

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
LEÓN**

**TEMA:**

**CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO GP5T3 DE LA  
GLICOPROTEÍNA GP5 DEL VIRUS  
RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO  
(PRRSV) EN MACRÓFAGOS PORCINOS.**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN CIENCIAS  
AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**CARMEN MONSERRATH FLORES  
GARCÍA**

**TUTOR: DRA. ILANE HERNÁNDEZ  
MORALES**



**LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO.**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Índice

1. Agradecimientos institucionales .....	5
2. Agradecimientos .....	5
3. Resumen .....	7
4. Abstract.....	8
5. Introducción .....	9
5.1 Historia e Importancia del estudio de PRRSV.....	9
5.2 Virus de PRRSV: Genoma, variabilidad y estructura .....	9
5.2.1 La glicoproteína GP5 .....	10
5.3 Vías de transmisión y patogenia de PRRSV .....	10
5.4 Huésped y células blanco de PRRSV .....	11
5.5 Replicación de PRRSV .....	11
5.6 Respuesta inmune innata .....	12
5.6.1 Vía de señalización de TLR4/LPS .....	13
5.6.2 Citocinas proinflamatorias .....	16
5.6.3 IFN $\alpha$ .....	16
5.6.4 IFN $\gamma$ .....	16
5.7 Respuesta inmune innata contra PRRSV .....	16
5.8 Vía de señalización NFAT .....	17
5.9 Respuesta inmune adaptativa .....	19
5.10 Respuesta inmune adaptativa contra PRRSV.....	20
5.11 Candidatos vacunales actuales .....	21
5.12 Nanopartículas de pMA .....	22
6. Justificación .....	24
7. Hipótesis .....	25
8. Objetivos.....	26
8.1 Objetivo General.....	26
8.2 Objetivos específicos.....	26
9. Materiales y Métodos .....	27
9.1 Estandarización de cultivo de macrófagos porcinos 3D4/31 .....	27
9.2 Estimulación de macrófagos porcinos 3D4/31 con péptidos de la proteína GP5 de PRRSV y péptidos de la proteína GP5 encapsulados en nanopartículas de pMA. ....	28
9.3 Evaluación de la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ en macrófagos porcinos. ....	29
9.4 Extracción de ARN por el método de Trizol y electroforesis. ....	30

9.5 Transcripción reversa.....	30
9.6 PCR punto final, diseño y estandarización de oligonucleótidos .....	30
9.7 PCR cuantitativa .....	33
9.8 Análisis de -doble delta CT .....	33
10. Resultados.....	34
10. 1 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR .....	34
10.1.1 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR GAPDH .....	34
10.1.2 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR TLR4 .....	35
10.2 Análisis de expresión del receptor TLR4 y citocinas proinflamatorias después de la estimulación. ....	38
11. Discusión .....	44
11.1 Análisis de expresión relativa TLR4.....	44
11.2 Análisis de la expresión relativa de IFN- $\alpha$ 1 .....	45
11.3 Análisis de la expresión relativa de IFN- $\gamma$ .....	46
12. Conclusiones .....	50
13. Perspectivas .....	51
14. Bibliografía.....	52
15. Anexos.....	59

**Lista de Abreviaturas:**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BCR: Receptor de linfocito B

CLRs: receptores de lectina tipo c

DAMP: patrones moleculares asociados a daño o peligro

DEXA: Dexametasona

DMSO: Dimetilsulfóxido

GAGs: Glucosaminoglicanos

IFN- $\alpha$ 1: Interferón alfa 1

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

LPS: lipopolisacárido

NFAT: Factor Nuclear de las células T activadas

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NSPS: Proteínas no estructurales

ORFS: *Open reading frames*

RTC: Complejo de replicación y transcripción viral

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

pMA: Poli (ácido metacrílico)

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

PRRSV: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

SFB: Suero Fetal Bovino

TCR: Receptor de linfocito T

TLR: Receptor Tipo Toll

# 1. Agradecimientos institucionales

Quisiera agradecer a la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León por aceptarme en la carrera de ciencias Agrogenómicas y permitirme usar sus instalaciones para llevar a cabo mis proyectos. Por otro lado, me gustaría agradecer PAPIIT IA208322 por patrocinar el proyecto.

# 2. Agradecimientos

A lo largo de toda mi carrera universitaria, muchas personas me apoyaron para poder llegar a este momento por lo que me gustaría agradecer a las siguientes personas.

Mi Familia, principalmente a mis Papás, Gerardo Flores y María García por apoyarme en mis sueños a pesar de las dificultades. Se que han sacrificado muchas cosas por mi espero poder algún día recompensarles todo el apoyo que me dieron. Además, me gustaría agradecer a mi Mamá por darme ese gusto por la ciencia, espero poder presentar muchos más trabajos aparte de este para que te sientas más orgullosa de mí. A mi hermana Camila por su apoyo incondicional y siempre darme su opinión más honesta. A mi prima Jenny que es como una hermana mayor, que siempre estuvo ahí para escucharme en los momentos más difíciles. Y a mi perrita Kiki por ayudarme en mis crisis de ansiedad y enseñarme lo que es el amor incondicional.

Me gustaría agradecer profundamente a la Doctora Ilane Hernández, por aceptarme como su estudiante, tener fe en mí, incluso en esas ocasiones en las que ni yo misma creía en mí. Por enseñarme hacer ciencia y casi todo lo que se del laboratorio. No pude caer en mejores manos, ya que me ha impulsado a hacer cosas que jamás creí que podría hacer, como ir a un congreso internacional a mostrar mi trabajo y tener la oportunidad hacer técnicas de laboratorio que jamás creí que podría hacer sola. Muchas gracias por darme la libertad y confianza de exponer mis ideas sobre los experimentos. Y por último por su amistad y sabios consejos. Realmente me enseñó mucho a crecer como persona espero poder tener la oportunidad de trabajar de nuevo con usted.

A la mejor compañera de laboratorio que pude tener Citlalli, muchas gracias por enseñarme a ser más valiente y lo que es trabajar en equipo con alguien como tú, espero que en el futuro podamos volver a trabajar juntas. Aprender contigo fue una experiencia muy bonita que llevare conmigo por siempre.

A mis amigos Mimi, Ana y Adrián que no estuvieron conmigo en la carrera, pero sin su apoyo esto no hubiera sido posible. Un agradecimiento especial a Ana por enseñarme el amor a la ciencia y a dibujar en tableta gráfica. El dibujo de mi hipótesis fue gracias a tu ayuda.

Un agradecimiento especial al Doctor Fernando por su infinita paciencia, adoptarme unos días como parte de su equipo para enseñarme a hacer q-PCR y por sus sabios consejos a lo largo de mi tesis.

Otro agradecimiento especial a la señora Tere por ayudarme siempre en el laboratorio y escucharme siempre que me llegue a sentir mal.

A los Doctores de la carrera en Ciencias Agrogenómicas por sus enseñanzas a lo largo de la carrera. En especial para los Doctores Julio Amezcua y Carlos Yebra por su apoyo en la revisión de esta tesis.

A la Doctora Elvira por su revisión de esta tesis y sus consejos. También su equipo de trabajo por sus consejos, reactivos y material de laboratorio que se utilizó para realizar esta tesis.

Por otra parte, me gustaría agradecer a Jacobo por enseñarme todos sus consejos de laboratorio, utilice cada consejo que diste y gracias a ti me volví una máster en muchas cosas, espero algún día te pueda regresar todo ese apoyo que diste.

A mis amigos de laboratorio Juanito, Ariel, Caro y Michelle muchas gracias por esos momentos divertidos y por seguirme la corriente cada que quería organizar algo. Un agradecimiento especial a Ariel, Uriel y Caro por esperarme muchas veces a que terminara mis experimentos antes de irse del laboratorio.

Por último, pero no menos importante a mis amigos de la carrera Moni, Josh, Paul, Job, Juan, Brenda, Paula y Rodrigo por estar ahí desde que empecé la carrera hasta este momento donde estamos terminando esta etapa. Los mejores momentos en el laboratorio los pase con ustedes, muchas gracias. En especial quiero agradecer a Moni por estar ahí en los momentos que sentía que ningún experimento me iba a salir, su apoyo incondicional y los almuerzos juntas fueron una gran motivación para seguir intentándolo.

### 3. Resumen

La respuesta inmune innata contra los virus de ARN es esencial para inducir señales tempranas que podrían limitar la patogénesis viral y activarán la respuesta inmune adaptativa para eliminar la infección viral. El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) representa un modelo para comprender los mecanismos de señalización inmune innatos que podrían desencadenar la eliminación viral o permitir la persistencia en los cerdos. La evidencia experimental muestra que las glicoproteínas virales pueden unirse al receptor tipo Toll 4 (TLR4) e inducir la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) para mejorar la expresión de citoquinas proinflamatorias. Es fundamental evaluar los efectos inmunomoduladores de los péptidos en macrófagos porcinos y evaluar el papel de TLR4 y NFAT en la cascada de señalización que induce la expresión de citoquinas antivirales. En este trabajo evaluamos el efecto inmunomodulador del péptido GP5T3 de la GP5 del PRRSV, solo o encapsulado en nanopartículas de Poli (ácido metacrílico) (pMA), mediante la cuantificación de la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  en macrófagos porcinos, para dilucidar las vías de señalización inmunitarias innatas involucradas en una respuesta antiviral protectora contra PRRSV. Los resultados indican un aumento en la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN  $\gamma$  2 horas después de la estimulación con el péptido GP5T3 solo o encapsulado en nanopartículas de pMA. Sin embargo, en el caso de TLR4, existe un aumento de la expresión tras la estimulación con el péptido GP5T3 solo o encapsulado en nanopartículas de pMA, pero no es comparable con el mayor nivel de expresión inducido por la estimulación con lipopolisacáridos (LPS). La sobreexpresión de TLR4, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ 1 por parte de GP5T3 sugiere que GP5 de PRRSV desencadena la activación de vías de señalización inmunitarias innatas con efectos antivirales. Se propone estudiar si el péptido puede unirse a TLR4 y activar la vía de señalización de NFAT de manera análoga al lipopolisacárido.



## 4. Abstract

The innate immune response against RNA viruses is essential to induce early signals that could limit viral pathogenesis and will activate the adaptive immune response to clear the viral infection. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) represents a model to understand the innate immune signaling mechanisms that could trigger viral clearance or enable persistence in swine. Experimental evidence shows that viral glycoproteins can bind Toll-like receptor 4 (TLR4) and induce the activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and nuclear factor of activated T cells (NFAT) to enhance the expression of proinflammatory cytokines. It is essential to assess the immunomodulatory effects of the peptides in swine macrophages and evaluate the role of TLR4 and NFAT in the signaling cascade that induces the expression of antiviral cytokines. In this work we evaluated the immunomodulatory effect of peptide GP5T3 from GP5 of PRRSV, alone or encapsulated in Poly (methacrylic acid) (pMA) nanoparticles, by quantifying the expression of TLR4, IFN- $\alpha$ 1 and IFN- $\gamma$  in swine macrophages, to elucidate the innate immune signaling pathways involved in a protective antiviral response against PRRSV. The results indicate an increase in the expression of TLR4, IFN- $\alpha$ 1 and IFN  $\gamma$  2 hours after stimulation with the GP5T3 peptide alone or encapsulated in pMA nanoparticles. However, in the case of TLR4, there is an increase in expression after the stimulation with the GP5T3 peptide alone or encapsulated in pMA nanoparticles, but it is not comparable to the higher level of expression induced by lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The overexpression of TLR4, IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$ 1 by GP5T3 suggests that GP5 of PRRSV triggers the activation of innate immune signaling pathways with antiviral effects. It is proposed to study whether the peptide can bind to TLR4 and activate the NFAT signaling pathway in an analogous manner to lipopolysaccharide.

