	3/3 (1)
Montanide ISA 70	1	0/5	0/5	1/5 (0.2)	0/5	2/5 (0.4)	3/3 (1)	2/5 (0.4)	4/4 (1)	4/4 (1)
	10	0/5	3/4 (0.75)	4/4 (1)	2/5	4/5 (0.8)	5/5 (1)	3/4 (0.75)	4/4 (1)	4/4 (1)

Por otra parte, no solo se prevé el empleo de estas dos proteínas por las razones previamente descritas. Otro objetivo es la utilización de los péptidos de la proteína GP5, la cual es codificada por ORF5. Esta GP5 es la mayor glicoproteína de envoltura, conocida también como glicoproteína de cápsula que consta de 200 aminoácidos y exhibe una variación genética muy marcada dentro de su secuencia relativamente corta de 600 pares de bases, por lo que es comúnmente utilizado para la identificación y la construcción de árboles filogenéticos [91, 34, 107, 122]. Además, GP5 es una proteína importante que media la internalización del virus a los macrófagos al interactuar con el receptor celular CD169 [10, 11] y se sabe que dentro de ella se encuentran epítopes que producen anticuerpos neutralizantes. La variabilidad en GP5 podría expresar la ineficiencia a una protección cruzada de las vacunas [123]. Estas características funcionales de esta proteína despiertan el interés en desarrollar respuestas que inhiban sus funciones, y el lograrlo podría favorecer a evitar la internalización del virus a su célula blanco.

Con base en esto, nuestro grupo de investigación propuso la utilización de 4 péptidos obtenidos a partir de la proteína GP5, los cuales fueron seleccionados bajo distintos criterios de acuerdo con un análisis bioinformático [102]. Dentro de los principales criterios tomados en cuenta el fundamental fue que estos péptidos

se eligieran de regiones conservadas con la finalidad de asegurar que la diversidad genética que caracteriza al PRRSV no se convierta en un obstáculo en cuanto a la eficiencia de la respuesta inducida por estos péptidos por lo que el grado de conservación de todos los péptidos oscilo entre el 94.8% y el 99.4%. En este sentido, los péptidos sintéticos seleccionados serían sometidos a las mismas pruebas que las proteínas no estructurales descritas con anterioridad; sin embargo, las actuales condiciones por las que estamos atravesando nos impidieron realizar, prácticamente la totalidad de los ensayos relacionados con estos péptidos. Cabe destacar que nuestro grupo de investigación ha logrado la expresión de dichos péptidos de manera recombinante en una quimera por lo que se hace imperativo retomar los ensayos encaminados a describir la respuesta inmune que generan de manera individual o en conjunto. No obstante, se logró comenzar con la estandarización de los ensayos enfocados a la descripción de la respuesta inducida por el péptido que fue nombrado como péptido 40, el cual se seleccionó debido a que se localiza en el ectodominio de la proteína GP5, lo que quiere decir que se encuentra expuesto y también abarca un aminoácido glicosilado en N51. Con los primeros ensayos no se logró detectar una respuesta específica de IgG's inducida por el péptido 40. Sin embargo, esta observación no es sorprendente, ya que las características propias del péptido hacen difícil suponer pueda inducir una fuerte respuesta de anticuerpos; más bien, nuestra propuesta está encaminada a utilizar estos péptidos a fin de inducir una respuesta inmune de tipo celular debido a que son péptidos pequeños, que son mayormente presentados por MHC-I a linfocitos TCD8+ buscando la generación de una actividad antiviral que inhiba en sí, la replicación del virus en etapas muy tempranas de la infección.

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que las proteínas no estructurales NSP11 y NSP1 del PRRSV son inmunogénicas; la NSP11 incluso más que el antígeno utilizado en la formulación de la vacuna comercial. Ambas son proteínas importantes al inicio de la infección, pues su función es evadir la respuesta inmune del huésped durante su replicación, lo que las hace candidatas ideales para producir anticuerpos específicos en contra de ellas buscando romper con esa función de evasión. Su utilización se hace muy promisoria ya que se demostró que linfocitos T CD4+ provenientes de ratones inmunizados con estas proteínas, proliferan ante su re-estímulo específico, incluso células T obtenidas de ratones que no utilizaron adyuvante.

Se hace evidente la necesidad de continuar con los estudios de seroneutralización y protección ante el desafío, con la finalidad de comprobar la capacidad de estas proteínas de generar anticuerpos neutralizantes.

