



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Tesis para obtención de título de licenciado en biología

Análisis de la variación genética de los genes *GP5* y *NP* de una cepa atenuada del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, PRRSV.

Presenta:

Humberto Gallegos Solis

Tutor:

Dr. José Tapia Ramírez

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2022



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.

CONTENIDO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA.....	1
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1. GENERALIDADES DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO	6
2.2. PROBLEMA ECONÓMICO MUNDIAL	7
2.3. EL PRRS EN MÉXICO Y SU IMPACTO ECONÓMICO.....	8
2.4. SINTOMATOLOGÍA Y CUADRO CLÍNICO	8
2.5. TAXONOMÍA PRRSV	9
2.6. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DE PRRSV	9
2.7. PROTEÍNAS DE PRRSV.....	9
2.7.1. INFECCIÓN DE VIRUS DE PRRS Y CICLO REPLICATIVO	14
2.7.2. INTERNALIZACIÓN DEL VIRIÓN EN LAS CÉLULAS PERMISIVAS.....	14
2.8. CEPAS DE PRRSV	16
2.9. VARIANTES DE VACUNAS DE PRRSV	16
2.9.1. VACUNAS MODIFIED LIVE VACCINE (MLV).....	17
2.9.2. VACUNAS POR VECTORES REPLICANTES DE PRRSV	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. OBJETIVO GENERAL	20
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
4.1. OBTENCIÓN DE STOCK VIRAL	21
4.2. OBTENCIÓN Y MANEJO DE CÉLULAS MARC-145	21
4.3. PASE Y PROPAGACIÓN DE CÉLULAS MARC-145	21
4.4. INOCULACIÓN DE PRRSV EN CÉLULAS MARC-145 Y OBTENCIÓN DE STOCK DE TRABAJO	22
4.5. CITOPATOLOGÍA DE PRRSV EN CÉLULAS MARC-145.....	22
4.6. COSECHA DE PRRSV	22
4.7. CLARIFICACIÓN Y PRECIPITACIÓN DE COSECHA DE PRRSV CON PEG-8000	22
4.8. TITILACIÓN DE PRRSV POR PLAQUEO EN CAJAS P-60.	23
4.9. EXTRACCIÓN DE RNA DE PRRSV.....	23
4.10. CUANTIFICACIÓN DE RNA DE PRRSV	24

4.11.	CALCULO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA PRRS	24
4.12.	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GENOMA DE PRRSV POR RT-PCR	25
4.13.	SECUENCIACIÓN DE PRODUCTO DE PCR	26
4.14.	ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE PRRSV Y PREDICCIÓN DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS	26
4.15.	PREDICCIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS DE PRRSV	27
4.16.	ELABORACIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO DE CEPAS MEXICANAS DE PRRSV	27
4.17.	ELABORACIÓN DE BIBLIOTECA DE cDNA DE LOS FRAGMENTOS SECUENCIADOS DE PRRSV	27
4.18.	PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR CLORURO DE CALCIO CaCl ₂	27
4.19.	REAMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE RT-PCR	28
4.20.	PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PRC PARA CLONACIÓN EN VECTOR TOPO-CLONING 4	28
4.21.	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES POR <i>CaCl₂</i> CON VECTOR TOPO CLONING 4.0 E INSERTOS DE PRRSV	29
4.22.	EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR MINIPREP DE BACTERIAS CANDIDATAS	29
4.23.	PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR POR GEL DE AGAROSA GTG	30
4.24.	VERIFICACIÓN DE INSERTOS DE PRRSV EN VECTOR PCR TOPO 4.0 POR PCR	31
4.25.	DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCEDIMIENTO DEL PRESENTE ESTUDIO	32
5.	RESULTADOS	33
5.1	EFFECTOS CITOPÁTICOS	33
5.2	TITULACIÓN DE PRRSV	40
5.3	ELECTROFORESIS DE LA EXTRACCIÓN DE RNA DE PRRSV	40
5.4	ELECTROFORESIS DE LA PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE RT-PCR POR COLUMNA GEN ELUTE	42
5.5	SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS FRAGMENTOS	43
5.6	ALINEAMIENTO DE NUCLEÓTIDOS DE PRRSV ORF 5 Y NP	48
5.7	CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO DE CEPAS NACIONALES REPORTADAS DE PRRSV	52
5.8	PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE PROTEÍNA ORF5 DE PRRSV VAC P24	58
5.9	PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE ORF 5 DE PRRSV VAC P24	58
5.10	PREDICCIÓN DE PÉPTIDO SEÑAL DE PROTEÍNA DE GP5	59
5.11	PREDICCIÓN DE SITIOS DE GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNA GP5 DE PRRSV VAC P24	60
5.12	PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PROTEÍNA DE GP5 DE PRRSV	61
6.	DISCUSIÓN	63
6.1.	REPLICACIÓN VIRAL EN CÉLULAS MARC-145	63
6.2.	COMPROBACIÓN DE OBTENCIÓN DE SECUENCIAS DE GENES GP5 Y NP	63
6.3.	TRADUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A AMINOÁCIDOS DE GP5	63
6.4.	FILOGENIA DE GP5 DE CEPAS MEXICANAS Y VACÚNALES DE PRRSV	66

7. BIBLIOGRAFÍA..... 69

1. Resumen

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino **PRRSV** afecta a **cerdos de todas las edades**, provoca una **enfermedad multisintomática, agresiva, persistente y evasiva**. los síntomas mas comunes son la pérdida de apetito, parálisis en extremidades traseras, abortos tardíos y cuadros respiratorios. **El PRRSV provoca pérdidas económicas importantes a nivel mundial** en la industria ganadera. El virus presenta un **genoma de 15Kb** dividido en 2 poli proteínas y estas a su vez generan mas de **14 proteínas no estructurales y de 9 proteínas estructurales**, entre las que se encuentran el **gen ORF5 (proteína GP5) y el gen ORF7 (Proteína NP)**, estas son parte fundamental del ciclo de replicación y tienen el mayor grado de variación a nivel genético. Las principales medidas de manejo de PRRSV en granjas porcinas es la **prevención por vacunación** y medidas de bioseguridad, estas medidas no son suficientemente eficaces, **las vacunas en algunos casos puede reproducir la enfermedad, y no presentar protección heterólogos y tampoco homóloga**, es por ello que es imperante el desarrollo de nuevas vacunas con mayor grado de efectividad para la republica mexicana. **El objetivo del presente trabajo es analizar la variación genética de las proteínas GP5 y NP de una cepa con posible uso vacunal del virus de PRRSV después del pasaje 24 (PRRSV VAC P24)**. Se procedió con la atenuación viral por medio de pasajes seriados en células Marc-145. Se analizó el efecto citopático y se tituló el virus para conocer la cantidad de partículas infectivas y la variación con la **cepa sin atenuar (VR2332)**, los resultados muestran una **disminución de tiempo de mantenimiento de infección, así como un aumento del título viral de PRRSV VAC P24**. Posteriormente se extrajo el RNA de PRRSV VAC P24, y se amplificaron y secuenciaron los genes **ORF5 y ORF7** correspondientes a las proteínas **GP5 y NP**, con la secuencia de nucleótidos se procedió a analizar las mutaciones de PRRSV VAC P24 respecto a VR2332, donde nos muestra un total de **10 mutaciones** en la secuencia a nivel de nucleótidos y de aminoácidos. Se realizó una **predicción de la estructura de la proteína de GP5** de PRRSV VAC P24 y VR2332. Se compararon ambas predicciones y se observo que a pesar de presentar 10 mutaciones, **las estructuras de la proteína no se ven afectadas**, por lo que presenta las mismas regiones hidrofóbicas, hidrofílicas, transmembranales, sitios de glicosilación y secuencias péptido señal. Finalmente se recompilo las **secuencias reportadas del gen ORF5 en NCBI para territorio mexicano** y se analizó la posible **relación filogenética** y tipo de cepa, donde las distancias muestra que las cepas vacúnales forman un clado muy definido y están en un punto cercano al origen de donde se ramifican la mayoría de las cepas silvestres mexicanas por lo que existe una relación directa. En el presente trabajo **se concluye** que PRRSV VAC P24 presenta **diferencias significativas** con la cepa original VR2332 tanto en comportamiento citopático, título viral, secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, por lo que **se considera una cepa candidata a ser probada como vacunal**.

2. Introducción

2.1. Generalidades del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

En los años 1986 y 1987 granjas de cerdos de los Estados Unidos presentaron **brotos importantes de una enfermedad** caracterizada por un defecto severo reproductivo en cerdas de cualquier paridad y problemas respiratorios que afectaban a cerdos de todas las edades (Hill, 1990). En Europa el primer reporte de la enfermedad apareció en Alemania en el poblado de Munster en noviembre de 1990, y en Holanda en enero de 1991 a 20 Km de la frontera con Alemania (Wensvoort, 1992, Busse y cols., 1992), después se propagó a varios países de Europa entre ellos Francia y España (Paton y cols., 1991; Meredith, 1991). En 1991 **el agente infeccioso es aislado y se reprodujo la enfermedad** cumpliendo con los postulados de Koch (Terpstra y cols., 1991): a) Se aisló a partir de cerdos enfermos, b) se caracterizó el agente como un nuevo virus de RNA, c) se reprodujo la enfermedad experimentalmente, y d) se aisló el virus a partir de cerdos donde se indujo la enfermedad.

Aunque la **enfermedad ha recibido diferentes nombres** como los son: Enfermedad de la Oreja Azul, síndrome disgénésico y respiratorio del cerdo, enfermedad misteriosa del cerdo, síndrome reproductivo misterioso, síndrome reproductivo e infertilidad misteriosa y Heko-Heko (White 1991; Meredith 1992; Terpstra y cols., 1991; Collins y cols., 1991); los participantes en el primer Simposium Internacional sobre la enfermedad celebrado en Minnessota, Estados Unidos en 1992, **aceptaron como denominación más idónea la de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS, por sus siglas en inglés)**. Esta denominación es reconocida por la International Office of Epizootics (O.E.E.).

El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) es un virus que ataca a cerdos, se caracteriza por presentar falla clínica reproductiva en cerdas, **umentando la mortalidad** durante la fase de lactancia y neumonía de los cerdos de engorde así como su nombre lo indica, los síntomas clínicos mayores en los cerdos se pueden resumir como abortos y dolor respiratorio (Lindhaus y Lindhaus, 1991).

Los signos clínicos de PRRS varían considerablemente debido a varias causas; incluyendo diferencias en la susceptibilidad de la piara, los factores ambientales, el estado inmune, la cepa del virus; así como su combinación con otros virus que afecten a los cerdos.

Se presenta el siguiente cuadro clínico de la enfermedad:

- 1) Pérdida de apetito o anorexia con pirexia
- 2) Abortos, nacimientos de cerdos muertos, débiles o momias,
- 3) Problemas respiratorios
- 4) Otros problemas reproductivos (Loula, 1990; Suárez y cols., 1996).

El PRRSV fue caracterizado primero en Europa en el año 1991, y **posteriormente en Estados Unidos**, ambos virus mostraron tener una homología del 60% a nivel de aminoácidos por lo que se definieron **dos serotipos**; **la cepa 1 ubicada principalmente en el continente Europeo y la cepa 2 ubicado en el continente americano y asiático**. La **primera vacuna de PRRSV** fue comercializada en 1994 en Norte América, siendo una **vacuna viva modificada (MLV)** a partir del virus serotipo 2 o serotipo del continente americano; el cual había sido **atenuado a través de pasajes seriados** en cultivos celulares para reducir su virulencia.

La comercialización y exportación de cerdos y semen para reproducción facilitó la segregación y multiplicación de cepas del virus, y los análisis moleculares de diversas cepas reportadas indican que son de **origen variado y algunas de estas son quiméricas**. En China se ha reportado la aparición de **brotes de virus de PRRS altamente virulentos**.

En México el PRRS fue reportado a finales de la década de los 80's, pero no tuvo reconocimiento oficial hasta 1999 (Lara, 2000). Los reportes muestran que las **cepas mexicanas provienen del serotipo 2** y las vacunas más utilizadas en el país son MLV provenientes de cepas americanas.

En la actualidad el PRRSV gracias a su rápida tasa de mutación y sus estrategias de recombinación han facilitado su diferenciación entre las principales cepas americanas y europeas, aunque también se ha promovido la aparición de virus quiméricos con características genómicas de ambos serotipos y cepas de alta virulencia como el HP-PRRS reportado recientemente en China.

2.2. Problema económico mundial

En la actualidad, la industria ganadera porcina tiene una **demanda del 40%** del total de carne roja a nivel mundial de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO). La producción de carne de cerdo tuvo un **aumento de 72 a 94 millones de toneladas en 10 años y se estima que aumente a 125 millones** de toneladas en el año 2020 (Delgado C., 1999). Los **desarrollos tecnológicos de bioingeniería** han sido claves en el desarrollo de la industria ganadera y ha sido promovida principalmente por los países desarrollados, sin embargo la industria se ha visto amenazada por enfermedades que han provocado la **disminución de la producción y grandes pérdidas económicas**; es por ello que el **control de enfermedades y la vacunación se han vuelto imprescindibles** para el desarrollo

sustentable de esta industria.

El PRRSV a provocando en E.U. una **pérdida económica anual 560.32 millones de dólares**; la alta mortandad, la pérdida de peso, la medicación y costos de las vacunas, son algunas de las causas (Neumann EJ. y cols., 2005). En granjas donde aparecen brotes de PRRSV, **la producción de lechones se reduce en un 10%**, y provocan que el gasto por cerda sea de 226 dólares, los brotes de PRRSV en granjas suelen ser **persistentes** pudiendo localizar partículas virales 3 meses posterior a la infección y en algunos casos se pueden encontrar partículas virales en órganos linfáticos posterior a los 6 meses post infección (P.I.) y generar respuestas positivas a pruebas de ELISA y RT-PCR 9 meses P.I. (Dee y cols., 1997).

2.3. El PRRS en México y su impacto económico

En México la industria ganadera porcina tiene el **tercer lugar en importancia económica e industrial**, produciendo actualmente alrededor de **1.33 millones de toneladas de carne** al año y alcanza a nivel nacional el consumo del **38% total de carne**. Se estima que durante el 2013 se produjo una cantidad de **1.28 millones de toneladas** de carne de cerdo con un valor comercial de **45,372 millones de pesos**. Los principales estados productores en ganadería porcina son **Jalisco** con 234 mil toneladas, **Sonora** 233 mil toneladas, **Puebla** 122 mil toneladas, **Guanajuato** 109 mil toneladas, **Veracruz** 106 mil toneladas, **Yucatán** 104 mil toneladas y **Michoacán** con 41 mil toneladas (Secretaría de Hacienda y crédito Público SHCP, 2015).

2.4. Sintomatología y cuadro clínico

El PRRSV provoca una enfermedad en cerdos **multisintomática y persistente**, produciendo en **cerdos jóvenes y lechones** cuadros respiratorios, anorexia, pirexia, debilidad, letargia y atrofia muscular. En cerdos **hembras adultas** puede provocar fallas reproductivas como abortos tardíos y alteraciones en el ciclo estral; **en verracos** la enfermedad provoca mala calidad de semen e inhibición del líquido (Ramírez y cols., 2006). A **nivel celular**, el virus tiene preferencia por células **alveolares pulmonares**, aunque se ha demostrado la ubicación del virus por medio de antígenos virales en cornetes nasales, pulmón, nódulos linfáticos, corazón, timo, vasos sanguíneos, bazo, hígado, glándulas adrenales, riñones, intestino, cerebro y testículos. El virus penetra a las células por endocitosis, preferentemente líneas de **monocitos y macrófagos** (Quintana, 2007).

2.5. Taxonomía PRRSV

Los virus de la familia **Arterividae** tienen un genoma de una **cadena sencilla de RNA de 12 a 16 kb, polaridad positiva, policistrónico**. El extremo 3'terminal poliadenilado y con **regiones no codificantes (UTR's)** en las regiones 3'y 5'. Las tres cuartas partes del genoma codifican para el **fragmento abierto a la lectura 1(ORF1)** el cual generalmente se divide en *ORF1a* y *ORF1b* separado por regiones de **cambio de sentido ribosomal o cambios de marco de lectura (ORF)**. En *ORF1a* se encuentra codificadas las **proteínas no estructurales (NSP)** mientras que en *ORF1b* se encuentra el complejo de replicación viral; El **resto del genoma** codifica una serie de genes que corresponde a las **proteínas estructurales**, las cuales se traducen por medio de una estrategia de transcripción discontinua produciendo una serie de mensajeros de diferente elongación llamados RNA sub genómicos (sgRNA) característicos del orden de los nidovirus.

2.6. Estructura del Virión de PRRSV

De acuerdo con estudios de microscopía electrónica (ME) se ha observado la estructura del virión, donde se muestra con una forma esférica u ovalada. En estudios de ME de tinción negativa las **partículas virales tienen un diámetro de 55 nm** mientras que en Cryo-ME varían de diámetro de 40-70 nm con una media de 54 nm. El virión presenta una superficie con textura suave o fibrosa con una profundidad de aproximadamente 2 nm de espesor concordante con la longitud de los ectodominios de los **complejos mayor proteico** el cual tiene una extensión de 16-30 a.a., algunas protuberancias o vellosidades muestran una longitud de 10-15 nm pudiendo corresponder con el **complejo menor proteico** el cual tiene un ectodominio de 436 a.a.. Se pueden observar en las fotografías de ME de tinción negativa que el **virión tiene una membrana de bicapa lipídica** de aproximadamente 4.5 nm de separación entre cada una, en regiones se observan estriaciones cruzadas lo que pudiera ser los endodominios del complejo mayor proteico. El núcleo se puede observar con un diámetro de 39 nm con una separación de la membrana interior de 4 nm aproximadamente, **la densidad del núcleo disminuye** en el centro de este, lo que supone el **núcleo viral es hueco**. Aunque las evidencias no son contundentes la **estructura nuclear pudiera ser icosaédrica** como se muestra en otros arterivirales y las **núcleo proteínas** se acoplan en dímeros con **regiones permisivas a la unión del RNA** formando fibras largas de **complejos Proteína-RNA** que permiten la encapsulación del ARN dentro de la cápside (Dokland, 2010).

2.7. Proteínas de PRRSV

El **genoma de PRRSV** así como el de los Arteriviridae es compacto y probablemente pueda ser

considerado como una versión minimalista del genoma viral de los nidovirales, más sin embargo aún **no se dispone de la información sobre el funcionamiento de algunas de las proteínas** de PRRSV. A través de estudios de proteómica se han logrado identificar **más de 14 proteínas no estructurales** que incluyen proteasas como cisteínas tipo papaínas proteasas (Papaine-like cysteine proteasas PLP) y serine-proteasas (SP), además de las proteínas que conforman el **complejo de replicación** como la RNA polimerasa RNA dependiente RpRd, Helicasa H y endonucleasa Urydilato-Específica (NENDO-U), una proteína no glicosilada *ORF5a* y **8 proteínas estructurales** de PRRSV que incluyen las glicoproteínas 2 a 6, proteína E, proteína M y la nucleoproteína que **son transcritas a partir del genoma de PRRSV en los serotipos 1 y 2.**

1.8.1. Las proteínas no estructurales NSP

Dentro del genoma de PRRSV la **mayoría de las proteínas se encuentra codificada dentro del gen *ORF1***, el cual ocupa $\frac{3}{4}$ partes del tamaño total del genoma y da origen a las poliproteínas pp1a que tiene de longitud 2503 a.a. y pp1ab con 3690 a.a. por lo que **es el producto transcrito mas largo de PRRSV** y estos a su vez generan mas de 14 proteínas no estructurales NSP, las cuales se numeran de acuerdo a su lugar en el genoma. Estas proteínas **se encargan principalmente de orquestar la replicación viral y formar el complejo de replicación CR** para que se lleve a cabo el ensamblaje y exocitosis del virión. Las proteínas NSP1 y 2 dan origen a las proteasas tipo papainas PLP, las cuales realizaran cortes en el polipéptido para liberarla a las NSP, las proteínas NSP3 a la 8 no esta muy clara su función, **las NSP 9 a la 12 están involucradas en el proceso de formación del complejo de replicación del genoma viral.** Durante la transcripción pp1a y pp1ab se ha mostrado que tanto PLP's como SP cortan el transcrito y lo dividen en cuanto se pliegan usando como sustrato la cadena de a.a.. en síntesis y generando las NSP. Se han logrado cristalizar y analizar por difracción de rayo X algunas de las NSP, sin embargo, aún **no se ha logrado esclarecer que probable función tienen las NSP de la 5 a la 8** (Snijder, 1994., Snijder y Meulenberg 1998).

1.8.2. Proteínas estructurales de PRRSV

Las regiones *ORF2-ORF7* contienen codificadas las proteínas estructurales de PRRSV, se ha mostrado que la **síntesis y plegamiento** de estas proteínas se realiza en las vesículas perinucleares de doble membrana presentes durante la infección a partir de la transcripción de los sgRNA. Estas proteínas son las **encargadas del ensamblaje, reconocimiento e**

internalización del virión, así como de encapsular el gRNA. Los productos codificados por *ORF2,3,4,5* son **proteínas glicosiladas GP2, GP3, GP4 y GP5** respectivamente, las cuales forman complejos (complejo de GP2,3,4) exponen en la membrana lipídica del virión, la proteína M es codificada por *ORF6*, y es una proteína no glicosilada que forma un complejo proteico con GP5, la proteína E o 2b es codificada por *ORF2* y muestra ser determinante para la ineffectividad del virión. La proteína N o NP es la encargada de estructurar la nucleocápside y encapsular el gRNA, la cual es codificada por *ORF7*.

Complejo GP2,3,4.

Las proteínas GP2, GP3 y GP4 forman un complejo multímero en la superficie celular del virión denominado como complejo menor proteico. En EAV se unen por medio de uniones por puentes di-sulfuro y probablemente en PRRSV aunque no se ha comprobado. En estudios de inmunoprecipitación se sugiere que la probable interacción entre complejos GP5-M y GP2-4 por medio de las proteínas GP5, GP4 en virus tipo 1.

1.8.2.2 Proteína 2b o E

La **proteína 2b** o también conocida como **proteína E (EP)** se encuentra codificada por *ORF2b*, es una proteína no glicosilada de 70-72 residuos de aminoácidos y forma parte de las proteínas estructurales ubicada en la superficie de la membrana viral, contiene un motivo transmembranal en hélice y forma un complejo oligómero que **funciona como canal iónico**, en comparación con otras proteínas virales con estructura similar se puede prever que **EP puede estar involucrada en el proceso de internalización y liberación del genoma viral** dentro del citoplasma al regular el paso de protones y ajustar el pH dentro de los endosomas durante la internalización. En EAV se ha observado que aunque sea determinante para llevar a cabo la infección del virión, no está involucrada en la formación del complejo menor proteico compuesto por GP2, 3,4.

1.8.2.3 Glicoproteína 3 GP3

La proteína GP3 se puede localizar en el medio extracelular durante la infección con PRRSV tipo 2 por lo que se tenía como supuesto que no era una proteína estructural, posteriormente con estudios de inmuno colocalización se ubicó a GP3 en la superficie del virión por lo que se confirmó como una proteína estructural. **GP3 tiene el mayor grado de variabilidad** en las proteínas estructurales de PRRSV después de GP5 con una similitud entre secuencias del tipo 1 y 2 del 58%; está compuesta por 254-265 residuos de a.a., y **presenta el número más alto de lugares de glicosilación**, la topología de GP3 es incierta aun, aunque las predicciones muestran

que contiene motivos transmembranales del residuo 1 a 27a.a. y otro de 180-200a.a., cerca de la región C-terminal se encuentra una región hipervariable de 30-50a.a., la supuesta región del ectodominio presenta una longitud de 117 a 163 a.a.

