



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN

TÍTULO DEL TRABAJO
“DISEÑO DE UNA CLONA INFECCIOSA
FLUORESCENTE DEL VIRUS DEL SÍNDROME
REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO COMO
MODELO DE INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS
ALVEOLARES”

MODALIDAD DE TITULACIÓN
TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

PRESENTA:
AURORA CITLALLI MONTES CENTENO

TUTOR-DIRECTOR DE TESIS
Dra. ILANE HERNÁNDEZ MORALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
AARÓN VÉLEZ, ILANE HERNÁNDEZ, ELVIRA NUÑEZ,
CARLOS YEBRA, JULIO AMEZCUA.

León, Guanajuato, México (ENES León), 2022



Escuela
Nacional de
Estudios
Superiores



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).....	7
Signos clínicos.....	7
Transmisión.....	8
Agente etiológico.....	8
Células blanco	11
Ciclo de replicación de PRRSV	12
Respuesta inmunitaria innata contra PRRSV.....	13
Respuesta antiviral mediada por IFN tipo 1.....	16
Clona infecciosa pFL12.....	18
Reporteros fluorescentes.....	19
Fluorímetro	21
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
HIPÓTESIS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Anotación del plásmido NF-kB-hrGFP.....	22
Anotación de la clona infecciosa de PRRSV (pFL12).....	24
Diseño de oligos.....	26
Amplificación de hrGFP	27
Amplificación de dos segmentos de nsp2.....	28
PCR de sobrelapación	28
Digestión de pFL12.....	29
Ligación del fragmento nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´ a pFL12.....	30
Transformación bacteriana.....	30

Comprobación de transformación	30
PCR del fragmento nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´ de colonias transformadas.	30
Digestión de colonias transformadas.....	31
PCR de hrGFP de colonias transformadas.....	31
Células A549 y A549-GFP	31
Medio de cultivo para células.....	32
Método de cultivo celular	32
Preparación de las células A549	33
Medición de fluorescencia de células A549 y A549-GFP.....	33
Secuenciación de fragmentos fusionados	35
RESULTADOS	36
Los segmentos de hrGFP y nsp2 se amplificaron de los plásmidos NF-kB-hrGFP y pFL12	36
La fusión hrGFP con dos fragmentos de nsp2 se obtuvo mediante una PCR de sobrelapación.....	37
La digestión de pFL12 se obtuvo con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>SpeI</i>	40
Se encontró una posible colonia transformada por medio de una PCR de hrGFP.....	41
Se secuenciaron los fragmentos fusionados en la PCR de sobrelapación	41
La fluorescencia de las células A549 y A549-GFP fue significativamente diferente ..	44
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIÓN	52
PERSPECTIVAS	52
ANEXOS	53
Bibliografía.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

AGRADECIMIENTOS

En este momento tengo tantos sentimientos encontrados que me es difícil aterrizar mis pensamientos, hay tantas personas que no están conmigo ahora, ya sea sentimental o físicamente que quisiera seguir conservando. Pero ni siquiera tengo como agradecer a los que eligieron quedarse, no suelo ser muy expresiva, pero a cada una de las personas que me acompañaron en todo este proceso les voy a estar eternamente agradecida.

Quiero agradecer a mi familia, a mis hermanos Santi y Omar, les agradezco por cuidarme siempre y por impulsarme a tomar retos, por ser mi refugio seguro y por hacerme sentir tan amada. A mis padres, que son mi mayor sostén y las personas más importantes en mi vida, no hay nada que no haya logrado sin ustedes, gracias por enseñarme que el trabajo duro y la honestidad son la base de todo logro. Gracias por jamás dejar que me derrumbe, por recordarme mi valor y que puedo lograr todo lo que me proponga. Ustedes han sido mi más grande ejemplo y espero algún día acercarme a ser, la persona que ustedes son ahora, los admiro y los amo muchísimo. Este logro también es suyo.

Muchas veces perdemos la oportunidad de expresarle a las personas lo que nos hicieron sentir, y me duele no poder compartir este logro presencialmente con una de las personas más importantes para mí, quiero agradecer a mi abuelito Santiago por enseñarme la fortaleza de la unión familiar, lo extraño mucho papá chago, lo tendré siempre en mi corazón.

A todos mis profesores en la ENES León, por enseñarme el valor de trabajar por y para la ciencia. A la doctora Harumi Shimada por su apoyo incondicional a cada uno de los alumnos en la carrera. Al doctor Aarón y a la doctora llane que me permitieron formar parte de este proyecto, por su ayuda tanto dentro como fuera de la ENES, por todos esos caminos en el carro llenos de consejos y por toda su confianza. A mi tutora llane, le agradezco el haberme acompañado paso a paso en todo el proceso de mi tesis, por las noches repasando presentaciones, las incontables pláticas, los consejos, le agradezco su confianza y su apoyo, me siento muy feliz de que mi tutora se haya convertido en mi amiga, gracias por estar en momentos tan complicados para mí, la aprecio muchísimo y jamás tendré como pagarle por todo.

A mi compañera de proyecto, Monse, te agradezco tanto por haber sido mi refugio en los peores momentos, por escucharme, por llenarme de ánimos, por las risas, por las lágrimas y por tu apoyo incondicional.

Quiero darles las gracias a todos mis compañeros de generación, me llevo un aprendizaje de cada uno de ustedes. Gracias a Alberto por enseñarme a no rendirme y mostrarme la magia de encontrar lo que verdaderamente te apasiona, a Majo por enseñarme el

valor de la amistad incondicional, a Vanessa por enseñarme a defender mis ideales, a Aarón por siempre levantarme el ánimo, por festejar mis pequeños logros, por las pláticas profundas, por compartir tu conocimiento, te admiro mucho y siempre lo haré. Quiero agradecer a Abel por enseñarme que siendo valientes se pueden lograr cosas increíbles, eres de las personas más honestas y nobles con las que he coincidido. Gracias también a Gema por ser una gran amiga en los momentos más difíciles.

Por último, quiero hacer una mención especial a mi hermano Santi, gracias por preocuparte por mí, por cuidarme, por impulsarme a realizar mis metas, por darme oportunidad de experimentar uno de los mejores viajes de mi vida, por defenderme sin importar contra quien sea y sobre todo por creer en mí, te quiero mucho hermanito.

RESUMEN

La infección provocada por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) representa un enorme riesgo para la industria porcina, ya que, hasta ahora el control de esta enfermedad es deficiente, ocasionando pérdidas económicas cuantiosas. A pesar de la gravedad de la infección por PRRSV, aún se desconocen los mecanismos moleculares de replicación viral y evasión de la respuesta inmunitaria del huésped. El virus de PRRS tiene un genoma de ARN de sentido positivo compuesto por 10 marcos de lectura abiertos (*ORFs*), estos codifican tanto para proteínas estructurales como no estructurales. Se ha identificado que la proteína no estructural 2 (*nsp2*) es una de las regiones más variables en el genoma de PRRSV y soporta deleciones de hasta 200 aminoácidos. Por lo que se ha identificado como una región clave para la inserción de secuencias exógenas.

Debido al surgimiento constante de nuevas enfermedades y a la rápida mutación de los microorganismos patógenos ante los medicamentos y vacunas, es fundamental el estudio de los mecanismos moleculares de interacción patógeno-huésped. Para lograr esto, se necesita el acceso al material genético de los microorganismos patógenos de forma rápida, sencilla y sin riesgo para el personal. Una opción es el uso de clonas infecciosas, en esta investigación se utilizó la clona pFL12 que consta de la inserción del genoma de PRRSV en el plásmido bacteriano pBR322.

El uso de reporteros fluorescentes podría facilitar el estudio de los mecanismos moleculares de la interacción patógeno-huésped. Por lo que en esta tesis se describe el proceso de la inserción del gen reportero hrGFP a la clona infecciosa pFL12. Se realizó un PCR de sobrelapación donde se fusionaron dos fragmentos de *nsp2* de PRRSV al gen reportero hrGFP. La clona infecciosa pFL12 se digirió con las enzimas XhoI y SpeI, eliminando una región de *nsp2* que posteriormente fue sustituida con el producto de la PCR de sobrelapación.

Además, se estandarizó la medición cuantitativa de fluorescencia utilizando un fluorímetro creado en las instalaciones de la ENES unidad León. Se midió la fluorescencia de células A549 y A549-GFP y se confirmó que la medición con el fluorímetro es comparable con la de otros sistemas de medición como el microscopio de fluorescencia.

Estos resultados son la base para establecer ensayos de infección viral *in vitro* para estudiar las interacciones moleculares entre el PRRSV y macrófagos porcinos, con lo cual se podrá contribuir al desarrollo de inmunógenos e inmunomoduladores eficientes contra PRRSV.

INTRODUCCIÓN

Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino se reportó por primera vez en los Estados Unidos de América en 1987 como la “enfermedad misteriosa del cerdo” (Keffaber, 1989; Hill, 1990). Posteriormente, alrededor de 1990, se comenzaron a registrar brotes de la enfermedad en Europa (López-Heydeck *et al.*, 2015). En 1991 se aisló el virus de PRRS (PRRSV) en territorio europeo, lo que permitió identificar un nuevo genotipo en 1992 (Wensvoort *et al.*, 1991).

Indudablemente a partir de su aparición, PRRSV se convirtió en una de las principales causas de pérdida económica en la industria porcina mundial. En Estados Unidos de América, se estimó que la pérdida puede fluctuar entre los 664 millones de dólares anuales en un tamaño de población de 5.8 millones de cerdas y 110 millones de cerdos comerciales (Thomann *et al.*, 2020).

PRRSV fue identificado en México por primera vez en el año 1992 (López-Heydeck *et al.*, 2015). Aunque la información sobre el impacto económico de PRRSV en México es escasa, en el congreso “Virus de PRRS; ayer, hoy y mañana” que se llevó a cabo en el 2012, se presentó una estimación de los 80 a 120 millones de dólares de pérdidas en el país (Amador Cruz, 2016). Además, se calculó que un brote agudo de la enfermedad provocada por PRRSV puede costar de \$2,500 a \$3,500 pesos por vientre, anualmente (Amador Cruz, 2016).

Signos clínicos.

PRRSV provoca el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), una enfermedad altamente infecciosa. En cerdas gestantes provoca fallas reproductivas importantes sobre todo en el último tercio de la gestación, además provoca problemas respiratorios severos en cerdos de todas las edades, afectando principalmente a lechones (Neumann Ramirez, A., Schwartz, K. J., 2009).

Los signos clínicos relacionados con la enfermedad son: fiebre alta, disnea, coloración roja en el cuerpo, anorexia, las orejas pueden llegar a tornarse de una coloración azul. Cuando la enfermedad logra avanzar por un tiempo prolongado, también se pueden observar signos como diarrea, neumonía, encefalitis, conjuntivitis, edema periocular, taquipnea y otros signos derivados de infecciones secundarias (Tong *et al.*, 2007).

En cerdas se presenta una disminución de partos, aumento de abortos tardíos, partos prematuros, aumento de las repeticiones del celo, disminución de fertilidad, se presenta el

nacimiento de camadas anormales, con cerdos débiles, cerdos nacidos muertos o momificados (Cura, 2010). En verracos, que son cerdos macho que se seleccionan como sementales, se observa disminución de la libido y existe una disminución de la calidad del semen (Cura, 2010).

Transmisión.

La transmisión de PRRSV puede darse por el contacto directo de cerdos infectados con cerdos sanos, por medio de fluidos como: saliva, orina, semen, secreciones mamarias, excremento. La transmisión del virus también puede ocurrir de la cerda al feto por vía transplacentaria (López-Heydeck *et al.*, 2015). Otra vía de transmisión importante es por medio del material del personal de trabajo, como agujas infectadas, ropa, botas y guantes (Ruiz *et al.*, 2009).

El virus de PRRS ingresa por vía nasal, bucal o genital y se multiplica en macrófagos pulmonares, tonsilares o del cornete nasal. Llega a los nódulos linfáticos regionales por vía linfática, para después distribuirse a nivel sistémico a través del torrente sanguíneo, ya sea circulando libre o asociado a monocitos (López-Heydeck *et al.*, 2015). Finalmente, el virus se distribuye en todo el organismo y se multiplica en los macrófagos de todos los tejidos, principalmente en los macrófagos alveolares (López Heydeck *et al.*, 2013).

PRRSV provoca una infección persistente debido a que los cerdos aparentemente recuperados, pueden aún transmitir el virus varios meses después de la infección (Ruiz *et al.*, 2009). Ya que se ha identificado que los animales eliminan el virus a través de la saliva hasta 42 días post infección (dpi), en la orina hasta 14 dpi, en el semen hasta 43-92 dpi y en el excremento hasta 35 dpi (Ruiz *et al.*, 2009). La permanencia prolongada del virus en el huésped provoca que los contagios se produzcan rápidamente y que la enfermedad sea muy difícil de controlar.

La persistencia del virus puede depender de diferentes factores como la cepa viral, la edad y la condición reproductiva (Dong *et al.*, 2021). Por ejemplo, las cerdas próximas a la primera gestación pueden combatir la infección por PRRSV dentro de los 90 días post infección, mientras que las cerdas que han tenido dos partos o más eliminan la infección hasta 180 dpi (Batista *et al.*, 2002).

Agente etiológico.

PRRSV pertenece a la familia Arteriviridae, género *Porarterivirus*. Es un virus con envoltura y contiene un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva con una longitud aproximada de 15.4 kb (Meulenberg *et al.*, 1993, 1994; Snijder and Meulenberg, 1998).

Hasta ahora PRRSV se ha clasificado en tres genotipos, PRRSV-1 que también es conocido como el genotipo europeo, PRRSV-2 nombrado también como genotipo norteamericano (Nelsen, Murtaugh and Faaberg, 1999) y la cepa altamente patógena identificada en China en 2006 (Lv *et al.*, 2008). Las secuencias de nucleótidos de los tres genotipos llegan a tener una similitud de 55% hasta 70%, mientras que en la secuencia de aminoácidos pueden tener una similitud entre el 50% hasta el 80% (Amarilla *et al.*, 2016).

Se ha reportado que dos de las regiones más variables en el genoma de PRRSV son ORF5 y ORF7 (Amarilla *et al.*, 2016). En un estudio realizado en México, se encontró que existen diversas sustituciones de aminoácidos en la secuencia del ORF5, según la región en la que haya sido recolectada la muestra (Martínez-Bautista *et al.*, 2018). El genoma de PRRSV está conformado por 10 marcos de lectura abiertos: *ORF1a*, *ORF1b*, *ORF2a*, *ORF2b*, *ORF3*, *ORF4*, *ORF5*, *ORF5a*, *ORF6* y *ORF7* (López-Heydeck *et al.*, 2015). En la **figura 1** se representa la estructura general del genoma de los virus pertenecientes a la familia *Arteriviridae*.

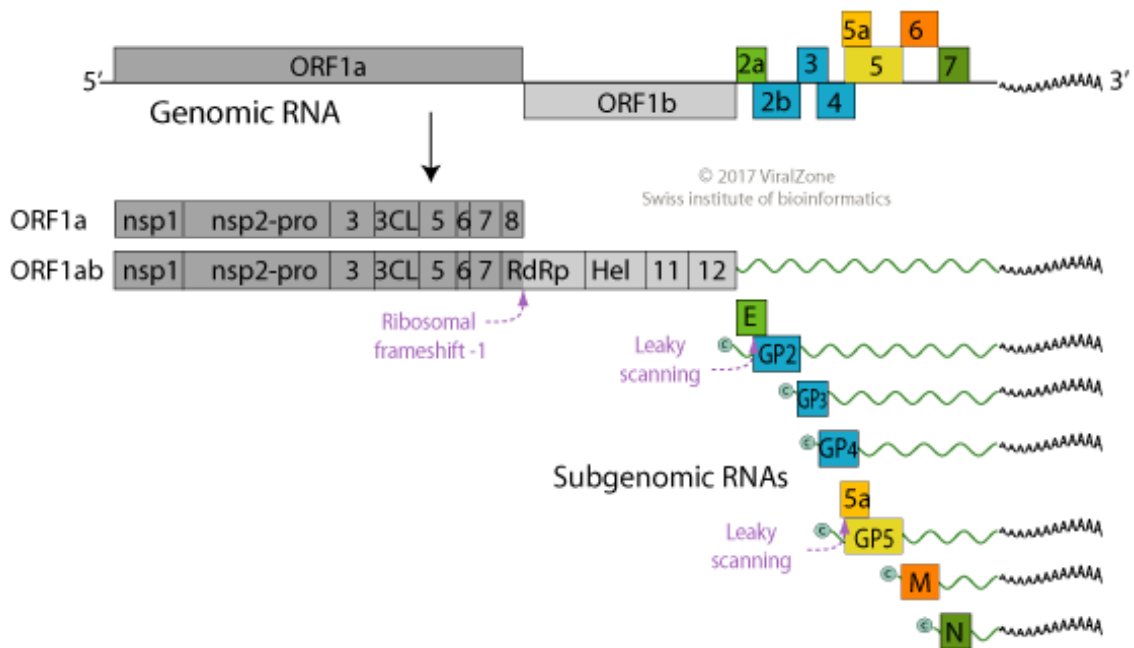


Figura 1. Estructura general del genoma de los virus pertenecientes a la familia *Arteviridae*. Las regiones sombreadas en gris representan los marcos de lectura que codifican para las proteínas no estructurales, en el caso de PRRSV, son hasta 16 proteínas. Las regiones azules representan las proteínas GP2, GP3 y GP4 que se encuentran en la membrana. Las regiones verdes muestran el *ORF2a* y *ORF7* que codifican para las proteínas E y N, respectivamente. La proteína GP5 está involucrada en la entrada de PRRSV a las células y se representa con el área amarilla. El *ORF6* codifica para la proteína no glicosilada M, representada en color naranja.

Recuperado de: (ViralZONE, 2007)

Las regiones del *ORF1a* y *ORF1b* codifican para 16 proteínas no estructurales del virus, las proteínas nsps (nsp1a, nsp1b, nsp2 a nsp12, nsp7a y nsp7b). Las proteínas estructurales, como la proteína de la nucleocápside (N), la proteína M y otras glicoproteínas de membrana (GP2, GP3, GP4 y GP5) son codificadas por los *ORF2* a *ORF7* (Meulenberg *et al.*, 1995; Mardassi, Massie and Dea, 1996; Meng *et al.*, 1996).

La proteína nsp2 es el producto viral más grande de PRRSV con 1195 aminoácidos, se ha encontrado que es una región altamente variable y está involucrada en la replicación viral (Han *et al.*, 2007). Nsp2 es una proteasa que regula la transcripción de los dos primeros marcos de lectura (*orf1a* y *orf1b*) cuando PRRSV entra a la célula (Yun and Lee, 2013). También es una de las proteínas que se asocia con el complejo de replicación y transcripción (RTC) que se acumulará en las vesículas de doble membrana que son inducidas por la entrada de PRRSV a la célula (Yun and Lee, 2013).

Se describió que una delección desde 100 hasta 200 aminoácidos en el dominio central de nsp2, no afecta la viabilidad del virus (Han *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014). Nsp2 se conforma por cuatro dominios, un dominio transmembranal putativo, el dominio CP/OTU (Cisteína proteasa, dominio del tumor de ovario) N-terminal, un dominio C-terminal y un dominio central hipervariable (Fang and Snijder, 2010).

Células blanco.