Con base en estos resultados se puede esperar que estos antígenos, tanto las proteínas no estructurales como los péptidos en conjunto, puedan ofrecer una protección más eficaz en contra de los virus de PRRS circulantes en la República Mexicana.



## REFERENCIAS

- [1] Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., & Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 227(3), 385–392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- [2] Snijder, E. J., Kikkert, M., & Fang, Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *The Journal of general virology*; 94(Pt 10), 2141–2163. <https://doi.org/10.1099/vir.0.056341-0>
- [3] Dokland T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus research*; 154(1-2), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>
- [4] Fang, Y., & Snijder, E. J. (2010). The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus research*; 154(1-2), 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.030>
- [5] Martínez-Bautista, N. R., Sciutto-Conde, E., Cervantes-Torres, J., Segura-Velázquez, R., Mercado García, M. C., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo Ortega, M. E., Delgadillo Alvarez, J., Castillo-Juárez, H., & Sanchez-Betancourt, J. I. (2018). Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México. *Transboundary and emerging diseases*; 65(4), 993–1008. <https://doi.org/10.1111/tbed.12831>
- [6] Duan, X., Nauwynck, H. J., & Pensaert, M. B. (1997). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of virology*, 142(12), 2483–2497. <https://doi.org/10.1007/s007050050256>

- [7] Loving, C. L., Brockmeier, S. L., & Sacco, R. E. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*; 120(2), 217–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02493.x>
- [8] Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S., & Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology*; 133(3-4), 477–483. <https://doi.org/10.1007/BF01313785>
- [9] Nauwynck, H. J., Duan, X., Favoreel, H. W., Van Oostveldt, P., & Pensaert, M. B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *The Journal of general virology*; 80 ( Pt 2), 297–305. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-297>
- [10] Welch, S. K., & Calvert, J. G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus research*; 154(1-2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.018>
- [11] Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J. Q., Crocker, P. R., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2010). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS pathogens*; 6(1), e1000730. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000730>
- [12] Prather, R. S., Rowland, R. R., Ewen, C., Tribble, B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J. M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M. S., Whitworth, K. M., Murphy, C. N., Egen, T., & Green, J. A. (2013). An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virology*; 87(17), 9538–9546. <https://doi.org/10.1128/JVI.00177-13>

- [13] Calvert, J. G., Slade, D. E., Shields, S. L., Jolie, R., Mannan, R. M., Ankenbauer, R. G., & Welch, S. K. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of virology*; 81(14), 7371–7379. <https://doi.org/10.1128/JVI.00513-07>
- [14] Butler, J. E., Lager, K. M., Golde, W., Faaberg, K. S., Sinkora, M., Loving, C., & Zhang, Y. I. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunologic research*; 59(1-3), 81–108. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5>
- [15] Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual review of animal biosciences*; 4, 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
- [16] Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary immunology and immunopathology*; 167(1-2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>
- [17] Sang, Y., Rowland, R. R., & Blecha, F. (2011). Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Animal health research reviews*; 12(2), 149–167. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000144>
- [18] Bordet, E., Blanc, F., Tiret, M., Crisci, E., Bouguyon, E., Renson, P., Maisonnasse, P., Bourge, M., Leplat, J. J., Giuffra, E., Jouneau, L., Schwartz-Cornil, I., Bourry, O., & Bertho, N. (2018). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type 1.3 Lena Triggers Conventional Dendritic Cells 1 Activation and T Helper 1 Immune Response Without Infecting Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*; 9, 2299. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02299>

[19] Tugal, D., Liao, X., & Jain, M. K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*; 33(6), 1135–1144. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>

[20] Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., & Udalova, I. A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology*; 12(3), 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>

[21] Sang, Y., Rowland, R. R., & Blecha, F. (2011). Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Animal health research reviews*; 12(2), 149–167. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000144>

[22] Darwich, L., Díaz, I., & Mateu, E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus research*; 154(1-2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.017>

[23] Wang, L., Hu, S., Liu, Q., Li, Y., Xu, L., Zhang, Z., Cai, X., & He, X. (2017). Porcine alveolar macrophage polarization is involved in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication. *The Journal of veterinary medical science*; 79(11), 1906–1915. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0258>