1.8.2.4 Glicoproteína 5 GP5

La glicoproteína 5 GP5 es la proteína con mayor grado de variabilidad con un 50-51% de homología entre virus de tipo 1 y 2, se ha mostrado que esta proteína es el **principal epítotope** en la reacción inmunológica contra PRRSV así **también es la causante de que no se presente reacción inmunológica cruzada** ente cepas de virus, está compuesta por 200 a.a. en donde en el extremo N-Terminal se encuentra el **dominio péptidos señal** del 1-31 a.a. seguido por un ectodominio el cual es glicosilado en dos regiones, Asn44 y Asn55; presenta una cisteína en la posición 48 la cual forma puentes disulfuro con proteína M formando el heterodímero complejo proteico **GP5-M también llamado complejo mayor proteico** el cual es fundamental durante para la formación del virión y reconocimiento de células infectivas. A pesar de que se han realizado predicciones por medio de software informático de las secuencias de aminoácidos las evidencias no son concluyentes al respecto, el residuo 60-125 donde se estima se encuentra una región hidrofóbica donde podrían encontrarse de **1 a 3 regiones transmembranales TM** donde solo la última TM parece ser la más de mayor probabilidad ubicada en la posición 107-125 de virus tipo 2, los otros dos probables ectodominios se encuentran en la posición 63-82; la ubicación de **3 regiones TM provocarían que la región de glicosilación ubicada entre el TM1 y TM2 se encontrara en un endodominio**, por lo que sería inusual, aunque **este acomodo daría como consecuencia que la longitud del ectodominio** sea de 30 a.a. lo que corresponde con las imágenes de microscopía electrónica del virión; los análisis de alineamiento entre PRRSV y EAV muestran que EAV contiene 255 a.a. (55 a.a. más que PRRSV) en donde la inserción está localizada en la región del ectodominio de EAV provocando que la región de la glicosilación se encuentre en el ectodominio a diferencia de PRRSV. En la región **C-Terminal se encuentra la sección del endodominio** ubicada en la posición 130-200, la cual **podría interactuar con la nucleocápside** viral aunque aún no existen evidencias concretas.

1.8.2.5 Proteína M

La proteína M es la proteína estructural mejor conservada de PRRSV, contiene entre 160 y 170 residuos de aminoácidos, en el extremo N-Terminal **carece de péptidos señal**, en su lugar se encuentra una secuencia de ectodominio con una región de unión a ácido myristico en las glicinas expuestas en la región N-Terminal, sin embargo en PRRSV no hay unión a ácido myristico debido a la presencia de una serina en la posición 6 que evita el reconocimiento de la N-Myristiltransferasa, a continuación se encuentran previstas **3 regiones transmembranales** de

20a.a. unidas por **2 ectodominios** cortos en asas de 6-9a.a., finaliza con una secuencia hidrofílica larga en la región C-Terminal de 70-80a.a.. La proteína M de PRRSV como de EAV **forma dímeros con GP5** por medio de un enlace disulfuro por medio del aminoácido de cisteína en la posición 8 del ectodominio, la **dimerización es esencial para el transporte del complejo M-GP5** por el retículo endoplásmico ER, la formación de homodímeros de proteína M suele ocurrir en PRRSV por medio de enlaces covalentes entre moléculas, aparentemente la formación de este homodímero no tiene funcionamiento en el proceso replicativo o infeccioso de PRRSV.

1.8.2.6 Proteína de nucleocápside NP

La **nucleocápside** de PRRSV está **conformada por un conglomerado de proteínas con gRNA**, la nucleoproteína de PRRSV muestra **ser fundamental para completar el ciclo replicativo de PRRSV**; es **la más abundante** de las proteínas virales encontradas durante la infección del virión de PRRSV por lo que a su vez provocan una **mayor cantidad de anticuerpos específicos pero no muestran ser neutralizantes** o efectivos para la eliminación del éste.

NP tiene un tamaño de 123-128a.a., la secuencia de a.a. se puede dividir en dos secciones, el extremo N-Terminal con el dominio de interacción con el RNA, y la sección C-Terminal con el dominio de dimerización, **la regiones N y C-Terminal en conjunto encapsulan el RNA**, forman la estructura de la nucleocápside y muy probablemente estén inmiscuidas para que se lleve a cabo el ensamblaje del virión. En los aminoácidos 21-33 se encuentra una región que se prevé forma una **hélice alfa presente en la mayoría de NP de nidovirales**. Para que se lleve a cabo la dimerización se ha visto inmiscuida las Cys 23 localizada en la región N- terminal del dominio de alfa hélice formando puentes di-sulfuro entre moléculas. Se encuentra fosforilada en las 4 tanto en los extremos N y C- Terminal aunque no se conoce la función.

Se ha reportado que se puede **localizar NP dentro del núcleo y nucléolo de las células infectadas** con el virión, por lo que podría **regular la transcripción del genoma celular** durante la fase de replicación. La cristalización de NP no se ha realizado completa, sin embargo se ha logrado analizar la región Ndelta57 donde se muestra que **la proteína se pliega en dímeros en paralelo** formando una base de 4 cadenas laminares en beta rodeada por cadenas alfa hélice, con dos cadenas con 3 giros de alfa hélice a los extremos de la proteína en contraposición, **esta conformación quizá funcione para la exposición del sitio de unión de RNA**. La proteína NP se ha reportado que se encuentra en dímeros en solución. Se han realizado pruebas donde se desnaturaliza la proteína con urea y posteriormente se en presencia de tRNA se presente nuevamente el plegamiento formando cadenas largas filamentosas de 4nm de grosor indicando que la conformación dentro del virión puede ser helicoidal y filamentosa correspondiente con la estructura prevista en ME (Dea S. y cols., 2000), (Meulenberg J.J. y cols., 1995), (Yoo D. y cols., 2003), (Mardassi H., 1996).

2.7.1. Infección de virus de PRRS y ciclo replicativo

El virus de PRRSV puede ser **transmisible por vía aérea, vía sanguínea, por mucosas, saliva y por vía sexual**. Una vez el virus ha sido introducido en el sistema puede **ser localizado en órganos linfáticos, sangre, semen, saliva, mucosas, y principales órganos incluyendo pulmones y cerebro** de cerdos de todas las edades. Tiene preferencia por **macrófagos alveolares**. En condiciones *in vitro* **se consiguen infecciones en células de riñón de mono verde MA-104 y sus derivadas como Marc-145 y CL2621** así como de líneas celulares que expresan de Cd-163 de forma exitosa con PRRSV; además existen algunos reportes que indican que **es viable la infección viral en células dendríticas DC (Dendritic Cells)** de cerdo.

2.7.2. Internalización del virión en las células permisivas

Para que exista la internalización del virión de PRRSV en las células permisivas se requiere interacciones de unión con afinidad muy alta entre proteínas transmembranales y los complejos proteicos expuestos en el exterior del virión. Los mecanismos de acción que utiliza el PRRSV para ingresar a la célula aun no son del todo conocidos, pero se han podido identificar algunas moléculas transmembranales involucradas en el proceso de acoplamiento entre el PRRSV y su hospedero de los cuales se han postulado modelos de internalización de PRRSV en macrófagos alveolares y cultivos Marc-145, donde **la heparina sulfato, sialoadhesinas y CD163 muestran ser determinantes para que se complete el proceso reconocimiento, anclaje y liberación del gRNA en citoesqueleto**.

Algunas observaciones han podido identificar la heparina sulfato como una de las moléculas de **reconocimiento y anclaje** del virión en la superficie celular de macrófagos alveolares de cerdo y Marc-145. Las moléculas tipo heparina son proteínas que se localizan en la superficie de células de mamíferos, se encuentran ancladas a proteínas O-glicosiladas o proteoglicanos ubicados en la superficie celular y tienen funciones de anclaje. En experimentos *in vivo*, se ha incubado PRRSV con heparina sulfato previamente a la infección en macrófagos alveolares de cerdo pudiendo reducir la ineffectividad del virus, sin embargo no se consiguió inhibir completamente la infección (Delputte y cols., 2002; Vanderheijden y cols., 2001). De acuerdo con la investigación de Jusa y cols., 1997 se han podido identificar a **las moléculas tipo heparina en la superficie celular de cultivos Marc-145. Los virus inoculados con heparina sulfato a-priori infección redujeron ampliamente la infectividad** en células Marc-145, a su vez, se han tratado

las células Marc-145 con enzima heparinasa 1 la cual degrada a la heparina sulfato previo a la infección con PRRSV y se han obtenido efectos semejantes (Delputte y cols., 2002; Vanderheijden y cols., 2001). Estos resultados sugieren que la infección de macrófagos alveolares esta mediada por moléculas de anclaje adicionales, pero en células Marc-145 pudiera ser el principal mediador del acoplamiento celular con el virión, así se explicaría el acoplamiento de PRRSV en la superficie celular de otros tipos de células que expresan moléculas tipo heparina y no internalizan al virión.

Las sialoadhecinas se reconoció su función por medio de estudios con anticuerpos monoclonales específicos para macrófagos alveolares (mAbs) ya que **al ser bloqueada por mAbs se evita la infección de PRRSV en macrófagos alveolares de cerdo.** (Duan y cols., 1998a, b). Las sialoadhesinas son glicoproteínas transmembranales tipo 1 de macrófagos, y se pueden localizar en células del sistema inmune como macrófagos, estas son las **encargadas de interactuar con el complejo mayor proteico M-GP5 de PRRSV y de internalizar a los viriones** dentro de la célula a través del mecanismo de endocitosis mediado por catrinas (Vanderheijden y cols., 2003; Van Breedam y cols., 2010). De acuerdo a las cinéticas de ligando, tanto las sialoadhecinas como la heparina sulfato son necesarias para el reconocimiento e interacción del PRRSV con las células permisivas pero estas moléculas **no están involucradas en el desencapsulamiento y liberación del material genético dentro del citosol de la célula.**

Una vez el virión es internalizado a la célula por la vía de endocitosis, requiere la liberación del RNA genómico (gRNA) en el citosol de la célula infectada, algunos estudios de colocalización muestran que el virión permanece en los endosomas tempranos (pH 6.5-6.0), pero desaparecen en los endosomas tardíos (pH 5.0-6.0) o los lisosomas (pH 5.0-4.5), lo que **sugiere que se requiere la disminución del pH dentro de los endosomas para la liberación del gRNA.**

La proteína localizada durante el endosoma temprano es **CD-163** y a pesar que no se conocen los mecanismos de acción se ha demostrado que es un **factor determinante en la liberación del gRNA en el citosol** mediante el análisis comparativo de bibliotecas de expresión de cDNA de macrófagos alveolares con respecto a líneas celulares no permisivas de infección por PRRSV. El **Cd-163 es una glicoproteína transmembranal del tipo 1 receptora de detritos característica de líneas celulares de monocitos macrófagos,** con afinidad hacia lipoproteínas. En humanos es conocido que CD-163 reconoce e internalizar complejos de hemoglobina-haptoglobina libres en sangre y evitando daño oxidativo en tejidos. **En células Marc-145 se ha reconocido la expresión y localización de esta glicoproteína transmembranal** y se ha reducido significativamente la infección del virión de PRRS al incubar anticuerpos específicos para Cd-163 por lo que sugiere a **Cd-163 como uno de los principales mediadores en la internalización del virión de PRRS tanto en macrófagos alveolares como en Marc-145** pero no interviene en la adherencia del virión en la superficie celular (Calvert y cols., 2007) (Van Gorp y cols., 2008). **Líneas celulares no permisivas a infección con PRRSV pueden volverse permisivas al expresar Cd-163** aunque en bajos porcentajes, la tasa de infección de PRRSV aumenta al combinar la expresión de CD-163 y

sialoadesinas. Por lo que sugiere que Cd-163 está más relacionada con el desnudamiento viral y la liberación del gRNA del virión. Los estudios de inmunoprecipitación del lisado de células infectadas con PRRSV con mAbs para Cd-163 así como para GP2 y GP4 muestran que Cd-163 **se une específicamente a GP2 y GP4 de PRRSV**, por lo que se sugiere que estas glicoproteínas virales están estrechamente relacionadas con el desnudamiento y liberación de gRNA en el citosol (Calvert, y cols., 2007)

2.8. Cepas de PRRSV

La industria porcina como se ha mencionado es una **industria mundial, lo que ha permitido la segregación del PRRSV en todo el mundo**. Es por ello que la importación y exportación de ganado porcino para reproducción así como la compra venta de semen ha transportado el virus de PRRS a otras localidades alrededor del mundo **favoreciendo la recombinación y aparición de virus quiméricos y de alta virulencia**, haciendo más difícil el manejo y control de la enfermedad.

2.9. Variantes de vacunas de PRRSV

La infección con PRRSV provoca **enfermedades persistentes**, mostrando la remisión de los síntomas posterior a los 3 meses de infección y encontrando PRRSV en órganos linfáticos **hasta 6 meses post infección (P.I.)**; sin embargo el sistema inmune del cerdo usualmente termina por resolver la enfermedad y eliminar por completo las partículas virales. El sistema inmunológico de los cerdos contra PRRSV puede generar la protección necesaria eventualmente antes de alcanzar los 200 días P.I.. Posterior los **7 días de la infección** de PRRSV los cerdos **producen anticuerpos específicos principalmente para la proteína nuclear** y algunos contra las proteínas transmembranales virales, aunque se ha demostrado que **estos anticuerpos no son neutralizantes** y no son efectivos contra la infección. **La aparición de anticuerpos neutralizantes (NAb) aparece posterior a los 15-22 días P.I.** y son dirigidos contra **GP5**. La respuesta inmune que generan los cerdos al ser infectados **solo es funcional contra los virus de PRRS homólogos**, por lo que las vacunas contra esta enfermedad solo funcionan con un número limitado de cepas

Ya que GP5 es la proteína a donde se dirigen los Nab's, podría ser la razón por lo que la protección de las vacunas se limite a cepas homologas debido a su variabilidad; **GP5 presenta 2 epítopes** nombrados como A y B, se ha mostrado que la primera respuesta mediada por anticuerpos va dirigido al epítope A, sin embargo los anticuerpos producidos no son neutralizantes, por el contrario con **el epítope B se generan anticuerpos neutralizantes**, aunque esta respuesta es tardía, presentándose después de los 20 días P.I.

Desde 1990 se comenzaron investigaciones relacionadas a posibles vacunas para PRRSV (Levstad, 1990) pero es hasta 1994 que se comienza a comercializar la **primera vacuna para PRRSV** en los Estados Unidos de América. La vacuna fue hecha a partir de un brote de PRRSV y modificada para **atenuar su virulencia lo que se conocen como vacunas Modified live vaccines (MLV)**. Las vacunas MLV han mostrado tener una buena aceptación en producción de anticuerpos específicos y en la disminución de virulencia y protección y disminuir la aparición de nuevos brotes en granjas vacunadas, sin embargo, este tipo de vacunas han mostrado no ser eficientes contra **virus de PRRSV heterólogos**, no mostrando así protección alguna contra la mayoría de las variantes de PRRSV, es por ello que **se han buscado otras alternativas en la producción y mejoramiento de vacunas**, dando origen a vacunas de virus inactivos, de subunidades víricas, de vectores ya sean virus o bacterias recombinantes con epítopes de PRRSV, y mejoras y especializaciones a las vacunas MLV como virus con mutaciones puntuales, recombinantes o quiméricos. Sin embargo los resultados no son alentadores y **no hay vacuna que permita la protección contra virus heterólogos y en algunos casos inclusive contra virus homólogos**.

1.12.1 Vacunas para inmunización por virus vivos

Este tipo de vacunas es utilizado cuando no existen otras alternativas ya que se utilizan **PRRSV silvestres nativos** de una región determinada para crear respuesta inmune en cerdos jóvenes que se introducirán en una nueva población de cerdos que han estado expuestos al virus. Las muestras virales son extraídas de sangre de cerdos expuestos al virus después de 4-5 días, el virus es almacenado en frío y posteriormente se utiliza para ser inoculado en los cerdos jóvenes que serán introducidos a la población dada.

2.9.1. Vacunas Modified Live Vaccine (MLV)

Las vacunas más utilizadas y que se comercializan actualmente provienen de virus vivos modificados. **Este tipo de vacunas muestran tener una eficiencia mayor** en cuanto a tipos de cepas virales que protegen promoviendo el **desarrollo de respuesta inmune de tipo innata humoral y celular**. Las vacunas PRRS-MLV se pueden obtener de cepas virales propagadas a través de **varios pases en líneas celulares** que expresan naturalmente CD-163 como las líneas celulares derivadas de riñón de mono verde como son **MA-104 o Marc-145** o aquellas que son modificadas con ingeniería genética para expresar dicha molécula en la membrana celular. Las PRRS-MLV también se pueden generar a través de ingeniería genética con la **identificación de fenotipos mutantes** que muestren baja virulencia, menor velocidad de replicación mayor producción de epítopes u otras alteraciones benéficas, estos cambios pueden ser por causas naturales y pueden ser identificados por secuenciación genómica, posteriormente se puede desarrollar con el aislamiento de la secuencia viral o generación de mutaciones dirigidas,

genotipos que produzcan fenotipos de baja virulencia que pueden ser introducidos al virus con el uso de enzimas de restricción, clonación, PCR, y uso de vectores. Estos virus pueden ser quiméricos al contener en su genoma mosaicos de diferentes cepas virales.

Las vacunas comerciales MLV distribuidas en Estados Unidos de América son vacunas provenientes del tipo viral 2 y particularmente de la **cepa VR2332**, mostrando tener una gran aceptación y eficacia en virus regionales mostrando protección heterogénea. En Europa se comercializan vacunas MLV provenientes tanto del tipo viral 1 y 2 de PRRSV.

Estas vacunas han demostrado tener **grandes beneficios en su aplicación en granjas de Norteamérica, europeas y asiáticas** protegiendo a los cerdos de una gran variedad de cepas virales de PRRS, sin embargo no son las únicas y se han desarrollado de **varias cepas virales dependiendo de las necesidades que se presenten**. Las vacunas de PRRSV-MLV han mostrado tener una **disminución de la sintomatología** de PRRSV disminuyendo temperatura corporal, daños a pulmones, evitando infecciones bacterianas secundarias, la pérdida de peso y disminuyendo la mortalidad en lechones jóvenes y abortos tardíos. También han tenido impacto al **reducir el costo económico del tratamiento** de la enfermedad y **evitando nuevos brotes** de la enfermedad en las granjas donde se aplica.

Sin embargo, cada vacuna MLV es susceptible a la regresión de la virulencia y han mostrado ser **ineficaces en algunas infecciones de PRRSV con cepas heterólogas**. Por lo que las vacunas más comercializadas en general no ofrecen protección cruzada y contra cepas regionales de PRRSV. **En México actualmente las vacunas comerciales más utilizadas provienen del serotipo viral tipo 2 de la cepa VR2332.**

2.9.2. Vacunas por vectores replicantes de PRRSV

Actualmente se estudian sistemas de expresión heterólogos, con capacidades de **replicar o expresar proteínas virales de PRRSV para generar respuesta inmunológica**. Como se ha mencionado los principales proteínas transmembranales que funcionan como epítotope para generar anticuerpos específicos son **GP3, GP5 y proteína M los cuales son los principales blancos** de estas vacunas.

Algunas pruebas se han realizado en virus caninos como el Adenovirus canino recombinante para expresar GP5 y proteína M de PRRSV. Las pruebas de inoculación en ratón generan anticuerpos específicos. Al ser expresado junto con el factor estimulante de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CD-40 (rAd-CD40L-GP35), estos se inocularon en cerdo y mostró un aumento significativo de anticuerpos; posteriormente se inoculo con PRRSV y se observó la disminución de virulencia, inhibiendo el cuadro clínico y daños a pulmones. Otros virus utilizados son el virus de la pseudorabia (PRV) recombinante para GP5 (rPRV-GP5), para GP5 y proteína M (rPRV-GP5-M) y para GP5 con una secuencia modificada (rPRV-GP5m-M) lo

que generó una mejor protección contra PRRSV, mostrando tener **potencial para su futura explotación como vacuna**. Sin embargo, algunas **pruebas de vacunas con vectores no han resultado exitosas teniendo como resultados protecciones parciales o nulos contra la infección con PRRSV** como son el caso del virus de la gastroenteritis transmisible recombinante que expresa las proteínas GP5 y M de PRRSV (rTGEV-GP5-N465S-M) así como el virus de la arteritis equina EA que expresa los ectodominios N-Terminal de las proteínas GP5 y M rEAV **estos intentos han demostrado ser completamente ineficaz** al ser infectivo en líneas celulares de EAV pero no poder infectar líneas celulares permisivas de PRRSV.

Debido a los altos costos que se generan durante el manejo de la enfermedad cuando aparece un brote en una granja; incluyendo la atención veterinaria, tratamientos paliativos, pérdida de peso de los cerdos, postergación y abortos de las etapas reproductivas, alta mortalidad en lechones, aparición de infecciones secundarias y la falta de tratamientos efectivos contra la infección, **la mejor forma de tratamiento contra PRRSV es la prevención y la aplicación de programas de cuarentenas oportunas, barreras físicas y sobre todo el uso de vacunas**, ya que reduce el riesgo de un brote y los costos de tratar la enfermedad. Sin embargo **en la práctica se ha demostrado que no todas las vacunas contra PRRSV ofrecen protección** contra las amenazas de infección; ya que **las vacunas generadas a partir de partículas virales o vectores replicantes no han mostrado generar la protección** necesaria ya que al retar a cerdos previamente inmunizados con muchas de estas vacunas, los cerdos presentan el cuadro clínico de la enfermedad, además de no presentar protección heteróloga contra cepas provenientes de tipos de PRRSV diferentes del cual se produjo la vacuna; por otro lado, las **vacunas vivas contra PRRSV**, a pesar de ser las más utilizadas y las más efectivas cuando se reta en cerdos inmunizados con ellas, **no generan protección contra infecciones de virus de PRRSV heterólogos**, y en algunas otras ocasiones las MLV **provocan la aparición de sintomatología, propagación en granjas y reversión de la virulencia**.

En México se ha reportado que el virus que se presenta con mayor frecuencia es el tipo 2, emparentado con la cepa VR2332, sin embargo, **las vacunas que se han comercializado** en nuestro país, a pesar de ser MLV generadas a partir de VR2332, **se ha puesto en duda su funcionalidad**, ya que existen reportes de la aparición de cuadro clínico, contagio y no muestran protección frente a infecciones heterólogas y en muchas ocasiones en infecciones homologas, apareciendo brotes de la enfermedad de PRRSV de tipo 2 en granjas previamente vacunadas, esta información hace suponer que **las MLV aplicadas en México puedan comenzar a comportarse como cepas silvestres** y al aplicarlas en el sector industrial ganadero, promover su proliferación.

Es por ello que el **objetivo de esta investigación es analizar el comportamiento en cultivo celular de una cepa vacunal la cual se replicado a través de 24 pasajes en el modelo de células de riñón de mono verde Marc-145, secuenciar los genes estructurales de esta cepa y una cepa silvestre aislada en el país y recabar información de las cepas silvestres que se han reportado en el país para realizar una comparación a nivel de nucleótidos y predicción de secuencia de**

aminoácidos con las cepas silvestres reportadas y las cepas vacúnales que son comercializadas en México.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Analizar la variación genética de los genes GP5 y NP del Virus de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, PRRSV, de una cepa atenuada replicada en células Marc-145.

3.2. Objetivos particulares

Analizar el comportamiento de la cepa PRRSV VAC P24 en cultivo celular después del pasaje 24 en células Marc-145.

Analizar y comparar la secuencia de nucleótidos de los genes estructurales GP5 y NP entre las cepas PRRSV VAC P24 y VR2332.

Comparar las secuencias de nucleótidos de las cepas de PRRSV VAC P24 con las reportadas en México.

Comparar las predicciones de las secuencias de aminoácidos de las cepas obtenidas.

4. Materiales y métodos.

Para visualizar el flujo de trabajo realizado en esta investigación, favor de consultar el diagrama 1 presentado al final de la sección de Materiales y métodos.

4.1. Obtención de Stock viral

El Stock inicial de trabajo del PRRSV se obtuvo de la cepa americana tipo 2 VR2332, la cual se considera una cepa virulenta y es posible su atenuación por medio de pasajes seriados en cultivos celulares. Se propago en la línea celular Marc-145 para realizar la replicación y atenuación viral *In vitro* ya que son células permisivas a la infección por PRRSV.