## 5. Introducción

### 5.1 Historia e Importancia del estudio de PRRSV

El virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) provoca una enfermedad que causa problemas respiratorios en lechones y abortos en cerdas (Wensvoort, G. et al 1991; Meulenberg, J. 2000). El virus se aisló por primera vez hace tres décadas en los Países Bajos (Meulenberg, J. 2000) y desde entonces, ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial (López-Heydeck *et al.*, 2015). Llegando a ser la enfermedad infecciosa porcina de mayor importancia económica en todo el mundo (Lunney, J. *et al.*, 2016).

En México se reportó por primera vez en 1992 y desde entonces PRRSV ocasiona hasta el 10% de pérdidas anuales en la producción de lechones en el país (López Heydeck *et al.*, 2013; Morrilla A, *et al.*, 2003).

Lamentablemente el virus sigue estando presente en la mayoría de los países de producción porcina ya que es muy difícil controlar la enfermedad. Esto es debido a la alta heterogeneidad del virus y la falla de la respuesta inmune adaptativa del cerdo para proteger completamente contra la reinfección, mediante anticuerpos neutralizantes (Dokland, T. 2010). Sólo se ha notificado libre de la enfermedad a Australia (Shi *et al.*, 2010), Suecia, Noruega y Nueva Caledonia (López-Heydeck *et al.*, 2015).

### 5.2 Virus de PRRSV: Genoma, variabilidad y estructura

El virus PRRSV pertenece a la orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus (López-Heydeck, S. *et al.*, 2015). La forma del virión de PRRSV se ha descrito como una forma esférica u ovalada con un diámetro aproximado de 50-60 nm (Lunney, J. *et al.*, 2016). Este virus se divide en dos genotipos: el virus europeo o tipo 1 y americano o tipo 2 (Dokland, T. 2010). Tienen tan solo de 55 a 70% de identidad de nucleótidos entre los dos genotipos, teniendo una diferencia considerable, tanto que se ha llegado a la hipótesis de que los dos linajes han evolucionado por separado a partir de un ancestro en común muy lejano (Lunney, J. *et al.*, 2016; Dokland, T. 2010).

Con respecto a su genoma, está conformado por ARN monocatenario de polaridad positiva, el cual tiene un tamaño aproximado de 15 Kb que contiene 10 marcos de lectura abierta (orfs -open reading frames) (Meulenberg, J. 2000; López-Heydeck *et al.*,2015). Los orf1a y orf1b codifican proteínas no estructurales pp1a y pp1ab, las cuales se procesan en al menos 16 proteínas no estructurales (nsps) (Lunney, J. *et al.*, 2016; Ma, J. *et al.*, 2021). Mientras que los orf2a, orf2b, orf3, orf4, orf5, orf5a, orf6, orf7 se traducen en la proteína (N) que forma la nucleocápside y las glicoproteínas estructurales que forman una envoltura lipídica que envuelve la membrana del virus como la glicoproteína M de membrana, E de envoltura, y las glicoproteínas (GP2,GP3,GP4,GP5). Siendo la glicoproteína GP5 y la proteína de M los principales componentes de la cubierta del virus (Meulenberg, J. 2000; Montaner-Trarbes *et al.*,2019; Ma, J. *et al.*, 2021).

### 5.2.1 La glicoproteína GP5

La glicoproteína GP5 es la proteína más variable de PRRSV con solo un 51-55 % de identidad de la secuencia entre los subtipos europeo y americano (Dokland, 2010). Esta proteína tiene un peso molecular de 25 kDa, se compone de 200 aminoácidos (López-Heydeck *et al.*, 2015) y es indispensable durante el proceso de infección ya que interacciona con los receptores de sialoadhesina de macrófagos alveolares de cerdo (López-Heydeck *et al.*, 2015). Además, se han identificado diferentes epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes; lo que la vuelve una proteína de interés para poder combatir esta enfermedad, ya que la finalidad de todas las vacunas es obtener este tipo de anticuerpos (Thaa *et al.*, 2013; Alcamí, J *et al.*, 2020).

### 5.3 Vías de transmisión y patogenia de PRRSV

Las vías de transmisión de PRRSV son por contacto directo con material contaminado por orina, heces fecales, semen, saliva, secreciones mamarias y transplacentarias de animales enfermos. Sin embargo, la vía principal de infección es el contacto con animales enfermos (López Heydeck *et al.*, 2015). La sintomatología de PRRSV consiste en fiebre, anorexia, postración, disnea en cerdas gestantes, diarrea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero, edema en párpados, conjuntivitis y depresión. Estos síntomas se empiezan a presentar a los dos o tres días después de la infección (Lager, K. 2002; López Heydeck *et al.*, 2015).

La infección por PRRSV se divide en tres etapas: infección aguda, persistencia y extinción (Lunney, J. *et al.*, 2016). La primera etapa comienza cuando el virus de PRRSV entra por vía oro-nasal y genital, propagándose a través de los nódulos linfáticos e infectando principalmente a macrófagos alveolares, células dendríticas y monocitos de los pulmones y el tracto respiratorio superior. Esto deriva en una viremia que aparece entre 6 y 12 horas después de la infección, la cual puede llegar a durar varias semanas a pesar de que se encuentren anticuerpos circulantes (López Heydeck *et al.*, 2015; Lunney, J. *et al.*, 2016). En la segunda etapa, la carga viral disminuye tanto que no se suele detectar el virus en la sangre y los pulmones. Durante este periodo, el virus se replica principalmente en órganos linfoides, incluidos las amígdalas y los ganglios linfáticos, a excepción del bazo. Posteriormente, en la etapa final, la carga viral decae gradualmente hasta que el virus se extingue en el huésped (Lunney, J. *et al.*, 2016). Desafortunadamente, no se sabe exactamente cuándo desaparece el virus, ya que PRRSV tiene las capacidades de inmunosupresión e inmunoregulación, que le permiten prolongar el tiempo de viremia en los animales enfermos hasta 200 días (López Heydeck *et al.*, 2013; LópezHeydeck *et al.*, 2015). Estas capacidades le permiten al virus permanecer inadvertido hasta que, en condiciones favorables, vuelve a manifestarse (López Heydeck *et al.*, 2013; Lunney, J. *et al.*, 2016).

## 5.4 Huésped y células blanco de PRRSV

Los cerdos son el único huésped natural conocido del PRRSV (Lunney, J. *et al.*, 2016) siendo las células blanco los macrófagos de pulmón alveolar porcino y los monocitos (Pol J *et al.*, 1992; López-Heydeck *et al.*, 2015). Por otra parte, también se ha reportado que las células dendríticas son permisivas al PRRSV (Lunney, J. *et al.*, 2016; Loving, C. *et al.*, 2007). Además de los macrófagos porcinos, la línea celular de riñón de mono verde africano MA-104 y derivados como MARC-145, son totalmente permisivos para la replicación *in vitro* de este virus (Lunney, J. *et al.*, 2016; Kim, H. *et al.*, 1993).

## 5.5 Replicación de PRRSV

La replicación viral empieza cuando el virus entra en contacto con la superficie celular del macrófago a través de glucosaminoglicanos (GAGs) de sulfato de heparán. Esta interacción promueve la unión entre el virus con la sialoadhesina. La sialoadhesina es una glicoproteína transmembranal de tipo 1. Esta glicoproteína funciona como un receptor de unión e

internalización de PRRSV a través del proceso de endocitosis mediado por clatrina (Ma, J. *et al.*, 2021). Finalizado el proceso de endocitosis, el genoma viral se libera en el citosol, este es traducido por los ribosomas de la célula infectada, empezando por las poliproteínas pp1a y pp1ab. Posteriormente, las proteasas de PRRSV hidrolizan y dividen a las poliproteínas en al menos 16 proteínas no estructurales (nsps). Por último, se arma el complejo de replicación y transcripción viral (RTC), el cual es ensamblado por nsps. Este complejo se encarga de la producción de cadenas negativas de longitud completa y sub-genoma (sg) de PRRSV utilizando un mecanismo de transcripción discontinua. El sub-genoma sirve como molde para la síntesis de ARNm (sg) de cadena positiva necesarios para expresar los genes de proteínas estructurales (Van Breedam *et al.*, 2010; Ma, J. *et al.*, 2021). Posteriormente se ensamblan los nuevos genomas de ARN generados por el RTC y se empaquetan en nucleocápsides. Esto con el fin de ser convertidos en viriones envueltos por proteínas estructurales a través de la gemación de las membranas intracelulares lisas. Para finalmente liberarlos de la célula, mediante exocitosis (Ma, J. *et al.*, 2021).

## 5.6 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del huésped contra cualquier agente infeccioso (Koyama *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2013). Esta primera línea de defensa está compuesta principalmente por barreras físicas como la piel y mucosas. Asimismo, estas barreras físicas cuentan con barreras químicas como péptidos antimicrobianos, alteraciones de pH, lípidos y enzimas antimicrobianas. En esta primera línea de defensa se encuentran diversas células inmunitarias como: monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK) (Koyama *et al.*, 2008; Lunney *et al.*, 2016).

La respuesta innata se caracteriza por tener sensores que se expresan en la membrana de la mayoría de las células que pueden reconocer a los agentes infecciosos. Estos sensores son conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patrones (Pattern Recognition Receptors -PRR, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* –PAMPs-, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño o peligro (*Damage-Associated Molecular Patterns* –DAMPs-, por sus siglas en inglés). De este tipo de sensores los principales son los receptores de lectina tipo c (*Myeloid C-type lectin receptors* –CLRs-, por sus siglas en inglés) y receptores tipo toll (*Toll-Like Receptors* –TLRs-, por sus siglas en inglés). En el caso de estos últimos, se encuentran tanto en células del sistema inmune innato, como del adaptativo, por lo tanto, se les considera como “el principal sistema de alarma del sistema inmune”. Por el momento

se conocen trece tipos de TLRs (TLR1 a TLR13) con diversas funciones como reconocer carbohidratos, péptidos, partes de hongos, partes de parásitos, ARN y ADN viral. En este trabajo nos enfocaremos en TLR4 que puede reconocer el lipopolisacárido bacteriano (LPS) de las bacterias Gram negativas (Martin *et al.*, 2013).

### 5.6.1 Vía de señalización de TLR4/LPS

La vía de señalización de TLR4 cuando es estimulado con LPS, está ampliamente estudiada. A continuación, se muestra en la **figura 1** el modelo más aceptado.