[24] Zeng, N., Wang, C., Liu, S., Miao, Q., Zhou, L., Ge, X., Han, J., Guo, X., & Yang, H. (2018). Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Gene Expression Profiles in Porcine Alveolar Macrophages in Response to the Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *BioMed research international*; 2018,1538127. <https://doi.org/10.1155/2018/1538127>

[25] Wang, L., Zhou, L., Hu, D., Ge, X., Guo, X., & Yang, H. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses post-transcriptionally the protein expression of IFN- $\beta$  by upregulating cellular microRNAs in porcine alveolar

macrophages in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(1), 115–126.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.5397>

[26] Wang, C., Shi, X., Zhang, X., Wang, A., Wang, L., Chen, J., Deng, R., & Zhang, G. (2015). The Endoribonuclease Activity Essential for the Nonstructural Protein 11 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus to Inhibit NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1 $\beta$  Induction. *DNA and cell biology*; 34(12), 728–735. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.2929>

[27] Bi, J., Song, S., Fang, L., Wang, D., Jing, H., Gao, L., Cai, Y., Luo, R., Chen, H., & Xiao, S. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces IL-1 $\beta$  production depending on TLR4/MyD88 pathway and NLRP3 inflammasome in primary porcine alveolar macrophages. *Mediators of inflammation*; 2014, 403515. <https://doi.org/10.1155/2014/403515>

[28] Lamontagne, L., Pagé, C., Larochelle, R., & Magar, R. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8<sup>high</sup> T cells. *Viral immunology*; 16(3), 395–406. <https://doi.org/10.1089/088282403322396181>

[29] Sinkora, M., Butler, J. E., Lager, K. M., Potockova, H., & Sinkorova, J. (2014). The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2. *Veterinary research*; 45(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0091-x>

[30] Olin, M. R., Batista, L., Xiao, Z., Dee, S. A., Murtaugh, M. P., Pijoan, C. C., & Molitor, T. W. (2005). Gammadelta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral immunology*; 18(3), 490–499. <https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.490>

[31] Cao, J., Grauwet, K., Vermeulen, B., Devriendt, B., Jiang, P., Favoreel, H., & Nauwynck, H. (2013). Suppression of NK cell-mediated cytotoxicity against PRRSV-infected porcine alveolar macrophages in vitro. *Veterinary microbiology*;, 164(3-4), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.001>

[32] Cao, Q. M., Ni, Y. Y., Cao, D., Tian, D., Yugo, D. M., Heffron, C. L., Overend, C., Subramaniam, S., Rogers, A. J., Catanzaro, N., LeRoith, T., Roberts, P. C., & Meng, X. J. (2018). Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Expressing Membrane-Bound Interleukin-15 as an Immunomodulatory Adjuvant Enhances NK and  $\gamma\delta$  T Cell Responses and Confers Heterologous Protection. *Journal of virology*; 92(13), e00007-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00007-18>

[33] Charentantanakul, W., Platt, R., & Roth, J. A. (2006). Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral immunology*; 19(4), 646–661. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.646>

[34] Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, F. A., & Hernández, J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clinical and vaccine immunology*; CVI, 15(4), 720–725. <https://doi.org/10.1128/CVI.00224-07>

[35] Loving, C. L., Brockmeier, S. L., & Sacco, R. E. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*; 120(2), 217–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02493.x>

[36] Piñeyro, P. E., Subramaniam, S., Kenney, S. P., Heffron, C. L., Giménez-Lirola, L. G., & Meng, X. J. (2016). Modulation of Proinflammatory Cytokines in Monocyte-Derived Dendritic Cells by Porcine Reproductive and Respiratory

Syndrome Virus Through Interaction with the Porcine Intercellular-Adhesion-Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. *Viral immunology*; 29(10), 546–556. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0104>

[37] Rodríguez-Gómez, I. M., Käser, T., Gómez-Laguna, J., Lamp, B., Sinn, L., Rümenapf, T., Carrasco, L., Saalmüller, A., & Gerner, W. (2015). PRRSV-infected monocyte-derived dendritic cells express high levels of SLA-DR and CD80/86 but do not stimulate PRRSV-naïve regulatory T cells to proliferate. *Veterinary research*; 46(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0186-z>

[38] Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., & Hernández, J. (2010). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology*; 396(2), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.024>

[39] Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1. *Frontiers in microbiology*; 7, 832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>