Los macrófagos son esenciales para el reconocimiento y procesamiento de un microorganismo patógeno, estas células son presentadoras de antígeno capaces de distinguir patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los reconocen a través de receptores de PAMPs como PRRS, por sus siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*, como los receptores tipo Toll los TLRs, por sus siglas en inglés *Toll like receptors*.

Los TLRs activan cascadas de señalización intracelular importantes para la regulación de la respuesta inmune. Las células blanco de PRRSV son los monocitos, células dendríticas, pero principalmente son los macrófagos alveolares (López Heydeck *et al.*, 2013). El virus de PRRS entra a los macrófagos alveolares por medio de la glicoproteína GP5 formando un complejo con la proteína M y a través de los receptores Heparan Sulfato, Vimentina, CD151, CD163, Sialoadhesina (Sn) y DC-SIGN (Dendritic Cell-specific ICAM-3-grabbing non integrin) (Shi *et al.*, 2015). En la **figura 2** se muestran los receptores de los macrófagos involucrados en reconocimiento de PRRSV.

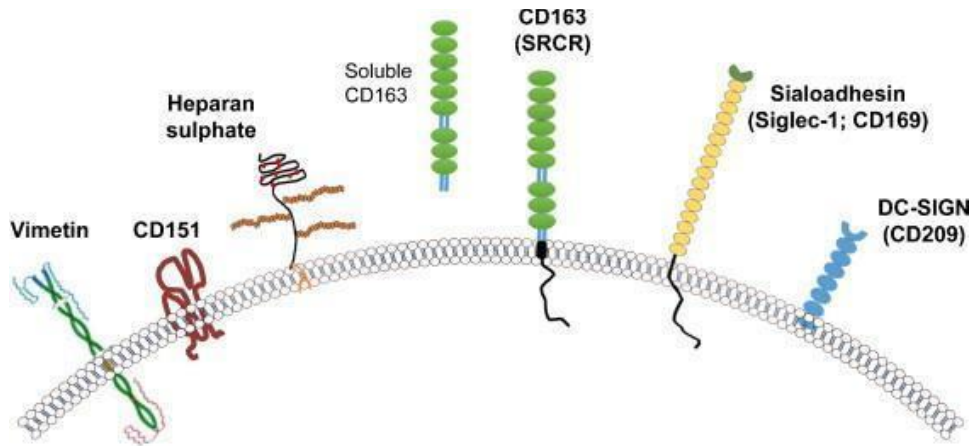


Figura 2. Receptores involucrados en la entrada de PRRSV al macrófago. CD163, receptor de adherencia. Sialoadhesina, modula respuesta inmune. CD151, activa señalización celular. Heparan sulfato, regula coagulación. Vimetina, componente citoesquelético. DC-SIGN, receptor viral y de adhesión. CD: *cluster of differentiation*; DC-SIGN: *Dendritic Cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*. Recuperado de Zhang and Yoo, 2015.

Ciclo de replicación de PRRSV.

Para que PRRSV pueda entrar a sus células blanco, los macrófagos, el primer contacto que se establece es el de la proteína M con receptores de heparán sulfato, después el virus activa la Sialoadhesina (Sn) que provoca la unión del complejo viral M-GP5 a la parte N-terminal de la Sialoadhesina. Posteriormente se internaliza el complejo virus-receptor por medio de endocitosis regulada por clatrina. Para que el genoma del virus pueda ser liberado en el citoplasma de la célula diana, es necesaria la acidificación del endosoma, que va a permitir que las membranas se fusionen. El receptor CD163 requiere de la interacción de las proteínas GP2 y GP4 con el dominio funcional 5 *scavenger receptor cysteine-rich* (SRCR) de CD163 para permitir la internalización del virus (Van Breedam *et al.*, 2010).

Una vez que el genoma entra al citoplasma los primeros marcos de lectura en traducirse son el ORF1a y ORF1b que se hallan en el extremo 5' del genoma de PRRSV, dando como resultado la producción de dos poliproteínas pp1a y pp1ab, que dan lugar al menos a 14 proteínas no estructurales del virus (nsps). Este proceso de traducción es regulado por cuatro proteasas: nsp1 α , nsp1 β , nsp2 y nsp4 (Yun and Lee, 2013). Posteriormente, se construyen complejos de replicación y transcripción (RTC) a los cuales se asocian la mayoría de las proteínas no estructurales, provocando una acumulación de este complejo en vesículas de doble membrana que son inducidas por el mismo virus (Yun and Lee, 2013). El complejo RTC, como lo indica su nombre, será el encargado de dirigir la replicación del genoma y además la

síntesis de ARNm subgenómico. Se sabe, hasta ahora, que se producen seis ARNm subgenómicos que expresan los ocho marcos de lectura restantes en el extremo 3' del genoma de PRRSV, codificando las proteínas estructurales: glicoproteína (GP) 2/2, 3, 4 y 5, proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M) y nucleoproteína (N), que conformarán el virión infeccioso (Yun and Lee, 2013).

Respuesta inmunitaria innata contra PRRSV.

El sistema inmune innato es el que se encarga de dar la primera respuesta ante la presencia de algún microorganismo patógeno, evitando la replicación de este en los tejidos. La respuesta inmune innata no es específica para un patógeno, consiste en el trabajo conjunto de proteínas y células fagocíticas que reconocerán características conservadas en los patógenos (Alberts, Johnson and Lewis, 2002). En la respuesta inmune innata del pulmón porcino participan los macrófagos alveolares y parenquimatosos, los neutrófilos, las células dendríticas (DC), células natural killer (NK) y células T $\gamma\delta$ (Crisci, Fraile and Montoya, 2019).

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno que activan la respuesta inmune adaptativa, en su superficie portan receptores, como los tipo Toll (TLR) que son esenciales para el reconocimiento de antígenos, estas células pueden dividirse en DC derivadas de monocitos (moDC), DC derivadas de médula ósea (BMDC) y DC plasmocitoides (Crisci, Fraile and Montoya, 2019). Las DC han sido utilizadas para estudiar la infección por PRRSV. En un estudio se reportó que las DC plasmocitoides infectadas por PRRSV tipo 2 fueron incapaces de producir IFN α , pero se pudo detectar una baja producción de IL2 (Calzada-Nova *et al.*, 2010).

Los macrófagos también son células presentadoras de antígeno, los precursores de estas células se diferencian en la médula ósea como monocitos y viajan a través del torrente sanguíneo a diferentes tejidos para diferenciarse en macrófagos específicos (Crisci, Fraile and Montoya, 2019). Los macrófagos alveolares porcinos (PAM) han sido estudiados como las células diana de PRRSV y se ha reportado que la replicación de la cepa HuN4 altamente patógena de PRRSV, disminuyó en los macrófagos activados por la vía clásica (M1), cuando son estimulados con LPS/IFN- γ mientras que en los macrófagos activados por la vía alternativa (M2) que fueron estimulados con IL4, no se observó disminución en la replicación (Wang *et al.*, 2017).

Los neutrófilos son esenciales para la respuesta inflamatoria ya que son la primera línea de fagocitos que actúan contra una infección aguda por patógenos extracelulares o daño tisular (Crisci, Fraile and Montoya, 2019). Se ha encontrado que las cepas de PRRSV altamente

patógenas provocan una patología grave que va acompañada con el aumento de neutrófilos, mastocitos y macrófagos, a comparación de las cepas de baja patogenicidad (Crisci, Fraile and Montoya, 2019).

Las células NK lisan las células infectadas por virus y producen citocinas reguladoras como el interferón gamma (IFN γ). Por último, las células T $\gamma\delta$, tienen actividad citotóxica, funciones reguladoras, de producción de citocinas, están involucradas en la inmunidad de las mucosas, incluso pueden actuar como células presentadoras de antígeno reconociendo una gran variedad de antígenos (Crisci, Fraile and Montoya, 2019). Las células NK y T $\gamma\delta$ han sido menos estudiadas en la infección por PRRSV, pero se encontró que, en el transcurso de la infección, la interacción de estos dos tipos de células se ve alterada por la supresión de la actividad de NK y la modulación de T $\gamma\delta$ que son una importantes para la producción de IFN γ (Crisci, Fraile and Montoya, 2019). En la **figura 3** se muestran los tipos de células involucradas en la respuesta inmune innata contra PRRSV, los receptores involucrados en la detección del virus y la principal respuesta de las células ante la presencia del virus, como se describió anteriormente.

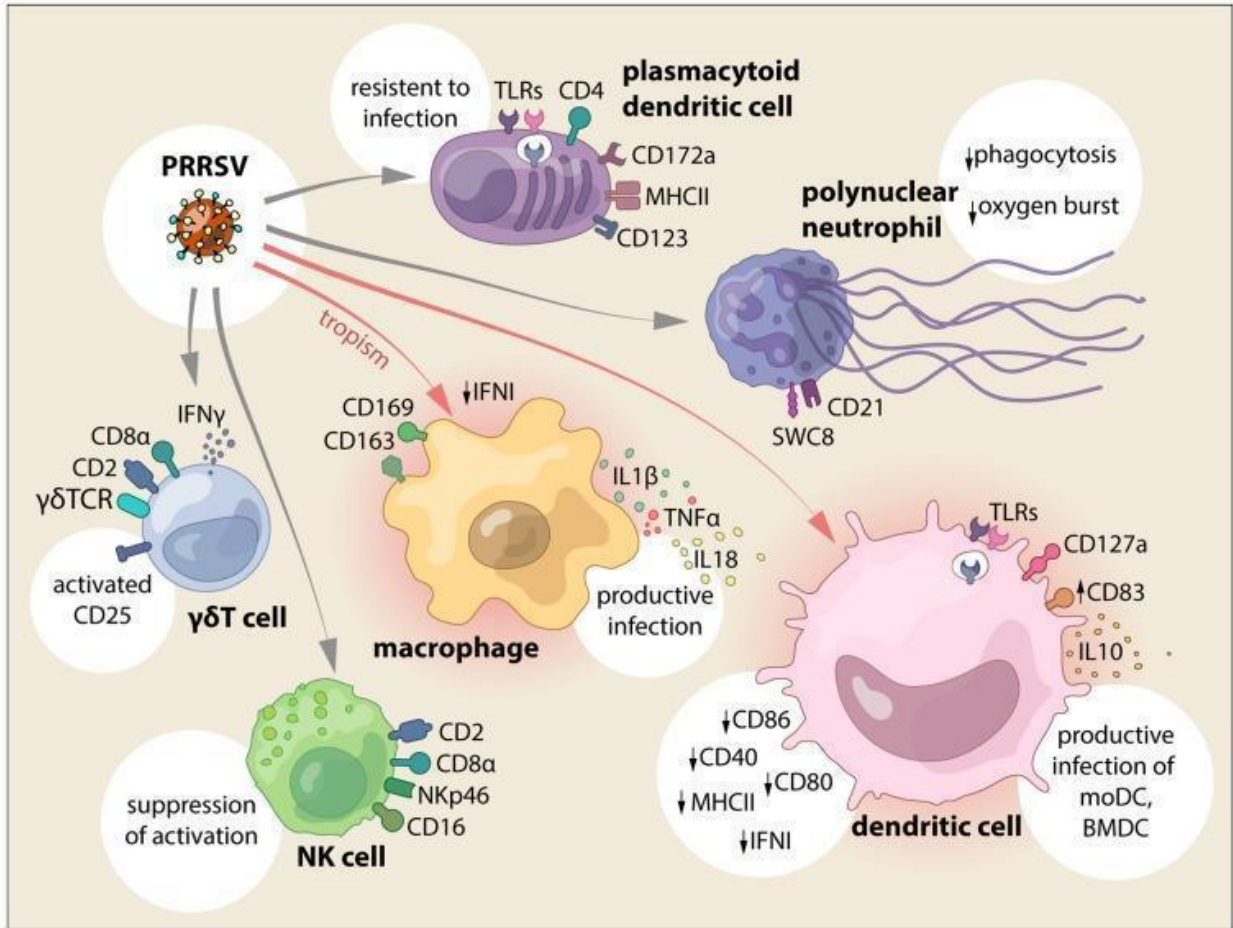


Figura 3. Células involucradas en la respuesta inmune innata celular contra PRRSV. En las células dendríticas existe el reconocimiento de PRRSV por los receptores tipo toll, CD127a, CD83 y hay producción de IL10. Ante una infección por PRRSV la actividad fagocítica de los neutrófilos se suprime. En los macrófagos la producción de IFN tipo I se inhibe, pero existe un nivel detectable de IL-18, IL-1 β y TNF α , y los receptores con mayor actividad son CD169 y CD163. En las células T $\gamma\delta$ se produce IFN γ y CD25 se activa. Las células NK se inactivan y las DC plasmocitoides muestran resistencia a la infección. Recuperado de: (Crisci, Fraile and Montoya, 2019).

Respuesta antiviral mediada por IFN tipo 1.

Uno de los mecanismos más importantes de la respuesta inmune innata es la producción de interferones (IFN). Los interferones se dividen en tres tipos: Tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω), tipo II (IFN- γ) y tipo III (IFN- λ).

Los IFN de tipo I (α / β) inducen la transcripción de un grupo de genes que generan resistencia del huésped contra infecciones virales, activan elementos del sistema inmune innato y adaptativo, para la presentación de antígenos y la inducción de citocinas implicadas en activar linfocitos T, linfocitos B y NK. Los IFN de tipo I se inducen cuando elementos de los patógenos son reconocidos por distintos receptores del huésped (InvivoGen, 2005).

Existen tres vías principales para la producción de IFN tipo I: La vía RIG-I, vía TRIF y vía IRF7. La vía RIG-I ocurre en el citoplasma y es activada principalmente por distintos virus de ARN monocatenarios y bicatenarios en DC convencionales, fibroblastos y hepatocitos. En la segunda vía, la proteína TRIF es reclutada por los receptores TLR3 en vesículas internas inducida por ARN de doble cadena no metilado y TLR4 en la membrana plasmática inducida por glicolípidos virales, en macrófagos y hepatocitos. Y la última vía se lleva a cabo en los endosomas, en donde se encuentran los receptores TLR9 y TLR7/8 que estimulan la activación MYD88 y los factores de transcripción IRF5 y IRF7 en DC plasmocitoides inducidas por ARN no metilado, células huésped dañadas e inmunocomplejos de cromatina (InvivoGen, 2005). Una vez producidos, los IFN tipo I provocan una respuesta antiviral a través de cascadas de señalización que se muestran en la **figura 4**.

NF- κ B o factor nuclear κ B, regula una gran cantidad de genes responsables de la respuesta inmune innata y respuestas inflamatorias (Liu *et al.*, 2017). La activación de este factor de transcripción puede llevarse a cabo por dos vías: la vía canónica o la vía no canónica. La vía canónica se presenta cuando existe la unión de ligandos a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), esta vía en resumen consiste en la degradación de I κ B α debido a su fosforilación por el complejo I κ B quinasa de múltiples subunidades (IKK) (Liu *et al.*, 2017). La vía no canónica comienza con estímulos específicos como los pertenecientes a la superfamilia TNRF, esta vía se basa en el procesamiento de la proteína precursora p100, la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) junto con IKK α regulan la fosforilación de p100 (Liu *et al.*, 2017).

Como se muestra en la **figura 4**, la activación de NF- κ B se encuentra principalmente en la vía TLR dependiente de MyD88 y TRIF, en la vía MyD88 tras la activación de la quinasa dependiente de ubiquitina TAK1 se activa la quinasa IKK que fosforila al inhibidor de NF- κ B, I κ B α , que resulta en la degradación de I κ B α dependiente de ubiquitina y se activa NF- κ B (Liu *et*

al., 2017). En la vía dependiente a TRIF se estimula la proteína 1 que interactúa con el receptor de quinada adaptadora (RIP1) que va a estimular la activación de IKK (InvivoGen, 2005).

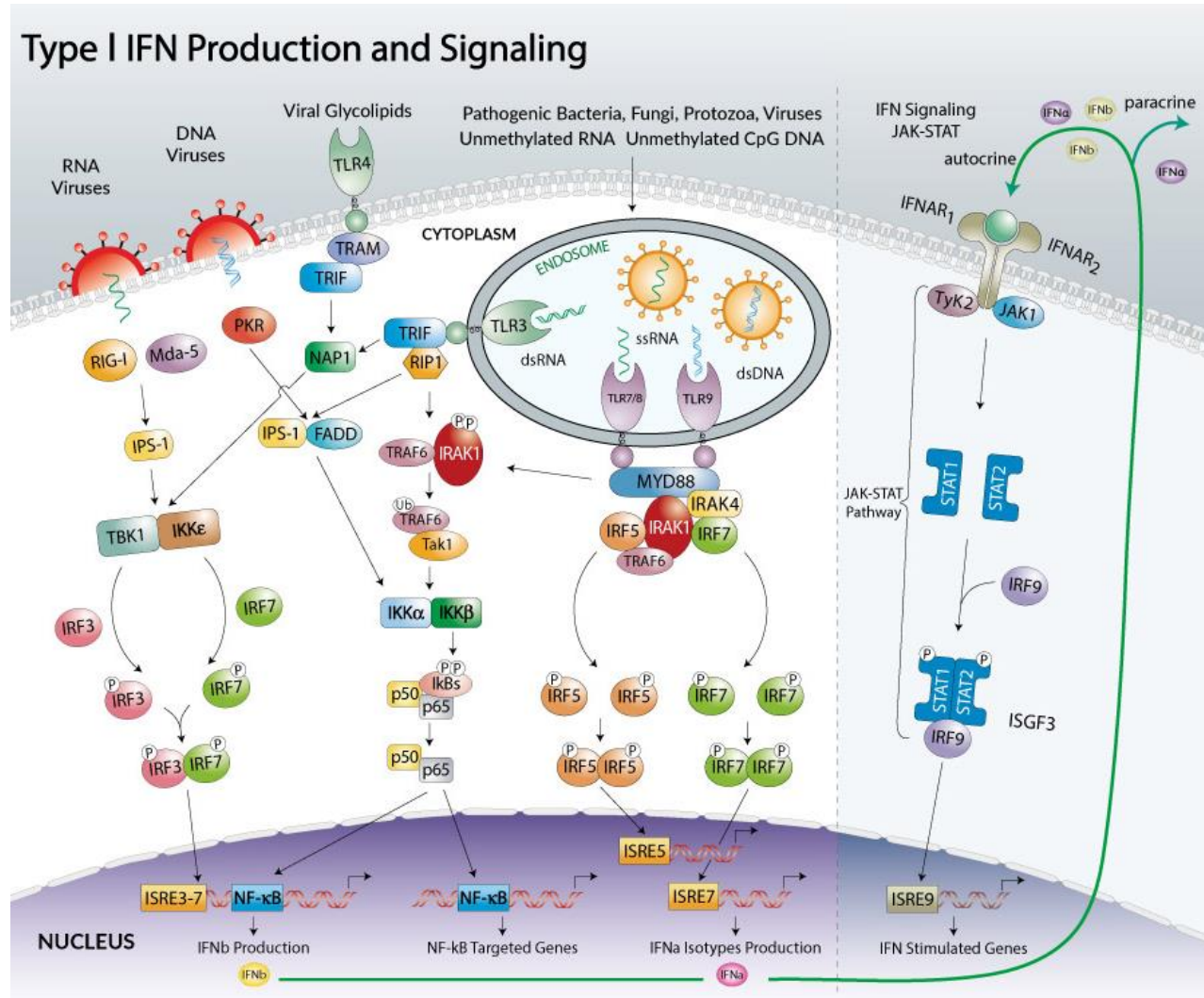


Figura 4. Vías de activación para la producción de IFN tipo I. Se muestran las 3 principales vías de activación de IFN tipo I, vía RIG-I, vía TRIF y vía MYD88/IRF5/IRF7. La vía 1 se activa por virus de ARN, en la segunda vía los TLR3 y TLR4 reclutan a la proteína TRIF y en la tercera vía se activa el factor de transcripción IRF7 reclutado por TLR7/8 y TLR9. Después de la producción de los IFN tipo I se unen a un receptor en común IFNAR, que inducen la vía JAK-STAT, conduciendo al ensamble del complejo ISGF3, formado por los dímeros IRF9, STAT1-STAT2. Este complejo se une a los promotores de los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE). En los que se encuentra IRF7 que activa nuevamente la transcripción de IFN tipo I, creando un estado antiviral en las células cercanas. Recuperado de: (InvivoGen, 2005).