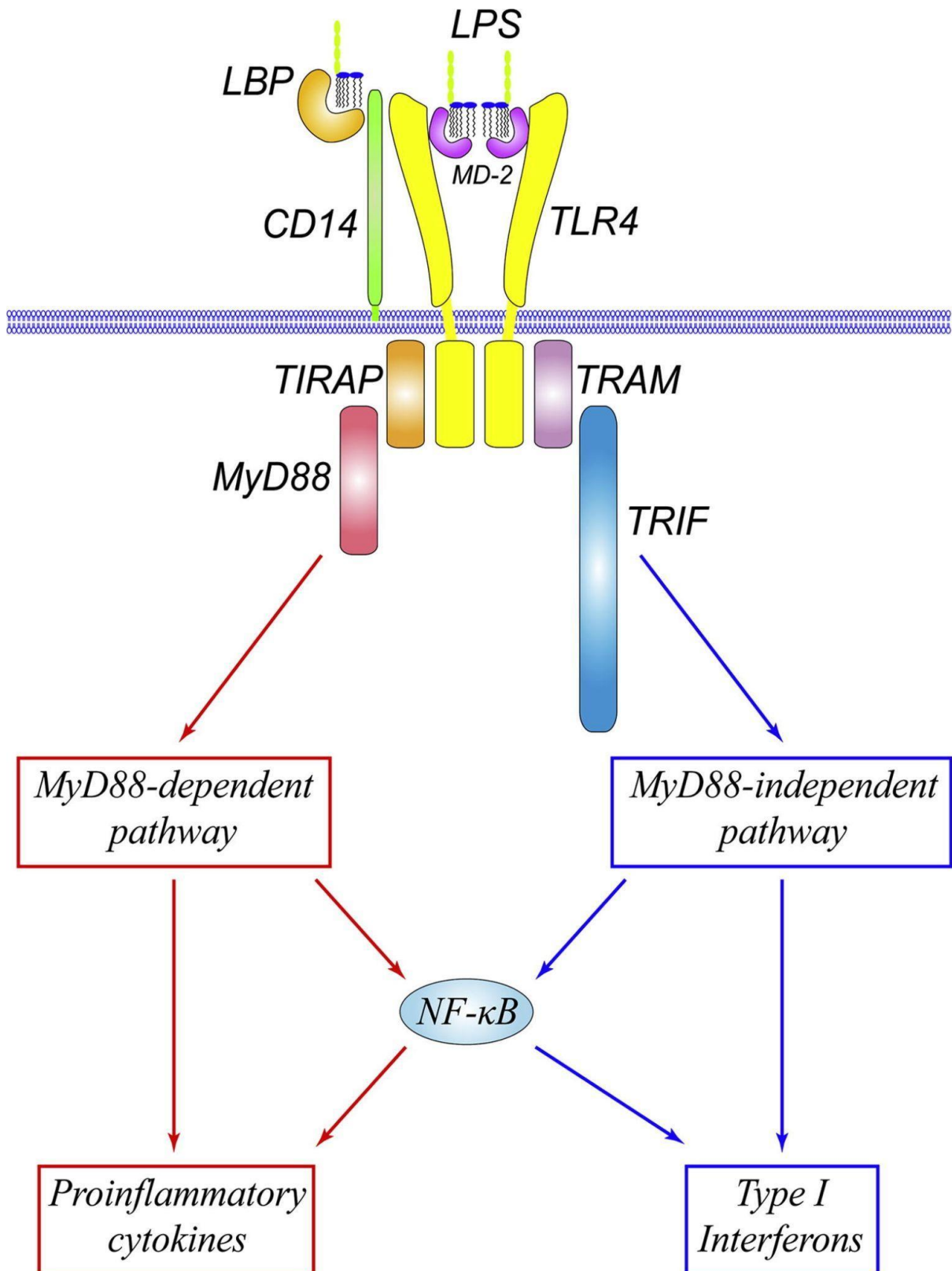


Figura 1. Vía de señalización de TLR4/LPS independiente y dependiente de MyD88. Mediante el complejo TLR4/MD-2, LBP y CD14 facilitan el reconocimiento de LPS. La señalización de LPS/TLR4 se divide dos vías, la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88, que median la activación de genes de citocinas proinflamatorias e interferón tipo I (Lu *et al.*, 2008).

El modelo consiste en que tras la estimulación del receptor TLR4 con LPS, este receptor sufre una oligomerización y recluta sus adaptadores citoplasmáticos (intracelulares) a través de interacciones con dominios TIR (*receptor Toll-interleucina-1* por sus siglas en inglés), los cuales median las interacciones proteína-proteína entre los TLR y las proteínas adaptadoras de transducción de señales (Lu *et al.*, 2008). TIR consta de cinco dominios que contienen proteínas adaptadoras las cuales son: SARM, una proteína que contiene motivos armadillo, la cual suprime la señalización inmune en lugar de promoverla (Carlsson *et al.*, 2016). Por otro lado está la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR inductor de interferón- $\beta$  (*TIR-domain-containing-adaptor-inducing interferon- $\beta$ -TRIF*, por sus siglas en inglés) esta proteína media la señalización independiente de MyD88. La proteína TRAM se asocia con la membrana plasmática a través de miristoilación y es esencial para la transducción de señales de TLR4 y también funciona como molécula adaptadora relacionada con TRIF. La proteína TIRAP ayuda a la asociación entre la proteína MyD88 y el dominio citoplásmico TLR4 para iniciar la señalización dependiente de MyD88. Por último, la proteína MyD88 tiene la función de adaptador crítico en la vía de señalización del receptor de interleucina-1 (Lu *et al.*, 2008).

Tras la estimulación con LPS la vía de señalización de TLR4 puede ser independiente de MyD88 o dependiente de MyD88. En la vía independiente de MyD88, TRIF recluta al Factor 3 asociado al receptor de TNF (*TNF Receptor Associated Factor-3-TRAF3*, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 que interactúa con el receptor (*receptor-interacting protein-1-RIP1*, por sus siglas en inglés) para activar los factores de transcripción, el factor regulador de interferón 3 (*Interferon Regulatory Factor 3-IRF3*, por sus siglas en inglés) junto con factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-NF-kB*, por sus siglas en inglés) los cuales activan la transcripción de genes diana, como los interferones de tipo I. Estos son importantes para las respuestas antivirales y antibacterianas (Lu *et al.*, 2008).

En la vía dependiente de MyD88, la proteína MyD88 activa quinasas asociadas al receptor de interleucinas (IL) (*Interleukin-1 receptor-associated kinase-IRAKs*, por sus siglas en inglés) y al Factor 6 Asociado a Receptor de TNF (*TNF receptor-associated factor 6-TRAF6*, por sus siglas en inglés) así como a los factores de transcripción NF-kB, a la Proteína Activadora 1 (*Activator protein-1-AP-1*, por sus siglas en inglés) y al factor regulador de interferón 5 (*Interferon regulatory factor 5-IRF5*, por sus siglas en inglés) aguas abajo. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes de citocinas proinflamatorias (Lu *et al.*, 2008).



## 5.6.2 Citocinas proinflamatorias

Las citocinas son moléculas del sistema inmune, las cuales tienen la función de regular las respuestas del huésped frente a infecciones, las respuestas inmunitarias, la inflamación y los traumatismos (Dinarello *et al.*, 2000). Las citocinas proinflamatorias tienen diversas funciones entre las cuales se encuentran la cicatrización de heridas, la activación de distintos tipos celulares, y efectos antivirales e inmunorreguladores (Filella *et al.*, 2002; Filella *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2019). Un grupo importante de estas citocinas son los interferones entre los que se encuentran IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfoxina (De la Cruz Conde, 2014). Los interferones son producidos por una gran variedad de células entre las cuales se destacan los macrófagos y los linfocitos B. Estas citocinas se caracterizan por sus efectos antivirales y por su efecto regulador de las células del sistema inmunitario (Filella *et al.*, 2002).

## 5.6.3 IFN $\alpha$

El interferón alfa (IFN  $\alpha$ ) pertenece a la familia de interferones tipo I que se caracteriza por sus efectos antivirales, anti proliferativos, pro-apoptóticos e inmunorreguladores (Sánchez *et al.*, 2019).

## 5.6.4 IFN $\gamma$

El interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) pertenece a la familia de interferones tipo II que se caracteriza por sus efectos antivirales, inmunomoduladores y antiproliferativos. En macrófagos aumenta su capacidad citotóxica y fagocítica (Mata *et al.*, 2008).

## 5.7 Respuesta inmune innata contra PRRSV

La respuesta inmune innata del cerdo se distingue por la activación de los TLRs 3, 7 y 8 que reconocen ARN viral, y que a su vez activan señales para la expresión de citocinas antivirales, como lo es, la vía de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, existe evidencia sólida de que glicoproteínas virales como la GP5 pueden ser reconocidas por el receptor TLR4 e inducir la activación del Factor nuclear de las células T activadas (NFAT) (Olejnik *et al.*, 2018). NFAT induce la transcripción de citocinas proinflamatorias que modulan la eficacia de la respuesta inmune para controlar la enfermedad y eliminar el virus (Olejnik *et al.*, 2018).

Sin embargo, PRRSV evade la respuesta inmune al modular de las vías NF-kb y NFAT (An et al., 2020; Liang et al., 2017) y propicia una infección crónica. Una rápida activación de esta respuesta inmune es esencial para prevenir la replicación viral e iniciar una fuerte respuesta inmune adaptativa para luchar contra el virus (Lunney *et al.*, 2016).

Por otra parte, los lechones suelen sufrir una infección mucho más fuerte de PRRSV en comparación con los cerdos adultos. Esto debido a que tienen un sistema innato poco desarrollado. Algunas de las carencias de este sistema inmune en lechones son: una respuesta limitada para contrarrestar las estrategias de evasión inmunitaria viral (Lunney *et al.*, 2016) y la ineficiencia de las células NK en su actividad citotóxica debido a su pequeño tamaño y carencia de gránulos intracelulares (Gerner *et al.*, 2009). Por otra parte, el virus desregula la modulación innata y adaptativa del huésped, lo que resulta en infecciones secundarias persistentes crónicas (Lunney *et al.*, 2016).

## 5.8 Vía de señalización NFAT

El Factor Nuclear de las células T activadas o por su abreviación en inglés NFAT, es una vía de señalización de la respuesta inmune innata que se caracteriza por su regulación mediada por  $Ca^+$  y serina fosfatasa calcineurina dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (Olejnik et al., 2018; Hogan *et al.*, 2003) la cual da como resultado la translocación del NFAT activado al núcleo y la producción de citocinas inflamatorias (Figura 2) (Elloumi *et al.*, 2012).

El papel de NFAT se ha estudiado muy bien en las células T, pero también se ha reportado que NFAT media la expresión génica en otras células del sistema inmunitario. Sin embargo, su papel en otras células no se ha estudiado muy bien (Elloumi *et al.*, 2012).

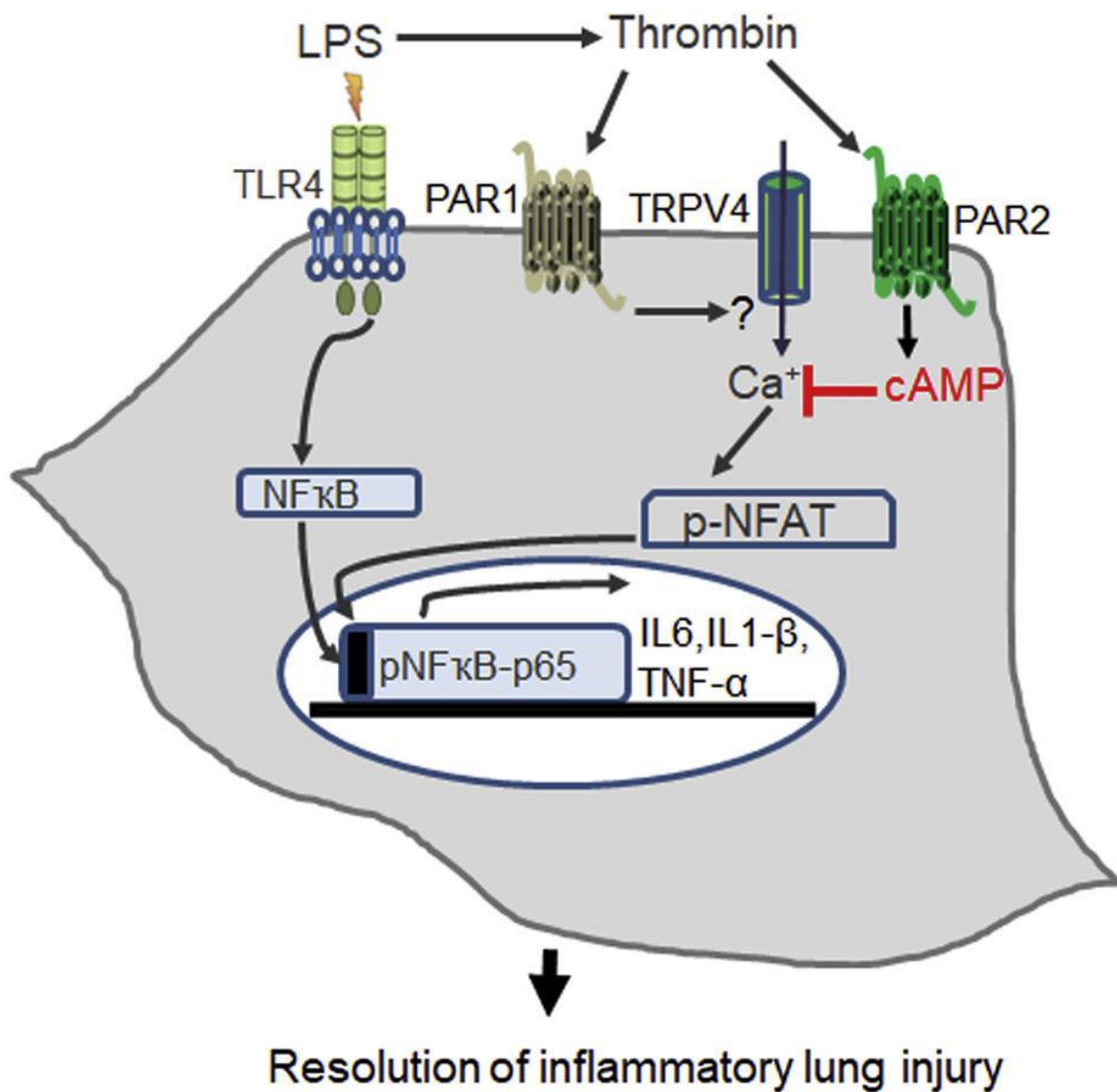


Figura 2. Vía de señalización NFAT y NF-Kb en macrófagos alveolares. El receptor TLR4 al reconocer LPS de patógenos, activa dos factores de transcripción, NF-kB y NFAT. Este último se activa cuando TLR4 genera trombina que activa el receptor de la proteasa AM2, el cual provoca la disminución de Ca<sup>+</sup>, activando este factor de transcripción. De esta forma ambos factores de transcripción desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por citocinas proinflamatorias (Rayees *et al.*, 2019).