4.2. Obtención y manejo de células Marc-145

Todo el proceso de mantenimiento y propagación del cultivo celular se realizó bajo condiciones de esterilidad en un gabinete de bioseguridad y con el material y soluciones esterilizados. La línea celular Marc-145 se deriva de células de riñón de mono verde. Las células se preservan congeladas con nitrógeno líquido en alícuotas suspendidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) con 10% de DMSO como criopreservador. Para descongelar, las células recién sacadas del tanque de nitrógeno se colocaron en un baño maría a 37°C, a continuación se centrifugaron a 1000 rpm por 1 minuto, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 1 ml de medio DMEM para finalmente colocarse en una caja P-100 con 9ml de medio de mantenimiento celular (DMEM con 10% de suero fetal bovino, SFB). Posteriormente se incubaron a 37°C con 5% de dióxido de carbono CO₂ y 90% de humedad relativa alrededor de 36 a 72 hrs hasta alcanzar 100% de confluencia. Las células en mantenimiento fueron revisadas constantemente en el microscopio para observar su confluencia, morfología y coloración del medio de cultivo para determinar el momento de realizar un pase o cambio de medio de cultivo.

4.3. Pase y propagación de células Marc-145

El pasaje de células se realizó una vez que la confluencia alcanzó el 100%, y tiene como finalidad el renovar el medio de cultivo consumido, eliminar los restos celulares y mantener a las células en reproducción. Se comenzó retirando el medio de mantenimiento de las cajas P-100 con una pipeta; se enjuagó la superficie de la monocapa celular con PBS (Buffer de fosfato alcalino), en seguida se adicionó 1ml de tripsina, se distribuyó por toda la superficie de la monocapa y se

incubaron a 37°C por unos minutos para se active la actividad proteolítica de la tripsina y sea más fácil desprender la monocapa, transcurrido el tiempo de incubación se recuperan las células en PBS con lavados suaves, se recolectó el resuspendió y se adicionó 1/3 en cajas nuevas p-100 a continuación se le agregaron 10ml de medio de mantenimiento y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. El pasaje de células se repitió cuando alcanzaron el 100% de confluencia hasta que se obtuvieron las cajas P-100 necesarias para cada paso del presente trabajo.

4.4. Inoculación de PRRSV en células Marc-145 y obtención de STOCK de trabajo

El stock viral se obtiene replicando el virus para tener el suficiente material para continuar con la investigación. Se inició preparando alícuotas de 1ml de medio de infección (virus de PRRS y medio DMEM relación 1:1) y se prepararon 20 cajas de cultivo mas una caja extra como testigo negativo de células Marc-145 con un 70% de confluencia a continuación a las cajas se les retiro el medio de mantenimiento y se le adicionaron 5ml de PBS para lavar la monocapa, en seguida se le agrego 1ml de medio de infección y se homogenizo por toda la monocapa, se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa por 1hr homogenizando cada 15 minutos, posteriormente se retiró el medio de infección y se adicionó 10ml de medio de mantenimiento de infección (DMEM con 20% de suero neonato), se incubaron y se observaron diariamente hasta cosechar el virus una vez se alcance el 80-90% de lisis celular.

4.5. Citopatología de PRRSV en células MARC-145

Las células Marc-145 C-5 inoculadas con el PRRSV y el testigo negativo fueron observadas y fotografiadas cada 24 horas en microscopio invertido (Olympus IX51) y se revisaron las características morfológicas de las células, confluencia, pH del medio celular y coloración con la finalidad de evidenciar diferencias con las células control y la cepa VR2332.

4.6. Cosecha de PRRSV

Una vez la lisis de células alcance un 80-90%, se procedió a hacer la cosecha del virus recuperando el medio de cultivo de las cajas y se colocó en una botella estéril, se les adicionó 20% de suero neonato, se homogenizo y se refrigero para su uso inmediato y para su almacenaje por tiempo prolongado se congelaron alícuotas de 50ml a -20°C.

4.7. Clarificación y precipitación de cosecha de PRRSV con PEG-8000

Para poder realizar la extracción de RNA de PRRSV de la cosecha viral se requiere separar los restos celulares a lo cual se le conoce como clarificación. Para realizarla se tomaron 50ml de la

cosecha de PRRSV y se centrifugación a 1000g por 3 minutos y se recuperó el sobrenadante y se desechó la pastilla con los restos celulares presentes.

Las partículas virales se precipitaron adicionando 7% de polyethilenglycol-8000 a la cosecha clarificada y se incubo a 4 oC por 48hrs, posteriormente se centrifugo en rotor JA-20 a 10,000rpm por 30 minutos a 4 oC, se recupero la pastilla y se resuspendió en 1ml de PBS para continuar con la extracción de RNA.

4.8. Titulación de PRRSV por plaqueo en cajas P-60.

La titulación viral nos permitirá conocer la cantidad partículas virales activas en UFP (unidades formadoras de placa) de la cosecha de PRRS. Para poder realizar la titulación se propagaron células Marc-145 y se sembraron en 6 cajas p-60 mas 1 caja extra como control negativo, se incubaron con medio de mantenimiento y condiciones de incubadora hasta que alcancen el 100% de confluencia. Para poder infectar a las cajas p-60 se preparan diluciones logarítmicas en base 10 con la cosecha de PRRSV con medio DMEM, las diluciones utilizadas fueron un total de 6 diluciones seriadas de 1:10 a 1:1000,000.

Una vez completados los pasos anteriores se procede a retirar el medio a las cajas P-60 y se adiciona 0.6ml de dilución logarítmica a cada caja y se incuban a 37°C durante 1hr, consecuentemente se agregó a cada caja p-60 6ml de medio semisólido (DMEM 1X con 50% de agarosa GTG al 1.8% y 2% de suero neonato), se incubaron y se observaron diariamente hasta que se sean visibles las UFP en la monocapa celular.

Posteriormente se le retira el medio de mantenimiento y se fijan con ácido tricloroacético al 10%, se retira la capa de agarosa, y se tiñen con 600 μ l de cristal violeta y se dejan secar, posteriormente se contabilizan las UFP y se utiliza la siguiente formula para obtener las partículas virales activas sobre mililitro de solución.

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{(UFP)(dilución)}{0.6ml}$$

4.9. Extracción de RNA de PRRSV

La extracción del RNA viral es crucial para poder continuar con la amplificación y secuenciación de los genes NP y GP5, la técnica realizada fue la de TRIzol y se siguió el procedimiento descrito por Invitrogen, el cual consistió en agregar 1ml de reactivo TRIzol de Invitrogen al enpastillado del precipitado con PEG-8000 y se lavó hasta resuspender la pastilla y se depositó en tubos de 1.5ml y se incubaba durante 10 minutos a temperatura ambiente, a partir de este paso el procedimiento se realizó en hielo o a 4°C; a cada frasco se agregó 200 μ l de cloroformo, se homogenizó y se incubó por 10 minutos, se centrifugó a 12000g por 12 minutos, se recuperó la

fase acuosa teniendo cuidado de no tocar la fase proteica de color blanquecino y se le agregó 0.8vol de isopropanol y se incubó por 10 minutos, posteriormente se centrifuga por 12000g durante 12 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó delicadamente la pastilla con etanol al 70% teniendo cuidado de no desprenderla por ultimo se elimina el etanol y se resuspendió la pastilla en H_2O grado inyectable.

4.10. Cuantificación de RNA de PRRSV

Las muestras de RNA obtenidas fueron cuantificadas en el espectrofotómetro EPOC (Biotek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para contabilizar la cantidad de material que se utilizará para los pasos siguientes.

Para visualizar el material genético y apreciar su integridad y tamaño se realizó una electroforesis en TBE 1X (Tris-Borato ácido etildiaminotetra acético) en gel de agarosa al 0.8% con 1X de Biotum GelRed en una cámara para electroforesis horizontal de BioRad con las condiciones de corrida de 100V y se corrió durante 50 minutos, donde se cargaron las muestras de RNA viral, un marcador de peso molecular y como testigo negativo RNA celular.

El gel se observó y se fotografió con una cámara digital, utilizando una fuente de luz ultra violeta (UV) para visualizar las bandas (Sambrook y cols., 1989).

4.11. Calculo de Oligonucleótidos específicos para PRRS

Se realizó un diseño de oligonucleótidos que funcionen como iniciadores para secuencias específicas de los genes NP y GP5 del virus de PRRS para amplificar los fragmentos que serán analizados en el presente trabajo. Para el diseño de los oligonucleótidos se obtuvieron secuencias totales de genomas de cepas de PRRSV mexicanas y vacúnales de la base de datos de NCBI (Nacional center of [biotechnology information](#)) y se alinearon a través de programas computacionales como SNAPGENE, MULTALIN, MACVECTOR y se obtuvo como secuencia consenso a la secuencia de VR2332 con acceso a NCBI (U87392.3) los criterios utilizados para seleccionar los oligonucleótidos fueron que se alienasen completamente con la cadena consenso, estuvieran en el rango de 16pb a 25pb, con secuencias ricas CG en las regiones 3', sin formación de auto complementariedad; cada juego de oligonucleótidos osciló con regiones de elongación entre 800 y 1600pb del genoma, con diferencias de T_M no mayor a $5^\circ C$, sin compatibilidad de alineamiento entre ellos, las regiones para amplificar fueron las correspondientes a ORF 5 y un fragmento de GEN NP. Los oligonucleótidos calculados fueron elaborados por la empresa Invitrogen.

4.12. Amplificación de fragmentos del genoma de PRRSV por RT-PCR

La técnica de RT-PCR (Transcripción reversa de la Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción) se utilizó con la finalidad de producir y purificar la cantidad necesaria de material genético de PRRSV para poder proceder al paso de la secuenciación. Se procedió de acuerdo con el Kit de invitrogen SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase con número de catálogo 12574018 de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de PRRSV se muestran en la tabla 1

lugar de hibridación	Dirección de Primer	Secuencia	Tm	Ta optima	tamaño de fragmento
13430	F	A.A.TGTGTCAGGCATCGTGG	61	56	1112
14487	R	AGA.A.TGTACTTGCGGCCTAGC	61	56	
15384	F	GGTCGA.A.GGTCATCTGATCG	61	56	296
15679	R	TGAGATGCCTCA.A.GA.A.TGCC	61	56	

Tabla 1 Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de PRRSV P24.

Se utilizó un termociclador para la realización del RT-PCR con las condiciones de corrida indicadas en la siguiente tabla (tabla 2).

Una vez terminada la RT-PCR de los genes se procedió a la verificación por presencia del amplificado por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

Lugar de hibridación en el genoma	Retro transcripción	Inhibición de Retro transcriptasa	Desnaturalización	Alineamiento segundos	Elongación segundos	Ciclo de elongación final	tamaño
13430-14487	55°C-30 minutos	94°C-3 minutos	94°C 45 segundos	55.0	65.0	5 minutos	1112
15384-15679	55°C-30 minutos	94°C-3 minutos	94°C 45 segundos	54.0	40.0	5 minutos	294
X 40 ciclos							

Tabla 2. Condiciones del programa del termociclador para la realización de la RTPCR de fragmentos de PRRSV P24

Se procedió para amplificar los fragmentos obtenidos por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) con el mismo kit de Invitrogen Super script III, una vez preparadas las reacciones se colocaron en el termociclador de BioRad con las siguientes condiciones de corrida (tabla 3).

Lugar de hibridación en el genoma	Inhibición de Retro transcriptasa	Desnaturalización	Alineamiento segundos	Elongación segundos	Ciclo de elongación final	tamaño de fragmento
13430-14487	94°C-3 minutos	94°C 45 segundos	55.0	65.0	5 minutos	1112
15384-15679	94°C-3 minutos	94°C 45 segundos	54.0	40.0	5 minutos	294
		X 40 ciclos				

Tabla 3 condiciones del programa del termociclador para la realización de la PCR de fragmentos de PRRSV P24

4.13. Secuenciación de producto de PCR.

Se requiere secuenciar el producto de PCR para poder revisar las posibles mutaciones que allá tenido el virus durante los 23 pasajes celulares previos. El proceso de secuenciación lo podemos dividir en 3 partes, la reacción de secuenciación, purificación del producto y lectura de la secuencia, por lo que primero se realizó la reacción con el kit Big Dye Terminator V3.1 ThermoFisher catálogo 4337455, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se corrió en el termociclador con el programa de 25 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 15 segundos y por ultimo un ciclo de 60 °C por 4 minutos. (Sambrook y cols., 1989).

El producto obtenido fue purificado en columnas CENTRI-SEP ThermoFisher Scientific de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se recuperó 20µl de las columnas, se procedió a colocarlo en SPEED-VAC por aproximadamente 30 minutos para secar el producto y se procedió a la lectura de la secuencia en el equipo ABI-PRISM 310 en los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, LaNSE-CINVESTAV IPN.

El electroferograma obtenido de la secuenciación fue analizado con el software EditView, con la secuencia de bases se hizo la predicción de la estructura primaria a nivel de aminoácidos y una comparación contra las secuencias reportadas para PRRS con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, de Nacional Center of Biotechnology Information NCBI) y se recuperaron las secuencias con mayor similitud. La realización del alineamiento de las secuencias recuperadas se procesaron con el software GeneWork y se obtuvieron las variaciones que presentó nuestra cepa atenuada con respecto a las secuencias de otras cepas de PRRS, en los genes GP5 y NP.

4.14. Alineamiento de las secuencias de PRRSV y predicción de secuencias de aminoácidos.

Las secuencias de los genes NP y GP5 de PRRSV obtenidas se utilizaron para realizar una

comparación con otras secuencias reportadas previamente por medio de una alineación de los ácidos nucleicos que la componen, primero se realizó una búsqueda de las secuencias reportadas de PRRSV tipo 2 (serotipo americano) vacúnales incluyendo la cepa VR2332 y se obtuvo un análisis de las mutaciones de los genes NP y GP5.

4.15. Predicción y alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas de PRRSV

A partir de la secuencia de los genes de PRRSV NP y GP5 se procedió a realizar una predicción de la secuencia de aminoácidos, se utilizaron las herramientas informáticas de SNAPGENE y MEGA 5 y se comparó con las secuencias reportadas por medio de BLAST para verificar que el marco de lectura fuera el correcto. Con la secuencia de aminoácidos se procedió a buscar las secuencias reportadas de aminoácidos para las cepas utilizadas para el alineamiento de nucleótidos de PRRS tipo 2 vacunal.

4.16. Elaboración de Árbol Filogenético de cepas mexicanas de PRRSV

- Para la realización del árbol filogenético se recuperaron las secuencias reportadas para la proteína GP5 en la base de datos de NCBI y se realizó un alineamiento con las secuencias de PRRSV Vac P24 y VR2332, así como otras cepas vacúnales reportadas para PRRSV tipo 2 en el software informático Mega 5. El alineamiento se sometió al cálculo de árbol de distancias por el algoritmo de probabilidad (Likelihood) con 500 repeticiones (bootstraps). El diagrama se importó en formato Newtik y se editó en el software informático en línea iTol. (Letunic I. y Bork P., 2019).

4.17. Elaboración de biblioteca de cDNA de los fragmentos secuenciados de PRRSV

La biblioteca de cDNA se realizó con la finalidad de almacenaje y futuras consultas de los fragmentos obtenidos. El material secuenciado de PRRSV se clonó en el vector TOPO Cloning IV de invitrogen utilizando bacterias *Escherichia coli* DH5- α competentes con calcio.

4.18. Preparación de bacterias competentes por Cloruro de calcio CaCl_2

Las bacterias competentes DH5- α se utilizarán para realizar la clonación del material genético de PRRSV ya que cuentan con las características de ser permisivas a la introducción de plásmidos vectoriales por técnica de competencia por calcio, presentan una inactivación de la recombinación homóloga y tienen deletada la actividad endonucleasa por mutaciones en los genes *recA1* y *endA1* respectivamente y presentan patrón azul en presencia de X-GAL para la selección de positivas transformantes. Para la preparación de bacterias competentes por CaCl_2 ,

se trabajo cerca de un mechero y se tomó con un asa de siembra una muestra de bacterias DH5- α y se inocularon en un tubo de ensayo con 10ml de medio LB (Luria Bertani) y se incubaron por 12hrs a 37 °C en agitación a 300rpm, posteriormente se agregó el cultivo de DH5- α en un matraz con 1L de medio LB y se agito a 37 °C y 300rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 440nm lo cual indica que las células se encuentran en la etapa final de la fase de crecimiento, posteriormente se centrifugaron en rotor JA-20 a 3000rpm por 3 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 30ml de una solución de CaCl₂ y se incubaron en hielo por 30 minutos, se centrifugaron en rotor JA-20 por 3 minutos a 300rpm y se desechó el sobrenadante, la pastilla se suspendió en 6ml de solución de CaCl₂ con 10% de glicerol y se almacenaron en alícuotas de 200 μ l a -80 °C.

4.19. Reamplificación de productos de RT-PCR

Para la elaboración de la biblioteca de cDNA se tomaron los productos de RT-PCR de las muestras secuenciadas de NP y GP5 y se preparó una reacción de PCR con el kit de Invitrogen One-Step, de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se corrieron en el termociclador con las condiciones que se muestran en la tabla 4.

Lugar de hibridación en el genoma	Inhibición de Retro transcriptasa	Desnaturalización	Alineamiento segundos	Elongación segundos	Ciclo de elongación final	tamaño de fragmento
13430-14487	94°C-3minutos	94°C 45 segundos	55.0	65.0	5minutos	1112
15384-15679	94°C-3minutos	94°C 45 segundos	54.0	40.0	5minutos	294
X 40 ciclos						

Tabla 4 condiciones de programa de termociclador para la reamplificación de fragmentos de PRRSV Vac P24.

Los productos obtenidos se corrieron en un gel agarosa al 1% en 1X de TBE y 1X de GelRed a 100v por 50 minutos y fueron observados y fotografiados en transluminador de luz U.V. para comprobar que existan resultados positivos con los pesos específicos para NP y GP5

4.20. Purificación de productos de PRC para clonación en vector Topo-Cloning 4

Es conveniente realizar la purificación de los fragmentos de RNA amplificados para eliminar posibles contaminantes que pudieran insertarse con mayor afinidad en los plásmidos como los oligonucleótidos utilizados. Para purificar las muestras primero se corren en una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.0% en 1x TBE y con 1X de GelRed, con condiciones de 100V por 50 minutos; terminado el tiempo se procede a cortar las bandas correspondientes a NP y GP5 del gel utilizando una navaja estéril, guantes, mascara protectora contra luz U.V. y

transluminador de mano, las bandas se colocaron en tubos de 1.5ml, posteriormente se utilizó el kit de purificación de muestras en gel PureLink® Quick Gel Extracción Kit, con número de catálogo K210012. El procedimiento para la purificación fue siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se obtuvieron 60 µl de muestra de PCR purificada de los fragmentos en H_2O , de estos se utilizaron de 4 a 10µl para realizar la reacción de ligación con el vector Topo (imagen 1) Cloning IV de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen con número de catálogo K4500-01.

4.21. Transformación de bacterias competentes por $CaCl_2$ con vector Topo Cloning 4.0 e insertos de PRRSV

La transformación de bacterias competentes es el paso en el cual se introducen los vectores ligados dentro de las células competentes para poder replicar el material genético por medio de la reproducción celular. Se descongelaron alícuotas de 200µl por cada muestra de células DH5-α competentes por calcio y se agregó a cada tubo una reacción de ligación y se incubaron por 30 minutos en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C por 45 segundos en baño maría e inmediatamente se incubaron en hielo por 5 minutos, se cambiaron las bacterias a un tubo de 1.5ml y se les adiciono 1ml de medio LB y se incubaron por 2hrs a 37 °C a 300rpm, posteriormente se tomó 200µl de cada tubo y se espatularon con mechero en cajas individuales de agar LB con 50mg/ml de ampicilina como antibiótico de selección y se incubaron a 37 °C por 12hrs hasta observar las colonias bacterianas o UFC (unidades formadoras de colonia).

4.22. Extracción de plásmido por Miniprep de bacterias candidatas.

Una vez crecieron las colonias se realizó la selección, aislamiento de colonias y extracción del plásmido por la técnica de miniprep-STET (llamado así por los reactivos que lo componen, sucrosa, triton x-100, EDTA y Tris-Cl). Se seleccionaron como candidatos positivos con vector con inserto a las UFC que crecieron en el medio de selección por ampicilina, para aislar las UFC se toma cada colonia y se resembran en diferentes cajas Petri estériles con agar LB con 50mg/ml amp, se etiquetaron y se incubaron a 37 °C por 12hrs.

Una vez aparecen las UFC se inoculan en tubos de ensayo individuales por UFC con 10ml de medio LB con 75mg/ml amp y se incubaron a 37 °C con 300rpm de agitación por 12hrs, en seguida se centrifugaron a 10,000g por 60 segundos y se recupero la pastilla y se resuspendió en 450µl de solución STET (8% sucrosa, 5% triton X-100 50mM, 50mM de Tris-HCl pH 8.0 y 50mM de EDTA pH8.0) y se adiciono 25µl de stock de lisozima (10mg/ml de lisozima, 50mM Tris

pH 8.0) Se incubaron por 4 minutos en temperatura ambiente y se sumergieron en agua en punto de ebullición por 60 segundos, posteriormente se centrifugaron a 12,000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se removió la pastilla con un palillo de madera estéril y se le adiciono 2µl de Stock de RNAsa (10mg/ml de RNAsa, 100mM de Tris pH 8.0, 15mM de NaCl), se calentó a 100 °C por 10 minutos, se le adiciono 75µl de acetato de sodio (CH₃COONa) 3M y 250 ml de isopropanol (C₃H₈O), se mezcló y se incubo a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifugo 10 minutos a 12,000g, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 70% (C₂H₅OH) y se disolvió en 600µl de agua. Se realizó electroforesis con gel de agarosa 1% 1X de TBE con 100V durante 50 minutos cargando las muestras obtenidas de miniprep y se fotografió el gel en el transluminador de UV.

4.23. Purificación de producto de PCR por gel de agarosa GTG

Los vectores candidatos requieren ser purificados posterior a la extracción de plásmido por STET para eliminar el exceso de sales y restos proteicos que pudieran interferir con los posibles análisis posteriores, por lo que se preparó un gel con 1% de agarosa en 1X de TBE y se cargaron las muestras amplificadas y se corrió a 100v por 50 minutos, posteriormente se colocaron en el transluminador y con una navaja estéril se cortaron las bandas de los pesos esperados y se guardaron en tubos previamente marcados y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Las muestras en gel se purificaron con el kit PureLink® Quick Gel Extracción Kit número de catálogo K210012 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas las muestras purificadas se corrió una porción en un gel de agarosa al 0.8% a 100V por 50 minutos para observar la integridad del material.