Clona infecciosa pFL12.

Una clona infecciosa es una copia de ADN de longitud completa de la cual se obtienen clones infecciosos virales *in vitro* o *in vivo*. Las clonas infecciosas sirven para estudiar y comprender los mecanismos de replicación de los virus, la expresión de proteínas virales y la interacción patógeno-huésped (Alangar and Govind, 2019). Para la creación de una clona infecciosa existen dos principales estrategias; la primera es la construcción de una clona de cADN (ADN complementario) de longitud completa (*Full Length-cDNA*) de un genoma viral, en el que se pueden obtener copias infecciosas por medio de un promotor de ARN polimerasa del bacteriófago (T3, T7 o SP6). La segunda estrategia consiste en la transcripción *in vivo* de cADN a través de vectores que contienen un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Alangar and Govind, 2019).

El plásmido FL12 (pFL12) fue descrito como una clona infecciosa del virus PRRSV (Ha M Truong *et al.*, 2004). Al conservar el virus de PRRS en una clona como lo es pFL12 es posible trabajar con mayor facilidad con el virus, además es una forma de tenerlo disponible rápidamente y en concentraciones óptimas.

La clona pFL12 está compuesta por el genoma de PRRSV genotipo norteamericano cepa NVSL 97-7895 insertado en el plásmido pBR322. En **figura 5** se muestra como fue construido el plásmido pFL12. La construcción del cADN de PRRSV se realizó amplificando y sobrelapando cinco regiones del genoma viral, los fragmentos A, B, 5C, 3C, y D. El fragmento D introduce 41 adenosinas en el extremo 3', el promotor de la polimerasa T7 se insertó en el fragmento A en el extremo 5'. Debajo de cada fragmento del genoma de PRRSV se observan los sitios de restricción que se utilizaron para la clonación. En la sección B de la **figura 5**, se muestra que se ensambló la secuencia consenso de PRRSV al plásmido pBR322 y además se incorporaron los sitios de restricción *AcI* aguas debajo de la cola poli A y el sitio *BsrGI*. La flecha que se encuentra antes del sitio *BsrGI* indica la dirección de la transcripción de la ARN polimerasa T7.

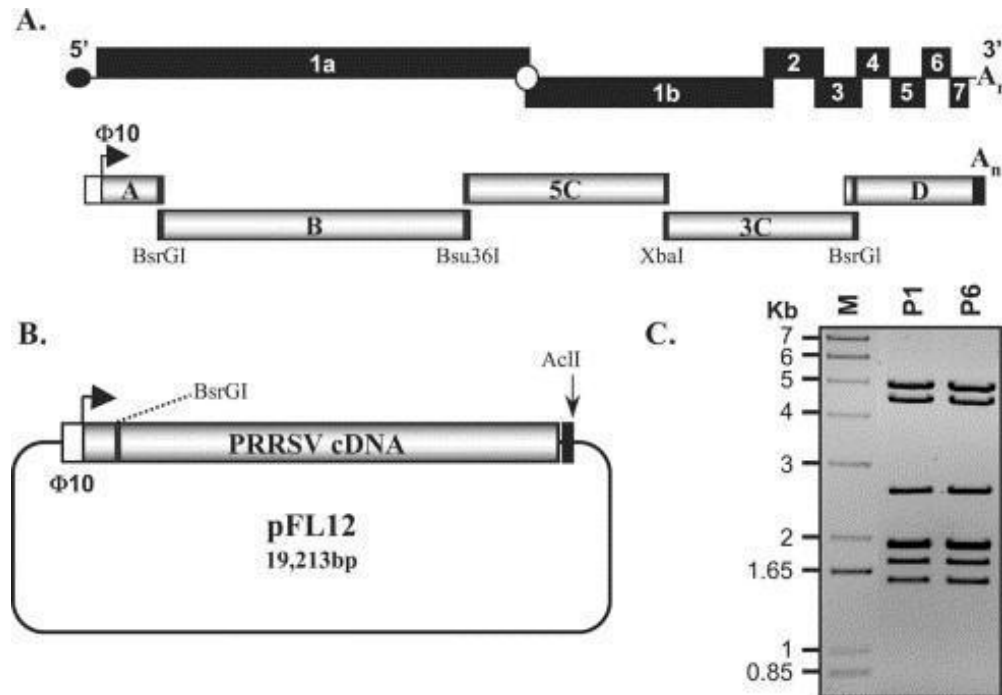


Figura 5. Construcción de la clona infecciosa pFL12. En la sección A se muestran los segmentos amplificados y sobrelapados del genoma de PRRSV. En la sección B se muestra la longitud completa de la inserción del genoma de PRRSV en el plásmido pBR322. Por último, en la sección C, se muestra el patrón de restricción de la clona pFL12 con la enzima *MfeI*. Recuperado de: (Ha M Truong *et al.*, 2004)

Reporteros fluorescentes.

A lo largo de la historia han existido descubrimientos científicos que revolucionaron la biología molecular, uno de ellos fue el descubrimiento de una proteína verde fluorescente proveniente de la medusa *Aequorea victoria*. Fue descrita en 1962 por Shimomura, Saiga y Johnson, que la descubrieron accidentalmente al tratar de obtener la proteína aequorina, que es una proteína dependiente del calcio (Shimomura, Johnson and Saiga, 1962; Shimomura, 2005). En 1969, se le llamó por primera vez *Green fluorescent protein* por sus siglas en inglés (GFP), en 1974 la proteína fue purificada, en 1992 fue secuenciada y fue hasta 1994 cuando Inoyue y Tsuji obtuvieron la conservación de la fluorescencia (Franco and Longart, 2009).

A partir del descubrimiento de GFP, la proteína se ha modificado para crear diferentes versiones de ella. Se creó una variante de tipo silvestre (wtGFP) para mejorar el brillo, la estabilidad y su expresión en células de mamíferos (Wallace *et al.*, 2013). Posteriormente se creó una variante mejorada enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) (Wallace *et al.*, 2013). El concepto de la versión mejorada (eGFP) sirvió para estimular el desarrollo de proteínas fluorescentes como hrGFP que es una versión humanizada de GFP, proveniente de *Renilla*

reniformis, esta versión se creó ya que se había observado que eGFP podría tener un comportamiento tóxico en el músculo estriado (Wallace *et al.*, 2013).

En el presente estudio se utilizó hrGFP como gen reportero para la creación de una clona infecciosa fluorescente del PRRSV. La proteína hrGFP tiene un pico de señal de excitación a 500 nm y un pico de emisión a 506 nm como se muestra en la **figura 6** (Welgene Biotech, 2017).

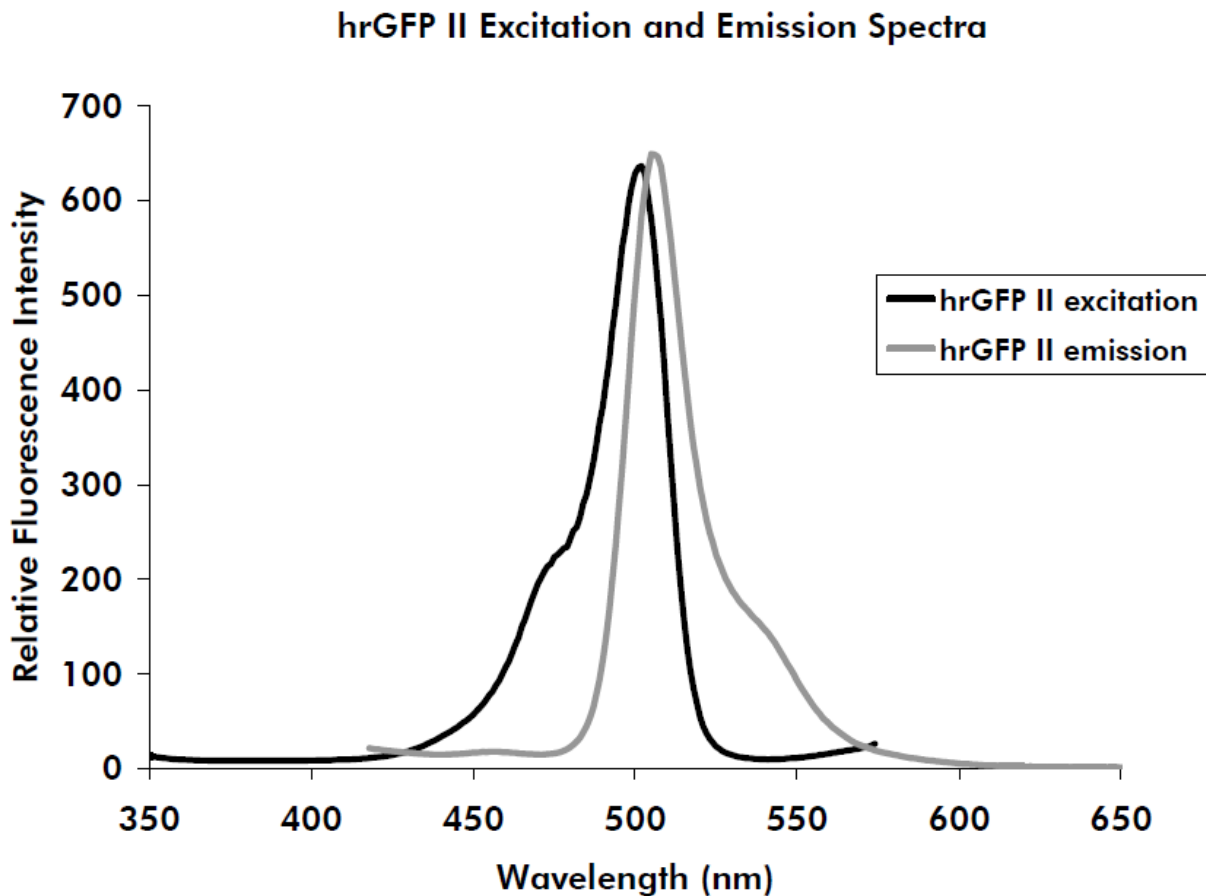


Figura 6. Espectro de excitación y emisión de la proteína verde fluorescente humanizada de *Renilla reniformis*. Su pico de excitación se encuentra a 500 nm y el pico de emisión de fluorescencia se encuentra en los 506 nm (Welgene Biotech, 2017).

Fluorímetro.

Un fluorímetro es un equipo que, como su nombre lo indica, tiene la capacidad de medir fluorescencia. La fluorescencia se produce cuando una sustancia fluorescente, conocida como fluoróforo, absorbe un fotón de luz; causando que sus electrones se exciten dejando atrás su estado basal. Una vez que la energía es absorbida por el fluoróforo, un poco de esta se disipa en forma de calor, el resto se disipa mediante la emisión de un fotón de luz con menor contenido energético en comparación al fotón que originalmente excitó el electrón. (Jameson, 2014). Así que, el principio de los fluorímetros es utilizar un haz de luz para excitar los electrones de los fluoróforos y como respuesta hay una emisión de luz, generalmente de menor energía a la que se aplicó.

JUSTIFICACIÓN

PRRSV es el virus que causa mayores pérdidas económicas en la industria porcina en todo el mundo. Por lo tanto, es de especial interés el encontrar vacunas o medicamentos antivirales que sean efectivos contra el virus. Actualmente ya existen vacunas para prevenir la infección con PRRSV, pero no siempre inducen la formación de anticuerpos que limiten la infección en los cerdos. Una solución para acercarnos a la producción de vacunas eficientes contra PRRSV es conocer más a detalle la forma en la que el sistema inmune responde ante la infección con este virus.

Una forma de conocer estos mecanismos es a través del diseño y desarrollo de modelos *in vitro*, que nos proporcionen información sobre las interacciones del virus con las células huésped. Por lo que, este proyecto se enfoca en producir un modelo *in vitro* que permita estudiar la interacción PRRSV-macrófagos, a través de la construcción de una clona infecciosa fluorescente. Para ello, se clonó un reportero fluorescente (hrGFP) en una región del genoma viral (nsp2) en la clona infecciosa contenida dentro del pFL12. Con ello, se podrá evaluar la replicación viral de manera cuantitativa, por medio de tecnología avanzada de fluorescencia.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar una clona infecciosa fluorescente del virus del PRRS por medio de un PCR de sobrelapación y establecer parámetros de medición de fluorescencia en cultivos celulares, utilizando el fluorímetro creado y adaptado en las instalaciones de la ENES León para que sirva en un futuro como herramienta para diseñar ensayos de replicación viral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificación del gen hrGFP
- Amplificación de dos segmentos de nsp2 de PRRSV
- Fusión de los dos segmentos de nsp2 con hrGFP mediante un PCR de superposición
- Digestión de la clona infecciosa pFL12 con las enzimas *XhoI* y *SpeI*
- Ligación del fragmento fusionado (nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´) a la clona infecciosa digerida (pFL12)
- Transformación de *E.coli* SURE2 con la clona infecciosa fluorescente (pFL12-hrGFP)
- Medición de fluorescencia de células A549 y A549-GFP en fluorímetro y en microscopio, para la comprobación de confiabilidad del fluorímetro.

HIPÓTESIS

Se podrá insertar el gen hrGFP en la clona infecciosa pFL12 para obtener una clona infecciosa fluorescente de PRRSV y se podrán establecer condiciones de medición de fluorescencia en las líneas celulares A549 y A549-GFP para ensayos de replicación futuros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anotación del plásmido NF-kB-hrGFP.

Se utilizó el plásmido NF-kB-hrGFP para obtener un amplicón del gen reportero hrGFP. Es importante mencionar que la elección de este plásmido fue debido a la disponibilidad de este en el laboratorio, pero bien se habría podido utilizar otro plásmido que en su secuencia se encontrara un gen reportero. NF-kB-hrGFP pertenece al sistema de vectores reporteros *Cis* PathDetected. El vector NF-kB-hrGFP contiene una variante del gen reportero GFP, hrGFP (proteína fluorescente verde humanizada) que permite detectar la señal sin intervenir a las células, favoreciendo la obtención de un cultivo de alto rendimiento. En la **figura 8** se muestra la anotación del plásmido realizada en el programa Snapgene.

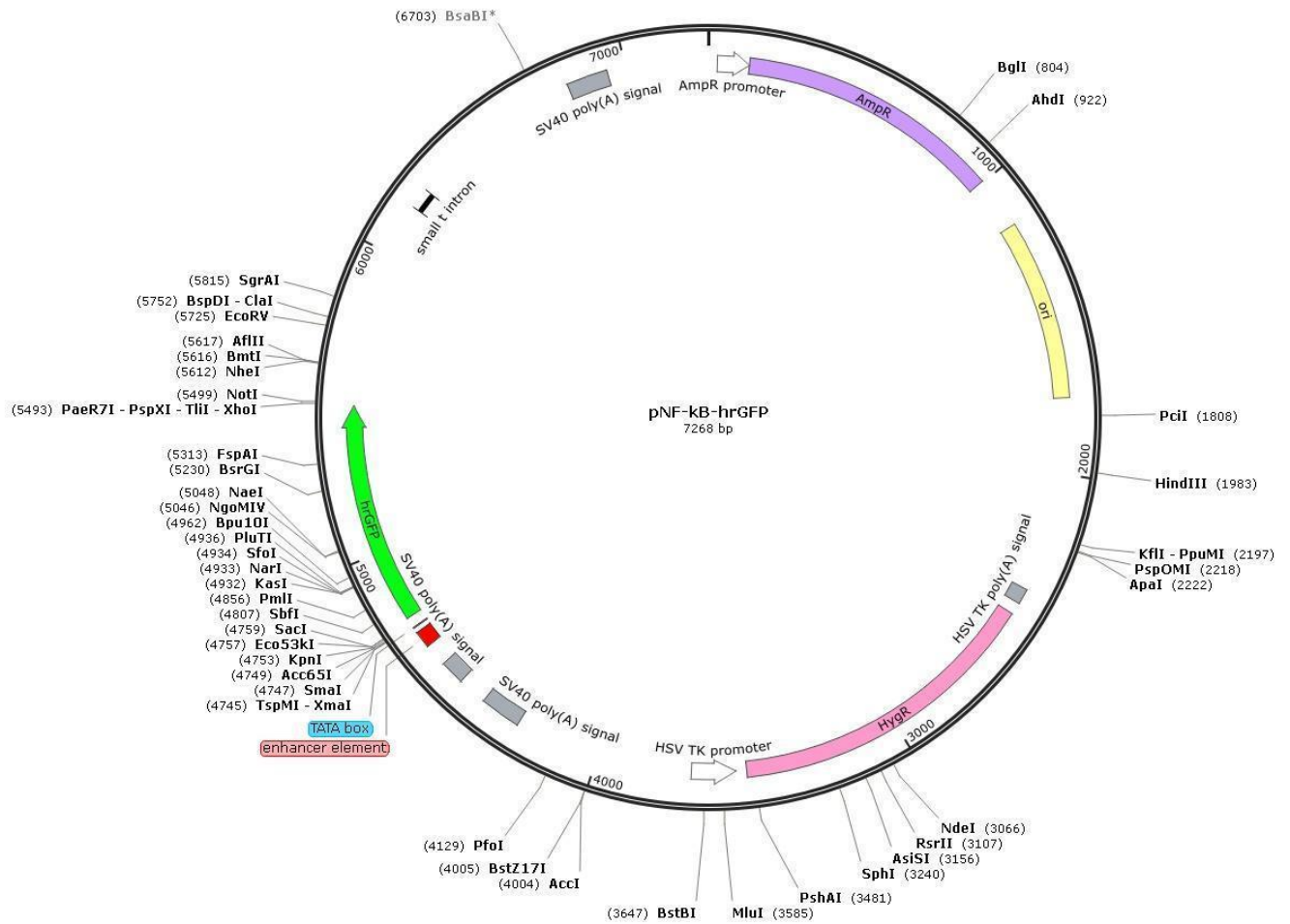


Figura 8. Anotación del plásmido NF-kB-hrGFP en el programa Snapgene. El plásmido porta los genes de resistencia a la ampicilina e higromicina. La sección verde representa al gen hrGFP, la pequeña región azul muestra la ubicación de la caja TATA y la región representada con el color rojo pertenece a la secuencia del *enhancer* específico para el plásmido.

Anotación de la clona infecciosa de PRRSV (pFL12).