Canónicamente en macrófagos alveolares se ha reportado que desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por el factor de transcripción NF-kB cuando el receptor TLR4 es activado por patógenos (Rayees *et al.*, 2019; **Figura 2**).

Sin embargo, también se ha reportado que se puede desencadenar una señal por medio del receptor activador de la proteasa AM 1 (*AM protease activating receptor 1-PAR1*, por sus siglas en inglés). Ya que muestran que el receptor TLR4 genera trombina que activa el receptor de la proteasa AM 2 (*AM protease activating receptor 2-PAR2*, por sus siglas en inglés), el cual genera cAMP que suprime la entrada de  $\text{Ca}^+$  a través del canal TRPV4. Por lo tanto, la eliminación de PAR2 aumenta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de TRPV4, lo que provoca la activación del factor de transcripción NFAT. Una vez traducida la señal, en el citoplasma la calcineurina le retira el fosfato NFAT-P. Quedando de forma activada NFAT. Posteriormente el factor de transcripción NFAT se transloca al núcleo y se une a una secuencia específica del ADN que codifica diferentes citocinas entre las que se encuentran Interleucinas e interferones. Al unirse el NFAT al ADN, promueve que la ARN polimerasa sintetice más ARN de esa región y por lo tanto haya más síntesis de proteínas, específicamente citocinas (Hogan *et al.*, 2003; Rayees *et al.*, 2019). Parte de esta vía la podemos observar en la **figura 2**.

## 5.9 Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa es la segunda línea de defensa en el sistema inmune. Esta respuesta tiene las siguientes características que la diferencian de la respuesta innata. La principal característica es la inmunidad que perdura por más tiempo, incluso puede perdurar toda la vida de un ser vivo. Pero una desventaja de este tipo de respuesta inmune es su lentitud en la primera ocasión que se presenta un patógeno ya que necesita expansión clonal de las células antígeno específicas. Después de que un patógeno es reconocido por los componentes de la respuesta adaptativa, se tiene una respuesta mucho más rápida y específica. Otra característica de esta respuesta inmune es la alta especificidad con la que combate microorganismos y macromoléculas, a diferencia de la innata, ya que esta suele dar una respuesta más general y rápida pero menos efectiva. Esta especificidad se desempeña por las células T y B con sus receptores de antígeno específicos, TCR (receptor de la célula T) y BCR (receptor de la célula B). (Martin *et al.*, 2013).

Las células B se caracterizan por ser parte de la respuesta inmune adaptativa “humoral” ya que crean anticuerpos que neutralizan a patógenos extracelulares o los etiquetan para posteriormente ser fagocitados, sin embargo, para que esto suceda necesitan ser activados. Los linfocitos B se activan con señales. La primera señal es provocada por la estimulación de un antígeno que reconocen específicamente a través de su BCR. El antígeno es internalizado dentro de los linfocitos B donde es procesado y vuelto a expresar en forma de péptidos por

medio de moléculas de MHC II. La segunda señal para la activación de los linfocitos B se divide en 2 tipos: dependiente de T e independiente de T. Sin embargo, los dos tipos de activación empiezan de la misma forma. En la activación dependiente de T, la segunda señal es proporcionada por un linfocito T al unirse a un linfocito B por medio de su receptor de antígeno (TCR) mediante una interacción entre CD40 sobre la célula B y CD40L sobre la célula T activada. En la activación independiente de T la segunda señal viene de un antígeno, como el Lipopolisacárido (LPS), que se une a receptores de la respuesta inmune innata como los TLRs, por lo que pasan de ser linfocitos B vírgenes a linfocitos B activados. Más adelante, estos Linfocitos activados darán lugar a células plasmáticas secretoras de anticuerpos y a las células B de memoria (Martin *et al.*, 2017)

Las células T se caracterizan por ser parte de la respuesta inmune adaptativa “celular” ya que tienen receptores específicos que son capaces de reconocer antígenos presentados por otras células. Las células T se diferencian de las células B por reconocer antígenos procesados enzimáticamente y presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA). Estas son principalmente células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Las células T se dividen en dos poblaciones, los linfocitos CD8+ y los linfocitos CD4+. La diferencia en la activación entre linfocitos CD4+ y CD8+ es que los linfocitos CD4+ se activan al reconocer antígenos presentados por moléculas de histocompatibilidad II que son expresadas por las células CPA. Mientras que los linfocitos CD8+ se activan al reconocer antígenos presentados en moléculas de histocompatibilidad I, las cuales pueden ser presentadas por todos los tipos de células nucleadas. Por último, cuando los linfocitos CD4+ son activados dos cosas pasan; al igual que las células B empiezan a proliferar muchas copias de sí misma, y un subconjunto de estas copias se diferencia en células T colaboradoras efectivas. El otro subconjunto se convierte en células T colaboradoras de memoria (Martin *et al.*, 2017).

## 5.10 Respuesta inmune adaptativa contra PRRSV

La respuesta inmune adaptativa contra PRRSV se divide en dos partes: 1) la respuesta celular y 2) la respuesta humoral. La respuesta celular contra PRRSV está protagonizada por los linfocitos T CD4+, los cuales ejecutan una reacción lenta y tardía. Se ha reportado una respuesta por parte de las células T contra PRRSV comenzando a partir de las cuatro semanas post infección, la cual con el tiempo vuelve a disminuir, lo cual también indica una respuesta irregular por parte de estos (Lopez, *et al.*, 2004). Por otro lado, la respuesta humoral contra PRRSV es lenta e irregular, debido a que después de la exposición de este virus la aparición de los anticuerpos neutralizantes contra PRRSV tardan en aparecer y son

deficientes. Por el momento solo se han encontrado anticuerpos neutralizantes, a partir de la cuarta semana post infección (Yoon et al., 1994; Meier et al., 2000; Meier et al., 2003; Lopez, et al., 2004). Es importante tener anticuerpos neutralizantes ya que son encargados de evitar la entrada del virus a la célula (Klasse & Sattentau, 2002; Lopez, et al., 2004). Específicamente se necesitan anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la glicoproteína GP5 de PRRSV, ya que se ha reportado que la aparición de este tipo de anticuerpos contra esta glicoproteína coincide con la eliminación del virus en la sangre de un cerdo infectado (Lopez, et al., 2004)

La respuesta inmune innata y adaptativa contra PRRSV es deficiente. Esto debido a la supresión y desregulación inmunitaria que resulta en una eliminación viral incompleta y deficiente en la mayoría de los cerdos, en función de su edad y estado inmunitario (Lunney et al., 2016).

## 5.11 Candidatos vacunales actuales

En el año 2007 se establecieron los estándares que tenían que cumplir las nuevas vacunas contra este virus. Los cuales eran rápida inducción de inmunidad, protección contra la mayoría de las cepas de PRRSV prevalentes en la actualidad, ausencia de resultados adversos para la salud de los cerdos y capacidad para diferenciar los animales vacunados de los infectados. Para el año 2017 no se reportó ninguna vacuna que cumpliera con estos estándares (Rock, 2007; Nan et al., 2017).

Actualmente existen diversos tipos de vacunas contra PRRSV que han sido autorizadas según el genotipo viral circulante del país, entre las cuales se encuentran vacunas con virus vivos modificados (MLV) como ReproCyc® PRRS EU (Boehringer Ingelheim), Ingelvac PRRSFLEX® EU (Boehringer Ingelheim), Pyrsvac-183 (Syva), Amervac-PRRS (Hipra) y Porcilis® PRRS (Merck) (Nan et al., 2017).

Vacunas de PRRSV inactivadas como Progressis® (Merial Labs) y PRRomiSe® (Intervet) (Nan et al., 2017) han sido aprobadas en la mayoría de países por su mayor seguridad a diferencia de las vacunas MLV. Sin embargo, se ha reportado que este tipo de vacunas tienen un rendimiento deficiente contra PRRSV ya que no producen anticuerpos específicos detectables contra PRRSV y por la falta de respuesta de inmunidad mediada por células (*Cell-Mediated Immunity-CMI*, por sus siglas en inglés) (Chareerntanakul, 2012; Kim et al.,

2011; Nan *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha visto que formulaciones de virus inactivados encapsulados en nanopartículas aumentan la respuesta inmune en este tipo de vacunas, como es el caso de una vacuna de PRRSV inactivada y encapsulada en nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (Binjawadagi *et al.*, 2014; Nan *et al.*, 2017).

Existen otro tipo de vacunas que han sido reportadas. Vacunas de PRRSV vectorizadas por virus que suelen estar en vectores de poxvirus y de adenovirus. Por ejemplo, la vacuna hAdV/ORF5 la cual está en un vector adenoviral de humanos de tipo 5 con replicación defectuosa (*Human type 5 adenoviral vectors-hAdV*, por sus siglas en inglés), la cual obtuvo resultados prometedores al inducir la producción de anticuerpos contra glicoproteína GP5 de PRRSV (Gagnon *et al.*, 2003). Vacunas experimentales de DNA, con plásmidos que expresan las proteínas de PRRSV, tales como la vacuna de ADN de células T en mosaico GP5, que expresa la glicoproteína GP5 de PRRSV, la cual indujo un aumento de expresión de ARNm de IFN- $\gamma$  y de anticuerpos neutralizantes contra PRRSV, sin embargo, no confiere una protección total contra el virus (Cui *et al.*, 2016).

Por último, se cuenta con vacunas de subunidades del virus, por ejemplo, PRRomiSe® (PRRSV-2) (Nan *et al.*, 2017), sin embargo, las vacunas de PRRSV vectorizadas por virus, de subunidades y de ADN parecen ser menos efectivas que las vacunas del virus atenuado MLV (Charerntantanakul, 2012; Nan *et al.*, 2017).

Las vacunas actuales no son capaces de controlar la enfermedad, puesto que hay un alto grado de variabilidad en las cepas de PRRSV, no inducen anticuerpos neutralizantes y falta de respuesta de inmunidad mediada por células. Por otro lado, al evolucionar, el virus se adapta a la inmunidad existente y resurgen como nuevas variantes para causar nuevos brotes (Morgan *et al.*, 2013; Nan *et al.*, 2017).