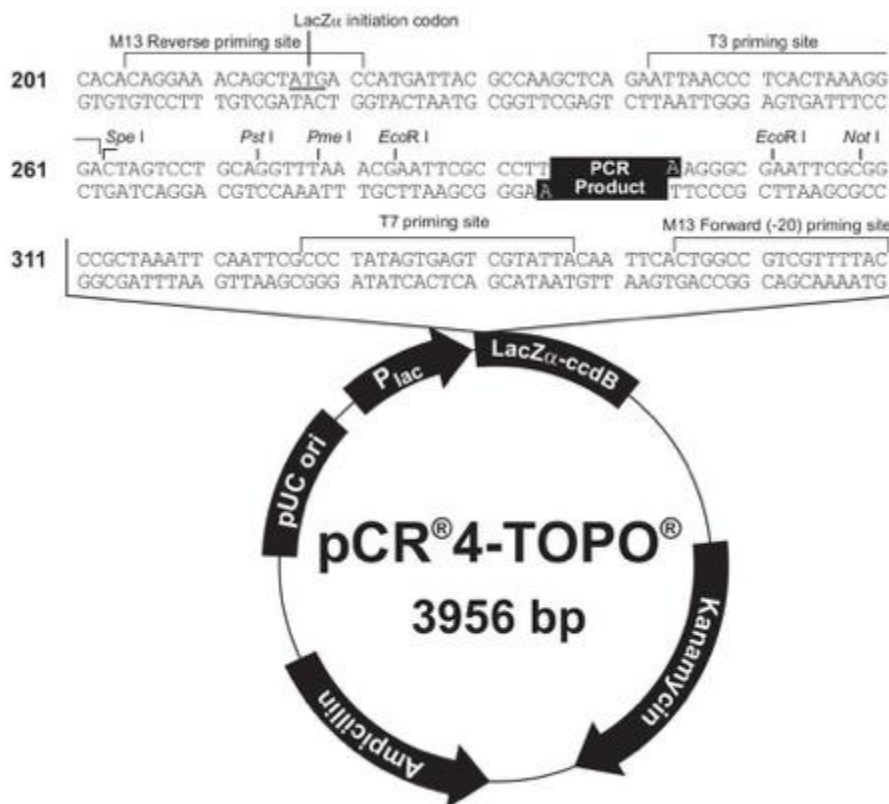


FIGURA 1. Vector Topo utilizado para insertar los fragmentos de PRRSV Vac P24

4.24. Verificación de insertos de PRRSV en vector PCR Topo 4.0 por PCR

Los plásmidos extraídos fueron cuantificados por absorbancia a 260/280 nm en el equipo Sinergy y se prepararon diluciones para verificar que el fragmento de PRRSV se insertó exitosamente por medio de una reacción de PCR usando oligonucleótidos M13 como iniciadores incluidos en el kit PCR-Topo Cloning 4, los cuales son oligonucleótidos específicos a las regiones contiguas a los insertos, las temperaturas de alineamiento se calcularon en el software especializado para análisis de secuencias MacVector como se muestra en la tabla 5.

Nombre de oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos
Oligonucleótido M13 Foward	GTA.A.A.A.CGACGGCCAG
Oligonucleótido M13 Reverse	CAGGA.A.ACAGCTATGAC

Tabla 5 Oligonucleótidos específicos para vector Topo cloning

Las muestras se observaron en gel de electroforesis al 0.8% con TBE 1X y GelRed 1X y se corrieron a 100V por 50 minutos en cámara de BioRad. Las bandas del tamaño del fragmento buscado de las muestras que resultaron positivas fueron cortadas con navaja como previamente se describió, se recolectaron en tubos de 1.5ml y se purificaron con kit purelink. Se cuantificaron y se prepararon reacciones de secuenciación para verificar la dirección del inserto y que fueran

el fragmento esperado (Sambrook y cols., 1989).

4.25. Diagrama de flujo de procedimiento del presente estudio

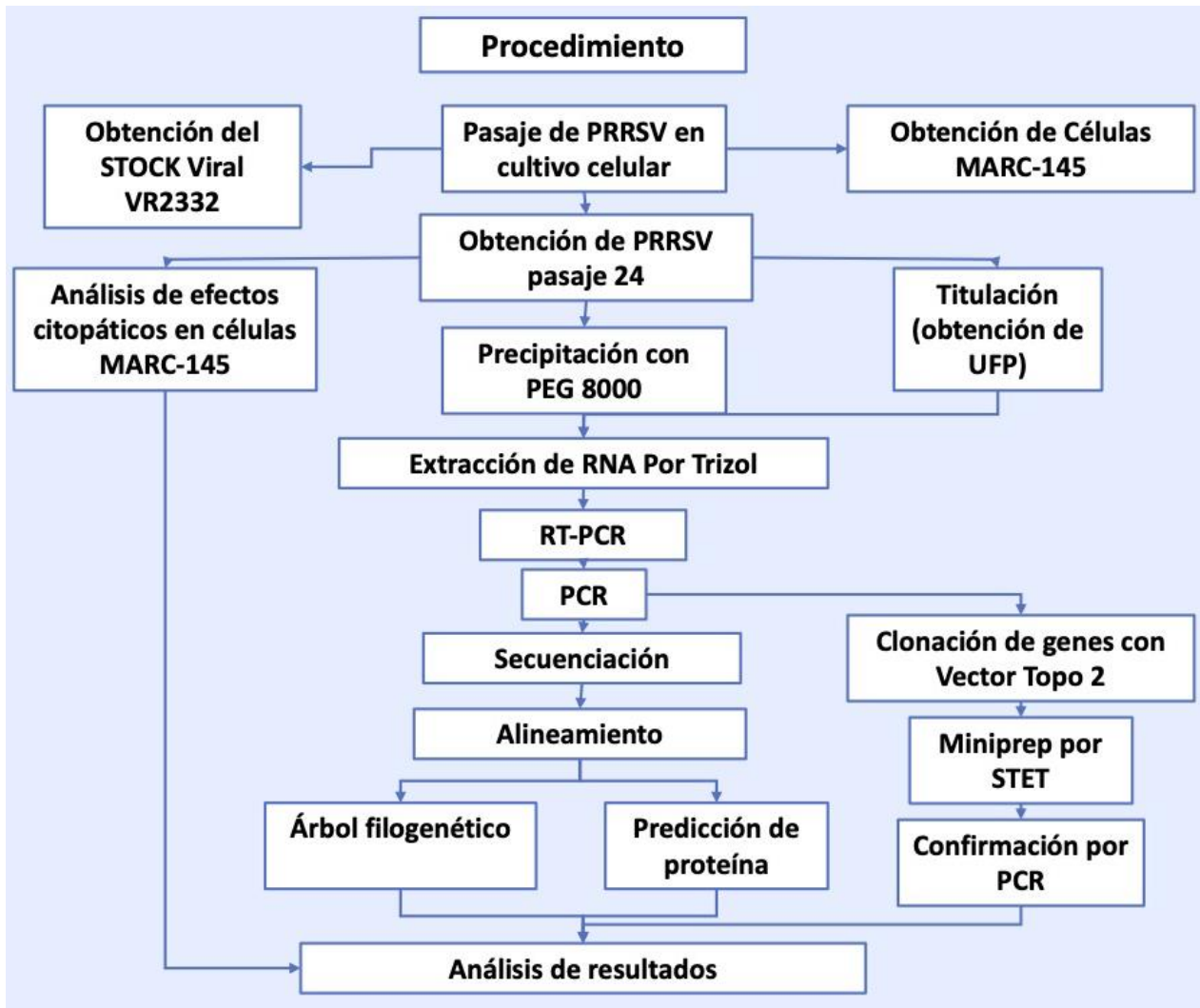


Diagrama 1. Diagrama de flujo del procedimiento que se realizó para llevar a cabo el presente estudio

5. Resultados

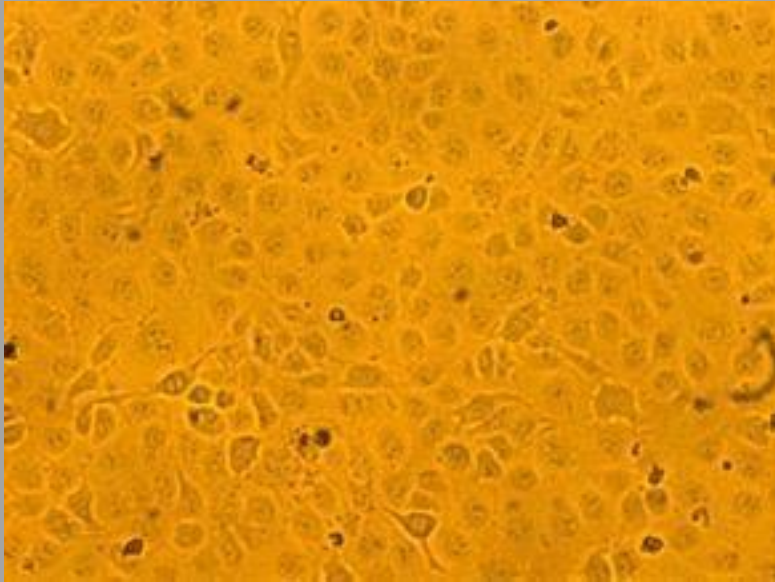
5.1 Efectos Citopáticos

La infección de 20 cajas de células Marc-145 con PRRSV y el testigo negativo se realizó para registrar el efecto citopático del virus y las posibles diferencias que existan entre infecciones en pases previos. Se obtuvieron fotografías de la cinética de la infección con microscopio invertido marca Olympus y con lente de aumento 10X antes de la infección y cada 24 hrs P.I. hasta que alcanzó el 90% de lisis celular a los 11 días post infección (Imagen 2).

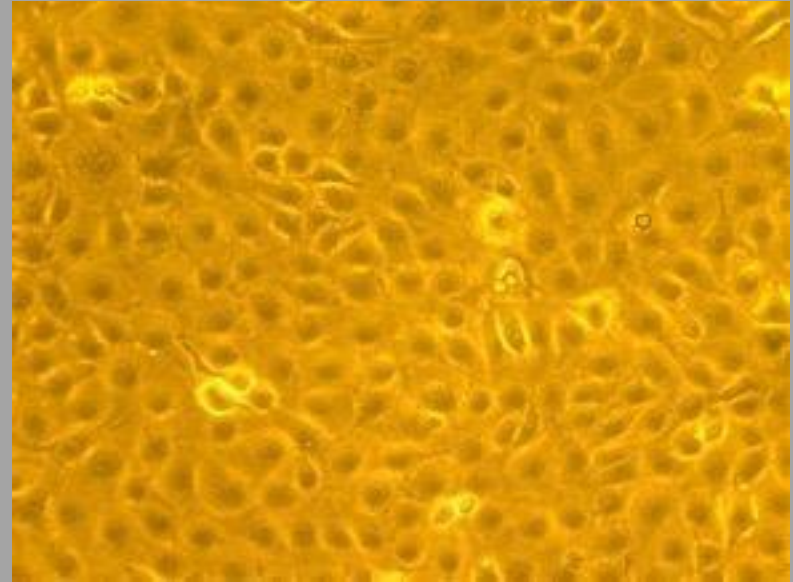
Las células previo a la infección mostraban una confluencia del 80%, donde presentan crecimiento en monocapa con formas semicirculares y tamaños similares entre ellas, lo que se consideró como morfología normal; durante los días 1 al 4 post infección (Figura 2) no se mostró efectos citopáticos y aumentaron su confluencia al 100%. El día 5 post infección (Figura 2) se mostraron zonas con efectos citopáticos donde las células mostraban una morfología ligeramente alargada y rectangular a comparación del control negativo donde estos focos de efectos citopáticos no se presentan. Durante el día 6 y 7 (Figura 2) aumentaron el número de focos de efectos citopáticos y se muestran un número significativo de células suspendidas en el medio de mantenimiento y la confluencia comienza a bajar ligeramente a un 90%. Los días del 8 al 12 (Figura 2) se pueden apreciar que los efectos citopáticos se han esparcido y se van agravando de forma progresiva, las células infectadas presentan aumento de tamaño, proyecciones citoplásmicas, formas elongadas, las células desprendidas de la monocapa aumentan y la confluencia disminuye del 80% el día 8 al 20% el día 12 en comparación con el tratamiento control, por lo que los efectos citopáticos visualizados son producto del tratamiento con virus de PRRSV Vac P24.

1 Día

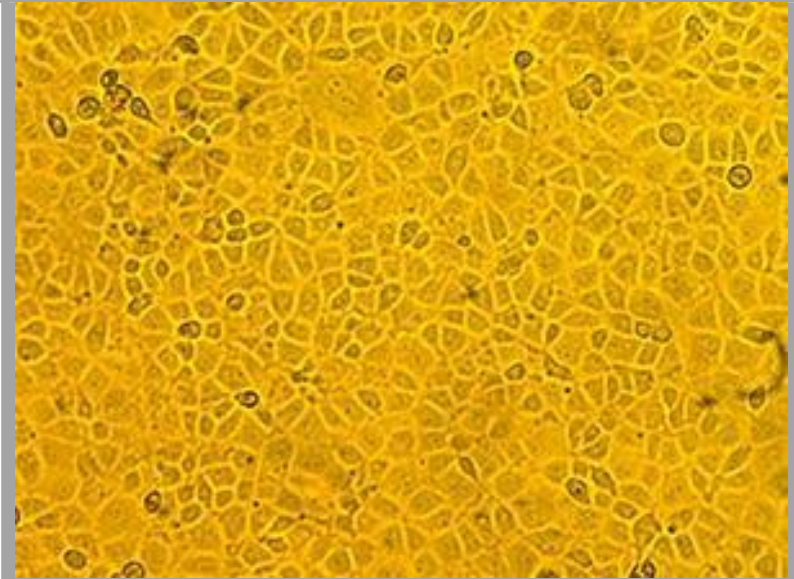
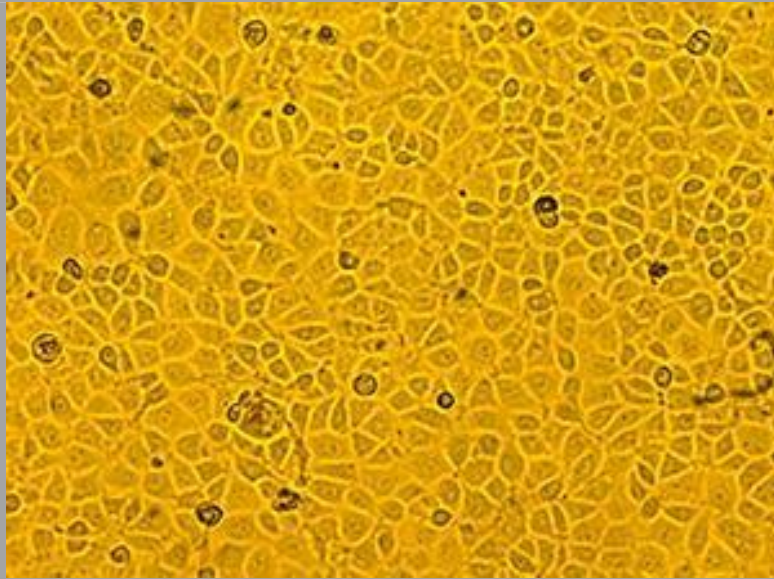
Células Marc-145 con infección de PRRSV P24



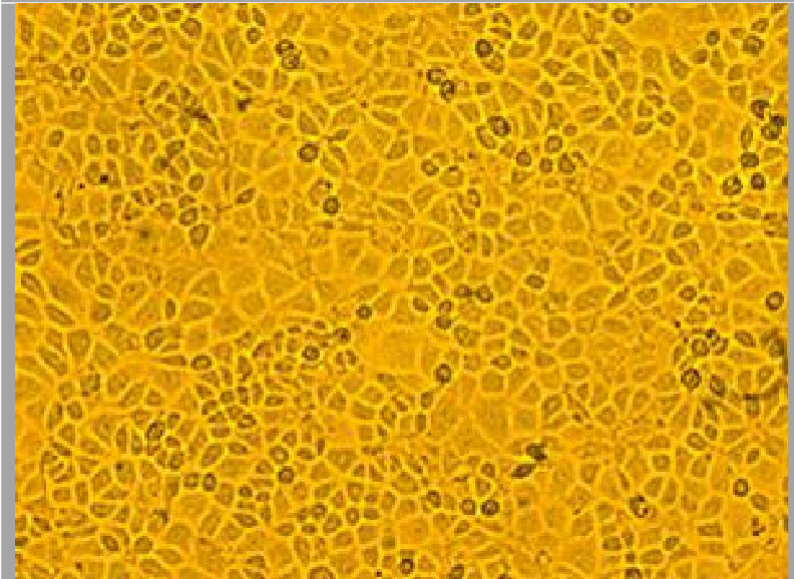
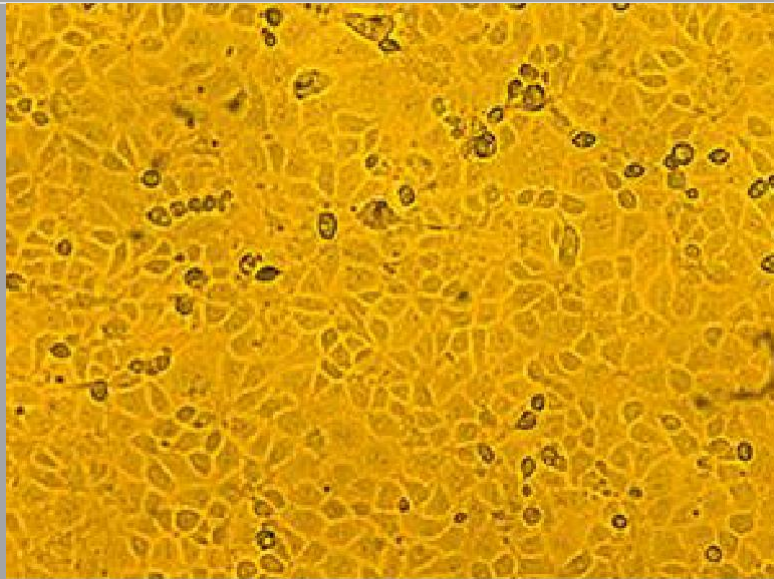
Células Marc-145 sin infectar



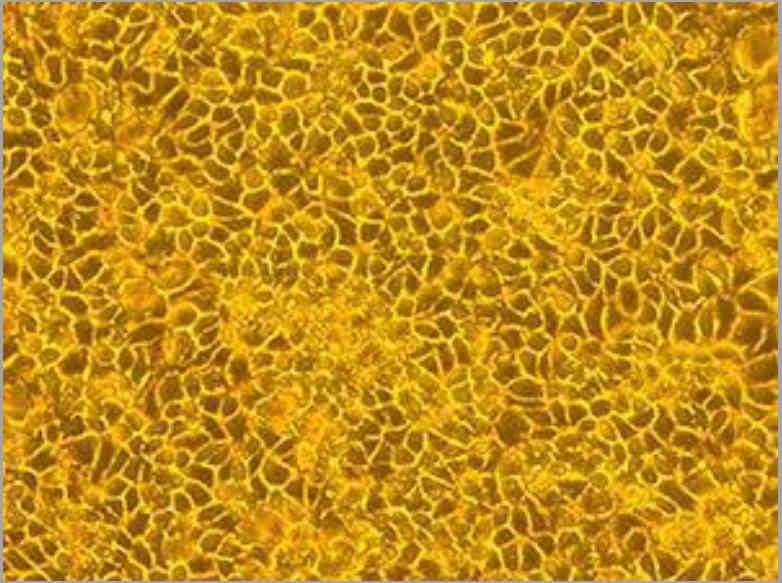
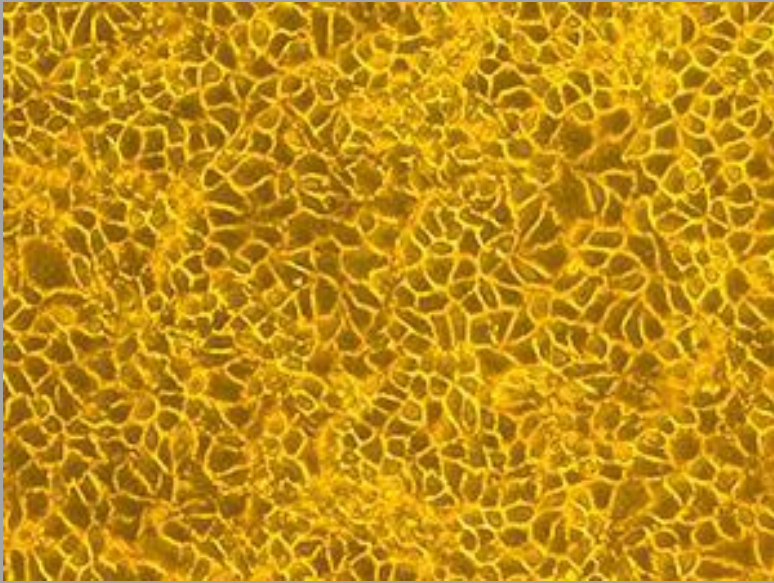
2



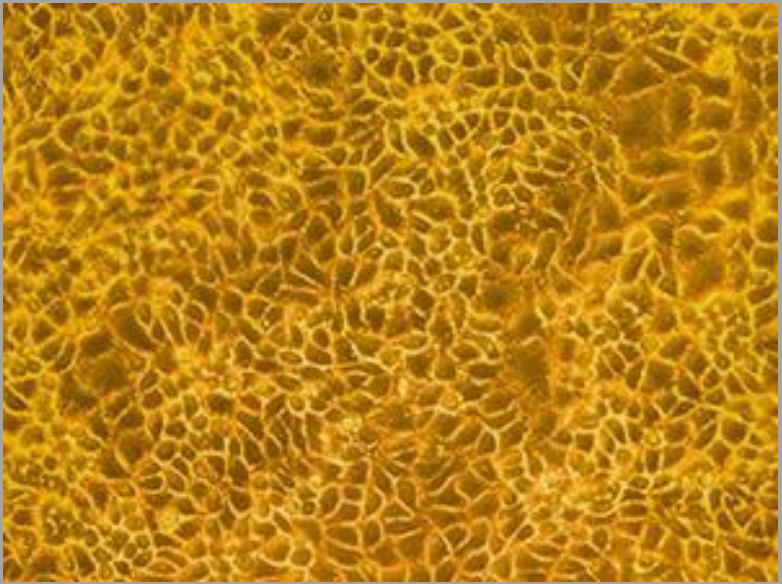
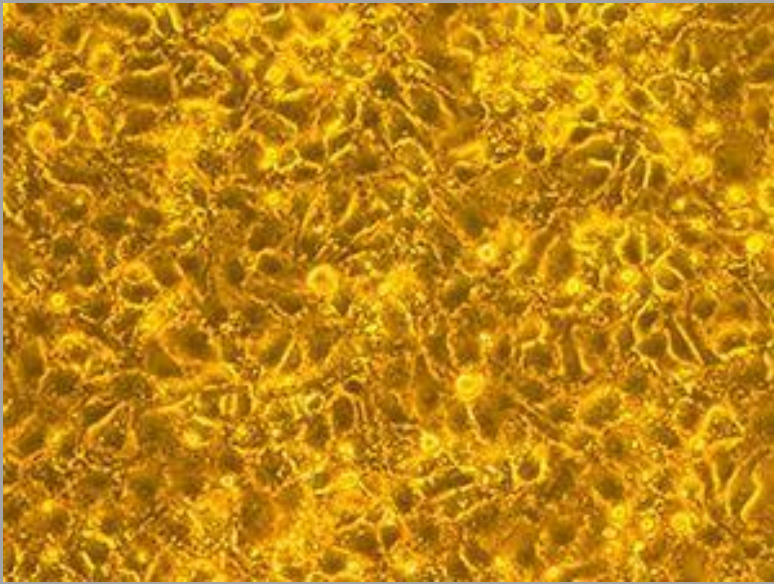
3



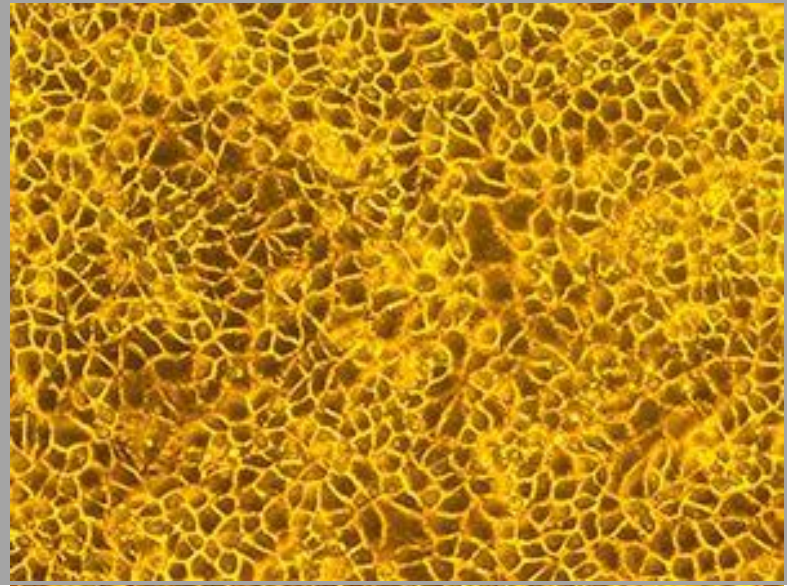
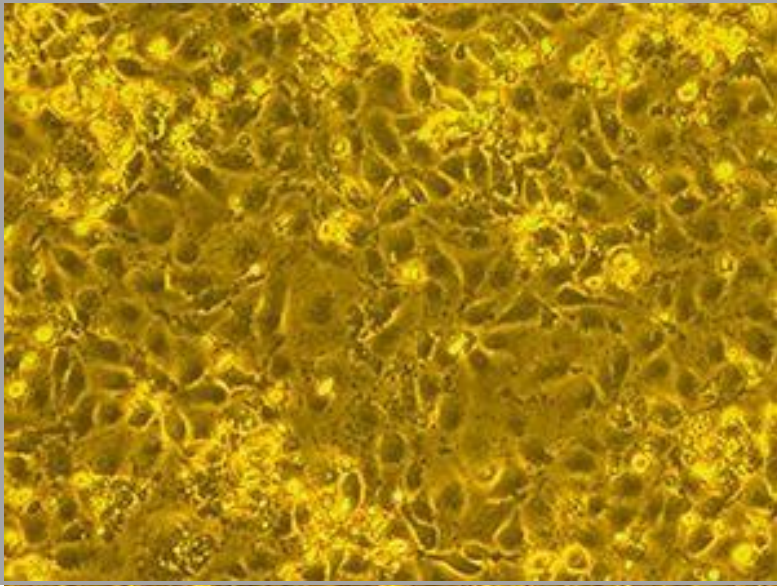
4