Se utilizó la clona infecciosa pFL12, que fue donada por el Dr. Asit K. Pattnaik de la Universidad de Nebraska, EE. UU. Se utilizó la clona 19 que es una *E. coli* cepa SURE2, transformada con pFL12, dicha clona fue obtenida por Gabriela Zamora Avilés en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. En la **figura 9** se muestra una simulación en el programa Snappgene de la construcción de pFL12 según lo descrito por Troung *et al.*, 2004. Donde el segmento rojo representa el genoma de PRRSV (número de acceso U87392) y la fracción negra representa el plásmido pBR322.

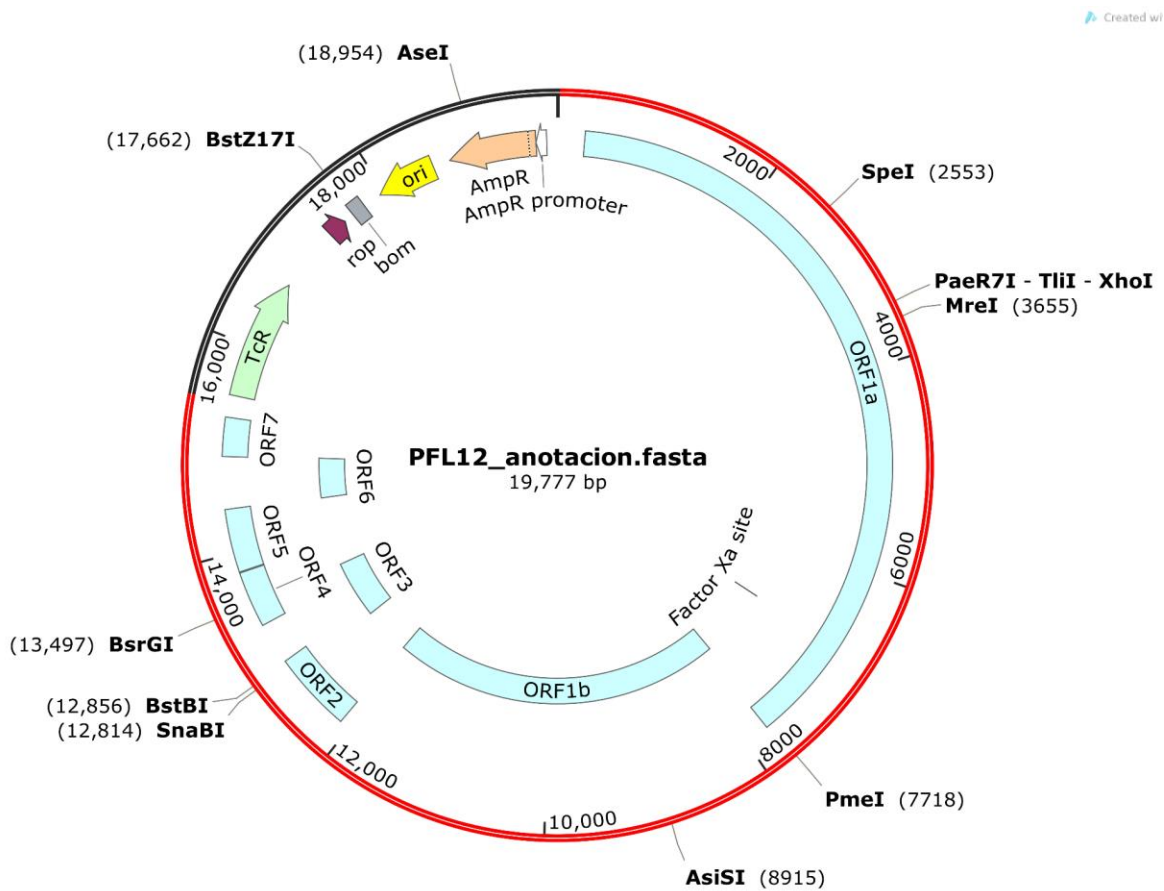


Figura 9. Simulación de la estructura de pFL12 en el programa Snappgene. La sección roja representa el genoma de PRRSV (U87392) genotipo norteamericano cepa NVSL 97-7895, dónde las franjas azules dividen los ORFs del genoma viral. La sección de color negro representa la secuencia del plásmido PBR322 que porta el gen de resistencia a ampicilina.

Para comprobar la construcción del plásmido pFL12 se realizó una simulación de gel de agarosa en Snapgene, se simuló el corte de la enzima MfeI debido a lo descrito por Troung *et al.*, 2004. Y se obtuvo la **figura 10** que muestra siete bandas con los tamaños de 5107 pb, 5037 pb, 2617 pb, 1905 pb, 1883 pb, 1704 pb, 1524 pb.

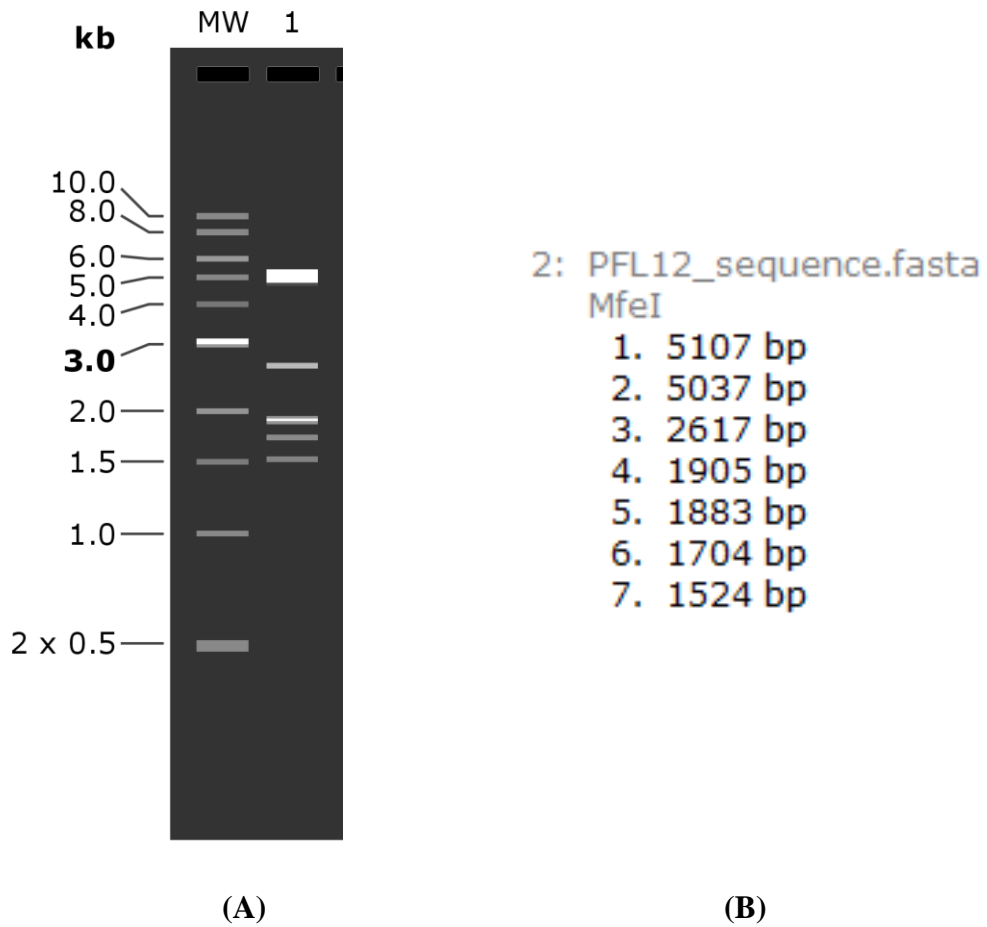


Figura 10. Simulación de gel de agarosa de la restricción de pFL12 con MfeI en *Snapgene*. (A) En el carril uno se encuentra el marcador de peso molecular 1 kb de New England Biolabs, en el carril dos se encuentra la restricción de pFL12 con la enzima MfeI, gel de agarosa al 1%. (B) Se muestra también el tamaño de las bandas de la restricción (carril 2) según lo indicado en el programa *Snapgene*.

Diseño de oligos.

Los oligos utilizados para la amplificación de dos fragmentos de la proteína nsp2 de PRRSV y el gen hrGFP del plásmido NF-kB-hrGFP fueron diseñados en el programa *Genome Compiler*, tomando como referencia la secuencia de PRRSV genotipo norteamericano cepa NVSL 97-7895 con el número de acceso AY545985 y la secuencia del plásmido NF-kB-hrGFP. En la **tabla 1** se muestra la secuencia diseñada, el tamaño del fragmento y su posición en el genoma.

Tabla 1. Oligos diseñados en Genome compiler para la amplificación de dos segmentos de nsp2 de PRRSV y el gen hrGFP perteneciente al plásmido NF-kB-hrGFP. Secciones resaltadas en verde representan que pertenecen al gen hrGFP

Oligo	Región	Secuencia 5' → 3'	Tamaño amplicón	Posición en la secuencia.
F1	Nsp2	CTACTATCCTGCACAAGGTG	355	2351~2370 (PRRS NVSL 97-7895)
R1	hrGFP-Nsp2	CTGCTTGCTCACCATGGT GCTCTCTGGCAAGCTCTTGACAG ACTTTG		2662~2705 (PRRS NVSL 97-7895)
F2	Nsp2-hrGFP	CAAAGTCTGTCAAGAGCTTGCCAGAGAGC ACCATGGTGAGC AAGCAG	800	4737~4784 (pNF-kB)
R2	Nsp2-hrGFP	GCGGGGACAGGTTTGTCCCTTACACCCACTCGTGACG		5473~5510 (pNF-kB)
F3	hrGFP-Nsp2	CTGCACGAGTGGGTGTAAGGGAACAAACCTGTCCCCGC	840	2667~2704 (PRRS NVSL 97-7895)
R3	Nsp2	GGTGTCTCGAGTATCATCTTTG		3481~3502 (PRRS NVSL 97-7895)

Después se realizó una modificación al oligo F1 para poder llevar a cabo la amplificación del segmento 1 de nsp2, se agregaron 9 nucleótidos en el extremo 3' para aumentar la Tm a 66.35 °C y se le asignó el nombre de F1.1-nsp2. En la **tabla 2** se muestra la secuencia completa de los oligos y sus temperaturas de fusión (Tm).

Tabla 2. Secuencia de oligos para amplificar dos segmentos de nsp2 y el gen hrGFP del plásmido NF-kB-hrGFP y sus temperaturas de fusión (Tm) correspondientes. La asignación de la letra F en el nombre de los oligos hace referencia a "Forward" y la letra R a "Reverse". Secciones resaltadas en verde representan que pertenecen al gen hrGFP

Oligo	Secuencia 5' □ 3'	Tm	Pb
F1-nsp2	CTACTATCCTGCACAAGGTG	53.9	20
F1.1-nsp2	CTACTATCCTGCACAAGGTGACGAGGTTG	66.35	29
R1-nsp2-hrgfp	CTGCTTGCTCACCATGGT GCTCTCTGGCAAGCTCTTGACAGACTT TG	66.7	47
F2-hrgfp	CAAAGTCTGTCAAGAGCTTGCCAGAGAGC ACCATGGTGAGCAAGC AG	56.8	47
R2-hrgfp	GCGGGGACAGGTTTGTTCCTTACACCCACTCGTGCAG	56.7	38
F3-nsp2-hrgfp	CTGCACGAGTGGGTGTAA GGGGAACAAACCTGTCCCCGC	64.4	38
R3-nsp2	GGTGTCTCGAGTATCATCTTTG	54.6	22

Amplificación de hrGFP.

Para la amplificación del gen hrGFP se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, cat.No PCR-204L). Se llevó a cabo una PCR con un volumen de reacción de 50 µl, utilizando 5 µl de Buffer Alta Fidelidad 10x, 0.5 µl (2.5 unidades/µl) de polimerasa de alta fidelidad, 1 µl de dNTPs (10mM) (cat.No R0192, Thermo Scientific), 1 µl de cada oligo (F2-hrgfp, R2-hrgfp a 10µM), 1 µl de ADN plasmídico de NF-kB (17 ng/µl), y 40.5 µl de agua grado PCR (Jena Bioscience cat.No PCR-258-100). Las condiciones en el termociclador fueron las

siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min y 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineación de 60 °C por 50 segundos, extensión a 72 °C durante 50 segundos y extensión final de 72 °C por 5 min.

Se realizó un gel de agarosa al 1 % en un volumen de 40 ml, se cargaron 10 µl de la muestra con 2 µl de SYBR green DNA stain (Jena Bioscience cat.No PCR-275) y 5 µl de agua. Se cargaron 2 µl de marcador molecular 1 kb Plus ADN (Invitrogen, cat. No 00784519 a 0.5 µg/µL) con 1 µl de SYBR Green DNA stain 6x (Jena Bioscience, cat.No PCR-275) y 7 µl de agua. La electroforesis se corrió durante 35 minutos a 100v. Posteriormente se realizó la purificación del producto de PCR de hrGFP con el kit "PCR purification" de Jena Bioscience (cat.No #PP-201S).

Amplificación de dos segmentos de nsp2.

La amplificación de los segmentos de nsp2 se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se utilizó el ADN del plásmido pFL12 original (donado por el doctor Asit K. Pattnaik). Se realizaron dos reacciones de 12.5 µl: 7 µl de Universal SYBR Green Supermix de BIORAD (cat.No 1/252/1), 1 µl de los oligos F1.1-nsp2 y R1-nsp2-hrgfp (10µM) para el segmento 5' (355 pb), F3-nsp2-hrgfp y R3-nsp2 para el segmento 3' (840 pb), 1 µl de ADN pFL12 (10 ng/µl) y 3.5 µl de agua MilliQ.

Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación de 60 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C durante 30 segundos y extensión final de 72 °C por 4 min.

Se realizó un gel de agarosa al 1%, se cargaron 8 µl de marcador molecular de 100 pb 205 ng/µl (Jena Bioscience cat.No M-205S) se cargó toda la reacción con 1 µl de Buffer de carga. Se corrió durante 35 minutos a 100 v. Posteriormente se realizó la purificación de los fragmentos del gel de los dos segmentos de nsp2. Se utilizó el kit "Agarose gel extraction" de Jena Bioscience cat No. PP-202S.

PCR de sobrelapación.

Se realizó una primera reacción de 50 µl para unir el fragmento de nsp2 (355 pb) al extremo 5' del gen hrGFP. Se agregó 5 µl de Buffer Alta Fidelidad 10x, 1 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de cada oligo (F1-nsp2, R2-hrgfp a 10 µM), 2 µl de una dilución 1:10 de la purificación de hrGFP (18.17 ng/µl), 1 µl del fragmento 3' (355 pb) de nsp2 (34.4 ng/µl), 0.5 µl de polimerasa de alta fidelidad (2.5 U/µl) y 38.5 µl de agua grado PCR (Jena Bioscience cat.No PCR-258-100).

Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineación a 58 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C durante 90 segundos y extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Se realizó un gel de agarosa al 1% de 40 ml, se cargó 15 µl de la reacción (139.5 ng/µl con 3 µl de SYBR Green DNA stain 6x (Jena Bioscience cat.No PCR-275), se cargaron 2 µl de marcador 1kb plus 0.5 µg/µL (Invitrogen, cat. No 00784519) con 1 µl de SYBR Green DNA stain 6x y 7 µl de agua. Se purificó la reacción de PCR con el kit "PCR purification kit" de Jena Bioscience (cat.No #PP-201S).

Se realizó una segunda reacción para fusionar el fragmento restante de nsp2 (840 pb) al extremo 3' del gen hrGFP. Se agregó 5 µl de buffer de alta fidelidad 10x, 1 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de cada oligo (F1-nsp2, R3-nsp2 a 10 µM), 2 µl de la purificación de la fusión nsp2-5'-hrGFP (13.95 ng/µl) y 2 µl del fragmento 3' (840 pb) de nsp2 (18.9 ng/µl), 0.5 µl de polimerasa de alta fidelidad (2.5 U/µl) y 37.5 µl de agua de grado PCR (Jena Bioscience cat.No PCR-258-100). Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineación a 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C durante 120 segundos y extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Se realizó un gel de 40 ml de agarosa al 1%, se cargaron 15 µl (6 ng/µl) de la muestra con 3 µl de SYBR Green DNA stain 6x y se cargaron 2 µl de marcador 1kb plus ADN (Invitrogen, cat. No 00784519 a 0.5 µg/µL) con 1 µl de SYBR y 7 µl de agua. Se realizó la purificación de la reacción de PCR y del gel de la fusión completa nsp2-hrGFP con los kits "PCR purification kit" y "Agarose gel extraction" de Jena Bioscience (cat.No #PP-201S y cat.No PP-202S).

Digestión de pFL12.

El pFL12 fue digerido con las enzimas *XhoI* y *SpeI* (Jena Bioscience, cat.No EN-134S y EN-E2398-02, respectivamente). En un tubo eppendorf de 0.5 ml se agregaron 5 µl de Buffer Universal 10x, 3 µl de ADN plasmídico de la clona 19 (401 ng/ µl), 0.5 µl de *XhoI* (10 U/µl) y 11.5 µl de agua MilliQ. La reacción se incubó en baño maría a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente se agregó 1 µl de la enzima *SpeI* (10 U/µl) y se incubó nuevamente durante 15 minutos. Se realizó un gel de agarosa al 1% de 50 ml y se cargaron 20 µl de la reacción de restricción con 5 µl de SYBR Green DNA stain 6x (Jena Bioscience cat.No PCR-275). Se cortó la banda y se purificó con el kit "Agarose gel extraction" (Jena Bioscience cat.No PP-202S).

Ligación del fragmento nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´ a pFL12.

Para la ligación se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Jena Bioscience cat No. EN149S). Se agregaron 2 µl de Buffer T4 ligasa, 0.4 µl de T4 ADN ligasa (80000 CE units), 15 µl del fragmento nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´ (6 ng/µl) y 2.6 µl de pFL12 digerido (7.3 ng/µl), para lograr una proporción aproximada de 10:1. La reacción se incubó en el termociclador a 25°C durante 15 minutos.

Transformación bacteriana.

La transformación se llevó a cabo por el método de choque térmico y se utilizó la cepa de *E. coli* SURE2. Las bacterias se descongelaron en hielo y se tomaron 100 µl para colocarlos en un tubo de polipropileno previamente enfriado, se agregó 1 µl del producto de ligación (pFL12-hrGFP), 280 ng/µl y se incubó 30 minutos en hielo. Se precalentó medio NZY a 42°C en baño maría. Transcurrido el tiempo de incubación en hielo se realizó el shock térmico a 42°C por 30 segundos. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio NZY precalentado y el tubo se incubó a 37°C a 250 rpm durante una hora.

Para la siembra de la transformación se realizaron 3 diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron en cajas Petri con agar LB adicionadas con ampicilina (100 µg/µl).

Comprobación de transformación.

Para verificar que la transformación fue exitosa se crecieron colonias transformadas en tubos con 5 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/µl). Se dejaron incubar toda la noche a 37°C a 250 rpm. Posteriormente se realizó extracción de plásmido por lisis alcalina de cada colonia.

PCR del fragmento nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´ de colonias transformadas.

Se realizó una PCR del ADN plasmídico extraído de las primeras 12 colonias transformadas para amplificar el fragmento fusionado nsp2-5´-hrGFP-nsp2-3´, se agregaron 5 µl de Buffer 10x, 1 µl de cada oligo (F1-nsp2, R3-nsp2-hrgfp 10µM), 1 µl de ADN, 0.5 µl de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, cat.No PCR-204L) (2.5 unidades/µl), 1 µl de dNTPs 10mM (cat.No R0192, Thermo Scientific) y 40.5 µl de agua grado PCR (Jena Bioscience cat.No PCR-258-100).