## 5.12 Nanopartículas de pMA

Las nanopartículas son materiales de metal o polímeros demasiado pequeños para ser vistas por el ojo humano, su tamaño ronda entre los 1- 100 nm. Su tamaño pequeño les permite ser usadas como vehículo para transportar diversos fármacos, de aquí su interés por este tipo de materiales en el área de la salud (Oroz, M., 2009). Existen diversos tipos de nanopartículas: de oro, de plata y de diversos polímeros, entre los que se encuentran las nanopartículas de Poli (ácido metacrílico). Este tipo de nanopartículas son ampliamente utilizadas en pruebas biomédicas, sin embargo, aún no se han probado todas sus cualidades (Montenegro, 2017).

Por lo que probar y explotar sus cualidades en conjunto con péptidos de la glicoproteína GP5 contra PRRSV resulta de gran importancia.



## 6. Justificación

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es el virus que causa más pérdidas económicas a nivel mundial (López-Heydeck et al., 2015), ya que provoca una enfermedad que causa problemas respiratorios en lechones y abortos en cerdas (Wensvoort, G. et al 1991; Meulenberg, J. 2000). Por otra parte, PRRSV puede permanecer en las amígdalas del cerdo por más de 200 días y pasar desapercibido hasta que en condiciones favorables resurgir y provocar brotes. A pesar de que se han desarrollado vacunas en estos últimos 20 años, no logran controlar la enfermedad (Rock, 2007; Nan et al., 2017).

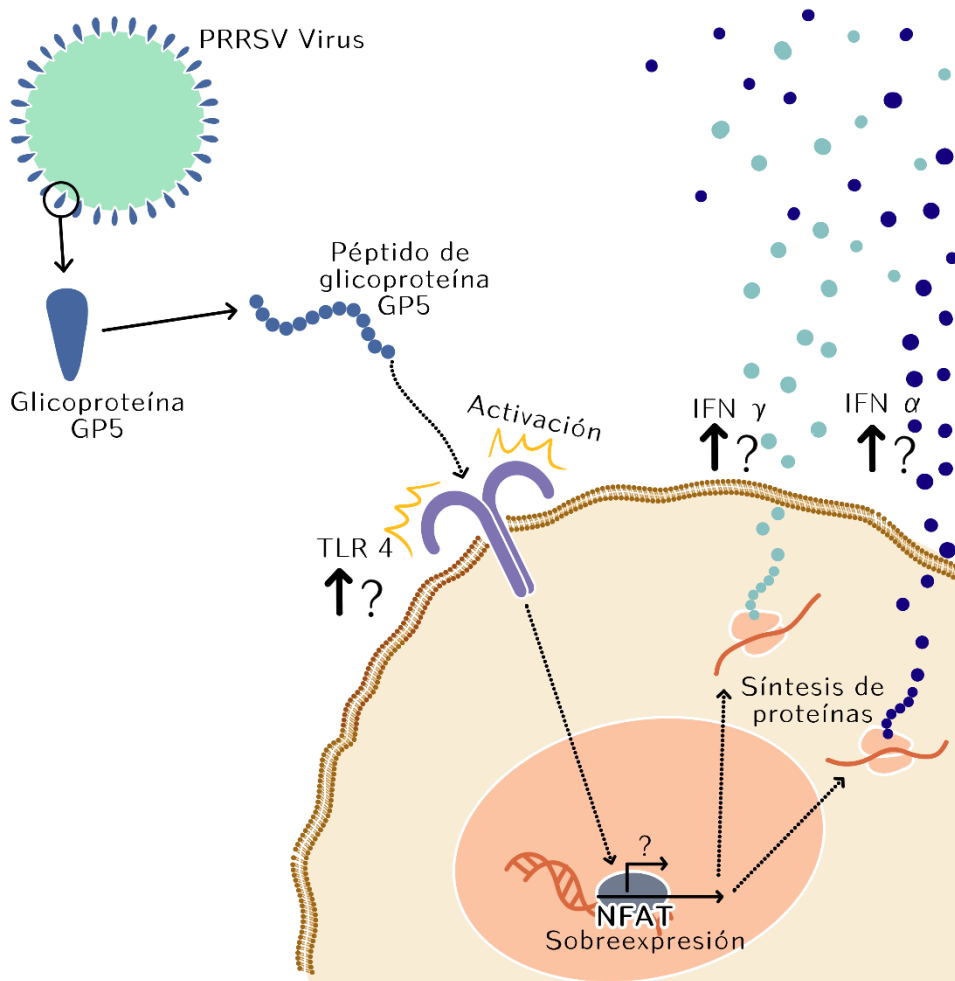
La evidencia experimental muestra que las glicoproteínas virales pueden unirse al receptor tipo Toll 4 (TLR4) e inducir la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Olejnik et al., 2018) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Liang et al., 2017) para potenciar la expresión de citocinas proinflamatorias.

Por lo tanto, un mejor entendimiento de los mecanismos de la respuesta inmune innata mediada por TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  contra el PRRSV puede ayudar a comprender los mecanismos que limitan la infección y la evasión de la respuesta inmunitaria, lo cual ayudará en la determinación de nuevas estrategias para desarrollar vacunas más eficaces.

## 7. Hipótesis

El péptido GP5T de PRRSV, solo o encapsulado en nanopartículas, inducirá la sobreexpresión de TLR4 y de citocinas inflamatorias en macrófagos de cerdo.

En la **figura 3** ilustra la hipótesis de este trabajo:



**Figura 3.** Hipótesis de la respuesta a la estimulación con el péptido de la proteína GP5 de PRRSV. En esta figura se esquematiza la hipótesis de la respuesta a la estimulación con el péptido GP5 de PRRSV. La cual consiste en la activación del receptor TLR4 y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias mediante la inducción de cascadas de señalización intracelular, como NFAT.

## 8. Objetivos

### 8.1 Objetivo General

Estudiar la respuesta inmune de macrófagos porcinos en respuesta a la estimulación con el péptido de la proteína GP5 de PRRSV para identificar mecanismos que promuevan una respuesta inmune eficaz contra la infección.

### 8.2 Objetivos específicos

- 1.-Estandarizar el cultivo *in vitro* de macrófagos porcinos 3D4/31.
- 2.-Estandarizar un ensayo de estimulación para macrófagos 3D4/31 con péptidos de la proteína GP5 de PRRSV.
- 3.-Analizar y cuantificar la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  en macrófagos 3D4/31 estimulados con péptidos de GP5.

## 9. Materiales y Métodos

### 9.1 Estandarización de cultivo de macrófagos porcinos 3D4/31

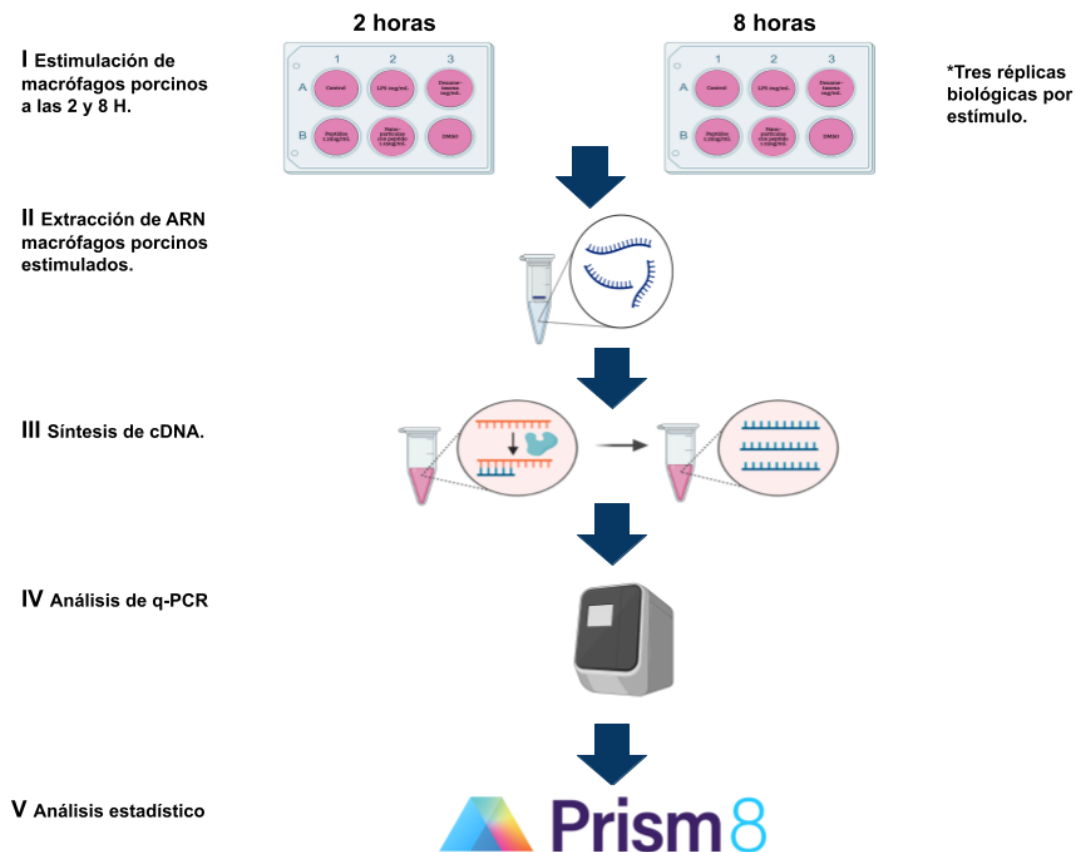
La línea celular de macrófagos porcinos 3D4/31 fue amablemente proporcionada por la Dra. Rosa Elvira Núñez de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las células fueron mantenidas en cajas de 100 mm x 20 mm con medio RPMI-1640 (Gibco, No. cat. 11875-093) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) No. cat. 26140079, 1% de antibiotico-antimicótico (Gibco, No. cat. 15240-96) y 1% de Anfotericina (Gibco, No. cat. 15290-018). Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Acosta Sánchez, 2017). Los pases de las células se daban cada tres días, dándoles un lavado con 3 mL de PBS 1X estéril, agregándoles 3 mL de tripsina por caja de 100 mm x 20 mm, al despegarse las células se agregaba 3 mL de medio RPMI al 10% SFB, 1% antibiotico-antimicótico, y 1% anfotericina. Se homogeneizaron bien con la micropipeta de 1000 microlitros haciendo leves movimientos. Para la cuantificación se colocaron 10 microlitros de una mezcla 1:1 de las células y azul de tripano en una cámara Neubauer. Colocando 1 millón de células por caja de cultivo celular nueva con 6 mL de medio RPMI 10% SFB, 1% antibiotico-antimicótico, y 1% anfotericina. De esta forma, se obtuvieron 20 alícuotas de más de un millón de células por tubo que fueron guardadas a -80°C para los experimentos.

## 9.2 Estimulación de macrófagos porcinos 3D4/31 con péptidos de la proteína GP5 de PRRSV y péptidos de la proteína GP5 encapsulados en nanopartículas de pMA.

Se estandarizó un ensayo *in vitro* con 500,000 de macrófagos porcinos por pozo, los cuales fueron estimulados con estímulos control: medio RPMI 2% SFB con lipopolisacárido (LPS) a 2ug/mL y medio RPMI 2% SFB con dexametasona (DEXA) 1ug/mL; los estímulos experimentales: fueron medio RPMI 2% SFB con péptido GP5T3 (GP5T3) 1.25 ug/mL y medio RPMI 2% SFB con péptido GP5T3 en nanopartículas de pMA (GP5T3-pMA) 5 ug/mL. Los controles que se utilizaron fueron medio RPMI 2%SFB (Control) y medio RPMI 2% SFB con DMSO. Este control de DMSO se incluyó, ya que el péptido GP5T3 fue suspendido en DMSO. La preparación de estímulos se encuentra en ANEXOS.

### 9.3 Evaluación de la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ en macrófagos porcinos.

Para la evaluación de la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ . Se realizó la siguiente metodología descrita en la **figura 4**.