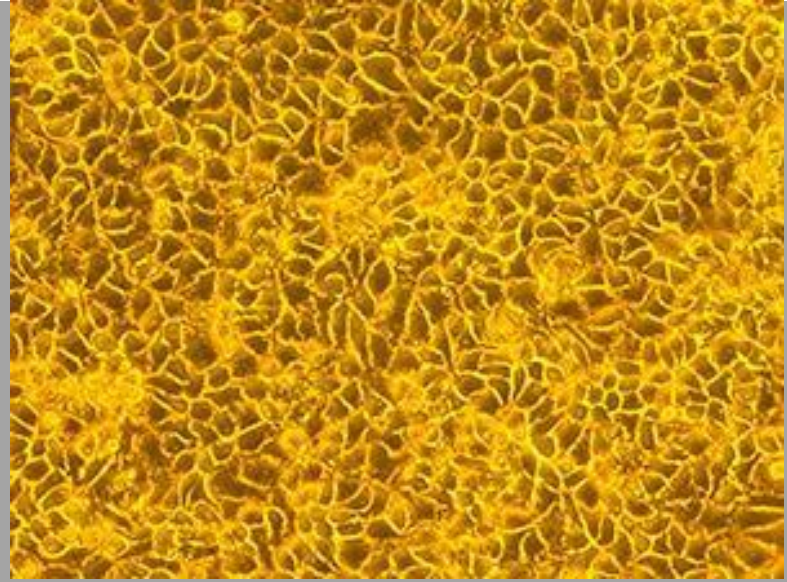
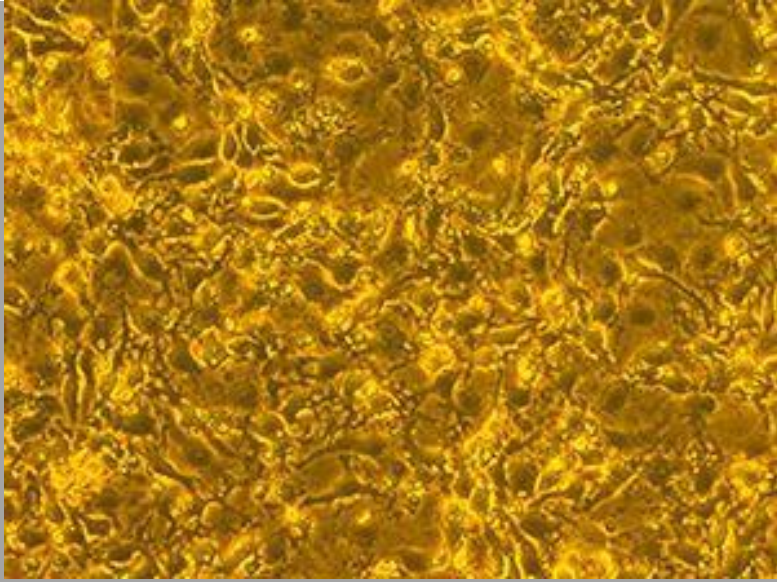
5



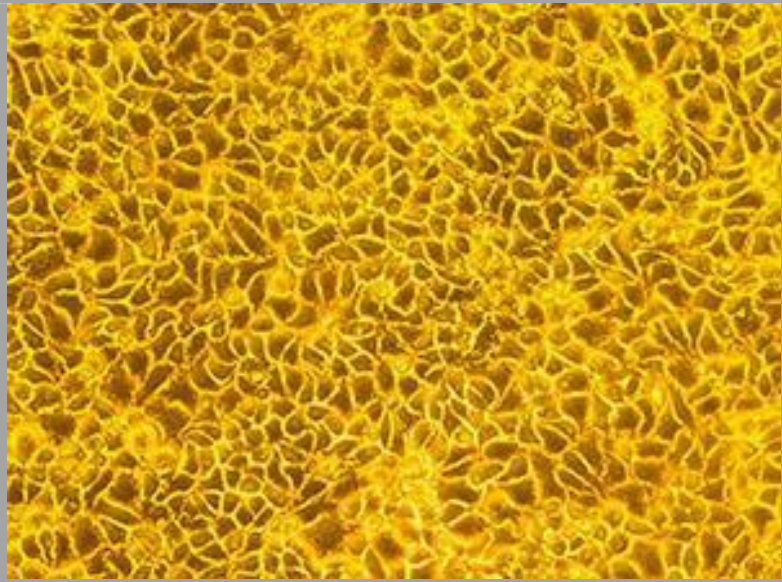
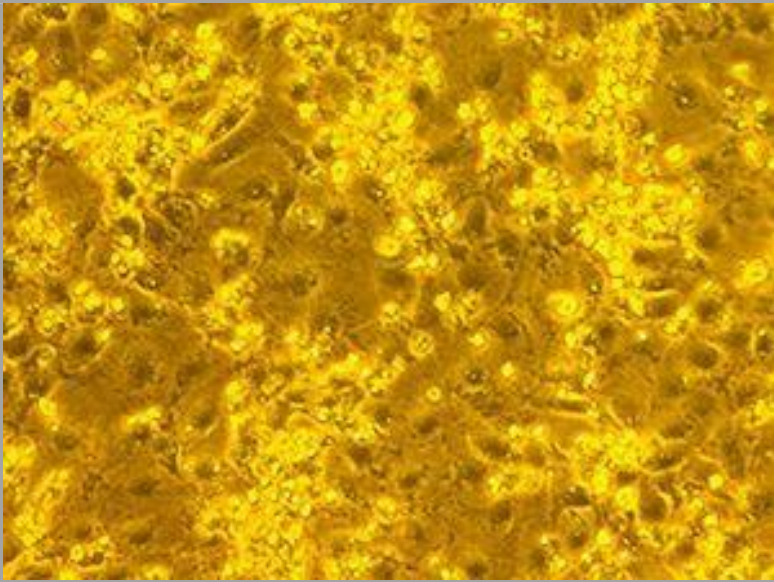
6



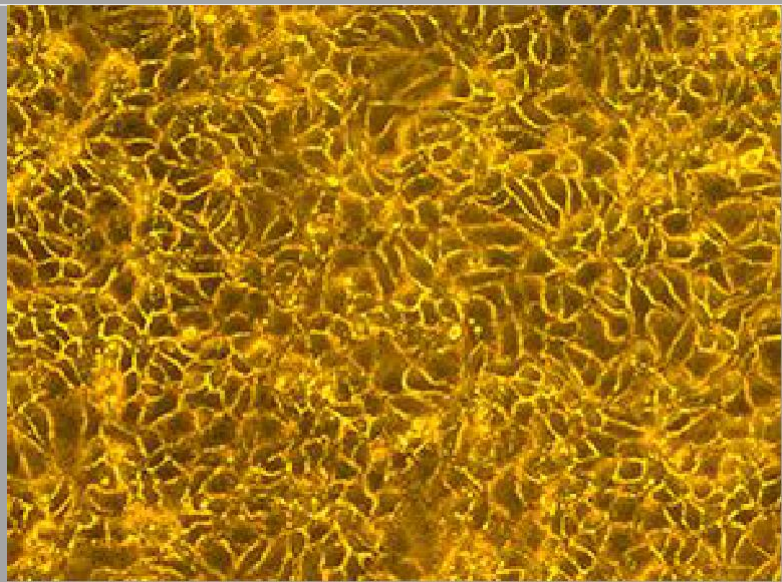
7



8



9



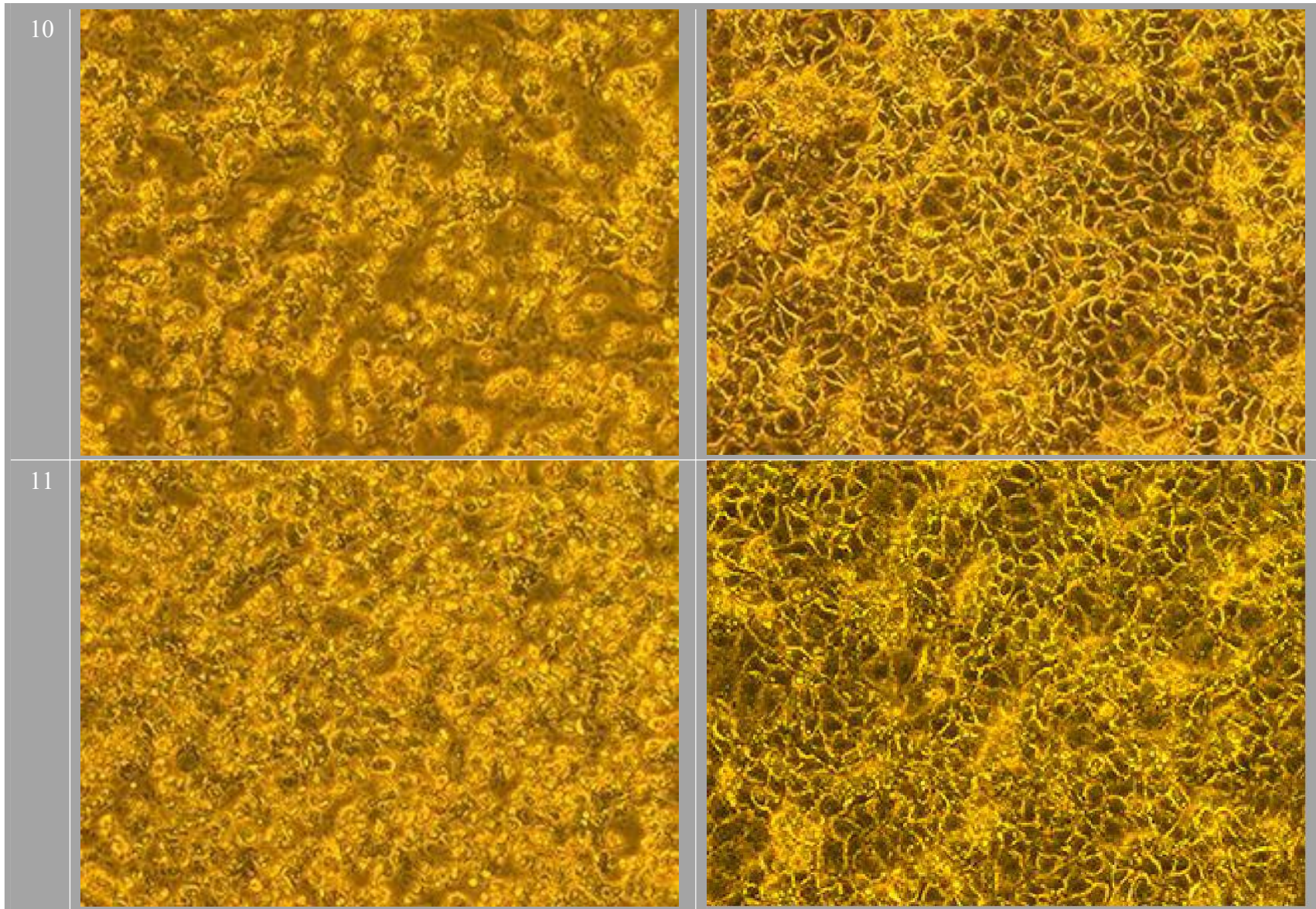


FIGURA 2. Efectos citopáticos de células Marc-145 infectadas con PRRSV Vac P24 tomadas con microscopio invertido con aumento de 10X durante el día 1 P.I. hasta el día 11 cuando se realizó la cosecha. En las imágenes de la izquierda se muestran las fotografías de las células infectadas con PRRSV Vac P24 y en el lado derecho se muestran las células control sin infectar.

5.2 Titulación de PRRSVV

Obteniendo el título de PRRSV se puede realizar una comparación con otras cepas o pasajes de la cantidad de partículas virulentas producidas. Se contabilizaron las UFP de las diluciones 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 , se obtuvo el promedio de las unidades formadoras de placas por mililitro de 3.84×10^6 UFP/ml lo cual fue mayor a lo esperado ya que de acuerdo con los reportes para VR2332, el título viral se encuentra en la escala de 10^5 . Las UFP/ml son indicadores de cuantas partículas infecciosas existen en el volumen cosechado y permite comparar contra los datos reportados para VR-2332.

5.3 Electroforesis de la extracción de RNA de PRRSV

Una vez completada la extracción de RNA se corrieron las muestras en gel de electroforesis junto con la muestra control de RNA de células Marc-145 se fotografió y se muestra en la Figura 3., la imagen obtenida será utilizada para analizar la presencia y la integridad del RNA. En el carril A y B se corrió marcador de pares de bases Lambda Hind-III el cual nos sirve para comparar las muestras con pesos conocidos, en el carril 2 y 3 se muestra el RNA extraído del precipitado viral y de la muestra control de células Marc-145 respectivamente una vez se comprobó que la extracción tenga la cantidad y calidad necesaria se procedió a realizar el RT-PCR.

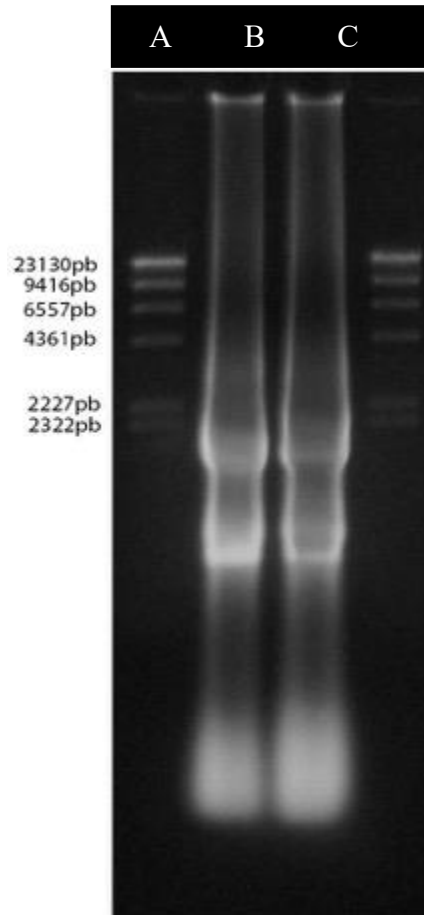


FIGURA 3. Extracción de RNA de PRRSV de sobrenadante de cultivo de Marc-145 C5. A y D: Marcador de peso molecular de DNA Lamda-Hind III. B: Muestra de extracción de RNA de células Marc-145, C: muestra de RNA de PRRSV precipitado con PEG 8000. Electroforesis de la amplificación por RT-PCR de fragmentos específicos de PRRSV

Se comprobó por medio de electroforesis que la amplificación de los genes GP5 y NP por RT-PCR tuviera productos del tamaño esperado en un gel de agarosa al 1% como se muestran en la imagen 4, donde se observan las bandas amplificadas correspondientes a los productos esperados de 1102 para ORF5 en A)-2 y un producto de 295pb para gen NP en B) carril 2, estos productos se aislaron y purificaron para realizar la secuenciación.

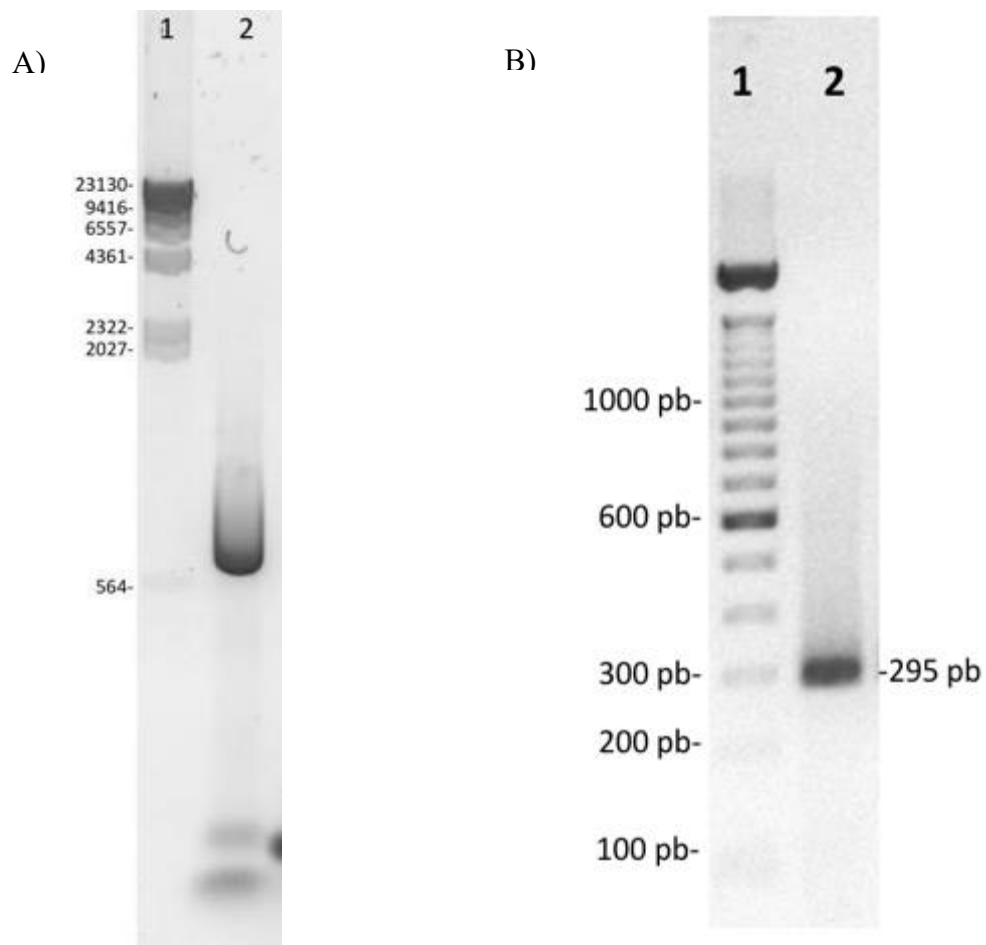


FIGURA 4 Amplificación de productos ORF 5 y NP de PRRSV Vac P24. A) Amplificación por RT-PCR de fragmento *ORF5* de PRRSV con una longitud de 1102pb. 1. Marcador de pares de bases Lambda Hind-III. 2. Muestra *ORF 5* de PRRSV con peso esperado de 1102pb.B) Amplificación por RT-PCR de Fragmento NP de PRRSV con longitud de 295pb. 1. Marcador de 100 pares de bases. 2. Muestra de NP de PRRSV con peso esperado de 295pb.

5.4 Electroforesis de la purificación de productos de RT-PCR por columna Gen Elute

La purificación de los productos de RT-PCR retiro de la muestra contaminantes que puedan interferir con la secuenciación. Para comprobar la cantidad y calidad de los genes purificados de la amplificación por RT-PCR Por el kit Gen Elute de Sigma Aldrich se corrieron en una electroforesis horizontal con gel de agarosa y observaron en transluminador de luz U.V. mostrado en la FIGURA 5.

A) Gen *ORF5*

B) Gen *NP*

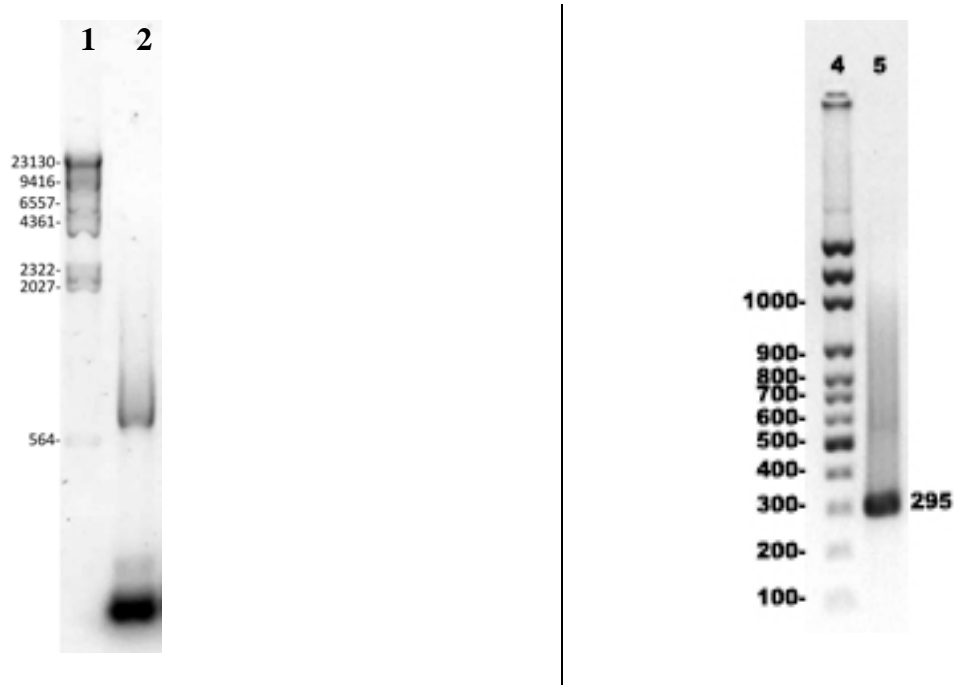


FIGURA 5. Amplificación de fragmentos específicos de PRRSV por PCR A) Fragmento amplificado con oligonucleótidos específicos para *ORF5* de 570pb. 1: Marcador de 100pb, 2: muestra de gen *ORF5* con 570pb B) Fragmento amplificado con oligonucleótidos específicos para Gen NP, producto esperado de 295pb 4: Marcador de 100pb, 5: Muestra purificada de gen NP.

5.5 Secuencias obtenidas de los Fragmentos

Las secuencias de los genes GP5 y NP obtenidas a partir de la extracción de RNA de PRRSV se muestran en las tablas 7 y 8, para la muestra de PRRSV Vac P24 *ORF5* se obtuvo un fragmento de 570, mientras que para NP se obtuvieron 295 nucleótidos. Las secuencias fueron utilizadas para la comparación con secuencias reportadas, realizar un árbol filogenético con muestras mexicanas y una predicción de la secuencia de aminoácidos.