Las condiciones en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineación a 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C durante 120 segundos y extensión final de 72 °C por 10 minutos. Se elaboró

un gel de 40 ml de agarosa al 1%, se cargaron 15 μ l de muestra con 3 μ l de SYBR ADN stain 6x (Jena Bioscience cat.No PCR-275) y se corrió durante 40 min a 100v.

Digestión de colonias transformadas.

Para corroborar la correcta inserción del fragmento nsp2-5'-hrGFP-nsp2-3' se realizó la digestión de las colonias transformadas. Se agregaron 5 μ l de Buffer Universal, 3 μ l de ADN plasmídico de la clona 19 (401 ng/ μ l), 0.5 μ l de *Xho*I (10 u/ μ l) y 11.5 μ l de agua MilliQ. Se dejó incubar 45 minutos a 37°C, posteriormente se adicionó 1 μ l de *Spe*I (10 U/ μ l) y se dejó incubar 15 minutos más. Se realizó un gel de 30 ml al 1% de agarosa, se cargó toda la muestra con 4 μ l de SYBR ADN stain 6x (Jena Bioscience cat.No PCR-275) y se corrió el gel durante 30 minutos a 90 v.

PCR de hrGFP de colonias transformadas.

Se realizó un PCR para la región del gen reportero (hrGFP) de la colonia 3 de la transformación. Se utilizó la enzima Taq polimerasa 5 U/ μ l de Thermo Scientific (cat.No 00185162). Se agregaron 5 μ l de Buffer 10x, 1 μ l de cada oligo (F2-hrgfp, R2-hrgfp 10 μ M) 1 μ l de dNTPs 10mM (cat.No R0192, Thermo Scientific), 2 μ l de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen cat.No 2097564), 1 μ l de ADN (967.8 ng/ μ l), 0.5 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l (Thermo Scientific cat.No EP0402) y 38.5 μ l de agua. Se incluyó, también, un control positivo del gen hrGFP, que corresponde a la amplificación de la región hrGFP del plásmido NF-KB-hrGFP, para comprobar si la colonia 3 transformada tenía insertada esta región. Las condiciones en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineación a 60 °C por 50 segundos, extensión a 72 °C durante 50 segundos y extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Células A549 y A549-GFP.

Las líneas celulares utilizadas para la estandarización del fluorímetro fueron A549 y A549-GFP. Las células A549 son células humanas de epitelio alveolar basal. Esta línea celular fue desarrollada en 1972 y se obtuvo de un tumor canceroso pulmonar extirpado de un hombre caucásico de 58 años (Cell Biolabs and Inc, 2010). Son de naturaleza escamosa, pero *in vitro* puede llegar a crecer como una monocapa. Las células A549-GFP expresan establemente el gen reportero verde fluorescente del organismo *Aequorea victoria*.

Medio de cultivo para células.

El medio de cultivo utilizado fue DMEM 1x (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Gibco (cat.No 11965092). DMEM es un medio basal específico para células de mamíferos (Cell Biolabs and Inc, 2010). Normalmente en este medio se cultivan células como: neuronas, células gliales, células de músculo liso, células endoteliales de la vena umbilical humana, etc (ATCC, 2002).

Método de cultivo celular.

El cultivo celular consiste en el conjunto de técnicas que permiten la obtención de poblaciones celulares *In vitro* conservando sus propiedades (Segretín, 2003). Las células A549 y A549-GFP fueron donadas por la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita de la facultad de Veterinaria de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las células fueron recibidas en un tubo Falcon de 50 ml con medio DMEM, el tubo se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se descartó el medio y el pellet de células se resuspendió en 6 ml de DMEM. El medio DMEM con rojo de fenol se preparó de la siguiente manera: 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, cat. No 16000-044), 2% de L-glutamina 200 mM (100x) (Gibco, cat.No 25030-081), 1% de gentamicina (10 mg/ml)(Gibco cat.No 15710-064). En cajas de cultivo celular de 100 mm x 20 mm (NEST, cat. No 704001) se agregaron 4 ml de medio DMEM y 1 ml de la suspensión de células A549 y A549-GFP respectivamente. Se dejaron incubando a 37°C con una concentración de 3% de CO₂.

A las células cultivadas se les realizó un pase cada 2 días, para el pase: se agregaron 2 ml de PBS a cada caja de células para lavarlas, se retiró el PBS y se agregó 1 ml de tripsina. Para dejar actuar la tripsina, las células se conservaron en la incubadora (37°C, 3% CO₂) durante 7 minutos, aproximadamente. Se observaron las células en el microscopio para verificar que se hubiesen despegado de la superficie de la placa y se adicionó 1 ml de DMEM para inactivar la tripsina. Después se realizó el conteo de células, se tomaron 10µl de las células y se colocaron en una placa de 96 pozos para realizar una dilución 1:1 con azul de tripano. Se resuspendieron muy bien y se colocaron 10 µl en la cámara Neubauer. Del total de células en la caja, se tomaba el volumen correspondiente para tener aproximadamente 300,000 células en una nueva placa de cultivo celular.

Para las células A549 se realizaron seis pases antes de almacenarlas y para las células A549-GFP se realizaron nueve pases. En el último pase de cada línea celular, se llegó hasta la etapa de inactivar la tripsina, el contenido de todas las cajas se colocó en un tubo falcon de 50 ml y se siguió el procedimiento del conteo de células, pero tomando la muestra del tubo falcon.

Se centrifugaron las células durante 15 minutos a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de SFB, se agregaron 2 ml de DMSO y 12 ml más de suero bovino fetal, se mezcló bien, se realizaron alícuotas de 1 ml y se guardaron a -80°C.

Preparación de las células A549.

Para la medición de fluorescencia se colocaron aproximadamente 4,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos. La medición se dividió en tres grupos:

1. Pozos con células A549 y medio DMEM sin rojo de fenol. (6 pozos)
2. Pozos con células A549-GFP y medio DMEM sin rojo de fenol. (9 pozos)
3. Medio DMEM sin rojo de fenol. (3 pozos)

Se dejaron incubando durante toda la noche (37°C, 3% CO₂) para realizar la medición de fluorescencia a la mañana siguiente.

Medición de fluorescencia de células A549 y A549-GFP.

En este proyecto se utilizó un fluorímetro diseñado y adaptado a las instalaciones de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) unidad León. El equipo fue construido por el profesor e investigador Aarón Vélez Ramírez. El fluorímetro consta de tres subsistemas: de excitación, de medición de fluorescencia, y de control e interfaz gráfica. El subsistema de excitación emite luz de excitación a la longitud de onda e intensidades necesarias y específicas para excitar la emisión de la GFP. El subsistema de medición de fluorescencia conduce, filtra y cuantifica la fluorescencia emitida. Finalmente, el sistema de control e interfaz gráfica controla a los otros dos subsistemas en respuesta a órdenes del usuario. En la **figura 7** se muestra la estructura del fluorímetro que se encuentra en la ENES León.

La fuente de excitación del fluorímetro está compuesta por una lámpara LED blanca de alto poder y un circuito electrónico que alimenta de corriente eléctrica al LED que permite que pueda recibir órdenes de la computadora como apagar, encender y regular la intensidad del LED, también cuenta con un filtro de excitación tipo “bandpass” de 472x30 nm. La intensidad de la luz de la placa fue medida por un medidor de luz (modelo LI-250Q) y un sensor cuántico (Modelo LI-190R) ambos del fabricante Li-Cor (Lincoln, Nebraska, USA). Se utilizó un fotodiodo modelo PDA100A2 de ganancia variable del fabricante ThorLabs (Newton, New Jersey, USA). Se utilizó un DAQ multifuncional modelo NI-6361 con interfaz PCIe del fabricante NI (Austin, Texas, USA)

El fluorímetro se estableció con una luz de excitación a 472 nm, que es percibida como luz azul para el ojo humano, y se midió la fluorescencia de cada pozo con células, las muestras

medidas fueron las mencionadas en la sección anterior: células A549, A549-GFP y medio DMEM sin rojo de fenol como blanco.

Para validar las mediciones realizadas por el fluorímetro, se midieron las mismas muestras con un equipo de referencia, en nuestro caso se utilizó el microscopio de fluorescencia modelo MD5000 B de la marca Leica, que cuenta con una cámara modelo MC170 HD con una resolución de 24 bits y que se maneja con el software LAS v4.13 y un filtro de excitación (modelo Leica 11504164 BZ:00). Se tomaron fotografías de todas las muestras con 200 ms de exposición, ganancia 6x y magnificación 50x. De cada una de las fotografías se cuantificó el nivel promedio de canal verde usando el software **ImageJ**. Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar que el fluorímetro podía detectar la fluorescencia de una manera comparable con un equipo de referencia como lo es el microscopio de fluorescencia. Se utilizó Rstudio para realizar una prueba ANOVA, una prueba posthoc Tukey.

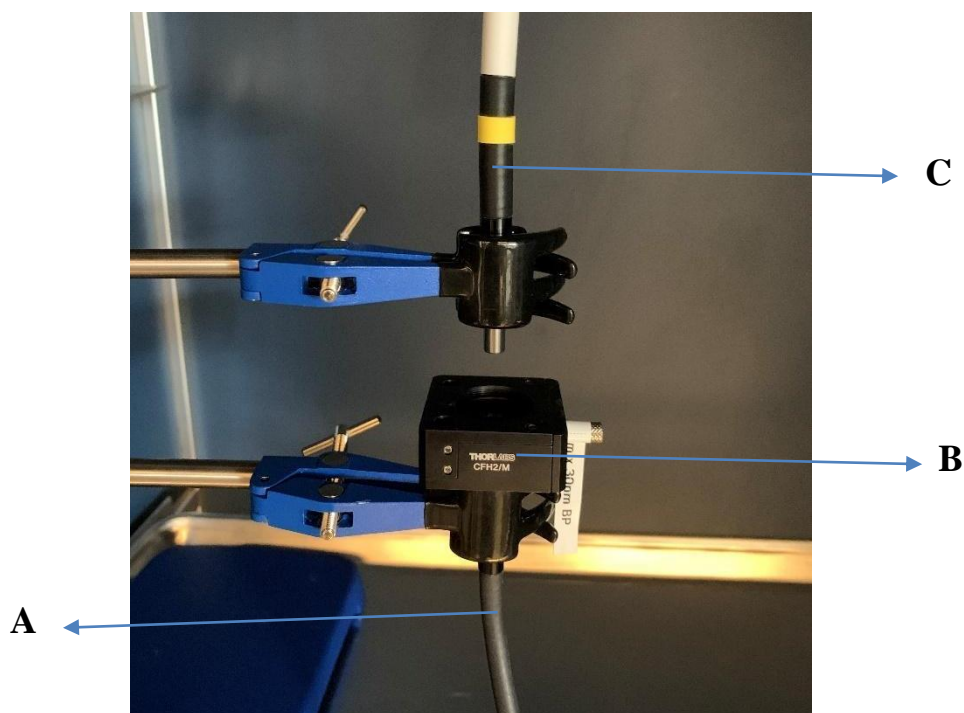


Figura 7. Subsistema de excitación del fluorímetro diseñado y adaptado en las instalaciones de la ENES Unidad León para la medición de hrGFP y GFP. La sección A señala la guía líquida de excitación, la sección B muestra el bloque que contiene el filtro de excitación y la sección C muestra la guía líquida de emisión.

Secuenciación de fragmentos fusionados.

Los fragmentos generados mediante PCR y utilizados para la PCR de superposición se secuenciaron mediante el método de Sanger. Se secuenciaron los dos fragmentos de nsp2 (355 pb y 840 pb) con los oligos F1-nsp2 y F3-nsp2 (Tabla 2), se secuenció el producto de la primera parte de la PCR de superposición (nsp2-5'-hrGFP) en dos fragmentos, utilizando los oligos F1-nsp2 y F2-hrgfp respectivamente, por último, se secuenció el producto final de la PCR de superposición (nsp2-5'-hrGFP-nsp2-3') dividiéndolo en tres fragmentos con los oligos F1-nsp2, F2-hrgfp y F3-nsp2 respectivamente.

Se decidió secuenciar el genoma completo de la clona infecciosa en el plásmido pFL12-GFP mediante secuenciación de Illumina. Se preparó la muestra de ADN total de la clona 3 con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (cat.No D6005) siguiendo las recomendaciones del fabricante Zymo Research. La muestra se secuenció en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) de la SENASICA, que es parte de la SADER. Mediante el uso de un secuenciador de segunda generación MiSeq de Illumina, se realizó una secuenciación pareada de 150 pb mediante el uso del kit Nextera DNA Flex Library (Illumina) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

RESULTADOS

Los segmentos de hrGFP y nsp2 se amplificaron de los plásmidos NF-kB-hrGFP y pFL12.

Se amplificaron tres segmentos, el gen hrGFP extraído de la secuencia del plásmido NF-KB-hrGFP y dos segmentos del gen nsp2 de PRRSV, obtenidos de la clona infecciosa pFL12 (Ha M. Truong *et al.*, 2004). Se obtuvo el fragmento hrGFP con una longitud de 800 pb de bases como se muestra en la **figura 11** sección A. Las amplificaciones de los segmentos de nsp2 corresponden a las longitudes de 355pb y 840pb, respectivamente, como se muestra en la **figura 11** sección B.

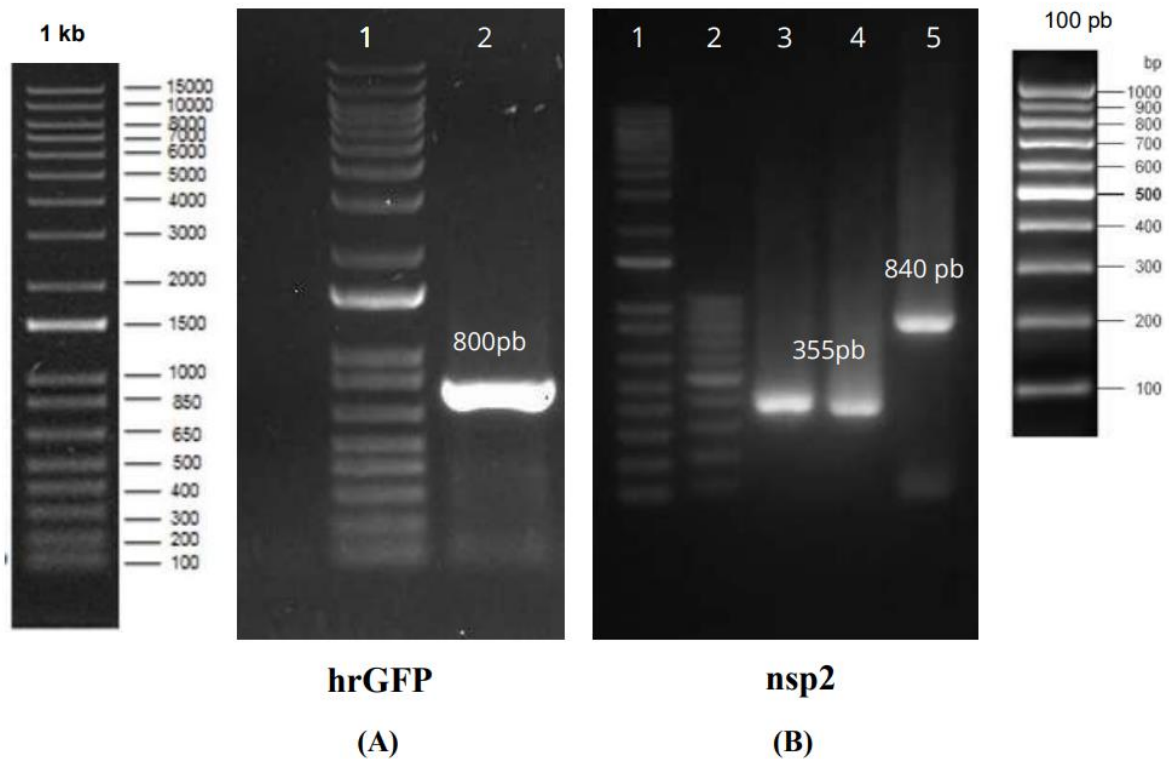


Figura 11. Amplificación del gen hrGFP (A) con una longitud aproximada de 800 pb (carril 2) y marcador molecular de 1kb (carril 1) en un gel de agarosa al 1%. Amplificación de dos fragmentos de nsp2 de PRRSV con una longitud de 355pb (carril 3 y 4) y 840pb (carril 5) respectivamente, marcador molecular de 1kb (carril 1) y marcador molecular de 100 pb (carril 2).

La fusión hrGFP con dos fragmentos de nsp2 se obtuvo mediante una PCR de sobrelapación.

El gen hrGFP fue insertado en la posición 449 del gen nsp2 de PRRSV y esto se llevó a cabo a través de la técnica de PCR de sobrelapación o también conocido como PCR de fusión. En la **figura 12** se ilustra el procedimiento del PCR de sobrelapación (A). Donde se amplificaron tres fragmentos: La región 5' del gen nsp2 de PRRSV con los oligos F1.1-nsp2, R1-nsp2-hrgfp (**tabla 2**), el gen reportero hrGFP con los oligos F2-hrgfp, R2-hrgfp y la región 3' de nsp2 con los oligos F3-nsp2-hrgfp, R3-nsp2 (**figura 12-A (1)**). Se realizó una primera reacción de PCR de fusión donde se unieron los fragmentos nsp2-5' y el gen reportero hrGFP (**figura 12-A (2)**) por medio de los oligos F1-nsp2 y R2-hrgfp (**tabla 2**). En una segunda reacción de PCR de fusión se unió el fragmento nsp2-5'-hrGFP con el fragmento nsp2-3' con los oligos F1-nsp2 y R3-nsp2 (**Tabla 2**), obteniendo así el fragmento fusionado nsp2-5'-hrGFP-nsp2-3' (**figura 12-A (3)**). Se realizó la digestión del plásmido FL12 con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, para retirar un fragmento de la secuencia de nsp2 y sustituirla por el fragmento fusionado con el gen reportero (**figura 12(B)**) por medio de la ligación con la enzima T4 ligasa. Obteniendo así una clona infecciosa fluorescente del PRRSV (**figura 12 (C)**).