[40] Liu, J., Wei, S., Liu, L., Shan, F., Zhao, Y., & Shen, G. (2016). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in immune phenotype and Th1/Th2 balance of dendritic cells. *Developmental and comparative immunology*; 65, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.012>

[41] Pröll, M. J., Neuhoff, C., Schellander, K., Uddin, M. J., Cinar, M. U., Sahadevan, S., Qu, X., Islam, M. A., Poirier, M., Müller, M. A., Drosten, C., Tesfaye, D., Tholen, E., & Große-Brinkhaus, C. (2017). Transcriptome profile of lung dendritic cells after in vitro porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *PloS one*; 12(11), e0187735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187735>

[42] Bordet, E., Blanc, F., Tiret, M., Crisci, E., Bouguyon, E., Renson, P., Maisonnasse, P., Bourge, M., Leplat, J. J., Giuffra, E., Jouneau, L., Schwartz-Cornil, I., Bourry, O., & Bertho, N. (2018). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type 1.3 Lena Triggers Conventional Dendritic Cells 1 Activation and T Helper 1 Immune Response Without Infecting Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*; 9, 2299. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02299>

[43] Reséndiz, M., Valenzuela, O., & Hernández, J. (2018). Response of the cDC1 and cDC2 subtypes of tracheal dendritic cells to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology*; 223, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.012>

[44] Chen, X., Bai, J., Liu, X., Song, Z., Zhang, Q., Wang, X., & Jiang, P. (2018). Nsp1 $\alpha$  of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain BB0907 Impairs the Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells via the Release of Soluble CD83. *Journal of virology*; 92(15), e00366-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00366-18>

[45] Chen, X., Zhang, Q., Bai, J., Zhao, Y., Wang, X., Wang, H., & Jiang, P. (2017). The Nucleocapsid Protein and Nonstructural Protein 10 of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Enhance CD83 Production via NF- $\kappa$ B and Sp1 Signaling Pathways. *Journal of virology*; 91(18), e00986-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00986-17>

[46] Yoon, I. J., Joo, H. S., Goyal, S. M., & Molitor, T. W. (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 6(3), 289–292. <https://doi.org/10.1177/104063879400600326>



[47] Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary immunology and immunopathology*; 167(1-2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>

[48] Lopez, O. J., Oliveira, M. F., Garcia, E. A., Kwon, B. J., Doster, A., & Osorio, F. A. (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clinical and vaccine immunology*; CVI, 14(3), 269–275. <https://doi.org/10.1128/CVI.00304-06>

[49] Lopez, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*; 102(3), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>

[50] de Lima, M., Pattnaik, A. K., Flores, E. F., & Osorio, F. A. (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*; 353(2), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.036>

[51] Oleksiewicz, M. B., Bøtner, A., Toft, P., Normann, P., & Storgaard, T. (2001). Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *Journal of virology*; 75(7), 3277–3290. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3277-3290.2001>

[52] Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of virology*; 80(8), 3994–4004. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3994-4004.2006>

[53] Ostrowski, M., Galeota, J. A., Jar, A. M., Platt, K. B., Osorio, F. A., & Lopez, O. J. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of virology*; 76(9), 4241–4250. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4241-4250.2002>

[54] Cancel-Tirado, S. M., Evans, R. B., & Yoon, K. J. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*; 102(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.017>

[55] Sang, Y., Rowland, R. R., & Blecha, F. (2011). Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Animal health research reviews*; 12(2), 149–167. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000144>

[56] Butler, J. E., Lager, K. M., Golde, W., Faaberg, K. S., Sinkora, M., Loving, C., & Zhang, Y. I. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunologic research*; 59(1-3), 81–108. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5>

[57] Vu, H. L., Kwon, B., Yoon, K. J., Laegreid, W. W., Pattnaik, A. K., & Osorio, F. A. (2011). Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *Journal of virology*; 85(11), 5555–5564. <https://doi.org/10.1128/JVI.00189-11>

[58] Zhou, L., Ni, Y. Y., Piñeyro, P., Sanford, B. J., Cossaboom, C. M., Dryman, B. A., Huang, Y. W., Cao, D. J., & Meng, X. J. (2012). DNA shuffling of the GP3 genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) produces a chimeric virus with an improved cross-neutralizing ability against a heterologous PRRSV strain. *Virology*; 434(1), 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.005>

[59] Robinson, S. R., Li, J., Nelson, E. A., & Murtaugh, M. P. (2015). Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*; 203, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.016>