**Figura 4. Metodología para cuantificar la expresión de TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  en macrófagos porcinos.**

## 9.4 Extracción de ARN por el método de Trizol y electroforesis.

Se extrajo ARN de los macrófagos estimulados a las 2 y 8 horas post estimulación (hpi). La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo de lisis QIAzol® (TRIzol, Qiagen, No. ref. 15596026) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Se cuantificó con el aparato Nanodrop 2000 (marca Thermo Scientific) obteniendo una calidad de ARN promedio de 1.9-2.0 en A260/230. Por último, para evaluar la integridad del ARN purificado, se utilizó la técnica de electroforesis (Longworth, L. et al.1939) con un gel desnaturalizante el cual se realizó en un matraz de 125 mL con 0.3 g de agarosa y se disolvió con 25.6 mL de agua DEPC. Se calentó en un microondas en intervalos de 20 segundos hasta disolver por completo la agarosa. En campana de extracción se agregó 3 mL de MOPS 10X y 1.4 mL de formaldehído. Por último, se agregó 3 µL de SYBR safe (Invitrogen, No. cat. S33102).

Se vertió en un molde para geles de agarosa con su respectivo peine y se dejó solidificar por 15 minutos. Se cargaron 10 µL de la muestra de ARN y 2 µL de buffer de carga (Thermo Scientific, No. cat. R0641). Se corrió el gel con MOPS 1X bajo las siguientes condiciones: 100 V, 116 mA por 50 minutos.

## 9.5 Transcripción reversa

La metodología para realizar la RT-PCR que se utilizó fue la descrita por Minus, R. 2016. Se realizó en dos pasos, primero la síntesis de cDNA y posteriormente la amplificación de los genes de interés. Se utilizó el Kit SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience, No. cat. PCR-S11S) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones finales por reacción de cDNA de 20 µL fueron de 2500 ng de ARN, 50 pmol de oligo-dT20, SCRIPT RT Buffer complete 1x, dNTP Mix 500 µM, DTT stock solution 5 mM, RNase inhibitor 20 units, SCRIPT Reverse Transcriptase 100 units y se completó la reacción a 20 µL con agua libre de RNasas.

## 9.6 PCR punto final, diseño y estandarización de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se realizó para medir la expresión de GAPDH, como gen constitutivo, y TLR4, IFN-α1, IFN-γ como genes de interés. Se utilizó la herramienta del NCBI primer *designing tool* (Ye, J. et al., 2012) y se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. A continuación, se muestra la **tabla 1** con las especificaciones:

**Tabla 1. Diseño de oligonucleótidos**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	<b>Longitud del primer</b>	<b>TM</b>	<b>%GC</b>	<b>Longitud del amplicón</b>
<b>GAPDH- Forward- Porcino</b>	ACATCATCCCTG CTTCTACTGG	22	56.4 °C	50.00	187
<b>GAPDH- Reverse- porcino</b>	CTCGGACGCCTG CTTCAC	18	58.8 °C	66.7	187
<b>TLR4- Forward- porcino</b>	CAGATAAGCGAG GCCGTCATT	21	57.3 °C	52.4	114
<b>TLR4- Reverse- porcino</b>	TTGCAGCCCACA AAAAGCA	19	56.3 °C	47.4	114
<b>INFalpha14- Forward- porcino</b>	CATCCTCAACTC TCCTCACG	20	57.42° C	55.00	183
<b>INFalpha14- Reverse- porcino</b>	CATGAGGGGATC CAAAGTCC	20	57.64° C	55.00	183
<b>IFN-gamma- Forward</b>	GCTCTGGGAAAC TGAATGAC	20	61°C	50 %	167
<b>IFN-gamma- reverse</b>	TCTCTGGCCTTG GAACATA	19	61°C	50 %	167

La estandarización de la PCR para amplificar el gen constitutivo y los genes de interés se realizó con ADNc de macrófagos porcinos y la *Ruby Taq Master (2x)* de (Jena Bioscience No. cat PCR-164), con una concentración de 10 mM para ambos oligonucleótidos en reacciones



de 20µL. A continuación, se muestran los programas que se utilizaron para cada gen en la **tabla 2:**

**Tabla 2. Programación para la PCR de los genes GAPDH, TLR4, IFN-α1 e IFN-γ**

<b>Gen</b>	<b>TM</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Tiempo de alineamiento</b>
GAPDH	68.5°C	35 x	30 segundos
TLR4	66 °C	35 x	30 segundos
IFN-α1	66 °C	35 x	30 segundos
IFN-γ	63°C	35 x	30 segundos

La verificación de los productos del RT-PCR se realizó con la técnica de electroforesis (Longsworth, L. et al., 1939).

## 9.7 PCR cuantitativa

Se realizó la qPCR con el gen endógeno GAPDH, y los genes de interés TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ . La estandarización de los productos de PCR del gen constitutivo y genes de interés se realizó con el Kit qPCR SYBR Master High ROX de (Jena bioscience No. Cat PCR-374S) en reacciones de 10  $\mu$ L. La concentración que se utilizó para el par de oligonucleótidos fue de 10 mM. Se utilizaron 125 ng de cDNA por reacción.

A continuación, se muestran los programas que se utilizaron para cada gen para la qPCR.

**Tabla 3. Programación para la qPCR de los genes GAPDH, TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$**

Gen	TM	Número de ciclos	Tiempo de alineamiento
GAPDH	68.5°C	40x	1 minuto
TLR4	66°C	40x	1 minuto
IFN- $\alpha$ 1	66°C	40x	1 minuto
IFN- $\gamma$	63°C	40x	1 minuto

## 9.8 Análisis de -doble delta CT

Los resultados obtenidos a través de la PCR cuantitativa se analizaron con el método de doble delta CT ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) para cuantificar la expresión relativa de los genes IFN- $\alpha$ 1, IFN  $\gamma$  y TLR4. Se calcularon los datos del valor de CT de los genes de interés IFN- $\alpha$ 1, IFN- $\gamma$  y TLR4, con respecto al valor de CT del gen constitutivo GAPDH, como se describe en Rao *et al.*, 2013.

## 9.9 Análisis estadísticos

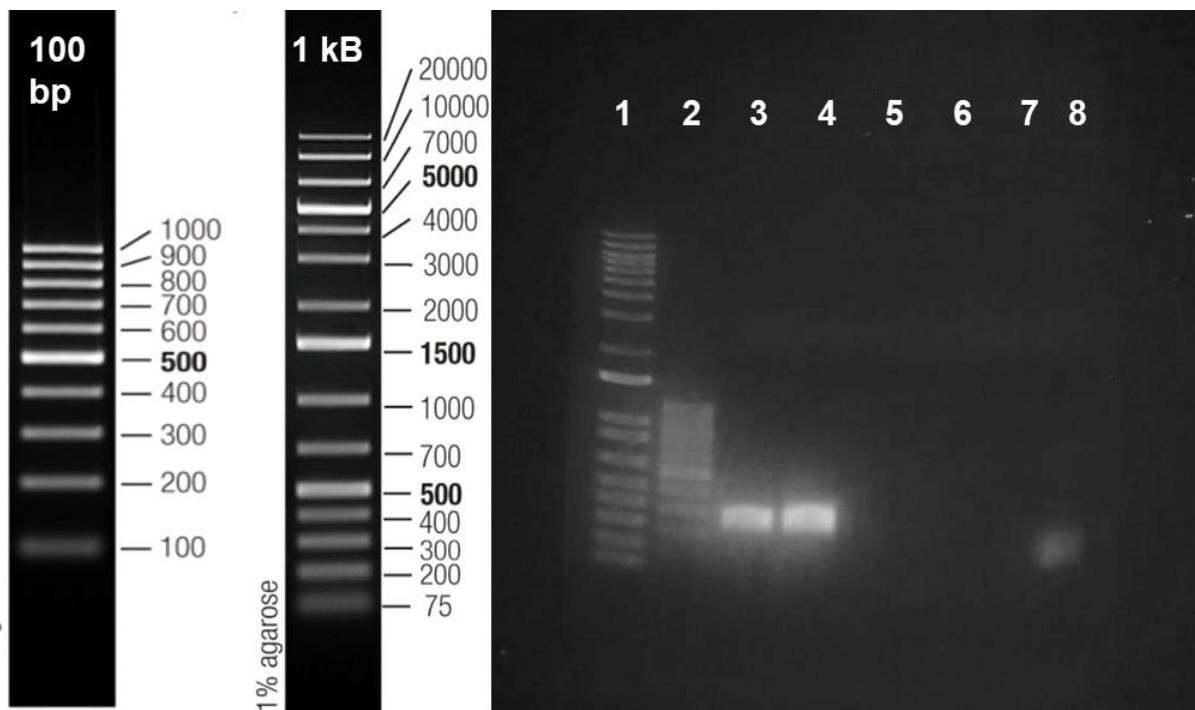
El análisis estadístico se realizó con RM-ANOVA de una sola vía y la prueba *post hoc* de Tukey. El general el nivel de significancia estadística que se utilizó fue menor a 0.05. Las gráficas se construyeron con el software GraphPad prism 8.0.0. (Swift., 1997).

## 10. Resultados

### 10. 1 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR

#### 10.1.1 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR GAPDH

Se realizó una PCR de gradientes para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos de GAPDH (**Figura 5**).

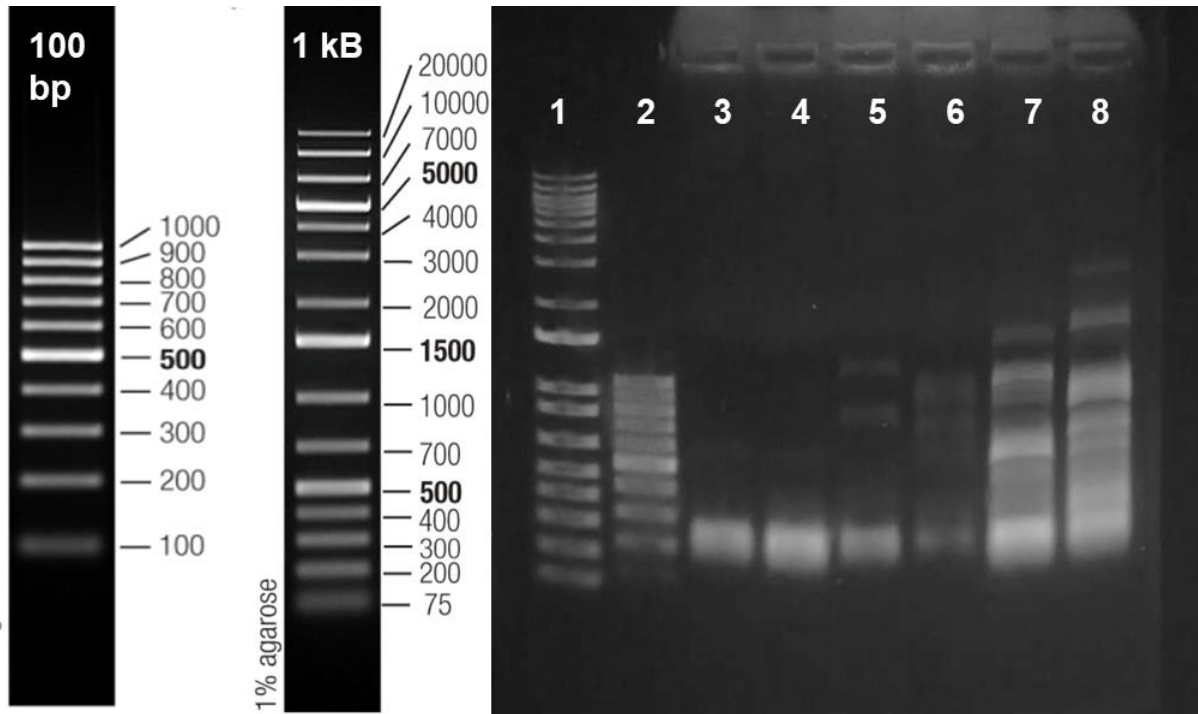


**Figura 5.** PCR de gradiente de temperatura para GAPDH. Gel de agarosa al 1% para productos de PCR utilizando muestras de cDNA de macrófagos estimulados utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. 1.- Marcador molecular 1 Kb, 2.- marcador molecular 100 pares de bases, 3.-68°C. 4.-68.5°C. 5.-69°C. 6.-69.5°C. 7.-70°C. 8.-70.5°C.