>VAC-VR2332-P24

```

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTGGCA.A.TTGCTTTCTTTGTGGTGTATCGTGCCGTT
GT
GTTTTGCTGTGTTGCGCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGATTACA.A.CTTGACG
CT
ATGTGAGCTGA.A.TGGCACAGACTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTCATC
TTT
CCCGTTTTGACTCACATTGTCTCGTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCCCTTGACACAGTCGCTTTAGTC
ACTGTGTCTACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTG
G
CTGCGTTGACTTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTACCAGAT
A
TACCA.A.CTTTCTTCTGGACACTA.A.GGGCATACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.A.A.
A.GG
GGCA.A.AGTTGAGGTCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CC
CCTATA.A.CCAGAGTTTCAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAGATGACTTCTGTCATGATAGCACGGC
TCC
ACA.A.A.A.GGTGCTTTTGGCGTTTTCTATTACCTACACGCCAGTGATGATATATGCCCTA.A.AGGTGAGTC
GC
GGCCGACTGCTAGGGCTTCTGCACCTTTTGATCTTCTCTGA.A.TTGTGCTTTACCTTCGGGTACATGACTT
T
CGCGCACTTTCAGAGTACA.A.ATA.A.GGTGCGCTCACTATGGGAGCAGTAGTTGCACTCCTTTGGGGG
GT G TACTCAGCCATAGA.A.ACCTGGA.A.ATTCA

```

Tabla 7 Secuencia obtenida de gen ORF5 de PRRSV Vac P24

```

>NP-PRRSV-VAC-1-p24
GCTGGGTA.A.G ATCATCGCTC AGCA.A.A.A.CCA GTCCAGAGGC A.A.GGGGCCGG
GA.A.AGA.A.A.A.A TA.A.GA.A.GA.A.A A.A.CCCGGAGA AGCCCCATTT
TCCTCTAGCGACTGA.A.GATG ATGTCAGACA TCACTTTACC CCTAGTGAGC
GGCA.A.TTGTGTCTGTCGTCA ATCCAGACCG CCTTTA.A.TCA AGGCGCTGGG
ACTTGACCCTGTCAGATTC AGGGAGGATA AGTTACACTG TGGAGTTTAG
TTTGCCTACGCATCATACTG TGCGCCTGAT CCGCGTCACA GCATCACCT CAGCATATG

```

Tabla 8 Secuencia obtenida para gen NP de PRRSV Vac P24

Se seleccionaron secuencias de PRRSV de virus vacúnales tipo 2 para compararlas por alineamiento con PRRSV pase 24 y se enlistan en la tabla 9. Y sus secuencias completas se muestran en la tabla 10.

No Acceso	Nombre
-----------	--------

>U87392.3	PRRSV VR2332
>KP256233.1	RVRp13
>KM386622.1	RVRp22
>KU844096.1	VACMX14
>JQ860390.1	HG.RV1

Tabla 9 Números de acceso de las cepas tipo 2 vacunales utilizadas para la comparación de las secuencias obtenidas de PRRSV.

>PRRSV VR2332	<p>ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGG TGTATCGTGCCGTTCTGT TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA TTACA.A.CTTGACGCTATGT GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTCCTTGACACAG TCGCTTTAGTCACTGTGTC TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT GTGCCCTGGCTGCGTTGAC TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA CCAGATATACCA.A.CTTTCTT CTGGACACTA.A.GGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA. A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG</p>
>KP256233.1_RVRp13	<p>ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG GTGTATCGTGCCGTTCTGT TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCAGCGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGAT TTACA.A.CTTGACGCTATGT GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT</p> <p>TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACTAGCCATTCCTTGACACAG TCGCTTTAGTCACTGTGTC TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT GTGCCCTGGCTGCGTTGAC</p>

TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.AGGGCA.A.AGTTGAGG
TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG

>KM386622.1_RVRp22

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG
GTGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACTAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG

>KU844096.1_VACMX14_GP5

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG
GTGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.

A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG

>JQ860390.1-HG.RV1-VIETNAM

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTTCTTTGTGG
TGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCAATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG

>KU844095.1_A16MX14_GP5

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG
GTGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTGGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCAATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TGGA.A.GGTCGTGTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGG
CA.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTT TCAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTCGTCCTTAG

>KU844094.1_A4MX14_GP5

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG
GTGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TGGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGTTCGTCCTTAG

>KU844097.1_G2MX14_GP5

ATGTTGGAGA.A.ATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCA.A.TTGCTTTCTTTGTG
GTGTATCGTGCCGTTCTGT
TTTGCTGTGCTCGCCA.A.CGCCAGCA.A.CGACAGCAGCTCCCATCTACAGCTGA
TTTACA.A.CTTGACGCTATGT
GAGCTGA.A.TGGCACAGATTGGCTAGCTA.A.CA.A.ATTTGATTGGGCAGTGGAG
AGTTTTGTCATCTTTCCCGTT
TTGACTCACATTGTCTCCTATGGTGCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAG
TCGCTTTAGTCACTGTGTC
TACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTA.A.GTAGCATCTACGCGGTCT
GTGCCCTGGCTGCGTTGAC
TTGCTTCGTCATTAGGTTTGCA.A.AGA.A.TTGCATGTCCTGGCGCTACGCGTGTA
CCAGATATACCA.A.CTTTCTT
CTGGACACTA.A.GGGCGGACTCTATCGTTGGCGGTTCGCCTGTCATCATAGAGA.
A.A.A.GGGGCA.A.AGTTGAGG
TCGA.A.GGTCATCTGATCGACCTCA.A.A.A.GAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGC
A.A.CCCCTATA.A.CCAGAGTTT CAGCGGA.A.CA.A.TGGGGGCGTCCTTAG

5.6 Alineamiento de nucleótidos de PRRSV ORF 5 y NP

La revisión de los cambios o mutaciones presentes en los genes NP y ORF 5 se hizo por alineamiento de secuencias donde se analizaron todas las muestras obtenidas de PRRSV

tipo 2 vacunas contra NP y GP5 de PRRSV P24, se utilizó como cepa consenso a la cepa original de virus de PRRSV VR2332. En el alineamiento se puede observar 15 mutaciones con respecto a la cepa VR2332; las mutaciones se encuentran en las posiciones 35, 38, 69, 82, 98, 162, 217, 218, 228, 234, 253, 259, 277, 251, 252, 431 (Imagen 5).

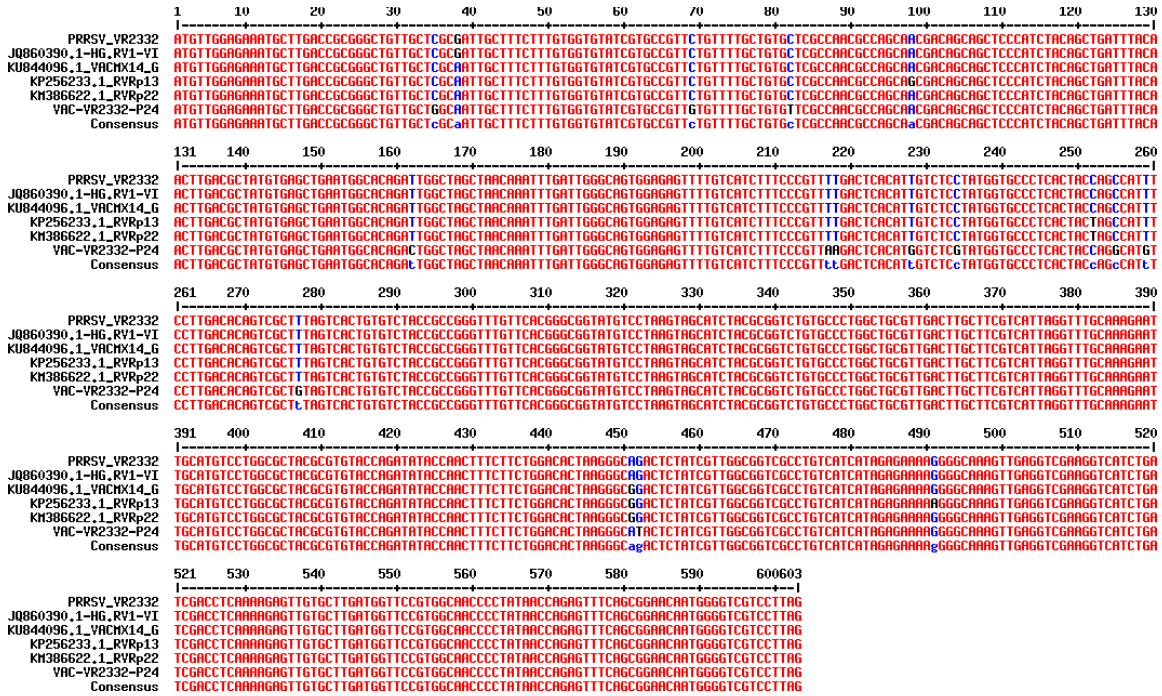


FIGURA 6. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *ORF5* obtenido con el Software en línea de Multalin. Se muestra en rojo las bases con la totalidad de eventos alineados entre las 5 muestras, en azul se muestran los eventos alineados superiores al 60% y en negro los eventos con alineamiento menor al 40% de los eventos.

El alineamiento de nucleótidos obtenidos con la secuenciación de gen NP de PRRSV VacP24 realizado con software informático en línea Multalin se muestra que la sepa vacunal de PRRSV pase 24 con la que se trabajó solo tiene un cambio en la posición 46 con respecto a la cepa VR2332 original reportada en NCBI (Imagen 6).

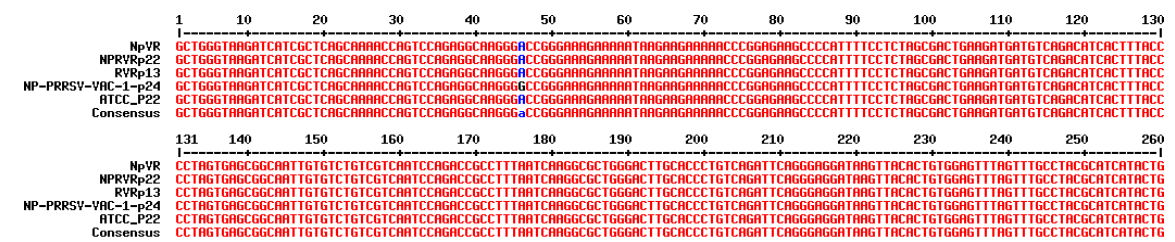


FIGURA 7. Alineamiento de secuencia parcial de nucleótidos de NP de PRRSV.

El Alineamiento de la predicción de secuencias de aminoácidos del gen GP5 de PRRSV muestra un total de 9 variaciones entre la cepa vacunal VR2332 Pase24 con respecto a la

secuencia VR2332 reportada en NCBI como se muestra en la FIGURA 8.

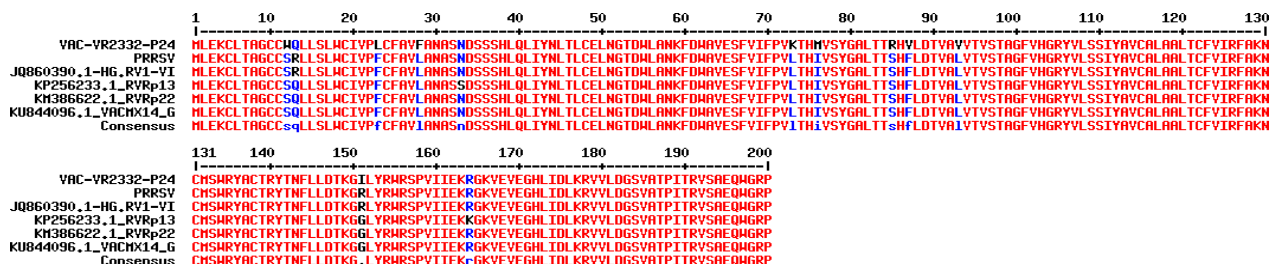


FIGURA 8. Alineamiento de la predicción de la secuencia de aminoácidos de PRRSV Vac P24 con las algunas cepas reportadas de PRRSV, donde se muestra que la cepa PRRSV Vac P24 hay un total de 9 cambios con respecto a la cepa VR2332.

La predicción de aminoácidos del gen GP5 con el programa MEGA 5 se realizó con el fin de compararla con las secuencias reportadas de virus vacúnales. Los aminoácidos que varían con respecto a la secuencia VR2332 original se muestran en color amarillo en tabla 10.

Nombre	Secuencia de Aminoácidos	
Vac P24	MLEKCLTAGCCWQLLSLWCIVPLCFAVFANASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVKTHM	1-77
> VR 2332	MLEKCLTAGCC SR LLSLWCIVPFCFAVLANASNDSSSHLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVLTHI	1-77
Vac P24	VSYGALTTRHVLDTVAVVTVSTAGFVHGGRYVLSIIYAVCALA.A.LTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYTNFLDITKGLIY	78-153
>VR 2332	VSYGALTTSHF LDTVALVTSTAGFVHGGRYVLSIIYAVCALA.A.LTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYTNFLDITKGRLY	78-153
Vac P24	RWRSPVIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGVSATPITRVSAEQWGRP	154-200
> VR 2332	RWRSPVIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGVSATPITRVSAEQWGRP	154-200

Tabla 10 Cambios en los aminoácidos de PRRSV Vac P24 respecto a VR2332, donde en amarillo se muestran los residuos que cambiaron.

Los 9 aminoácidos que variaron se enlistaron en la tabla 11, donde se muestra las características de los aminoácidos y la posición de la mutación.

Posición de la mutación	Aminoácido en PRRSV VR2332	Características del aminoácido	Aminoácido en VAC-VR2332-P24	Características del aminoácido
12	S-SERINA	POLAR, SIN CARGA	W-TRIPTOFANO	NO POLAR AROMATICO
13	R-ARGININA	CARGA POSITIVA	Q-GLUTAMINA	POLAR SIN CARGA
23	F-FENILALANINA	POLAR AROMATICO	L-LEUCINA	POLAR ALIFATICO
28	L-LEUCINA	POLAR ALIFATICO	F-FENILALANINA	POLAR AROMATICO
73	L-LEUCINA	POLAR ALIFATICO	K-LISINA	CARGADO POSITIVAMENTE
76	I-ISOLEUCINA	POLAR, ALIFATICO	M-METIONINA	NO POLAR ALIFATICO
85	S-SERINA	POLAR, SIN CARGA	R-ARGININA	CARGA POSITIVA
87	F-FENILALANINA	POLAR AROMATICO	V-VALINA	NO POLAR ALIFATICO
93	L-LEUCINA	POLAR ALIFATICO	V-VALINA	NO POLAR ALIFATICO
151	R-ARGININA	CARGA POSITIVA	I-ISOLEUCINA	NO POLAR ALIFATICO

Tabla 11 Mutaciones a nivel de aminoácidos de la cepa PRRSV Vac P24 con respecto a VR2332

El alineamiento del gen NP entre las cepas vacúnales reportadas y la cepa de PRRSV VR2332 P24 se muestra en la imagen 9 en el cual no hay variaciones de aminoácidos con las cepas seleccionadas

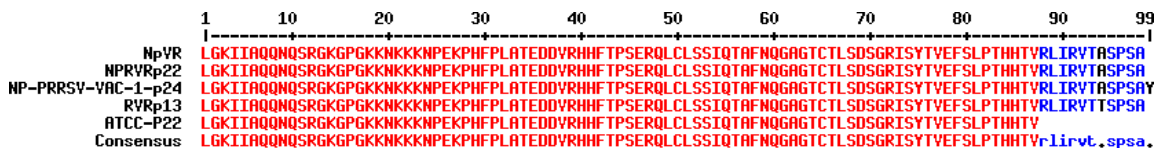


FIGURA 9 Alineamiento de secuencia parcial aminoácidos de proteína NP donde no se aprecian mutaciones con respecto a VR2332.

5.7 Construcción de árbol filogenético de cepas nacionales reportadas de PRRSV

Se realizó la recopilación de cepas reportadas para PRRSV de aislados mexicanos de la base de datos de NCBI para secuencias de nucleótidos de *ORF5*, encontrándose 160 cepas diferentes las cuales se muestran en el siguiente listado con número de acceso (tabla 12).

>KM386622.1 RVRp22

>KP256233.1 RVRp13

>lcl|U87392.3 ATCC 23

Acceso NCBI	
1 >DQ250069.1 ciad001 GP5	5 >DQ250073.1 ciad002 GP5
2 >DQ250070.1 ciad009 GP5	6 >DQ250074.1 ciad004 GP5
3 >DQ250071.1 ciad008 GP5	7 >DQ250075.1 ciad003 GP5
4 >DQ250072.1 ciad013 GP5	8 >DQ250076.1 ciad006 GP5
	9 >DQ250077.1 ciad007 GP5
	10 >DQ250078.1 ciad005 GP5

11 >DQ250079.1 ciad014 GP5	34 >GQ468685.1 ciad033 GP5
12 >DQ250080.1 ciad010 GP5	35 >GQ468686.1 ciad034 GP5
13 >DQ250081.1 ciad011 GP5	36 >GQ468687.1 ciad035 GP5
14 >DQ250082.1 ciad012 GP5	37 >GQ468688.1 ciad036 GP5
15 >DQ250083.1 ciad015 GP5	38 >GQ468689.1 ciad037 GP5
16 >DQ250084.1 ciad016 GP5	39 >GQ468690.1 ciad038 GP5
17 >DQ473570.1 Mex-1 GP5	40 >GQ468691.1 ciad039 GP5
18 >DQ473572.1 Mex-2 GP5	41 >GQ468692.1 ciad040 GP5
19 >GQ468670.1 ciad017 GP5	42 >GQ468693.1 ciad041 GP5
20 >GQ468671.1 ciad018 GP5	43 >GQ468694.1 ciad042 GP5
21 >GQ468672.1 ciad019 GP5	44 >GQ468695.1 ciad043 GP5
22 >GQ468673.1 ciad020 GP5	45 >GQ468696.1 ciad044 GP5
23 >GQ468674.1 ciad021 GP5	46 >GQ468697.1 ciad045 GP5
24 >GQ468675.1 ciad022 GP5	47 >GQ468698.1 ciad046 GP5
25 >GQ468676.1 ciad023 GP5	48 >GQ468699.1 ciad047 GP5
26 >GQ468677.1 ciad024 GP5	49 >GQ468700.1 ciad048 GP5
27 >GQ468678.1 ciad025 GP5	50 >GQ468701.1 ciad049 GP5
28 >GQ468679.1 ciad027 GP5	51 >GQ468702.1 ciad050 GP5
29 >GQ468680.1 ciad028 GP5	52 >GQ468703.1 ciad051 GP5
30 >GQ468681.1 ciad029 GP5	53 >GQ468704.1 ciad052 GP5
31 >GQ468682.1 ciad030 GP5	54 >GQ468705.1 ciad053 GP5
32 >GQ468683.1 ciad031 GP5	55 >GQ468706.1 ciad054 GP5
33 >GQ468684.1 ciad032 GP5	56 >GQ468707.1 ciad055 GP5

57 >GQ468708.1 ciad056 GP5	80 >GQ468731.1 ciad084 GP5
58 >GQ468709.1 ciad057 GP5	81 >GQ468732.1 ciad085 GP5
59 >GQ468710.1 ciad058 GP5	82 >GQ468733.1 ciad086 GP5
60 >GQ468711.1 ciad060 GP5	83 >GQ468734.1 ciad087 GP5
61 >GQ468712.1 ciad061 GP5	84 >GQ468735.1 ciad088 GP5
62 >GQ468713.1 ciad064 GP5	85 >GQ468736.1 ciad089 GP5
63 >GQ468714.1 ciad065 GP5	86 >GQ468737.1 ciad090 GP5
64 >GQ468715.1 ciad066 GP5	87 >GQ468738.1 ciad092 GP5
65 >GQ468716.1 ciad068 GP5	88 >GQ468739.1 ciad093 GP5
66 >GQ468717.1 ciad069 GP5	89 >GQ468740.1 ciad094 GP5
67 >GQ468718.1 ciad070 GP5	90 >GQ468741.1 ciad095 GP5
68 >GQ468719.1 ciad071 GP5	91 >GQ468742.1 ciad096 GP5
69 >GQ468720.1 ciad072 GP5	92 >GQ468743.1 ciad097 GP5
70 >GQ468721.1 ciad073 GP5	93 >GQ468744.1 ciad099 GP5
71 >GQ468722.1 ciad074 GP5	94 >GQ468745.1 ciad100 GP5
72 >GQ468723.1 ciad075 GP5	95 >GQ468746.1 ciad101 GP5
73 >GQ468724.1 ciad076 GP5	96 >GQ468747.1 ciad102 GP5
74 >GQ468725.1 ciad077 GP5	97 >GQ468748.1 ciad103 GP5
75 >GQ468726.1 ciad078 GP5	98 >GQ468749.1 ciad104 GP5
76 >GQ468727.1 ciad079 GP5	99 >GQ468750.1 ciad105 GP5
77 >GQ468728.1 ciad080 GP5	100 >GQ468751.1 ciad106 GP5
78 >GQ468729.1 ciad081 GP5	101 >GQ468752.1 ciad107 GP5
79 >GQ468730.1 ciad083 GP5	102 >GQ468753.1 ciad108 GP5

103	>GQ468754.1 ciad111 GP5	126	>KF444476.1 ciad371 GP5
104	>GQ468755.1 ciad112 GP5	127	>KF444477.1 ciad386 GP5
105	>GQ468756.1 ciad113 GP5	128	>KF444478.1 ciad388 GP5
106	>GQ468757.1 ciad114 GP5	129	>KF444479.1 ciad389 GP5
107	>GQ468758.1 ciad116 GP5	130	>KF444480.1 ciad390 GP5
108	>GQ468759.1 ciad117 GP5	131	>KF444481.1 ciad391 GP5
109	>GQ468760.1 ciad119 GP5	132	>KF444482.1 ciad392 GP5
110	>GQ468761.1 ciad121 GP5	133	>KF444483.1 ciad394 GP5
111	>GQ468762.1 ciad122 GP5	134	>KF444484.1 ciad399 GP5
112	>GQ468763.1 ciad124 GP5	135	>KF444485.1 ciad402 GP5
113	>GQ468764.1 ciad132 GP5	136	>KF444486.1 ciad405 GP5
114	>GQ468765.1 ciad133 GP5	137	>KF444487.1 ciad412 GP5
115	>GQ468766.1 ciad134 GP5	138	>KF444488.1 ciad413 GP5
116	>GQ468767.1 ciad140 GP5	139	>KF444489.1 ciad416 GP5
117	>GQ468768.1 ciad141 GP5	140	>KF444490.1 ciad417 GP5
118	>GQ468769.1 ciad179 GP5	141	>KF444491.1 ciad419 GP5
119	>GQ468770.1 ciad180 GP5	142	>KF444492.1 ciad420 GP5
120	>GQ468771.1 ciad182 GP5	143	>KF444493.1 ciad423 GP5
121	>GQ468772.1 ciad183 GP5	144	>KF444494.1 ciad424 GP5
122	>GQ468773.1 ciad187 GP5	145	>KF444495.1 ciad425 GP5
123	>GQ468774.1 ciad188 GP5	146	>KF444496.1 ciad426 GP5
124	>KF444474.1 ciad369 GP5	147	>KF444497.1 ciad427 GP5
125	>KF444475.1 ciad370 GP5	148	>KF444498.1 ciad428 GP5

149	>KF444499.1 ciad429 GP5	156	>KJ769642.1 ciad434 GP5
150	>KF444500.1 ciad430 GP5	157	>KU844094.1 A4MX14 GP5
151	>KF444501.1 ciad432 GP5	158	>KU844095.1 A16MX14 GP5
152	>KF444502.1 ciad436 GP5	159	>KU844096.1 VACMX14 GP5
153	>KF444503.1 ciad446 GP5	160	>KU844097.1 G2MX14 GP5
154	>KF444504.1 ciad447 GP5		

Tabla 12. Secuencias encontradas para el gene *ORF5* de PRRSV de cepas obtenidas en territorio mexicano y utilizadas para obtener el árbol filogenético.

Debido a que ORF 5 fue el gen que mostro mayor variabilidad en las secuencias reportadas se utilizo este para realizar el árbol filogenético de cepas mexicanas. Las secuencias se alinearon por medio de software informático MEGA 7 utilizando el algoritmo de Muscle, una vez obtenido el alineamiento de ácidos nucleicos y aminoácidos, se procedió a realizar el cálculo de un árbol filogenético a través del método de likelihood con 500 bootstrap con el mismo software (Figuras 10, 11).

El árbol filogenético nos muestra que las cepas de virus se agrupan en 11 clados, en donde las cepas vacúnales reportadas para PRRSV, entre ellas, la cepa VR2332 y PRRSV P24 se alinean en el mismo clado de color verde oscuro mostrado en la imagen 10, en el resto de los clados se muestran las cepas reportadas para territorio mexicano.