[60] Lee, J. A., Kwon, B., Osorio, F. A., Pattnaik, A. K., Lee, N. H., Lee, S. W., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., & Lee, J. B. (2014). Protective humoral immune response induced by an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing the hypo-glycosylated glycoprotein 5. *Vaccine*; 32(29), 3617–3622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.083>

[61] Tribble, B. R., Popescu, L. N., Monday, N., Calvert, J. G., & Rowland, R. R. (2015). A single amino acid deletion in the matrix protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus confers resistance to a polyclonal swine antibody with broadly neutralizing activity. *Journal of virology*; 89(12), 6515–6520. <https://doi.org/10.1128/JVI.03287-14>

[62] Gerner, W., Käser, T., & Saalmüller, A. (2009). Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. *Developmental and comparative immunology*; 33(3), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.06.003>

[63] Renukaradhya, G. J., Alekseev, K., Jung, K., Fang, Y., & Saif, L. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral immunology*; 23(5), 457–466. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0051>

[64] Dwivedi, V., Manickam, C., Patterson, R., Dodson, K., Murtaugh, M., Torrelles, J. B., Schlesinger, L. S., & Renukaradhya, G. J. (2011). Cross-protective immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus by intranasal delivery of a live virus vaccine with a potent adjuvant. *Vaccine*; 29(23), 4058–4066. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.006>

[65] Dwivedi, V., Manickam, C., Binjawadagi, B., Linhares, D., Murtaugh, M. P., & Renukaradhya, G. J. (2012). Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. *Virology journal*; 9, 45. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-45>

[66] Dwivedi, V., Manickam, C., Patterson, R., Dodson, K., Weeman, M., & Renukaradhya, G. J. (2011). Intranasal delivery of whole cell lysate of *Mycobacterium tuberculosis* induces protective immune responses to a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. *Vaccine*; 29(23), 4067–4076. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.005>

[67] Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X. Q., Liew, F. Y., Caligiuri, M. A., Durbin, J. E., & Biron, C. A. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*; 169(8), 4279–4287. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4279>

[68] Albina, E., Carrat, C., & Charley, B. (1998). Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*; 18(7), 485–490. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.485>

[69] Murtaugh, M. P., Xiao, Z., & Zuckermann, F. (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral immunology*; 15(4), 533–547. <https://doi.org/10.1089/088282402320914485>

[70] Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., & Fang, Y. (2010). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome

virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology*; 398(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.033>

[71] Samuel C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*; 14(4), 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>

[72] Sadler, A. J., & Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews. Immunology*; 8(7), 559–568. <https://doi.org/10.1038/nri2314>

[73] Albina, E., Carrat, C., & Charley, B. (1998). Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*; 18(7), 485–490. <https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.485>

[74] Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J. G., & Yoo, D. (2012). Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses*; 4(4), 424–446. <https://doi.org/10.3390/v4040424>

[75] Yoo, D., Song, C., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., & Liu, H. C. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*; 154(1-2), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.019>

[76] Beura, L. K., Sarkar, S. N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A. K., & Osorio, F. A. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *Journal of virology*; 84(3), 1574–1584. <https://doi.org/10.1128/JVI.01326-09>

[77] Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., & Fang, Y. (2010). Identification of two auto-cleavage products of

nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology*; 398(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.033>

[78] Song, C., Krell, P., & Yoo, D. (2010). Nonstructural protein 1 $\alpha$  subunit-based inhibition of NF- $\kappa$ B activation and suppression of interferon- $\beta$  production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*; 407(2), 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.025>

[79] Han, M., Du, Y., Song, C., & Yoo, D. (2013). Degradation of CREB-binding protein and modulation of type I interferon induction by the zinc finger motif of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1 $\alpha$  subunit. *Virus research*; 172(1-2), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.012>

[80] Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., & Zhang, Y. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *Journal of virology*; 84(21), 11045–11055. <https://doi.org/10.1128/JVI.00655-10>

[81] Wang, R., Nan, Y., Yu, Y., & Zhang, Y. J. (2013). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp1 $\beta$  inhibits interferon-activated JAK/STAT signal transduction by inducing karyopherin- $\alpha$ 1 degradation. *Journal of virology*; 87(9), 5219–5228. <https://doi.org/10.1128/JVI.02643-12>

[82] Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J. G., & Yoo, D. (2012). Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses*; 4(4), 424–446. <https://doi.org/10.3390/v4040424>