En la **figura 5** se observa que la temperatura óptima de amplificación para los oligonucleótidos del gen GAPDH es 68.5°C. En el carril 4 se muestra un producto de PCR de un tamaño aproximado de 187 pares de bases que coincide con el tamaño esperado (**Tabla 1**) Por lo tanto, se utilizó esa temperatura para los análisis de PCR y qPCR de GAPDH.

### 10.1.2 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR TLR4

Se realizó una PCR de gradientes para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos de TLR4 para así poder medir la expresión de esta citocina en cDNA de macrófagos estimulados (**Figura 6**).

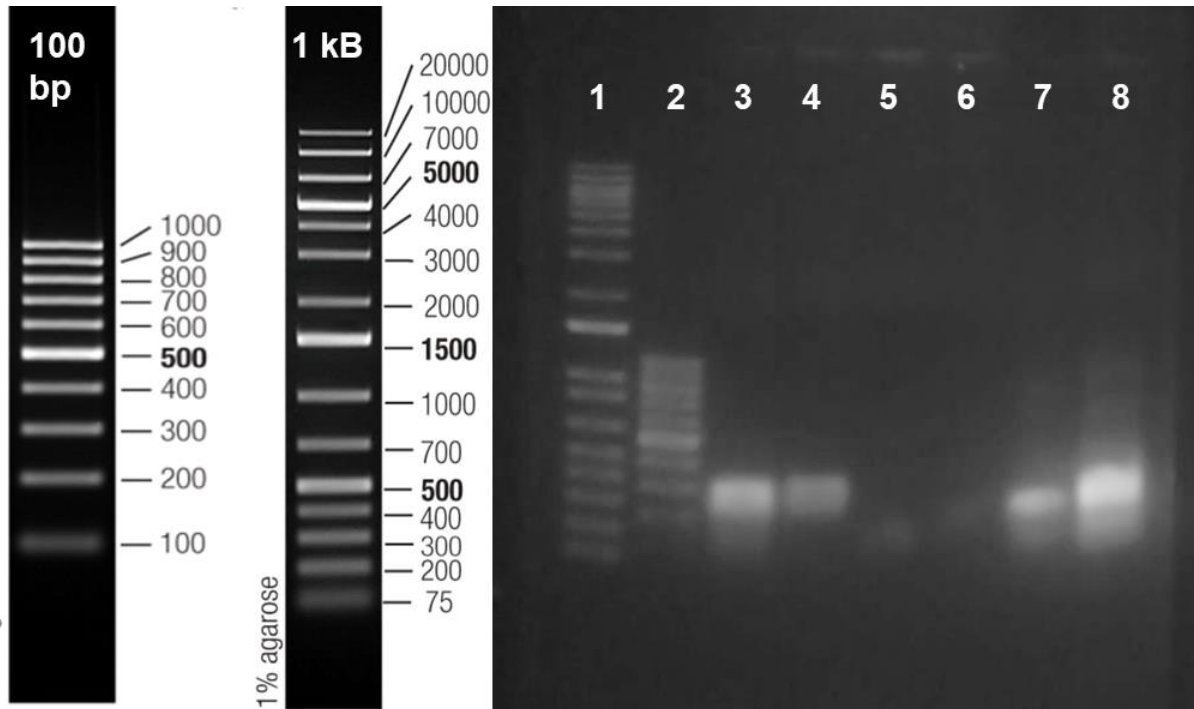


**Figura 6.** PCR de gradiente de temperatura para TLR4. Gel de agarosa al 1% para productos de PCR utilizando muestras de cDNA de macrófagos estimulados utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. 1.- Marcador molecular 1 Kb, 2.- marcador molecular 100 pares de bases, 3.- 66°C. 4.- 66.5°C. 5.- 67°C. 6.- 67.5°C. 7.- 68°C. 8.- 68.5°C.

En la **figura 6** se observa que la temperatura óptima de amplificación para los oligonucleótidos del gen TLR4 es 66°C. En el carril 3 se muestra un producto de PCR de un tamaño aproximado de 114 pares de bases que coincide con el tamaño esperado (**Tabla 1**). Por lo tanto, se utilizó esa temperatura para los análisis de PCR y qPCR de TLR4.

### 10.1.3 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR IFN- $\alpha$ 1

Se realizó una PCR de gradientes para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos de IFN- $\alpha$ 1 y así poder medir la expresión de esta citocina en cDNA de macrófagos estimulados (**Figura 7**).

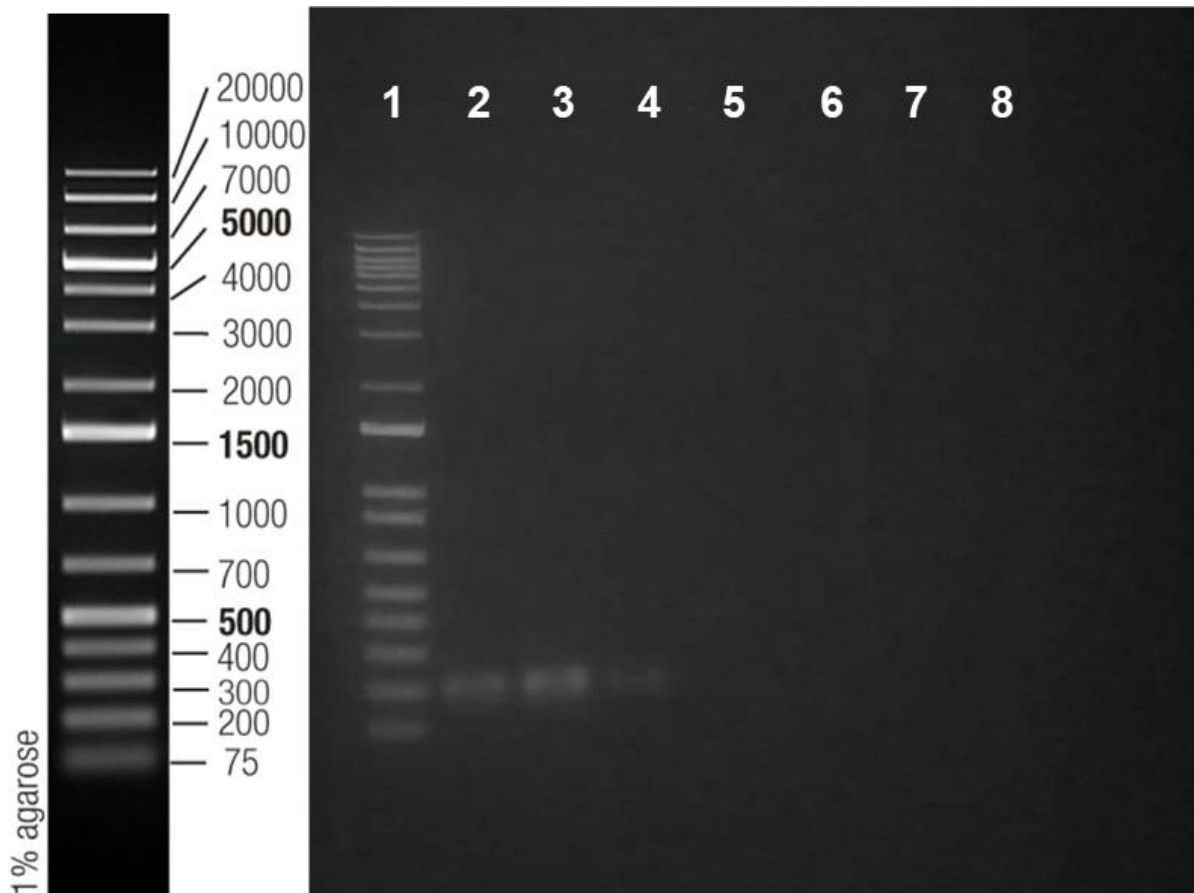


**Figura 7.** PCR de gradiente de temperatura para IFN- $\alpha$ 1. Gel de agarosa al 1% para productos de PCR utilizando muestras de cDNA de macrófagos estimulados utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. 1.- Marcador molecular 1 Kb, 2.- marcador molecular 100 pares de bases, 3.-65.5°C. 4.66°C. 5.-66.5°C. 6.67°C. 7.67.5°C. 8.-68°C.

En la **figura 7** se observa que la temperatura óptima de amplificación para los oligonucleótidos del gen IFN- $\alpha$ 1 es 66°C. En el carril 4 se muestra un producto de PCR de un tamaño aproximado de 183 pares de bases que coincide con el tamaño esperado (**Tabla 1**) Por lo tanto, se utilizó esa temperatura para los análisis de PCR y qPCR de IFN- $\alpha$ 1.

#### 11.1.4 Estandarización de oligonucleótidos para qPCR IFN- $\gamma$

Se realizó una PCR de gradientes para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos de IFN- $\gamma$  así poder medir la expresión de esta citocina en cDNA de macrófagos estimulados (**Figura 8**).

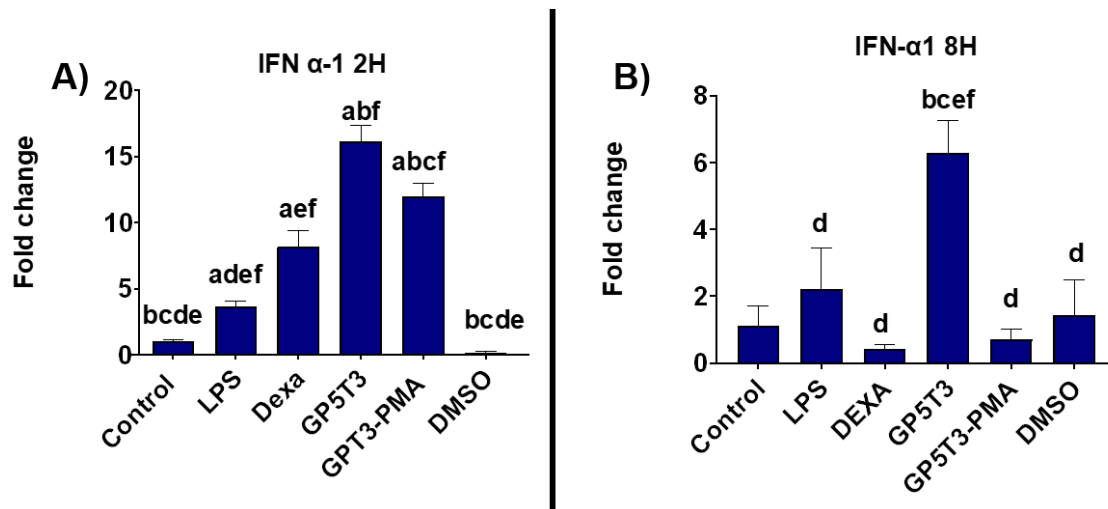


**Figura 8.** PCR de gradiente de temperatura para IFN- $\gamma$ . Gel de agarosa al 1% para productos de PCR utilizando muestras de cDNA de macrófagos estimulados utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb, 2.- 62°C. 3.- 63°C. 4.- 64°C. 5.- 65°C. 6.- 66°C. 7.- 67°C 8.- 68°C.

En la **figura 8** se observa que la temperatura óptima de amplificación para los oligonucleótidos del gen IFN- $\gamma$  es 63°C. En el carril 3 se muestra un producto de PCR de un tamaño aproximado de 183 pares de bases que coincide con el tamaño esperado (**Tabla 1**) Por lo tanto, se utilizó esa temperatura para los análisis de PCR y qPCR de IFN- $\alpha$ 1.