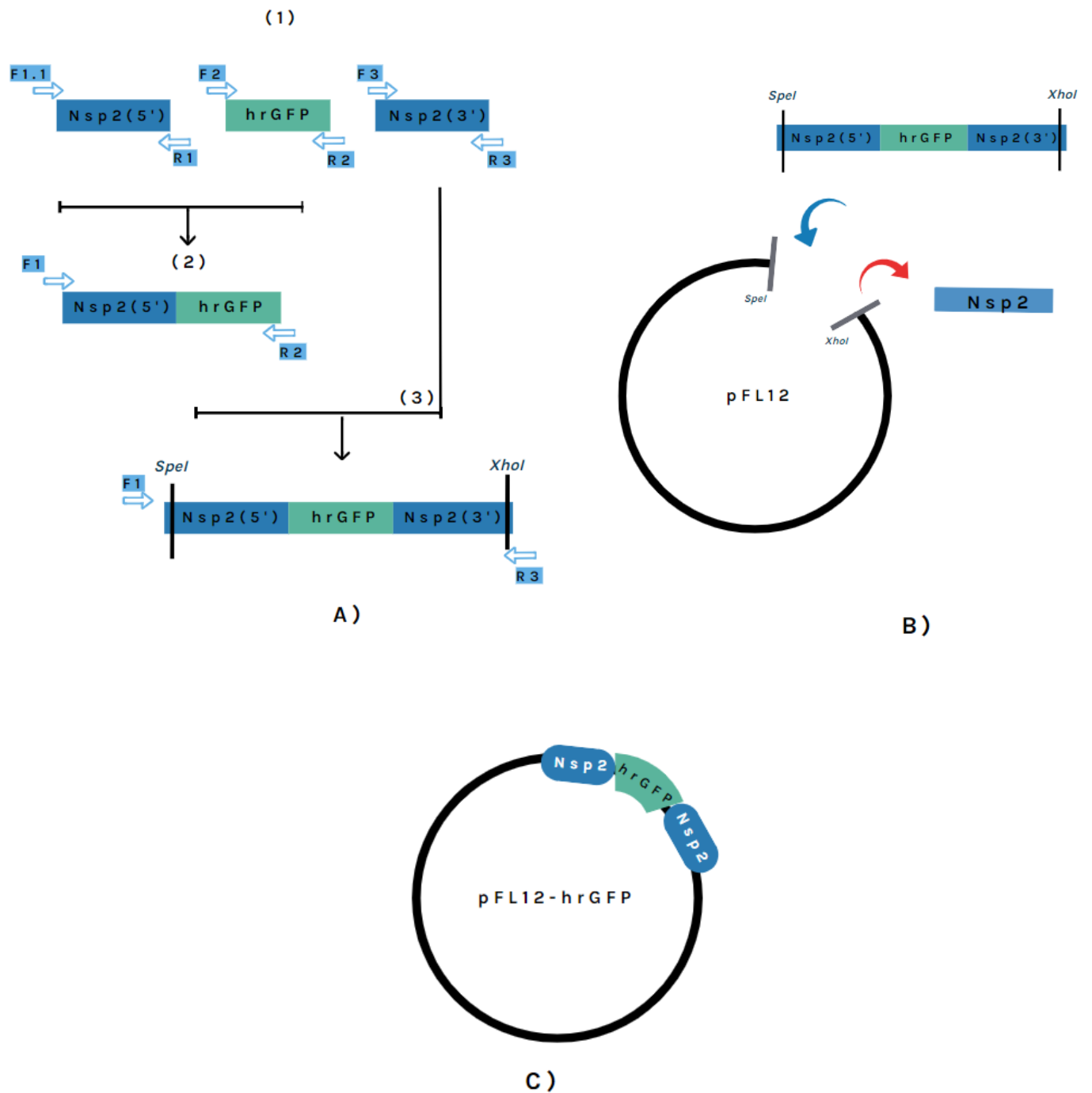


Figura 12. (A) PCR de sobrelapación, se realizaron tres amplificaciones, el extremo 5' de nsp2 del virus del PRRS, el gen reportero hrGFP y el extremo 3' de nsp2 (1-A). Se realizó una PCR con los oligos F1 y R2 (tabla 2) para fusionar el extremo 5' de nsp2 con hrGFP (2-A). A través de una segunda reacción de PCR con los oligos F1 y R3 se fusionó el fragmento Nsp2 5'-hrGFP con el fragmento 3' de nsp2 (3-A). Digestión del plásmido pFL12 con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, para la sustitución del fragmento nsp2 por el fragmento fusionado (B). Se obtuvo una clona infecciosa fluorescente del virus del PRRS (C).

En la **figura 13** se muestra el resultado de la primera unión del fragmento nsp2-5' (355 pb) con hrGFP (800 pb), que resulta en un fragmento de aproximadamente 1,155pb **(A)**. Se muestra también el tamaño total de la fusión nsp2-5'-hrGFP (1195 pb) con el fragmento nsp2-3' con una longitud de 840 pb, dando como resultado un fragmento de 1995 pb **(Figura 12 (B))**.

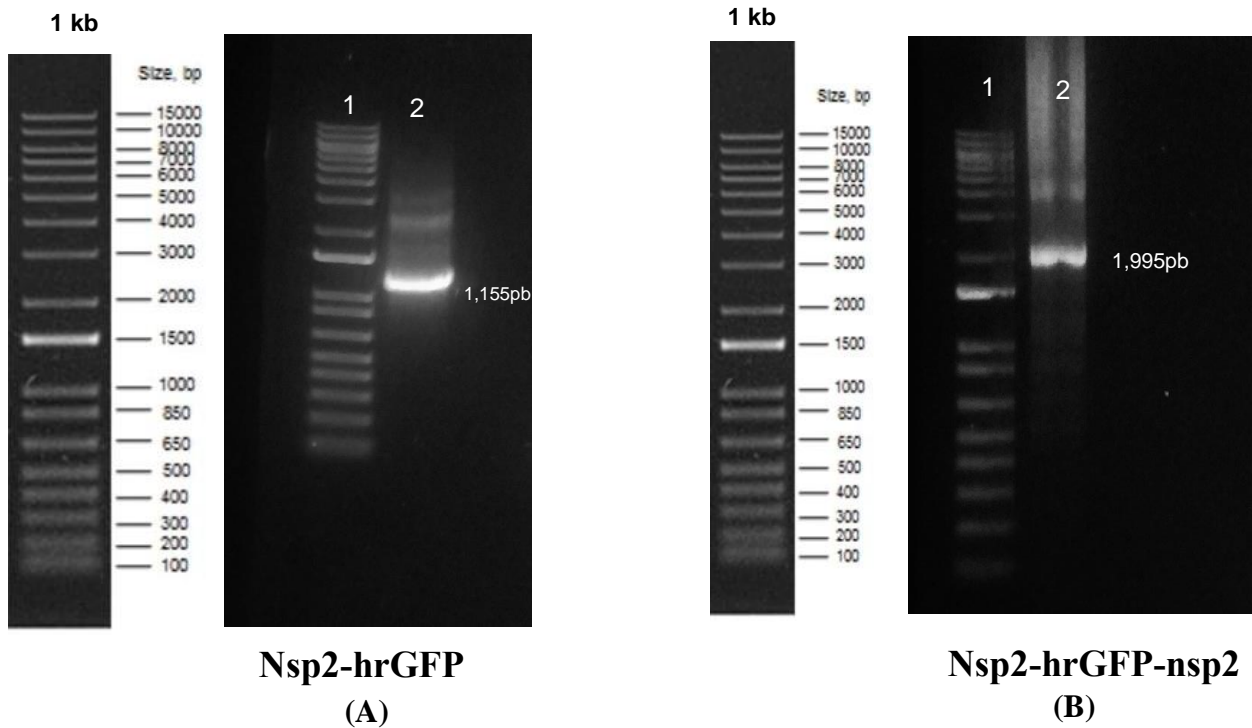


Figura 13. PCR de fusión de dos fragmentos de nsp2 de PRRSV con el gen hrGFP. Sección **(a)**, unión del fragmento nsp2 (355pb) al extremo 5' de hrGFP (carril 2) y marcador molecular de 1kb (carril 1). Sección **(b)** unión de el fragmento nsp2 (840pb) al extremo 3' del fragmento hrGFP obteniendo un fragmento de 1,995 pb (nsp2-hrGFP-nsp2).

La digestión de pFL12 se obtuvo con las enzimas *XhoI* y *SpeI*.

Se digirió el plásmido pFL12 con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, y se corrió la reacción en un gel de agarosa al 1%. Se obtuvo que la banda del plásmido digerido mostrada en el carril 4 de la **figura 14**, tuvo un mayor tamaño que el plásmido no digerido (**figura 14**, carril 2).

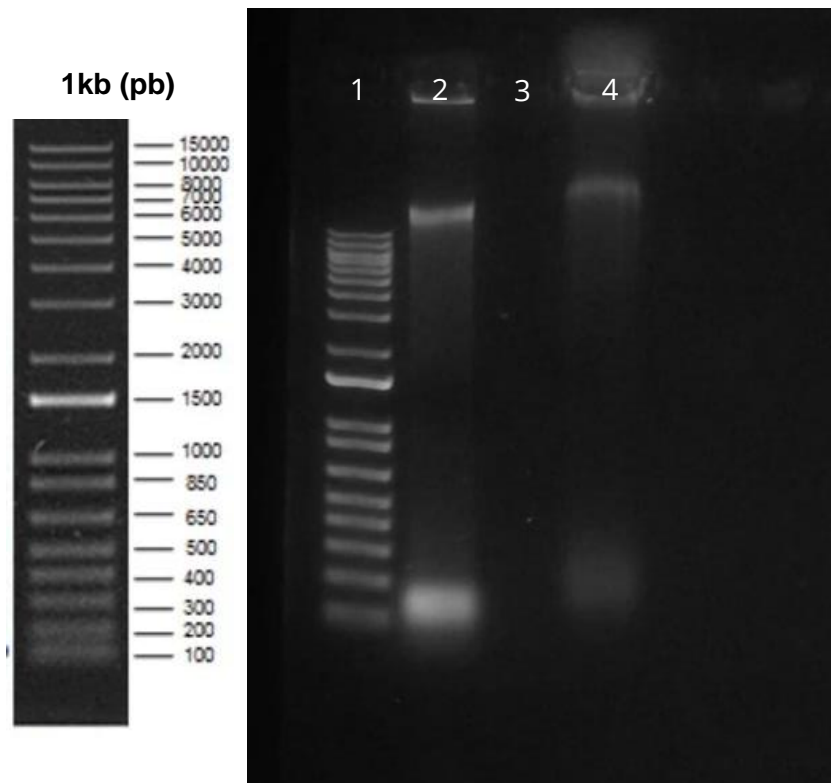


Figura 14. Digestión de la clona pFL12. En el carril 1 se muestra el marcador molecular 1kb, en el carril 2 se muestra la clona sin digerir y en el carril 4 la clona pFL12 digerida con las enzimas *XhoI* y *SpeI*.

Se encontró una posible colonia transformada por medio de una PCR de hrGFP.

Se realizó la digestión del plásmido pFL12 (clona 19) con las enzimas *XhoI* y *SpeI* y se ligó el fragmento nsp2-hrGFP-nsp2, que contiene en su secuencia los mismos sitios de restricción de las enzimas mencionadas. Posteriormente a la ligación se realizó una transformación bacteriana por choque térmico en bacterias *E.coli* cepa SURE2.

Para comprobar si la transformación había sido exitosa, se realizó extracción de ADN plasmídico de al menos 20 colonias y se realizó una PCR para amplificar el gen hrGFP, para poder identificar cuáles colonias portan el plásmido pFL12-hrGFP. Se identificó que la colonia número 3 tuvo un resultado positivo para el PCR de hrGFP, resultado que se muestra en la **figura 15**.

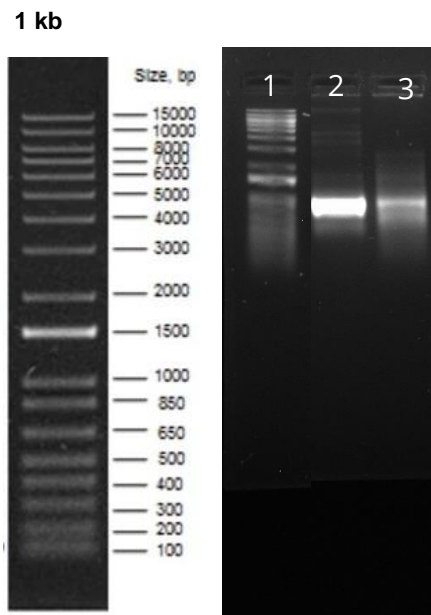


Figura 15. PCR de hrGFP de la colonia transformada número 3. Marcador molecular 1kb (carril 1), control positivo de la amplificación de hrGFP obtenida del plásmido NF-KB-hrGFP con un tamaño esperado de 800 pb (carril 2), amplificación de hrGFP de la colonia transformada 3 (carril 3).

Se secuenciaron los fragmentos fusionados en la PCR de sobrelapación.

Los fragmentos nsp2-5', nsp2-3', la primera fusión nsp2-5'-hrGFP y la fusión completa nsp2-5'-hrGFP-nsp2-3' se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología, UNAM. Los resultados de la secuenciación se alinearon a la secuencia de pFL12-hrGFP utilizando el programa **Snappgene**.

Se obtuvo la secuencia de dos fragmentos de nsp2 de PRRSV denominados en esta investigación como nsp2-5' y nsp2-3', y se realizó un alineamiento a una secuencia de referencia (pFL12-hrGFP), el resultado se muestra en la **Figura 16**. Se puede apreciar que las flechas marrones, que corresponden a los alineamientos, se unieron a las regiones esperadas de nsp2 (5' y 3').

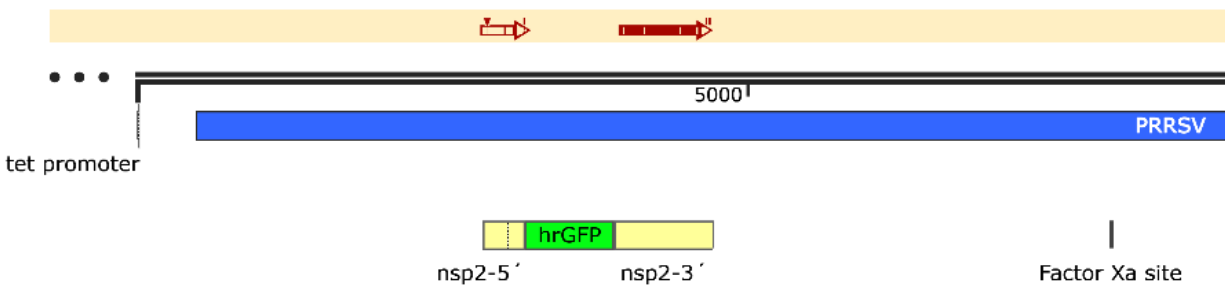


Figura 16. Alineamiento de los fragmentos 5' y 3' de nsp2 a pFL12-hrGFP utilizando *Snappene*. La línea negra representa la secuencia de pFL12-hrGFP, la línea azul es la anotación del genoma de PRRSV, en la parte inferior en color amarillo se muestra la anotación de los fragmentos 5' y 3' de nsp2, en color verde se anotó la región del gen reportero. La línea amarilla superior muestra la zona de alineamientos, dónde las flechas de color marrón corresponden a los alineamientos. La región en la que los alineamientos aparecen en la secuencia de pFL12-hrGFP confirma que son los fragmentos de nsp2 esperados.

Se obtuvo la secuencia de la primera fusión (nsp2-5'-hrGFP) que consiste en la unión del fragmento nsp2-5' con el gen reportero hrGFP. Podemos observar en la **figura 17** que el fragmento fusionado se secuenció con los dos oligos Forward (**Tabla 2**) de cada fragmento, ya que la secuenciación alcanza una longitud aproximada de 800 pb, por eso se observan dos alineamientos que corresponden a las flechas marrones que se encuentran en la línea amarilla superior. La figura nos muestra que los fragmentos secuenciados coinciden tanto con la región 5' de nsp2 y hrGFP. Este alineamiento comprobó la correcta fusión entre nsp2-5' y hrGFP.

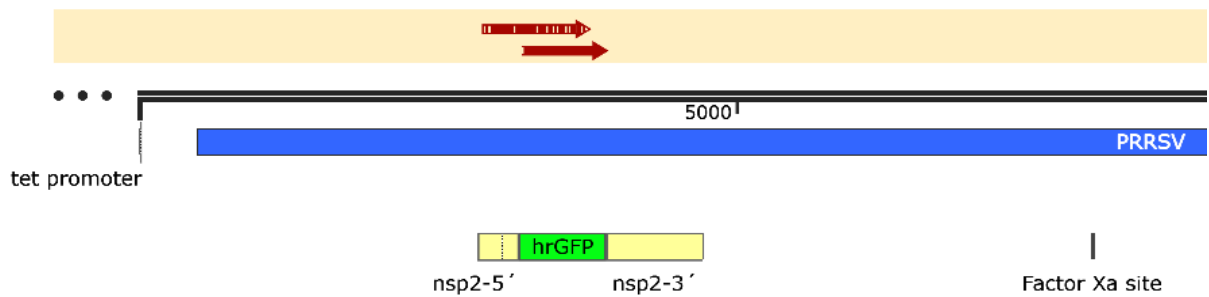


Figura 17. Alineamiento de la fusión nsp2-5'-hrGFP a pFL12-hrGFP utilizando *Snappgene*. La línea negra representa la secuencia de pFL12-hrGFP, la línea azul es la anotación del genoma de PRRSV, en la parte inferior en color amarillo se muestra la anotación de los fragmentos 5' y 3' de nsp2, en color verde se anotó la región del gen reportero. La línea amarilla superior muestra la zona de alineamientos, las flechas de color marrón en la línea amarilla corresponden a los alineamientos que realizamos. La fusión nsp2-5'-hrGFP se secuenció en dos fragmentos los cuales están representados con las dos flechas marrones en la línea amarilla. Se observa que alinea al área esperada de nsp2 y al gen reportero fluorescente.

En la **figura 18** se observa el alineamiento de la fusión completa nsp2-5'-hrGFP-nsp-3', este fragmento fusionado se secuenció en tres partes con los oligos, F1-nsp2, F2-hrGFP y F3-nsp2 respectivamente (**tabla 2**). Al realizar el alineamiento se observó que existía un error de secuenciación con el primer fragmento secuenciado, por lo que se decidió descartar y solo presentar el alineamiento de los dos fragmentos restantes. Las flechas marrones en la línea amarilla corresponden a los alineamientos y se muestra que abarcan las regiones del gen reportero y la parte 3' de nsp2. Lo que indica que la fusión se llevó a cabo correctamente.

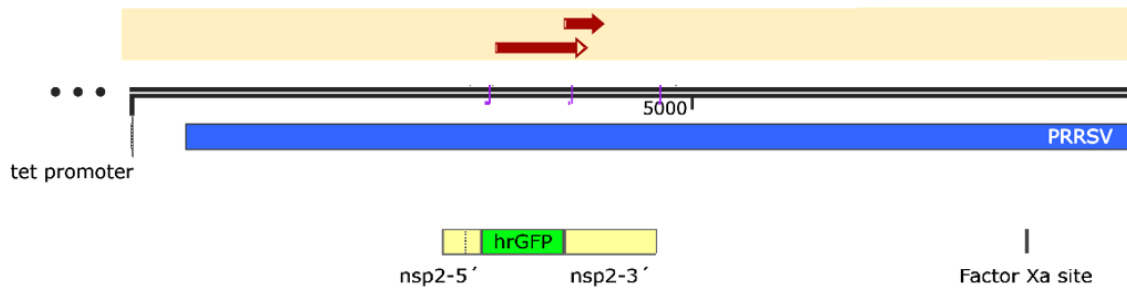


Figura 18. Alineamiento de la fusión nsp2-5'-hrGFP-nsp2-3' a pFLI2-hrGFP utilizando *Snapgene*. La línea negra representa la secuencia de pFLI2-hrGFP, la línea azul es la anotación del genoma de PRRSV, en la parte inferior en color amarillo se muestra la anotación de los fragmentos 5' y 3' de nsp2, en color verde se anotó la región del gen reportero. La línea amarilla superior muestra la zona de alineamientos, las flechas de color marrón en la línea amarilla muestran los alineamientos realizados. La secuenciación de la fusión se realizó en 3 fragmentos, sólo se presentan dos de ellos debido a un error de secuenciación. Los alineamientos (flechas marrones) están abarcando la región del gen reportero y la región 3' de nsp2. Lo que indica que la fusión se realizó correctamente.