[83] Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Abrahante, J. E., Lam, T. T., & Leung, F. C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*; 154(1-2), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.015>

[84] Martelli, P., Cordioli, P., Alborali, L. G., Gozio, S., De Angelis, E., Ferrari, L., Lombardi, G., & Borghetti, P. (2007). Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine*; 25(17), 3400–3408. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.050>

[85] Darwich, L., Díaz, I., & Mateu, E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus research*; 154(1-2), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.017>

[86] Renukaradhya, G. J., Meng, X. J., Calvert, J. G., Roof, M., & Lager, K. M. (2015). Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine*; 33(27), 3065–3072. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.102>

[87] Xu, Y. Z., Zhou, Y. J., Zhang, S. R., Tong, W., Li, L., Jiang, Y. F., & Tong, G. Z. (2012). Identification of nonessential regions of the nsp2 protein of an attenuated vaccine strain (HuN4-F112) of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus for replication in marc-145 cell. *Virology journal*; 9, 141. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-141>

[88] Wang, Z. S., Xu, X. G., Liu, H. J., Li, Z. C., Ding, L., Yu, G. S., & Tong, D. W. (2011). Immunogenicity of the envelope GP3 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus displayed on baculovirus. *Acta virologica*; 55(2), 139–146. [https://doi.org/10.4149/av\\_2011\\_02\\_139](https://doi.org/10.4149/av_2011_02_139)

[89] Plana Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortés, E., Vela, C., & Casal, J. I. (1997). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5

proteins in protection. *Virus genes*; 14(1), 19–29.  
<https://doi.org/10.1023/a:1007931322271>

[90] Chia, M. Y., Hsiao, S. H., Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chang, H. W., Tsai, Y. C., Lin, C. M., Pang, V. F., & Jeng, C. R. (2011). Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*; 140(3-4), 215–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.01.002>

[91] Chia, M. Y., Hsiao, S. H., Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chang, H. W., Tsai, Y. C., Lin, C. M., Pang, V. F., & Jeng, C. R. (2010). Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Veterinary immunology and immunopathology*; 135(3-4), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.003>

[92] Chan, H. T., Chia, M. Y., Pang, V. F., Jeng, C. R., Do, Y. Y., & Huang, P. L. (2013). Oral immunogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen expressed in transgenic banana. *Plant biotechnology journal*; 11(3), 315–324. <https://doi.org/10.1111/pbi.12015>

[93] Hu, J., Ni, Y., Dryman, B. A., Meng, X. J., & Zhang, C. (2012). Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vaccine*; 30(12), 2068–2074.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.059>

[94] Vimolmangkang, S., Gasic, K., Soria-Guerra, R., Rosales-Mendoza, S., Moreno-Fierros, L., & Korban, S. S. (2012). Expression of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in soybean seed yields an immunogenic antigenic protein. *Planta*; 235(3), 513–522.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-011-1523-8>



[95] Chen, X., & Liu, J. (2011). Generation and immunogenicity of transgenic potato expressing the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virological methods*; 173(1), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.001>

[96] Gagnon, C. A., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B., & Dea, S. (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archives of virology*; 148(5), 951–972. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0943-y>

[97] Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Du, Y., & Wang, X. (2008). Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus research*; 136(1-2), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.016>

[98] Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B., & Chen, P. (2007). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus genes*; 35(3), 585–595. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0161-5>

[99] Shen, G., Jin, N., Ma, M., Jin, K., Zheng, M., Zhuang, T., Lu, H., Zhu, G., Jin, H., Jin, M., Huo, X., Qin, X., Yin, R., Li, C., Li, H., Li, Y., Han, Z., Chen, Y., & Jin, M. (2007). Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine*; 25(21), 4193–4202. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.010>

[100] Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Tang, J., Wang, X., & Ma, S. (2006). Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Veterinary immunology and immunopathology*; 113(1-2), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.05.001>

[101] Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Li, B., Pan, Y., Luo, R., & Chen, H. (2009). A suicidal DNA vaccine co-expressing two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigens induce protective responses. *Biotechnology letters*; 31(4), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9905-0>

[102] García Plata M. (2019) Identificación de epítomos conservados de la proteína GP5 de Betaarterivirus Suid 2 mediante herramientas bioinformáticas y su evaluación antigénica. Universidad Nacional Autónoma de México. Junio.