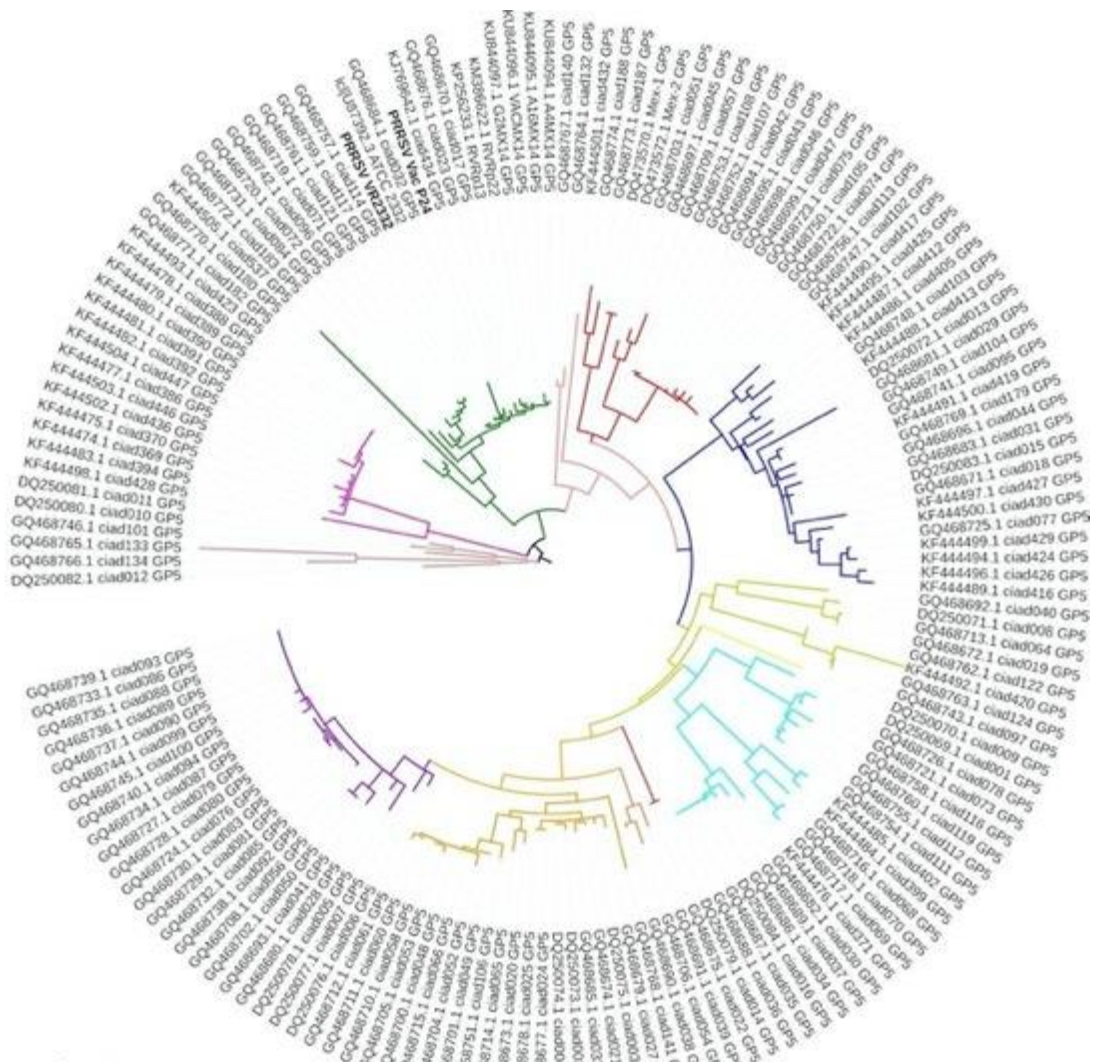


Imagen 10. Árbol Filogenético dispuesto en círculo del gen GP5 de cepas de PRRSV reportadas para México alineadas con el software informático MEGA7 y generado por método de Likelihood con 500 bootstrap.

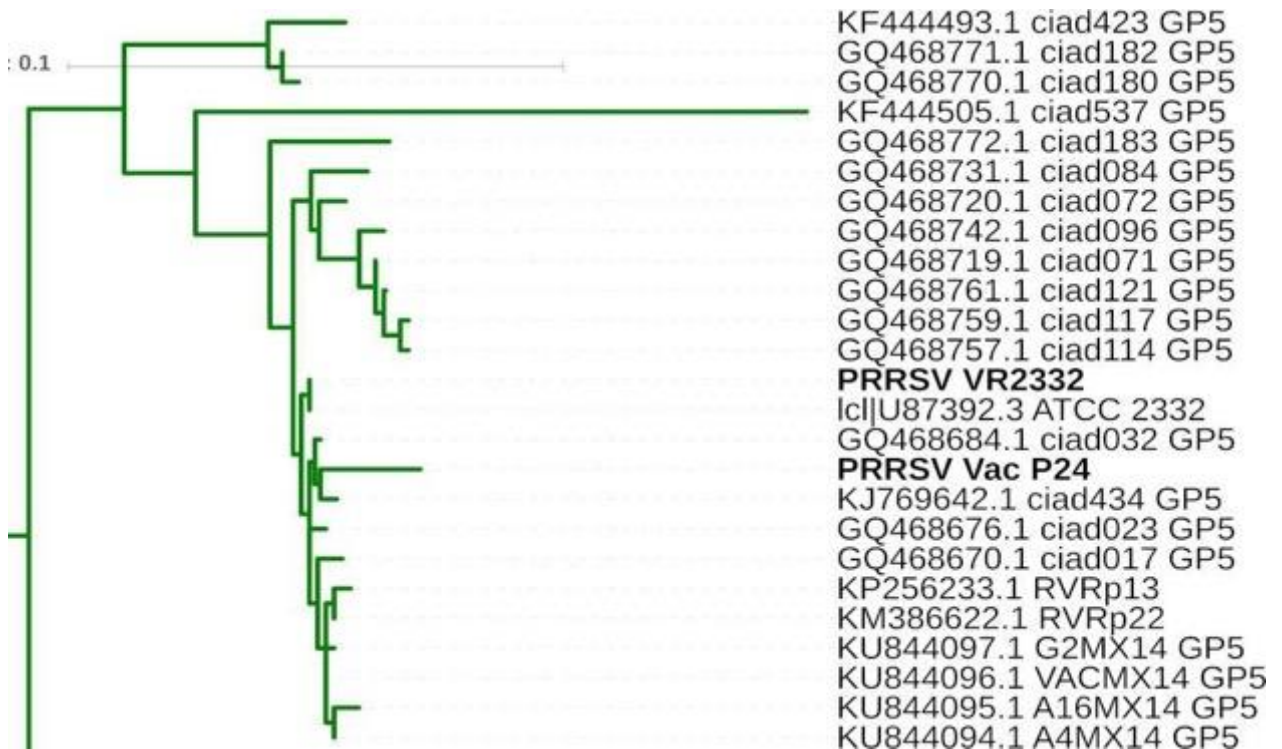


FIGURA 11 Clado de árbol de distancias de gen GP5 de cepas mexicanas y vacúnales de PRRSV, este clado incluye a la cepa VR2332 a partir de ella se desglosan el resto de cepas vacúnales que se utilizaron para este estudio, siendo la que tiene mayor distancia la cepa de PRRSV Vac P24, en este clado también se encuentran otras cepas silvestres mexicanas.

5.8 Predicción de estructura de Proteína ORF5 de PRRSV Vac P24

Ya que ORF 5 fue la secuencia que mostro tener mutaciones a nivel de nucleótidos y aminoácidos, se utilizo para realizar la predicción de la estructura secundaria y terciaria de la proteína GP5, regiones péptido señal, epítopes y glicosilaciones por medio de programas bioinformáticos.

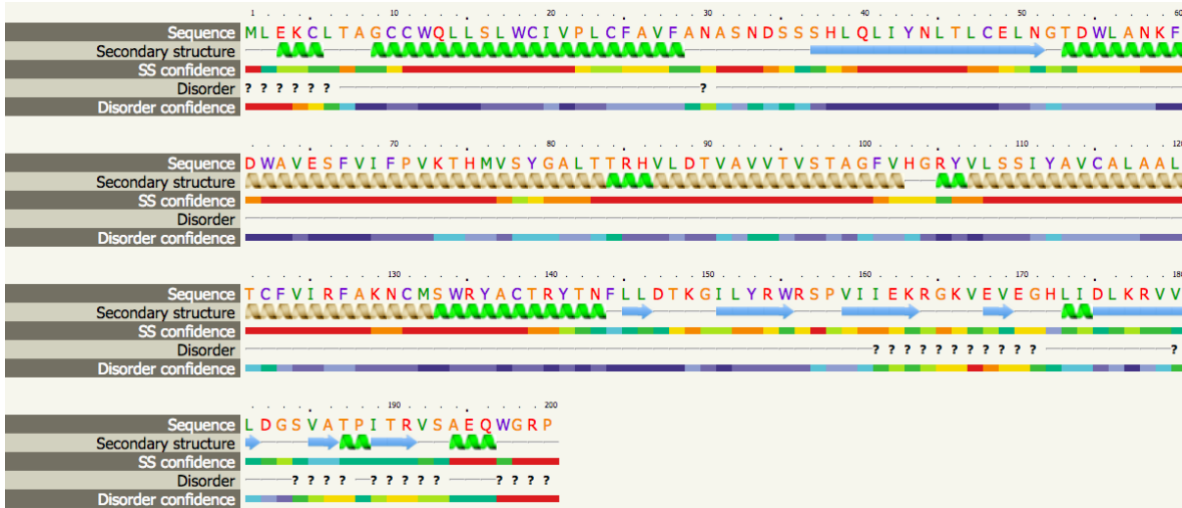
5.9 Predicción de estructura secundaria de ORF 5 de PRRSV Vac P24

La Predicción de estructura secundaria de proteína *ORF 5* de PRRSV vacunal P24 y PRRSV VR2332 reportada en NCBI de acuerdo a los software informáticos en línea PHYRE2 (Kelley LA y cols., 2015) y se muestra en la FIGURA 12, donde se observan las regiones alfa hélice en color verde y beta plegada en color azul. Se muestran 3 regiones transmembranales en las predicciones para PRRSV Vac P24 y PRRSV VR2332 en los aminoácidos 61-83, 87-102, y 107- 132, en azul se muestran las regiones beta plegada, las regiones ectomembranales

fueron

localizadas entre los aminoácidos 1-60 y de 101-106 y la región endomembranal se localiza en los aminoácidos 84-87 y 133-200 para ambas proteínas (Imagen 13).

1).PRRSV Vac P24



2) VR2332

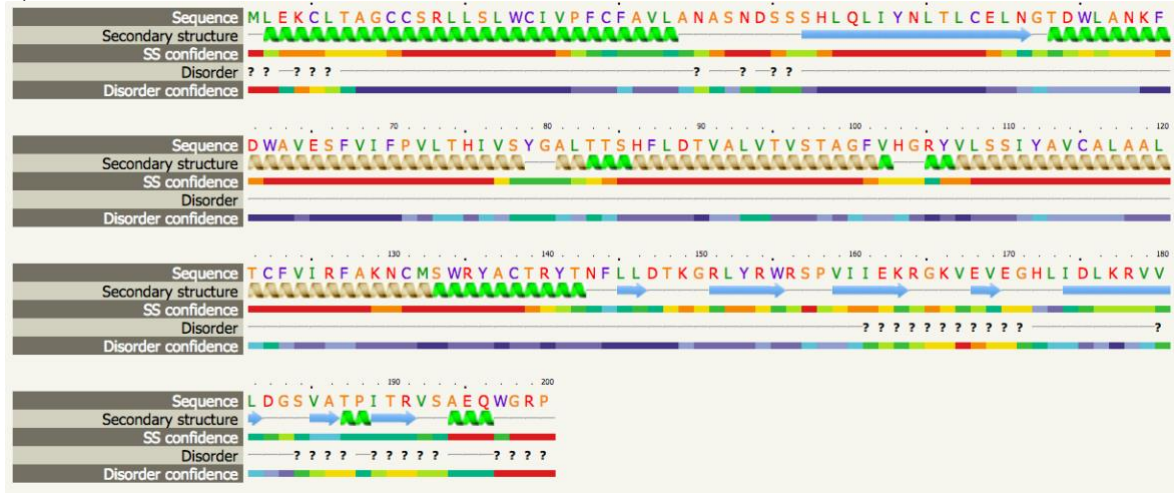


FIGURA 12. Predicción de estructura secundaria de secuencia de aminoácidos de GP5, se observan las regiones transmembranales (espiral color café claro), estructuras beta plegadas (flecha azul) y alfa hélices (espiral verde y café claro). (1) predicción de secuencia de GP5 de PRRSV Vac P24. (2) predicción de secuencia de aminoácidos de PRRSV VR2332.

5.10 Predicción de péptido señal de proteína de GP5

Se realizó una predicción del péptido señal por medio del software informático en línea

SignalP 5.0 (SignalP 5.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. Nature Methods, 8:785-786, 2011) de la cepa PRRSV Vac P24 y PRRSV VR2332 (FIGURA 13). La predicción muestra que los aminoácidos que comprenden el péptido señal van desde el 1er aminoácido y terminan en el 31 tanto para PRRSV Vac P24 como para PRRSV VR2332.

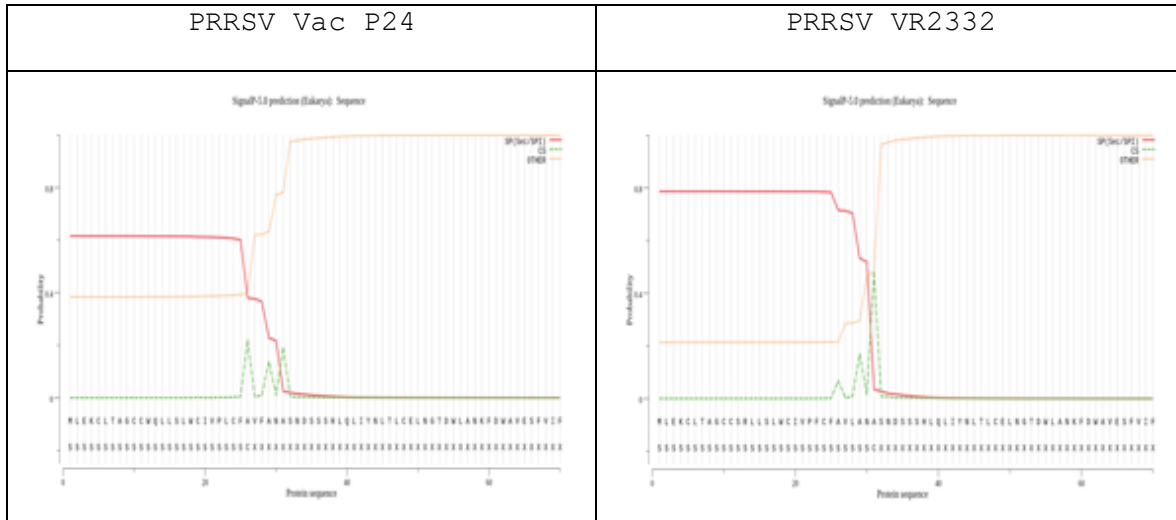


FIGURA 13. Predicción de péptido señal de la proteína GP5 de PRRSV probabilidad vs secuencia. En rojo se muestra la probabilidad de que los aminoácidos correspondan al péptido señal, en naranja se muestra la probabilidad de que la secuencia no sea parte del péptido señal y en verde se muestran los sitios de anclaje. A la izquierda se muestra la predicción de cepa de PRRSV Vac P24. Derecha, Predicción de PRRSV VR2332. En ambos casos, se muestra que el péptido señal comienza desde el aminoácido 1 y termina en el aminoácido 31.

5.11 Predicción de sitios de glicosilación de proteína GP5 de PRRSV Vac P24

Se realizó la predicción de sitios de N glicosilación y O glicosilación para las proteínas GP5 de PRRSV Vac P24 y VR2332 a través de la herramienta en línea NetNGlyc (R. Gupta, y cols., 2004) y NetOGlyc (Steentoft C, y cols., 2013), donde se muestra que tanto en VR2332 como en PRRSV Vac P24 tienen el mismo sitio de O glicosilación en el aminoácido 97 y los en 4 sitios previstos de N- glicosilación, en las posiciones 30, 33, 44, y 51, como se muestra en la FIGURA 14, sin embargo en estudios previos se han identificado que solo los últimos dos sitios (44 y 51) son positivos a N glicosilación en virus *In situ*.

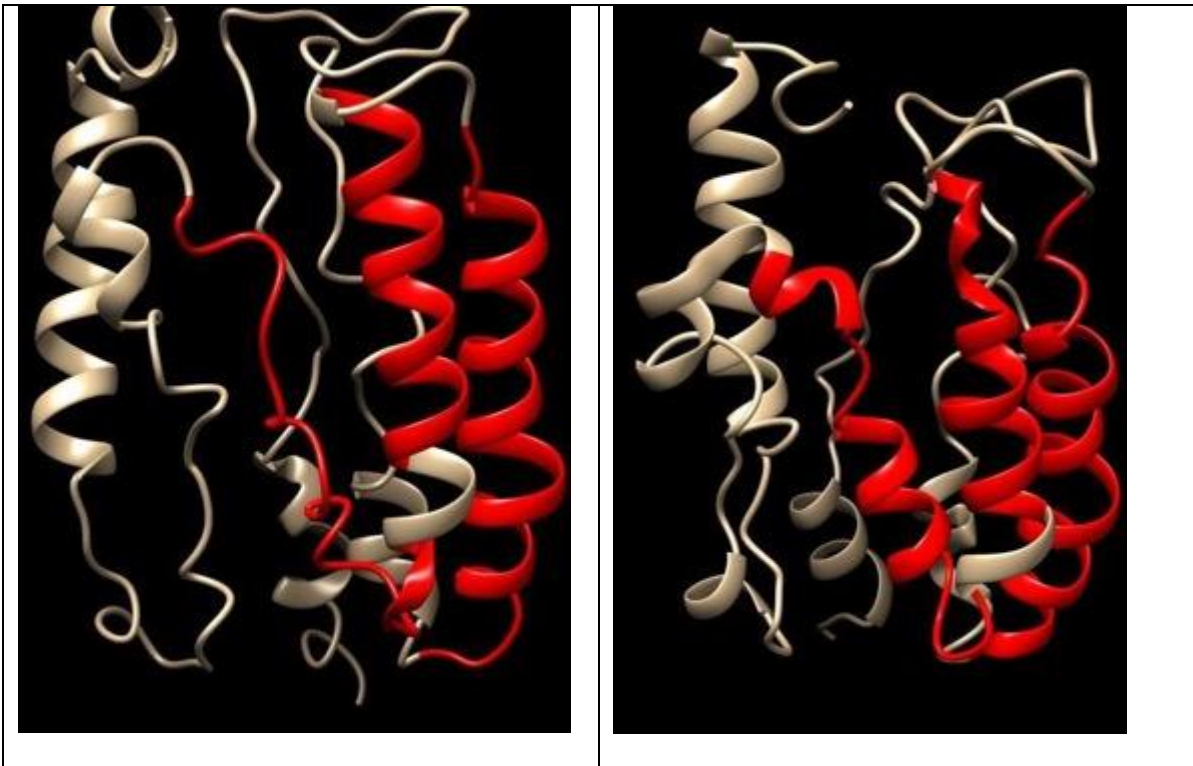


FIGURA 15. Predicción y visualización tridimensional de la estructura terciaria de la proteína GP5 de PRRSV de las cepa Vac P24 del lado izquierdo y VR2332 del lado derecho. Se muestra en color rojo las regiones transmembranales.

Se superpusieron las estructuras terciarias de las proteínas para ver los cambios morfológicos entre estas, se muestran en la imagen 16 donde la proteína PRRSV Vac P24 se muestra en rojo y la proteína PRRSV VR2332 en amarillo.

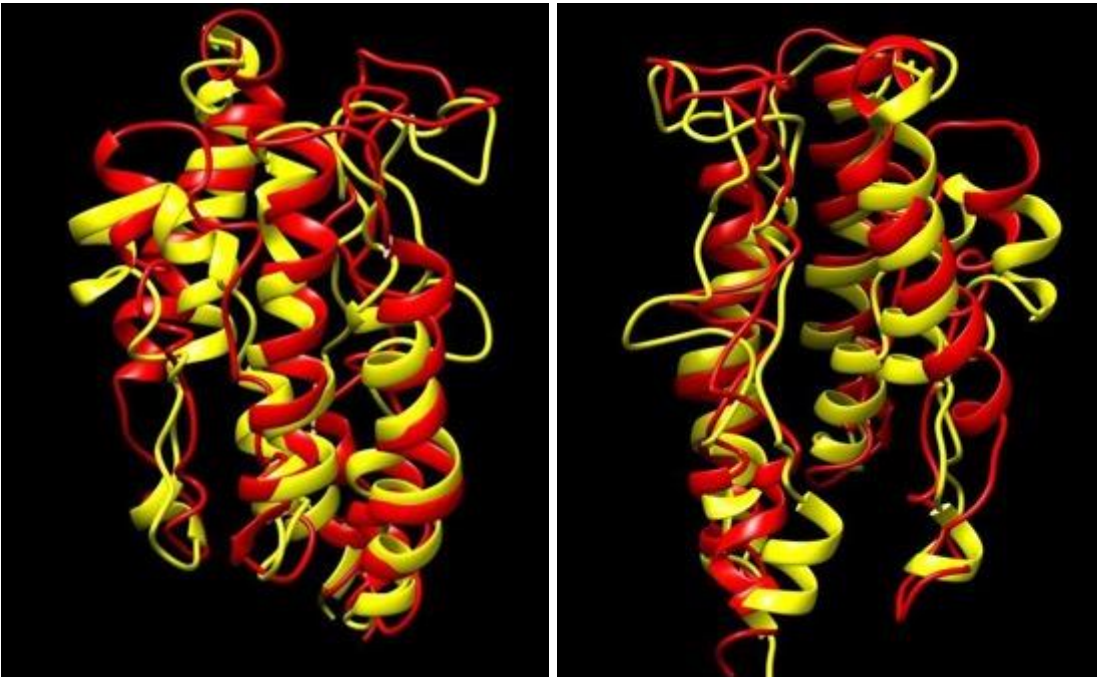


FIGURA 16. Sobreposición de proteínas de ORF 5 de PRRSV. En Amarillo se muestra la proteína de ORF5 de PRRSV VR2332 y en rojo se muestra la proteína PRRSV Vac P24.

6. Discusión

6.1. Replicación viral en células Marc-145

Las células infectadas con PRRSV VAC P24 comenzaron a mostrar diferencias significativas en comparación con las células control el día 5 P.I. y de ahí los efectos fueron en aumento, algunos de ellos fueron la aparición de células desprendidas de la monocapa celular, cambio de la morfología como elongamientos y aparición de proyecciones citoplasmicas, disminución de la confluencia, acidificación del medio celular, mientras que las células control solo mostraron un aumento en la confluencia y consumo de medio celular, por lo cual podemos aseverar que los efectos son inducidos por la presencia de partículas virales.

La cinética de infección muestra una disminución del tiempo de mantenimiento con respecto a los primeros pases de PRRSV VR2332, reduciendo en 24hrs el tiempo en el que alcanza el 90% de lisis de 12 días a 11, esto indica que al someter la cepa a pases seriados ha acumulado cambios los cuales podrían indicar una atenuación en su hospedero natural.

El título viral obtenido fue con una escala logarítmica que alcanzaba el orden de los millones de UFP (3.84×10^6), mientras que los datos reportados para VR2332 son de 5.4×10^5 (Gauger P. y cols., 2011)

6.2. Comprobación de obtención de secuencias de genes GP5 y NP

Se pudo comprobar que las secuencias obtenidas de PRRSV para ORF 5 pertenece al virus de PRRSV tipo 2, debido a la homología mayor al 95% presentada con varias secuencias reportadas en NCBI y alineadas por la herramienta BLAST, por lo que es concluyente que la cepa es perteneciente al serotipo americano, lo cual concuerda con lo esperado, las secuencias se observa en Figura 8 y Figura 9.