Con los resultados de la secuenciación de Sanger se comprobó la presencia de hrGFP en la fusión dentro de nsp2. Se decidió secuenciar la clona infecciosa completa para corroborar que la secuencia estuviera completa y que no hubiese desplazamiento de los marcos de lectura. El ensamblaje y análisis de las secuencias están en proceso.

La fluorescencia de las células A549 y A549-GFP fue significativamente diferente.

Se tomaron fotografías de las células A549-GFP y A549 sin GFP usando el microscopio de fluorescencia. En la **figura 19** se muestran las fotografías de las células A549-GFP en campo claro (**A**) y fluorescencia (**B**). También se muestran las imágenes de las células A549 sin GFP en campo claro (**C**) y fluorescencia (**D**). En las imágenes **B** y **D** se puede distinguir que las células A549-GFP presentan un mayor número de células fluorescentes a comparación de las células A549 sin GFP (**D**). Se puede observar que tanto las células A549 y A549-GFP presentan fluorescencia, esto debido a un fenómeno denominado autofluorescencia, por esto es importante realizar una medición cuantitativa, que ayude a confirmar la diferencia entre la fluorescencia de las diferentes líneas celulares.

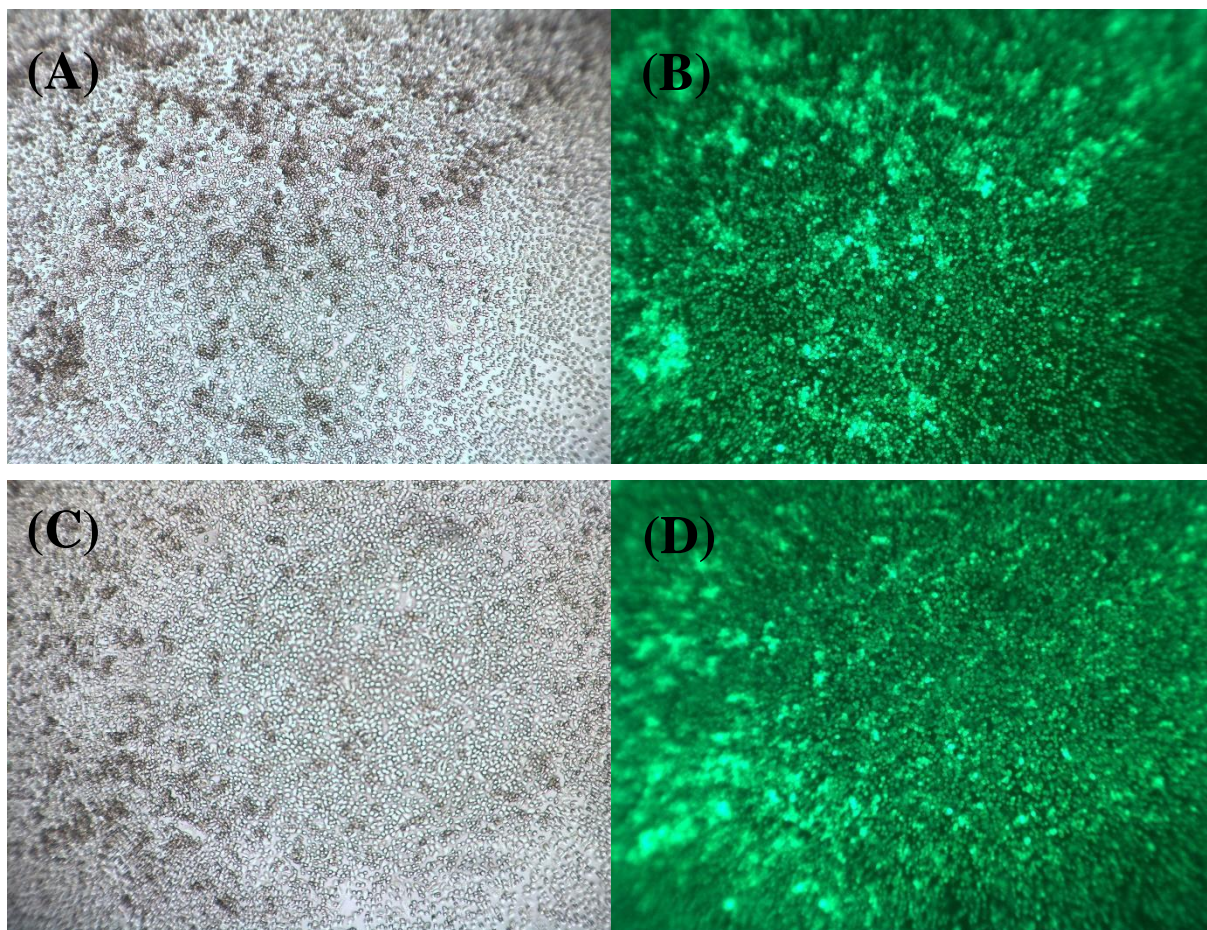


Figura 19. Fotografías tomadas en microscopio de fluorescencia a 200 ms de exposición, ganancia 6x y magnificación 50x. Células A549-GFP en campo claro **(A)** y fluorescencia **(B)**. Células A549 sin GFP en campo claro **(C)** y fluorescencia **(D)**.

Se realizó un boxplot con valores de significancia por la prueba Tukey para las mediciones de fluorescencia en el microscopio (**figura 20**), la gráfica nos muestra que existe una diferencia significativa entre la fluorescencia emitida de las células A549 y A549-GFP. De igual manera la **figura 21** muestra la diferencia significativa de fluorescencia emitida entre las células A549 con y sin GFP medida con el fluorímetro. Las condiciones de medición que se establecieron para medir fluorescencia de GFP de las células A549 fueron: una intensidad del LED a $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una ganancia de fotodiodo de 40 a 70 decibeles (dB), la frecuencia de medición del fotodiodo a 1kHz y la frecuencia de corte del filtro de señal fluorescente a 10 Hz.

Posterior a la medición de fluorescencia en el microscopio (**figura 20**) y en el fluorímetro (**figura 21**), se realizaron pruebas estadísticas para comprobar la correcta funcionalidad del fluorímetro, así que se compararon los datos de las mediciones de ambos equipos mediante una prueba ANOVA y una prueba Tukey.

La prueba de ANOVA confirmó que al menos un grupo muestra una intensidad de fluorescencia diferente (valor $P < 0.002$). La fluorescencia de las células con GFP fue significativamente mayor que la fluorescencia de las células sin el gen reportero GFP y fue confirmada por una prueba Tukey (valor $P < 0.05$).

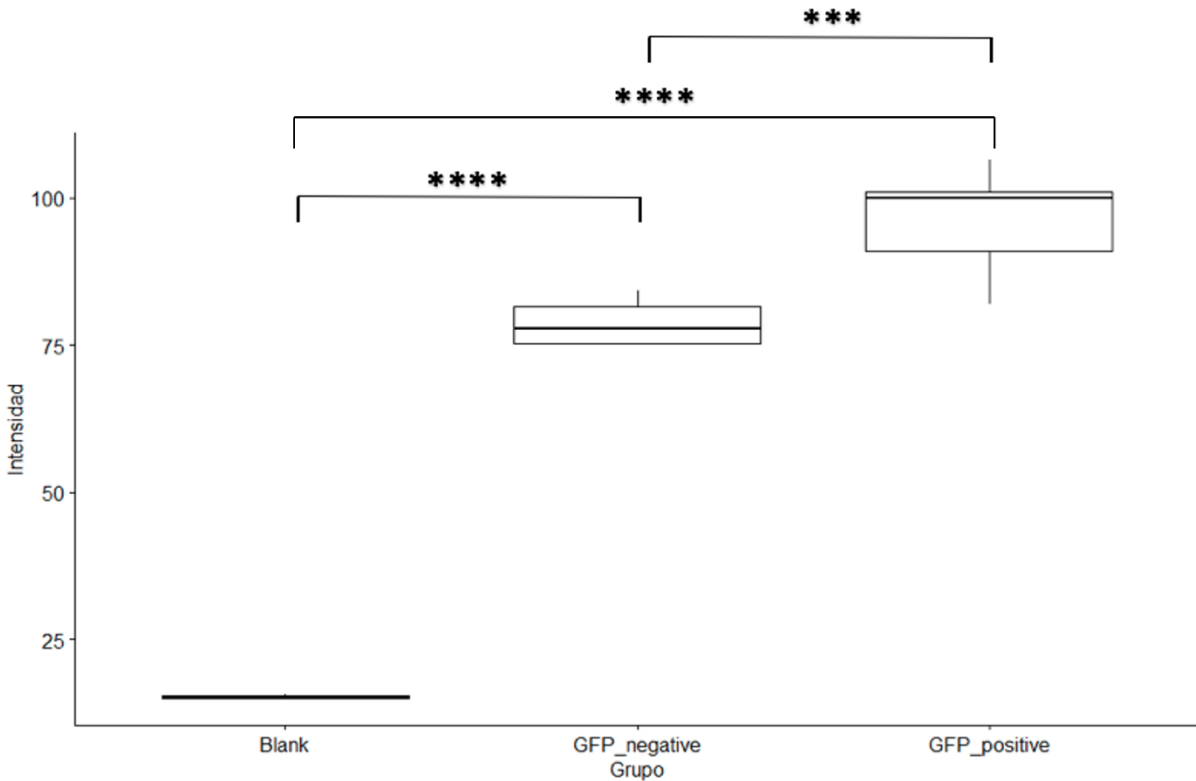


Figura 20. Fluorescencia verde cuantificada con microscopio de fluorescencia. El eje X representa los diferentes grupos celulares medidos y el eje Y representa el promedio de intensidad del canal verde en imágenes de fluorescencia. Para el blanco, $n=3$, A549 $n=6$, y A549-GFP $n=9$. Nivel de significancia por prueba Tukey; valor- $P < 0.001$ (***) y valor- $P < 0.0001$ (****).

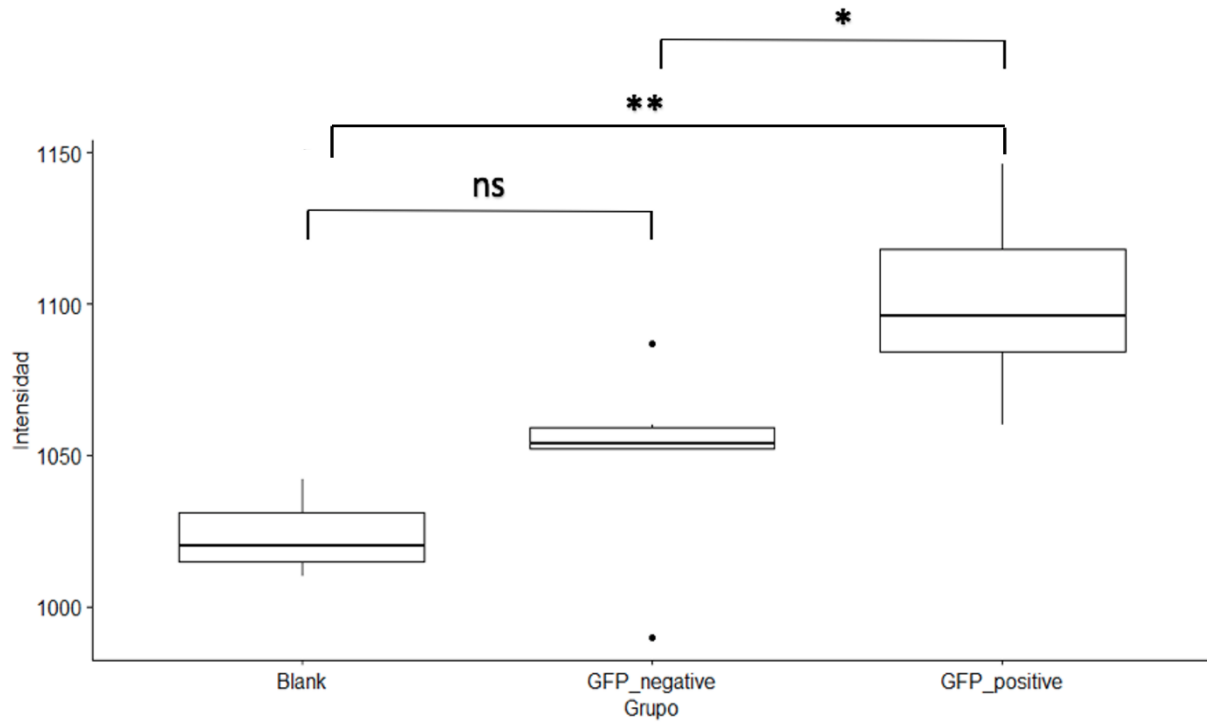


Figura 21. Fluorescencia verde cuantificado con el fluorímetro diseñado y construido en la ENES unidad León. Eje Y representa el promedio de fluorescencia medido por el fotodiodo en mV. Para el blanco, n=3, A549 n=6, y A549-GFP n=8. Nivel de significancia por prueba Tukey; valor- $P > 0.05$ (ns) valor- $P < 0.05$ (*) y valor- $P < 0.01$ (**).

DISCUSIÓN

En este trabajo se describe la metodología para obtener una clona infecciosa fluorescente de PRRSV a partir de la clonación del gen hrGFP en el plásmido pFL12. La clona infecciosa fluorescente permitirá establecer un ensayo *in vitro* en donde se cuantifique la fluorescencia del gen reportero para estimar la replicación viral en cultivos celulares. Finalmente, estos ensayos permitirán estudiar las interacciones virus-macrófagos para establecer marcadores de activación o restricción de la respuesta inmunitaria ante la infección viral.

El gen hrGFP se fusionó con la secuencia correspondiente a la proteína viral nsp2 de PRRSV mediante PCR de superposición o superposición. La PCR de superposición es una variante de la PCR que se utiliza para unir dos o más fragmentos de ADN y crear un fragmento largo fusionado que puede ser utilizado para distintos procesos como: mutagénesis dirigida, la creación de una delección o un vector complementario (Lu, 2018). Para que la PCR de superposición sea eficiente se deben de considerar dos factores muy importantes en el proceso, como lo es el diseño de los oligos y la optimización del ciclo térmico (Lu, 2018). Los oligos deben de medir aproximadamente de 20-30 pb, deben de ser superpuestos, es decir, unirse entre sí y su temperatura de fusión tiene que ser cercana o incluso idéntica para propiciar una unión correcta.

Una de las principales ventajas de la PCR de superposición es que es un proceso rápido y económico para fusionar diferentes fragmentos de distintas secuencias, también no requiere de sitios de restricción (Zhang, 2021). Algunas de las limitantes de este tipo de PCR son, la longitud máxima de inserción de aproximadamente 7kb (Bryksin and Matsumura, 2013), la concentración de ADN en la muestra, el tamaño del vector de clonación, ya que entre más grande sea el tamaño del plásmido la eficacia de la transformación disminuye. También la exposición del fragmento fusionado a la luz ultravioleta puede dañar el ADN, ya que generalmente se trata de fragmentos muy largos. Otro factor que debe de considerarse es el uso de una polimerasa de alta fidelidad en la PCR de superposición, ya que los fragmentos obtenidos suelen tener una longitud mayor y el error de la polimerasa puede aumentar.

Se optó por seleccionar la técnica de PCR de superposición para el estudio realizado en esta tesis, porque el objetivo fue unir tres fragmentos de ADN de dos diferentes organismos. Dos fragmentos del gen nsp2 de PRRSV y el gen reportero hrGFP de *Renilla reniformis*. La optimización del ciclo térmico y la concentración de las muestras fue clave para obtener el fragmento fusionado final. Uno de los problemas con los que nos enfrentamos fue la amplificación de los dos segmentos de nsp2, ya que la diferencia de la temperatura de fusión de los oligos F1-nsp2, R1-nsp2-hrgfp y F3-nsp2-hrgfp, R3-nsp2 (**Tabla 2**) era muy grande,

debido a la longitud de la secuencia de estos. Incluso se realizó una modificación en el oligo F1, creando una versión F1.1, en la cual se le agregaron nucleótidos para optimizar el ciclo térmico de la PCR y poder obtener la amplificación de la secuencia de interés.

La clona infecciosa PRRSV-hrGFP se clonó en un plásmido bacteriano para su amplificación. Los vectores bacterianos son comúnmente usados para la generación de clonas infecciosas. Existen otras alternativas al uso de bacterias, como el uso de baculovirus. Por ejemplo, se reportó la inserción del genoma de PRRSV en el baculovirus *Autographa californica multcapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Zheng *et al.*, 2010). AcMNPV es un virus con un genoma circular de ADN de doble cadena con una longitud de 134 kb (Ayres *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2010). Una ventaja de los baculovirus es el gran tamaño y la flexibilidad de su genoma, que les permite aceptar con facilidad la inserción de fragmentos largos de ADN exógeno (Zheng *et al.*, 2010). Este sistema representa una alternativa en caso de que la replicación del ARN de PRRSV se vea limitada en cuando a que se replique el genoma completo o que la producción de progenie viral sea de bajo número de copias.

Es de particular importancia seleccionar el promotor para la transcripción del ARN viral, en este caso se utilizó el T7. El T7 es una secuencia promotora para la ARN polimerasa T7 que se encarga de catalizar la producción de ARN a partir de ADN. Este promotor se ha utilizado recientemente para generar una clona infecciosa del virus coxsackie (Liu *et al.*, 2019).

Sin embargo, el promotor puede variar dependiendo del tipo de virus, tamaño de su genoma y su complejidad de replicación. Por ejemplo, se describió que se agregó la ribozima del virus de la hepatitis delta a una clona infecciosa del virus de la clorosis del tomate para mejorar la eficacia de los clones infecciosos y se menciona la inserción del promotor CaMV 35S aguas arriba del primer nucleótido de las secuencias virales de RNA1 y RNA2, respectivamente, esto para evitar la presencia de nucleótidos no virales 5' (Navas-hermosilla, Fiallo-olivé and Navas-castillo, 2021).

El PRRSV es un virus de ARN con un genoma relativamente pequeño (15.4 kb) por lo que es viable utilizar el promotor T7 dentro del vector PBR322 para mantener y replicar el ARN para estudios *in vitro*.

Actualmente los estudios de los mecanismos moleculares y los factores genéticos virales se vuelven más importantes debido al surgimiento de nuevas enfermedades. Para poder estudiar estos mecanismos es fundamental tener acceso al material genético del virus de una forma sencilla. Por lo que el uso de clonas infecciosas comienza a tornarse en una prioridad. Ya que permiten obtener copias del virus de una manera más rápida, sencilla y económica. Uno de los principales retos para la creación de clonas infecciosas es la inestabilidad y tamaño

del genoma del virus que quiera insertarse en el plásmido, aunque los avances en las técnicas de clonación han permitido superar poco a poco estas limitantes. Por ejemplo, en un artículo reciente se reportó el desarrollo de dos clonas infecciosas de dos cepas del virus Usutu (Bates *et al.*, 2021) y en otro estudio se recuperó virus del Nilo occidental de células transfectadas con el ARN del virus obtenido de un sistema de dos plásmidos, este sistema se centró en separar las regiones 5' y 3' del ADN del virus para la posterior transcripción de ARN, los plásmidos utilizados fueron NY-pA y NY-pB respectivamente para cada región (Vandergast and Fredericksen, 2016).