[103] Gunn, B. M., & Alter, G. (2016). Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. *Trends in molecular medicine*, 22(11), 969–982. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.002>

[104] Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y (2013) The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol* 4:302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>

[105] Kaur H, Salunke DM (2015) Antibody promiscuity: understanding the paradigm shift in antigen recognition. *IUBMB Life* 67:498–505. <https://doi.org/10.1002/iub.1397>

[106] Kringelum JV, Nielsen M, Padkjær SB, Lund O (2013) Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. *Mol Immunol* 53:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.06.001>

[107] Gupta S, Ansari HR, Gautam A *et al* (2013) Identification of B-cell epitopes in an antigen for inducing specific class of antibodies. *Biol Direct* 8:27. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-27>

[108] Shi, M., Lam, T. T., Hon, C. C., Murtaugh, M. P., Davies, P. R., Hui, R. K., Li, J., Wong, L. T., Yip, C. W., Jiang, J. W., & Leung, F. C. (2010). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of virology*, 84(17), 8700–8711. <https://doi.org/10.1128/JVI.02551-09>

[109] Contreras Luna María Josefina. (2021) Expresión recombinante de proteínas no estructurales del virus de PRRS para evaluar su potencial antigénico e inmunogénico. Tesis en proceso para obtener el grado de Doctora.

[110] Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yoon, K. J., Pogranichniy, R. M., Harmon, K. M., Evans, R., Key, K. F., Pallares, F. J., Thomas, P., & Meng, X. J. (2002). Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *Journal of virology*, 76(23), 11837–11844. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.11837-11844.2002>

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

[112] Jeong, J., Park, C., Choi, K., & Chae, C. (2017). Evaluation of the new commercial recombinant chimeric subunit vaccine PRRSFREE in challenge with heterologous types 1 and 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire; 81(1), 12–21.

[113] Duy, D. T., Kim, H., Jeong, J., Park, K. H., Yang, S., Oh, T., Kim, S., Kang, I., & Chae, C. (2018). Comparative evaluation of the efficacy of commercial and prototype PRRS subunit vaccines against an HP-PRRSV challenge. *The Journal of veterinary medical science*; 80(9), 1463–1467. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0583>

[114] Balka, G., Dreckmann, K., Papp, G., & Kraft, C. (2016). Vaccination of piglets at 2 and 3 weeks of age with Ingelvac PRRSFLEX® EU provides protection against heterologous field challenge in the face of homologous maternally derived antibodies. *Porcine health management*; 2, 24. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0037-y>

[115] Yang, L., He, J., Wang, R., Zhang, X., Lin, S., Ma, Z., & Zhang, Y. (2019). Nonstructural Protein 11 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induces STAT2 Degradation To Inhibit Interferon Signaling. *Journal of virology*; 93(22), e01352-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01352-19>

[116] Jing, H., Ke, W., Tao, R., Li, Y., Zhao, Y., Cao, S., Sun, Y., Wang, J., Zhang, Y., Dong, W., Zhao, P., & Duan, E. (2019). TRIM59 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 replication in vitro. *Research in veterinary science*, 127, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.004>

[117] Wang, D., Chen, J., Yu, C., Zhu, X., Xu, S., Fang, L., & Xiao, S. (2019). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus nsp11 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Targeting IRF9. *Journal of virology*; 93(15), e00623-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00623-19>

[118] Jing, H., Ke, W., Tao, R., Li, Y., Zhao, Y., Cao, S., Sun, Y., Wang, J., Zhang, Y., Dong, W., Zhao, P., & Duan, E. (2019). TRIM59 inhibits porcine reproductive

and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 replication in vitro. *Research in veterinary science*, 127, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.10.004>

[119] Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., & Fang, Y. (2010). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology*; 398(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.033>

[120] Han, M., & Yoo, D. (2014). Modulation of innate immune signaling by nonstructural protein 1 (nsp1) in the family Arteriviridae. *Virus research*; 194, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.007>

[121] Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., & Zhang, Y. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *Journal of virology*; 84(21), 11045–11055. <https://doi.org/10.1128/JVI.00655-10>

[122] Batista L, Murtaugh M, Pijoan C. (2003) Genetic Variation of PRRSV. *Rev Anaporc* 2003;23(236):52-60.

[123] Lunney, J. K., Benfield, D. A., & Rowland, R. R. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus research*; 154(1-2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.009>