La proteína GP5 esta reportada como el segmento del genoma más variable del virus de PRRSV, de acuerdo con los informes presentan una homología entre cepas americanas y europeas del 60%, todas las cepas alineadas muestran ser del tipo 2, ya que se usa como referencia VR2332, y el resto presenta una homología mayor al 90%. En el alineamiento del gen *ORF5* (Figura 8) se encontraron 13 mutaciones de la cepa PRRSV Vac P24 con respecto a VR2332., dentro del gen se localiza una región hipervariable comprendida entre la zona del péptido señal y la región del ectodominio, es en esta donde se localizan 12 de los 13 cambios localizados en la secuencia

6.3. Traducción de ácidos nucleicos a aminoácidos de GP5

Se tomo como referencia los orígenes y fin de traducción reportados para GP5, la secuencia obtenida fue de 200a.a. las cuales se alinearon por medio de la herramienta BLAST de NCBI para comprobar la identidad y correcto marco de lectura del gen GP5, las secuencias arrojadas muestran una homología mayor al 95% por lo que se corroboró que la secuencia de aminoácidos y marco de lectura corresponde los reportados en NCBI.

En el alineamiento de la secuencia de GP5 se muestra que la cepa PRRSV Vac P24 tiene un total de 10 cambios en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 12, 13, 23, 28, 73, 76, 85, 87, 93 y 151 con respecto a VR2332, en los cambios observados 9 corresponden a la zona de hipervariable de la proteína.

De acuerdo a la predicción de la estructura secundaria de la proteína, podemos observar los aminoácidos comprendidos como el péptido señal de la región (1-26) de acuerdo a la predicción realizada con SignalP4.1 (Petersen T N y cols., 2011) seguido por el ectodominio, comprendido dos regiones hidrofóbicas con una beta plegada intermedia (26-60 a.a.), continuamente comienzan los dominios transmembranales, los cuales algunos autores reportan 3 y van de los aminoácidos 66 al 126, y finalmente se encuentra un endodominio del aminoácido 127 al 200, en la comparación con la predicción de VR2332 se aprecia que existen cambios en la estructura secundaria en los aminoácidos 6-8, en la región del péptido señal y en la zona hidrofóbica donde se encuentra la región transmembranal 79-80, interrumpiendo la alfa hélice en ambos casos, por el contrario aparece una región alfa hélice en los aminoácidos 173-174 comprendidos como región del endodominio.

De acuerdo al análisis de las regiones de N glicosilación se muestran 4 zonas positivas a glicosilar en las posiciones 30, 33, 44, 51, por lo que concuerda con los resultados expuestos, encontrando que las mutaciones no alteran las regiones glicosilación (Wei, Z. Y cols., 2012.), sin embargo los estudios recientes sobre mapeo de regiones de glicosilación por espectrometría de masas, concluyen en que las regiones a N glicosilación de GP5 de PRRSV VR2332 presentes in situ son los aminoácidos 44, 51, por lo que las regiones 30, 33 a pesar de tener potencial de N-glicosilación no se encuentran en virus en su hospedero natural.

La predicción de sitios con epítopes realizada para PRRSV P24 u PRRSV VR2332, indican que la región epítope se encuentra entre el aminoácido 29 y 38, sin embargo De acuerdo a los reportes sobre la proteína GP5 existen 2 zonas de reconocimiento por anticuerpos localizados en el ectodominio, el epítope 1 se localiza entre los aminoácidos 27-31, de acuerdo a los reportes esta zona podría funcionar como señuelo para la generación de anticuerpos, ya que la respuesta temprana del sistema inmune adquirido va dirigida a este epítope, sin embargo los anticuerpos no son neutralizantes. El epítope 2 se localiza entre

los aminoácidos y 37-44, es en esta zona donde se reporta el reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes contra PRRSV. en los resultados de la secuenciación se muestra que existe una mutación en la región del epítipo 1 en el aminoácido 28 cambiando una Lisina el cual es una aminoácido de carácter polar aromático por una leucina, un aminoácido de carácter alifático, por lo que es altamente polar y su capacidad de reacción es limitada, es un aminoácido el cual no es característico de una región epítipo.

De acuerdo a la predicción realizada de la estructura terciaria de GP5

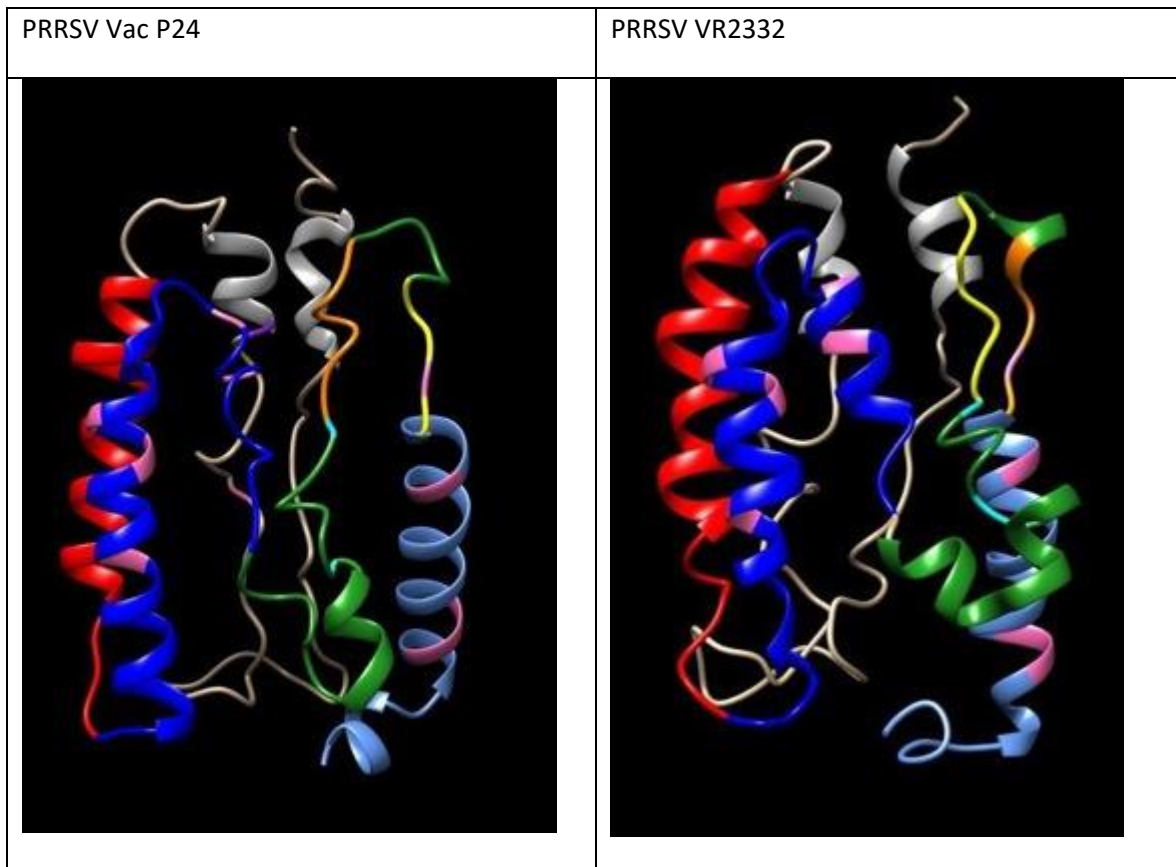


FIGURA 17. Comparación entre las predicciones de proteínas GP5 de PRRSV Vac P24 y PRRSV VR2332. Izquierda, Predicción de estructura terciaria de PRRSV Vac P24. Derecha Predicción de estructura terciaria de PRRSV VR2332

Imagen.

Predicción	Lugar	Color
Péptido señal	1-30	Azul claro
TMR región trans membranal	105-126 a.a.	Rojo

Región hidrofóbica	66-105 a.a.	Azul oscuro
Región ectodominio	1-65 a.a.	Verde
Epítotope A	27-31 a.a.	Naranja
Epítotope B	37-44	Amarillo
N-Glicosilaciones	N-44 N-51	Azul cian
Aminoácidos variables		Rosa

Tabla 13 Predicciones ubicadas en las proteínas modeladas con posición y color en la imagen.

6.4. Filogenia de GP5 de cepas mexicanas y vacúnales de PRRSV

El árbol de distancias de la secuencia de codones alineados de la proteína GP5 de cepas mexicanas nos muestran la separación de las cepas en varios clúster diferentes como se muestra en la imagen.

Los clúster mostrados nos indican que todas las cepas mexicanas recopiladas en el presente estudio, son pertenecientes al PRRSV tipo 2, el cual corresponde al genotipo americano; sin embargo a pesar de tener mayor incidencia la aparición de PRRSV tipo 2 en el continente americano, existen reportes en Estados Unidos la presencia de PRRSV tipo 1 y en Europa y Asia existen brotes de PRRSV tipo 2, por lo que la importación y exportación de productos de la ganadería porcina con países europeos y estadounidenses pueden promover la aparición del virus tipo 1 en territorio mexicano.

La generación de los clúster en el árbol filogenético debido a la propagación de PRRSV en México a través de las últimas décadas muestran que las cepas se han ramificado lo cual es una probable causa de la baja protección de la vacunación con vacunas contra PRRSV, ya que la protección adaptativa no es capaz de reconocer a las variantes de los virus y los mecanismos de evasión del sistema inmune hacen que sea complicados para el organismo eliminar la enfermedad.

El clúster donde se encuentra incluida la cepa de PRRSV Vac P24 se localizan también la cepa VR2332 y las demás cepas vacúnales que se seleccionaron para el presente estudio. La cepa VR2332, se encuentra más cercana al origen del y a partir de ella se ramifican y se encuentran el resto de las cepas vacúnales, incluyendo PRRSV Vac P24 esta cepa presente una distancia mayor con respecto al resto de las cepas dentro de este clado. También se incluyen algunas cepas mexicanas, las cuales por la cercanía con VR2332, las probabilidades

de que una vacuna proveniente esta cepa provea la protección contra estas cepas silvestres.

En la imagen 18 se muestra el dendograma de distancias con la separación de dos grupos, en donde el color verde corresponde al clado donde se incluyen las cepas vacúnales proveniente de VR2332, mientras que en color rojo se muestran los clados que se han distribuido en el territorio mexicano, los cuales comparten un tronco en común muy cercano a VR2332, el cual podría ser un indicador de la posible eficiencia de las cepas vacúnales de este clado frente a la cepas incluidas en los clados rojo.

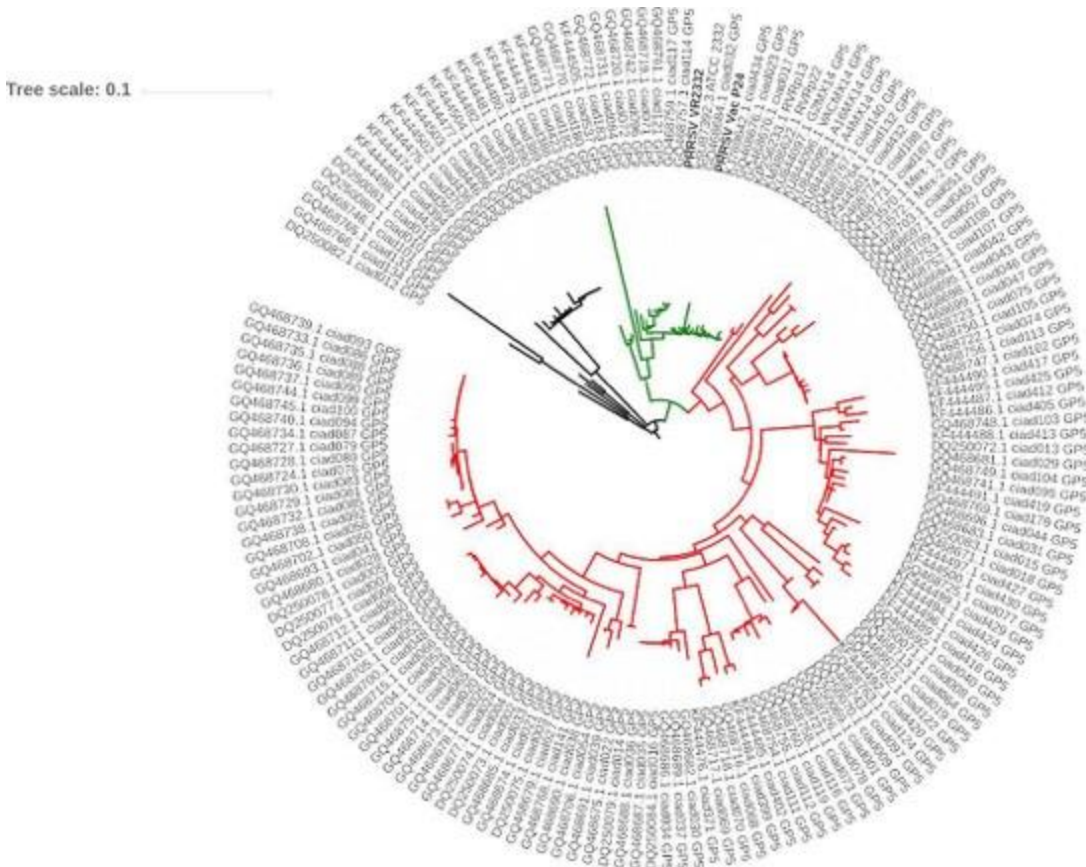


FIGURA 18. Variación de cepas relacionadas a la cepa de PRRSV VR2332. Se muestra en negro las cepas mas cercanas al origen, en verde se muestran las cepas relacionadas con VR2332 donde se encuentra PRRSV VAC P24 y en rojo se muestran el resto de las cepas mexicanas reportadas, las cuales comparten un tronco en común con el clado verde

Algunos reportes indican que las vacunas aplicadas contra PRRSV actúan como cepas silvestres, provocando la aparición de síntomas en el cerdo y propagándose en las granjas aledañas, por esta razón las cepas silvestres mexicanas incluidas en los clúster cercanos a las cepas vacúnales podrían provenir de estas y haberse propagado y variado por su cuenta en el territorio nacional o bien podrían ser cepas originarias de VR2332 y por esta razón presentan homologías con las cepas vacúnales.

Esta información revela que las cepas vacúnales podrían tener reversión de la virulencia y comportarse como una cepa silvestre esparciéndose en granjas donde no se han vacunado con estas cepas o en animales sin vacunar de la misma granja, así también las cepas vacúnales de PRRSV de acuerdo a reportes previos, pueden no ser muy efectivas, comportándose como cepas silvestres virulentas, esparciéndose y mostrando sintomatología aguda de la enfermedad.

Por estas causas la cepa de PRRSV Vac P24 al tener diferencias claras en los efectos citopáticos, variaciones a nivel genético que repercuten la secuencia de aminoácidos y en la estructura terciaria de la proteína GP5, podemos suponer que esta cepa es una buena candidata para ser probada como una potencial vacuna contra virus de PRRSV tipo 2.

7. Conclusiones

- De acuerdo a los efectos citopáticos del virus de PRRSV Vac P24 en células MARC-145 se muestran diferencias significativas con respecto a las infecciones del virus de la cepa VR2332 ya que los tiempos de alcanzar el máximo de lisis se alcanzan en 24hr menos que la cepa original VR2332 y el título viral aumenta una escala logarítmica
- El virus secuenciado corresponde a PRRSV tipo2 o americano, con una homología con VR2332 del 99%.
- El virus muestra tener 15 mutaciones en la proteína GP5, la mayoría en la región hipervariable del virus, estas mutaciones se traducen a 10 cambios a nivel de aminoácido.
- Los cambios a nivel de aminoácido presentan cambios a nivel estructural de acuerdo a las predicciones realizadas
- Las cepas mexicanas recopiladas para este estudio son del tipo americano.
- El virus de PRRSV Vac P24 se muestra en el mismo clúster con respecto a VR2332, y las cepas restantes presentan un tronco en común con estas, por lo que podrían presentar protección homóloga.
-

7. Bibliografía

- Andreyev V.G., R. Wesley, W. Mendeling A. Volwald, M. Lager. 19997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on secuencia analyzing of open reading frame 5. Archives of Virology. 142:993-1001
- Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, Welch SK: CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J Virol 2007, 81:7371–7379.
- Conzelmann K., N. Visser, P. Woensel, H. Thiel,1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. Virology 193: 329-339.
- Dea S., C. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, D. Rogan. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Archives of Virology. 145: 659-658.
- Dee, S.A., Joo, H.S., Polson, D.D., Marsh, W.E., 1997. Evaluation of the effects of nursery depopulation of the profitability of 34 pig
- Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. Virus Res. 154 (1–2), 86–97.
- Done S. 1995. Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Porcino (PRRS). Pigs-Misset pp.12-15.
- Fang, Y., Snijder, E.J., 2010. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. Virus Res. 154.
- Fang, Y., Treffers, E.E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., de Ru, A.H., van Veelen, P.A., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Firth, A.E., 2012. Efficient-2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 109.

- Kelley LA. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)
- Knoop, K., Barcena, M., Limpens, R.W., Koster, A.J., Momma, A.S., A.M., Snijder, E.J., 2012. Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *Journal of Virology*. 86.
- Lara J. 2000. PRRSV: Aislamiento, caracterización y evidencias en campo. *Información Oficial de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*; *Cerdos* 3 (38): 30-35.
- Li, B., Fang, L., Xu, Z., Liu, S., Gao, J., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S., 2009. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 15.
- Li, Y., Tas, A., Sun, Z., Snijder, E.J., Fang, Y., 2015. Proteolytic processing of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicase. *Virus Res.*, 10.1016/j.virusres
- Li, Y., Treffers, E.E., Naphine, S., Tas, A., Zhu, L., Sun, Z., Bell, S., Marc, B.L., van Veelen, P.A., van Hemert, M.J., Firth, A.E., Brierley, I., Snijder, E.J., Fang, Y., 2014. Transactivation of programmed ribosomal frameshifting by a viral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66.
- Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102 (3), 155–163. (anticuerpos contra GP5 y NP)
- Mardassi H, S. Mounir, S. Dea. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol*

140: 1 405-1 418

- Mardassi, H., Massie, B., Dea, S., 1996. Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221, 98–112
- Meng X., T Prem, S. Halbur, Igor Morozov. 1995. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 76: 3181-3188.
- Meng, X.J., 2012. Spread like a wildfire-The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Res*. 164.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 30-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 75.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., 1996. Characterization of a high-virulence US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Investig.* 8.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Morozov, I., Halbur, P.G., 1996. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 77.
- Meulenber J., M. Hulst, E. Meijer, P. Moonen, A. Besten, E. Kluyver, G. Wensvoort, Moormann RJM 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192: 62-72.
- Meulenber, J.J., de Meijer, E.J., Moormann, R.J., 1993a. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J. Gen. Virol.* 74.
- Meulenber, J.J., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de

Kluyver, E.P., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1993b. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192.

- Meulenbergh, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyverer, E.P., Moormann, R.J., Scha.a.per, W.M., Wensvoort, G., 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155–163.
- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Fa.a.berg, K.S., 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of Virology*. 73.
- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Fa.a.berg, K.S., 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of Virology*. 73.
- Letunic I. and Bork P., 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments., *Nucleic Acids Res.* 10:1093
- Pasternak, A.O., van den Born, E., Spa.a.n, W.J., Snijder, E.J., 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* 20.
- Patton B., R. Rowland, D. Yoo, K. Chang. 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Research.* 140:161-171
- Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N., Snijder, E.J., 1999. Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J.*
- Plagemann P., V. Moennig .1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus and simian hemorrhagic fever virus, a new group of positive strand RNA virus. *Adv Virus Res* 41: 99-192

- Quintana P. 2007. Evaluación inmuno histoquímica te tejidos de cerdos inoculados experimentalmente con el virus del PRRS y de cerdos contacto. Tesis para obtención de título de médico veterinario.
- R. Gupta, E. Jung and S. Brunak. In preparation, 2004 consultado en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc> en 7 de enero de 2017.
- Ramírez E., A. Ruiz, A. Islas, C. Lecoq, L. Carrasco, M. Quezada, 2006. Características hematológicas y patológicas de cerdos inoculados experimentalmente con el aislado chileno del virus síndrome respiratorio y reproductivo porcino. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 38: 151-160.
- Rossow D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology*. 35:1-20
- Sambrook J, F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, New York, 1989. 625-710, 1350-1402, 1600-1653 pp.
- Shi X, L. Wang, Y. Zhi, G. Xing, D. Zhao, R. Deng, G. Zhang. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) could be sensed by professional beta interferon-producing system and had mechanisms to inhibit this action in MARC-145 cells. *Virus Research*. 153
- SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. (2019), Almagro A., Tsirigos D, Ka.a.e S, Nordahl P, Ole W, Søren B, Von Heijne and H Nielsen. *Nature Biotechnology*, 37, 420-423.
- Snijder J., J. Meulenberg. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *Journal General Virology*. 79: 961-977.
- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*,

32(10):1478-88, May 15, 2013.

- V.G. andreyev , R. Wesley, W. Mendeling, A. Volwald, K. Lager. 1997. Genetic variation and Phylogenetic relationship of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. Archives of virology. 142.
- Van Marle, G., Dobbe, J.C., Gulyaev, A.P., Luytjes, W., Spa.a.n, W.J., Snijder, E.J., 1999a. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96.
- van Marle, G., van Dinten, L.C., Spa.a.n, W.J., Luytjes, W., Snijder, E.J., 1999b. Characterization of an equine arteritis virus replicase mutant defective in subgenomic mRNA synthesis. Journal of Virology. 73.
- Wei, Z., Lin, T., Sun, L., Li, Y., Wang, X., Gao, F., Liu, R., Chen, C., Tong, G., Yuan, S., 2012a. N-linked glycosylation of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus is critically important for virus replication in vivo. Journal of Virology. 86 (18), 9941–9951.
- Wensvoort G; C. Terpstra., J. Pool., E. Ter La.a.k., M. Bloemra.a.d., E. De Kluuver., C. Kragten., L. Van Buiten., A. Den Besten., F. Wagena.a.r., J. Broekhuijsen., P. Moonen., T. Zetstra., E. Deboer., H. Tibben., M. De Jong, P. Van't ., G. Groenland., J. Van Genneep., M. Voets., J. Verheijden J. Bra.a.mskamp. 1991b. Mystery Swine Disease in the Netherlands: isolation of Lelystad virus. Veterinary Quarterly, 1:13.
- Wensvoort G., Kluuver. E., Luijtze A., Besten A., Harris L., Collins J., Christianson W., Chladek. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. Veterinary Diagnostic Investigation. 4:134-138.
- Yoo, D., Wootton, S., Li, G., Song, S., Rowland, R.R., 2003. Colocalization and Yoo, D., Wootton, S., Li, G., Song, S., Rowland, R.R., 2003. Colocalization and inter- action of

the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *Journal of Virology*. 77: 12173–12183.

- Yuan, S., Murtaugh, M.P., Fa.a.berg, K.S., 2000. Heteroclite subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 275.
- Yuan, S., Murtaugh, M.P., Schumann, F.A., Mickelson, D., Fa.a.berg, K.S., 2004. Characterization of heteroclite subgenomic RNAs associated with PRRSV infection. *Virus Res*. 1:105.
- Yuan, S., Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Schmitt, B.J., Fa.a.berg, K.S., 1999. Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*. 1:61.
- Yun, S.I., Lee, Y.M., 2013. Overview: replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Microbiol*. 51, 711–723.
- Zhu L., Zhang G., Ma. J., He X., Xie Q., Bee Y., Zhon S., 2010. Complete genomic characterization of a Chinese isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*. 1:10.
- Gauger P, Fa.a.berg K, Guo B, Kappes M, Opriessnig T. 2012. Genetic and phenotypic characterization of a 2006 United States porcine reproductive and respiratory virus isolate associated with high morbidity and mortality in the field. *Virus Res*, 163: 98-107.