Se comprobó que se puede cuantificar la fluorescencia de células a través del fluorímetro. Existen estudios donde se describe la medición de fluorescencia tanto cualitativa como cuantitativa por medio del análisis con softwares de fotografías obtenidas con microscopios de fluorescencia (Warke and Khot, no date; Kim, Choi and Kang, 2020).

En este estudio comprobamos que la medición cuantitativa del fluorímetro diseñado en la ENES Unidad León, fue capaz de compararse con sistemas de medición de fluorescencia como los microscopios. Se comprobó que es una forma más rápida y eficaz de medir la emisión de fluorescencia de células como lo son las A549-GFP.

Se realizó la transformación de bacterias con el producto de ligación y se obtuvo una colonia con la clona infecciosa fluorescente.

Finalmente, el uso de clonas infecciosas ha demostrado ser una herramienta útil para diversas aplicaciones. Por ejemplo, en un estudio se construyó un clon infeccioso del virus del Zika que expresa el gen reportero fluorescente EGFP. Donde, primero recombinaron a través de la técnica de PCR, el genoma del zika con el promotor del CMV, el EGFP, la ribozima del virus de la hepatitis delta y la secuencia del terminador SV40 y, posteriormente, se clonó en el vector pBAC11. Utilizando este plásmido recombinante la infección en células de humanos, monos e insectos, fue exitosa (Gao *et al.*, 2021).

Otra de las aplicaciones de las clonas infecciosas es para desarrollar medicamentos antivirales y estudiar patógenos emergentes, ya que la construcción de clonas infecciosas fluorescentes con patógenos emergentes como lo es el SARS-CoV-2 facilitan la estandarización de ensayos *in vitro* para la identificación de compuestos que inhiben la replicación viral (Gao *et al.*, 2021). También las clonas infecciosas son altamente utilizadas para el desarrollo de vacunas, por ejemplo, se encontró que con un clon de ADNc del virus del Zika atenuado fue altamente inmunogénica, no causó algún riesgo y además proporcionó protección total contra la infección con el virus (Ávila-pérez *et al.*, 2020).

Se confirmó que las mediciones de fluorescencia usando nuestro fluorímetro dieron resultados comparables con las mediciones en el microscopio de fluorescencia. Al realizar lo análisis estadísticos se comprobó que las mediciones realizadas en el fluorímetro son confiables, ya que tuvieron un comportamiento similar a las realizadas en el microscopio. Es importante considerar los diferentes factores que podrían causar diferencias en la confiabilidad de las mediciones entre ambos sistemas, por ejemplo, analizando los sensores de ambos sistemas, el sensor de la cámara es menos sensible que el fotodiodo, ya que en el fotodiodo al recibir luz que en este caso es la fluorescencia, la amplifica y genera un voltaje. Este voltaje se mide con el DAQ, que es dispositivo recopilador de datos, el DAQ puede tomar una medición de voltaje cada 500 nanosegundos, en un segundo puede llegar a tomar hasta dos millones de mediciones, al ser tan rápido necesita ser muy sensible a la luz, lo que provoca una medición más precisa y sensible.

Todos los sistemas de medición llegan a presentar ruido y los sistemas de medición de fluorescencia no son la excepción, si comparamos los dos sistemas utilizados en este estudio, el fluorímetro produce menos ruido que el microscopio debido al software con el que se maneja el DAQ. Así que podemos resaltar que el duo del fotodiodo-DAQ es superior a la cámara del microscopio, ya que la cámara solo tiene una resolución de 24 bits, 8 bits por cada uno de los canales (RGB Red-Green-Blue), pero nuestro interés es el canal verde por lo que la resolución se mantiene sólo en 8 bits, en comparación con el DAQ que digitaliza la señal con una resolución de 16 bits.

Además de la medición de fluorescencia, ambos sistemas tienen otras aplicaciones, por ejemplo, el microscopio puede utilizarse para marcaje de moléculas en células y tejidos, ya sea para identificarlas o caracterizarlas, se utiliza para el estudio de células patológicas, para estudios inmunológicos y el fluorímetro puede aplicarse para la medición de fluorescencia de clorofila, o la medición en tiempo real de células infectadas.

CONCLUSIÓN

La clona infecciosa de PRRSV con el reportero de GFP se generó mediante PCR de sobrelapación. Se utilizó la clona pFL12 que está conformada por el plásmido pBR322 y el genoma de PRRSV. Esta clona se dirigió con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, lo cual permitió eliminar una región de nsp2, para posteriormente sustituirla con el producto de la PCR de sobrelapación. El producto de la PCR consiste en la fusión de una región de nsp2 (misma que se eliminó en la digestión de la clona) con el gen reportero fluorescente hrGFP.

Encontramos que la medición de la fluorescencia utilizando el fluorímetro creado en la ENES León fue similar a otro sistema de medición establecido como el microscopio de fluorescencia. Ya que se pudo comprobar la diferencia entre las mediciones en células A549 y A549-GFP en ambos sistemas.

Con los resultados obtenidos concluimos que se acepta la hipótesis de este trabajo de investigación, ya que los objetivos específicos se llevaron a cabo y existe la información suficiente que sustenta que el objetivo general de esta investigación se cumplió. Concluimos también, que este sistema puede contribuir al estudio de las interacciones virus-célula en específico para evaluar la respuesta inmune ante PRRSV. Ya que la creación de una clona infecciosa fluorescente no solo de PRRSV, sino de cualquier virus, puede facilitar el estudio de los mecanismos que desarrollan los virus para la evasión de la respuesta inmune; nos permite monitorear la replicación del virus.

PERSPECTIVAS

Producir PRRSV-GFP para realizar ensayos de infección y estandarizar ensayos para estudiar la interacción virus-células. Se espera poder producir ARN del virus PRRSV-GFP para transfectar macrófagos y medir la fluorescencia a diferentes horas y observar la evolución de infección viral. Se podrían aplicar diferentes tratamientos a las células para que, a través de la medición de fluorescencia, se puedan detectar cambios en la tasa de replicación, como una estrategia para descubrir medicamentos antivirales o inmunomoduladores. Se establecería un ensayo para detectar la influencia de factores de transcripción en la replicación del virus, por ejemplo. Todo esto para generar información que pueda ayudar a la producción de vacunas eficientes contra el virus.

ANEXOS

Bibliografía

- An, T.-Q. *et al.* (2020) 'Molecular and Cellular Mechanisms for PRRSV Pathogenesis and Host Response to Infection.', *Virus research*, 286, p. 197980. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197980.
- Cao, S. *et al.* (2020) 'The tail domain of PRRSV NSP2 plays a key role in aggrephagy by interacting with 14-3-3ε.', *Veterinary research*, 51(1), p. 104. doi: 10.1186/s13567-020-00816-7.
- Hashimoto, T. (2004) '[Sample size determination given data of preliminary experiment for student's t-test, ANOVA and Tukey's multiple comparison].', *Shinrigaku kenkyu: The Japanese journal of psychology*, 75(3), pp. 213–219. doi: 10.4992/jjpsy.75.213.
- Li, N. *et al.* (2014) 'GFP stable transfection facilitated the characterization of lung cancer stem cells.', *Molecular biotechnology*, 56(12), pp. 1079–1088. doi: 10.1007/s12033-014-9788-3.
- Lunney, J. K. *et al.* (2016) 'Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System.', *Annual review of animal biosciences*, 4, pp. 129–154. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025.
- Margolin, W. (2000) 'Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells.', *Methods (San Diego, Calif.)*, 20(1), pp. 62–72. doi: 10.1006/meth.1999.0906.
- McHugh, M. L. (2011) 'Multiple comparison analysis testing in ANOVA.', *Biochemia medica*, 21(3), pp. 203–209. doi: 10.11613/bm.2011.029.
- Meulenber, J. J. (2000) 'PRRSV, the virus.', *Veterinary research*, 31(1), pp. 11–21. doi: 10.1051/vetres:2000103.
- Murtaugh, M. P., Yuan, S. and Faaberg, K. S. (2001) 'Appearance of novel PRRSV isolates by recombination in the natural environment.', *Advances in experimental medicine and biology*, 494, pp. 31–36. doi: 10.1007/978-1-4615-1325-4_4.
- Remington, S. J. (2011) 'Green fluorescent protein: a perspective.', *Protein science: a publication of the Protein Society*, 20(9), pp. 1509–1519. doi: 10.1002/pro.684.
- Song, J. *et al.* (2018) 'Mapping the Nonstructural Protein Interaction Network of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.', *Journal of virology*, 92(24). doi: 10.1128/JVI.01112-18.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alangar, I. B. and Govind, P. R. (2019) 'Development of Infectious Clone of Virus', *The Ben Cao Gang Mu*, (2), pp. 1233–1250.
- Hill, H. (1990) 'Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome)', in *Proceedings of the mystery swine disease committee meeting*. Livestock Conservation Institute Madison, WI, USA, pp. 29–30.
- Alberts, B., Johnson, A. and Lewis, J. (2002) *Biología molecular de la célula*. 4ta edn. New York. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>.
- Amador Cruz, J. (2016) 'Evaluación del impacto económico del virus de PRRS en granjas porcinas en México'. Available at: <http://132.248.9.195/ptd2016/enero/0739467/0739467.pdf>.
- Amarilla, S. *et al.* (2016) 'Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: Epidemiología, síntomas y lesiones', *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 5(2), pp. 38–46. Available at: <http://scielo.iics.una.py/pdf/ccv/v5n2/v5n2a07.pdf>.
- ATCC, cell products (2002) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*. Available at: <https://www.atcc.org/products/30-2002#product-references>.
- Ávila-pérez, G. *et al.* (2020) 'In vivo rescue of recombinant Zika virus from an infectious cDNA clone and its implications in vaccine development', pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-57545-2.
- Ayres, M. D. *et al.* (1994) 'The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.', *Virology*, 202(2), pp. 586–605. doi: 10.1006/viro.1994.1380.
- Bates, T. A. *et al.* (2021) 'Development and characterization of infectious clones of two strains of Usutu virus', *Virology*, 554, pp. 28–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.004>.
- Batista, L. *et al.* (2002) 'Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts', *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(3), pp. 196–200.
- Bryksin, A. and Matsumura, I. (2013) 'Chapter 4 Overlap Extension PCR Cloning', 1073, pp. 31–42. doi: 10.1007/978-1-62703-625-2.
- Calzada-Nova, G. *et al.* (2010) 'Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(1–2), pp. 20–33. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.10.026.
- Cell Biolabs and Inc (2010) 'A549/GFP Cell Line', *Cell Biolabs, Inc*, pp. 1–2. Available at: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-209-gfp-a549-cell-line.pdf>.
- Crisci, E., Fraile, L. and Montoya, M. (2019) 'Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses.', *Veterinary sciences*, 6(1). doi: 10.3390/vetsci6010026.
- Cura, A. (2010) 'El síndrome reproductivo y respiratorio porcino', *Axoncomunicacion*, pp. 15–19. Available at: http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/2/cys_2_Sindrome_reproductivo_re

spiratorio.pdf.

- Dong, Q. *et al.* (2021) 'Gene expression in tonsils in swine following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus', *BMC Veterinary Research*, 17(1), pp. 1–21. doi: 10.1186/s12917-021-02785-1.
- Fang, Y. and Snijder, E. J. (2010) 'The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins', *Virus research*. 2010/08/07, 154(1–2), pp. 61–76. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.030.
- Franco, A. Y. and Longart, M. (2009) 'Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso', *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), pp. 84–96.
- Gao, J. *et al.* (2021) 'Construction of an infectious clone of Zika virus stably expressing an EGFP marker in a eukaryotic expression system', *Virology Journal*, pp. 1–10. doi: 10.1186/s12985-021-01622-z.
- Han, J. *et al.* (2007) 'Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture.', *Journal of virology*, 81(18), pp. 9878–90. doi: 10.1128/JVI.00562-07.
- InvivoGen (2005) *Type I IFN Production and Signaling*. Available at: <https://www.invivogen.com/review-type1-ifn-production>.
- Hill, H. (1990) 'Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome)', in *Proceedings of the mystery swine disease committee meeting*. Livestock Conservation Institute Madison, WI, USA, pp. 29–30.
- Jameson, D.M (2014). *Introduction to Fluorescence* (1st ed). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16502>
- Keffaber, K. K. (1989) 'Reproduction failure of unknown etiology', *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1, pp. 1–9.
- Kim, S., Choi, S. and Kang, D. (2020) 'Quantitative and qualitative analysis of autophagy flux using imaging', *BMB Reports*. 2020/05/31, 53(5), pp. 241–247. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.5.046.
- Liu, Q. *et al.* (2019) 'Construction and characterization of an infectious cDNA clone of coxsackievirus A 10', pp. 1–10.
- Liu, T. *et al.* (2017) 'NF-κB signaling in inflammation', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), p. 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- López Heydeck, S. M. *et al.* (2013) 'Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México', *Voprosy Filosofii*, 4(8), pp. 70–81.
- López-Heydeck, S. M. *et al.* (2015) 'Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Review', (January).

- Lu, Y. (2018) 'Using overlap-extension PCR technique to fusing genes for constructing recombinant plasmids', (October 2017), pp. 6–9. doi: 10.1002/jobm.201700455.
- Lunney, J. K., Benfield, D. A. and Rowland, R. R. R. (2010) 'Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine.', *Virus research*. Netherlands, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.virusres.2010.10.009.
- Lv, J. *et al.* (2008) 'An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome', *Journal of General Virology*, 89(9), pp. 2075–2079. doi: 10.1099/vir.0.2008/001529-0.
- Mardassi, H., Massie, B. and Dea, S. (1996) 'Intracellular Synthesis, Processing, and Transport of Proteins Encoded by ORFs 5 to 7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus', 112(221), pp. 98–112.
- Martínez-Bautista, N. R. *et al.* (2018) 'Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México', *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(4), pp. 993–1008. doi: 10.1111/tbed.12831.
- Meng, X. *et al.* (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', *General Virology*, pp. 1265–1270.
- Meulenbergh, J. J. M. *et al.* (1993) 'Lelystad Virus, the Causative Agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), Is Related to LDV and EAV', *Virology*, 192(1), pp. 62–72. doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1008>.
- Meulenbergh, J. J. M. *et al.* (1994) 'Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus', in Brinton, M. A., Calisher, C. H., and Rueckert, R. (eds) *Positive-Strand RNA Viruses*. Vienna: Springer Vienna, pp. 441–448.
- Meulenbergh, J. J. M. *et al.* (1995) 'Characterization of Proteins by ORFs 2 to 7 of Lelystad Virus', 163, pp. 155–163. doi: 10.1016 / s0042-6822 (95) 80030-1.
- Navas-hermosilla, E., Fiallo-olivé, E. and Navas-castillo, J. (2021) 'Infectious Clones of Tomato Chlorosis Virus: Toward Increasing Efficiency by Introducing the Hepatitis Delta Virus Ribozyme', 12(July), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2021.693457.
- Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P. and Faaberg, K. A. Y. S. (1999) 'Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Comparison: Divergent Evolution on Two Continents', 73(1), pp. 270–280. doi: 10.1128 / JVI.73.1.270-280.1999.
- Neumann Ramirez, A., Schwartz, K. J., E. J. (2009) *Swine disease manual*. Perry, Iowa: American Association of Swine Veterinarians.
- Ruiz, A. *et al.* (2009) 'Estudio de la excreción y transmisión del aislado chileno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en animales inoculados experimentalmente

y centinelas en contacto mediante RT-nPCR y ELISA', *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41(3), pp. 221–228. doi: 10.4067/s0301-732x2009000300006.

- Segretín, M. E. (2003). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *Argen Bio*.
- Shi, C. *et al.* (2015) 'PRRSV receptors and their roles in virus infection', *Archives of Microbiology*, 197(4), pp. 503–512. doi: 10.1007/s00203-015-1088-1.
- Shimomura, O. (2005) 'Discovery of aequorin and green fluorescent protein', *Methods of Biochemical Analysis*, 47(January), pp. 1–13. doi: 10.1002/0471739499.ch1.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saiga, Y. (1962) 'Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.' *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, pp. 223–239. doi: 10.1002/jcp.1030590302.
- Snijder, E. J. and Meulenber, J. J. M. (1998) 'The molecular biology of arteriviruses', 2(1998), pp. 961–979.
- Thomann, B. *et al.* (2020) 'Modeling Economic Effects of Vaccination Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: Impact of Vaccination Effectiveness, Vaccine Price, and Vaccination Coverage', *Frontiers in Veterinary Science*, 7(August), pp. 1–9. doi: 10.3389/fvets.2020.00500.
- Tong, G. Z. *et al.* (2007) 'Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [8]', *Emerging Infectious Diseases*, pp. 1434–1436. doi: 10.3201/eid1309.070399.
- Truong, Ha M *et al.* (2004) 'A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus', *Virology*, 325(2), pp. 308–319. doi: 10.1016/j.virol.2004.04.046.
- Van Breedam, W. *et al.* (2010) 'Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage', *Journal of General Virology*, 91(7), pp. 1659–1667. doi: 10.1099/vir.0.020503-0.
- Vandergaast, R. and Fredericksen, B. L. (2016) 'Chapter 4 Generating West Nile Virus from an Infectious Clone', 1435. doi: 10.1007/978-1-4939-3670-0.
- ViralZOne (2007) *Arteriviridae*. Available at: <https://viralzone.expasy.org/28>.
- Wallace, L. M. *et al.* (2013) 'Dose-dependent Toxicity of Humanized Renilla reniformis GFP (hrGFP) Limits Its Utility as a Reporter Gene in Mouse Muscle', *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2(4), pp. e86–e86. doi: 10.1038/mtna.2013.16.
- Wang, L. *et al.* (2014) 'Preparation of North American Type II PRRSV infectious clone expressing green fluorescent protein', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/368581.
- Wang, L. *et al.* (2017) 'Porcine alveolar macrophage polarization is involved in inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication', *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(11), pp. 1906–1915. doi: 10.1292/jvms.17-0258.
- Warke, D. J. and Khot, K. P. (no date) 'A comparative study for qualitative and quantitative

analysis of light and fluorescence microscopy stains in oral premalignant and malignant lesions', *Cytojournal*, 18, p. 14. doi: 10.25259/Cytojournal_39_2020.

- Welgene Biotech (2017) *Vitality hrGFP II Mammalian Expression vectors*. Available at: https://shop.welgene.com.tw/product/reagent/agilent/protein_expression/Vitality_hrGFP_II_Mammalian_Expression_Vectors.
- Wensvoort, G. *et al.* (1991) 'Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus.', *The veterinary quarterly*, 13(3), pp. 121–130. doi: 10.1080/01652176.1991.9694296.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991;13:121-130.
- Yun, S. I. and Lee, Y. M. (2013) 'Overview: Replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus', *Journal of Microbiology*, 51(6), pp. 711–723. doi: 10.1007/s12275-013-3431-z.
- Zhang, J. (2021). Molecular Biology Methods to Construct Recombinant Fibrous Protein. In: Ling, S. (eds) *Fibrous Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol 2347. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1574-4_12
- Zhang, Q. and Yoo, D. (2015) 'PRRS virus receptors and their role for pathogenesis', *Veterinary Microbiology*, 177(3–4), pp. 229–241. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.04.002.
- Zheng, H. *et al.* (2010) 'Baculovirus expression of cloned porcine arterivirus generates infectious particles in both insect and mammalian cells.', *Journal of biotechnology*, 150(2), pp. 251–258. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.08.009.