## 10.2 Análisis de expresión del receptor TLR4 y citocinas proinflamatorias después de la estimulación.

Mediante RT-qPCR se cuantificó la expresión del receptor TLR4 y de las citocinas IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  en macrófagos porcinos de la clona 3D4/31 estimulados por 2 y 8 horas con Lipopolisacárido 2 ug/mL (LPS, control) y Dexametasona 1ug/mL (DEXA). También fueron estimulados con los candidatos para vacuna GP5T3 solo (1,25 ug/mL) o encapsulado en pMA (GP5T3-pMA) nanopartículas (5ug/mL). Como controles se usó medio RPMI con 2% de SFB (Control) y medio RPMI con 2% de SFB y DMSO (DMSO). Los resultados obtenidos se normalizaron con el gen constitutivo GAPDH y se analizaron con el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Rao et al., 2013). En las **Figuras 9, 10 y 11** se muestran los gráficos de la expresión relativa de TLR4 y de las citocinas IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ .



**Figura 9.** Expresión relativa de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 y 8 horas post-estimulación.

La letra representa A) 2h post estimulación y B) 8 horas post estimulación. Las letras representan que son estadísticamente diferentes  $p \leq 0.05$  de a-Control, b-LPS, c-DEXA, d-GP5T3, e-Péptido GP5T3-pMA y f-DMSO. Los datos se analizaron con una RM-ANOVA de una vía y Tukey.

La **figura 9** representa la expresión relativa de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 y 8 horas post estimulación de M $\Phi$  3D4/31 con diferentes estímulos. Se observa que el candidato vacunal GP5T3 indujo un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación y es estadísticamente mayor al Control, LPS y DMSO ( $p \leq 0.05$ ).

Posteriormente podemos observar que el estímulo GP5T3-pMA indujo un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación estadísticamente mayor con respecto a casi todos los estímulos a excepción de GP5T3.

Con respecto a los estímulos control LPS y DEXA. El estímulo LPS indujo un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación. Esta expresión es estadísticamente mayor que el Control y DMSO. Por otro lado, es estadísticamente menor a GP5T3 y GP5T3-pMA. El estímulo DEXA indujo un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación. Esta expresión es estadísticamente mayor a la expresada por el Control y DMSO. Por otro lado, es estadísticamente menor a la expresión inducida por GP5T3-pMA.

No se muestra un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación con el Control y DMSO, ambos tienen una expresión estadísticamente menor con LPS, DEXA, GP5T3 y GP5T3-pMA.

Por último, en la expresión relativa a las 8 horas (**Figura 9-B**) se observa una disminución considerable de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 en casi todos los estímulos, a excepción de GP5T3. La expresión de IFN- $\alpha$ 1 con estímulo GP5T3 a las 8 horas post estimulación, aunque similar a la expresión a las 2 horas post estimulación, tiene una diferencia estadísticamente significativa mayor que LPS, DEXA, GP5T3-pMA y DMSO ( $p \leq 0.05$ ). A las 8 horas post estimulación con los demás estímulos no se observó un aumento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 estadísticamente significativa



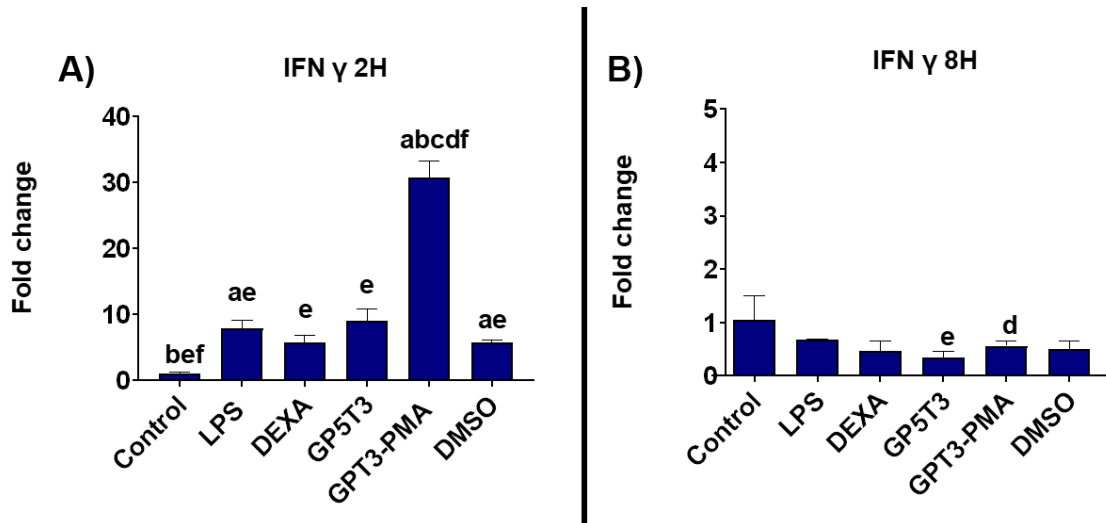


Figura 10. Expresión relativa de IFN- $\gamma$  a las 2 y 8 horas post estimulación.

La letra representa A) 2h post estimulación y B) 8 horas post estimulación. Las letras representan que son estadísticamente diferentes  $p \leq 0.05$  de a-Control, b-LPS, c-DEXA, d-GP5T3, e-Péptido GP5T3-pMA y f-DMSO. Los datos se analizaron con una RM-ANOVA de una vía y Tukey.

En la **figura 10** se representa la expresión relativa de IFN- $\gamma$  a las 2 y 8 horas post estimulación de M $\Phi$  3D4/31 con diferentes estímulos. Se observa que hay un aumento de la expresión de IFN- $\gamma$  con el candidato vacunal GP5T3-pMA es estadísticamente mayor comparada con los demás estímulos.

Por otro lado, la expresión de IFN- $\gamma$  a las 2 horas post estimulación con el GP5T3 solo es estadísticamente menor que la expresión inducida por GP5T3-pMA y no tiene diferencias estadísticamente significativas con la expresión inducida con los demás estímulos.

Con respecto a la expresión de IFN- $\gamma$  a las 2 horas post estimulación con los controles positivos, LPS y DEXA, se puede observar una expresión de IFN- $\gamma$  similar a la expresada por el estímulo GP5T3. Sin embargo, la expresión inducida por LPS es significativamente mayor a la expresión del Control y menor a la expresión de GP5T3-pMA. Mientras que la expresión inducida por DEXA solo es estadísticamente menor que la expresión de GP5T3-pMA.

Por otra parte, los controles DMSO y Control muestran expresiones diferentes. El Control no muestra un aumento de la expresión de IFN- $\gamma$  a las 2 horas post estimulación y la expresión es estadísticamente menor que la expresada por LPS, GP5T3-pMA y DMSO.

El control DMSO muestra un ligero aumento de la expresión de IFN- $\gamma$  a las 2 horas post estimulación, pero esta expresión solo es estadísticamente mayor a la expresada por el Control y estadísticamente menor a la expresión inducida por GP5T3-pMA (**Figura 10**).

Por último, en la **figura 10-B** se representa la expresión relativa de IFN- $\gamma$  8 horas post estimulación. Se puede observar que no aumentó la expresión de este gen. La única observación sería que la expresión inducida por GP5T3-pMA es significativamente mayor que la expresión por la estimulación con GP5T3 ( $p \leq 0.05$ ).

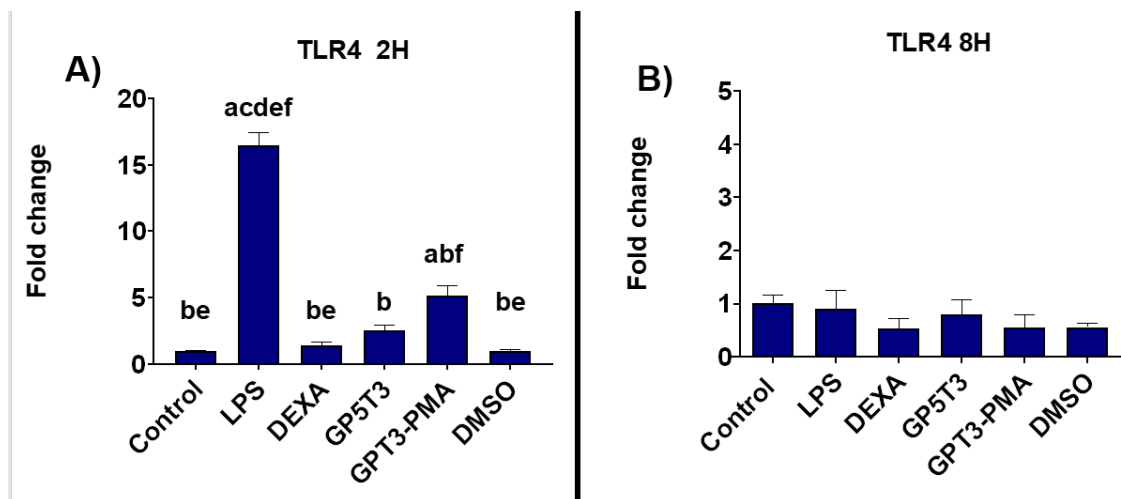


Figura 11. Expresión relativa de TLR4 a las 2 y 8 horas post estimulación.

La letra representa A) 2h post estimulación y B) 8 horas post estimulación. Las letras representan que son estadísticamente diferentes  $p \leq 0.05$  de a-Control, b-LPS, c-DEXA, d-GP5T3, e-Péptido GP5T3-pMA y f-DMSO. Los datos se analizaron con una RM-ANOVA de una vía y Tukey.

En la **figura 11** se representa la expresión relativa de TLR4 a las 2 y 8 horas post estimulación de M $\Phi$  3D4/31 con diferentes estímulos. Principalmente, se observa un aumento de expresión de este gen a las 2 horas post estimulación con el estímulo control LPS, como se esperaba y es estadísticamente mayor que los demás estímulos ( $p \leq 0.05$ ).

Por otra parte, se observa un aumento de la expresión de TLR4 a las 2 horas post estimulación por parte del estímulo GP5T3-pMA, aunque significativamente menor que la expresión inducida por el estímulo LPS, pero significativamente mayor que la expresión inducida por el Control y DMSO.

El estímulo control DEXA, no muestra un aumento de la expresión de TLR4 a las 2 horas post estimulación y solo es estadísticamente menor a la expresión inducida por LPS y menor que la expresión inducida por DMSO.

Por otra parte, los Controles DMSO y Control, no muestran un aumento de la expresión de TLR4 a las 2 horas post estimulación y tienen una diferencia estadísticamente menor a la expresión inducida por LPS y GP5T3-pMA.

Por último, en la **figura 11-B** no se observa ningún aumento estadísticamente significativo de la expresión de TLR4 a las 8 horas post estimulación.



# 11. Discusión

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) puede permanecer en las amígdalas de los cerdos por más de 200 días. Este virus pasa desapercibido hasta que, en condiciones favorables, resurge y provoca brotes (Lian *et al.*, 2017). A pesar de que se han desarrollado vacunas de virus vivo modificado, vectorizadas, DNA, Subunidades y del virus inactivado, no logran controlar la enfermedad (Rock, 2007; Nan *et al.*, 2017). Últimamente, se han desarrollado candidatos vacunales con nuevas formulaciones, en las que incluyen nanopartículas obteniendo muy buenos resultados (Binjawadagi *et al.*, 2014). Sin embargo, es fundamental encontrar anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína GP5, ya que se ha reportado que cuando hay este tipo de anticuerpos, coincide con la eliminación del virus (Lopez, *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha reportado que glicoproteínas virales pueden unirse al receptor tipo toll 4 (TLR4) de la respuesta inmune innata e inducir la activación del factor de transcripción NFAT para mejorar la expresión de citocinas proinflamatorias (Olejnik *et al.*, 2018). Para obtener una vacuna eficaz contra PRRSV es necesario activar de manera adecuada la respuesta inmune antiviral innata mediada por citocinas proinflamatorias y lograr la producción de anticuerpos neutralizantes por la respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, es fundamental evaluar los efectos inmunomoduladores de los péptidos de la glicoproteína GP5 de PRRSV solos o encapsulados en nanopartículas de pMA en macrófagos porcinos y evaluar el papel de TLR4 y NFAT en la cascada de señalización que induce la expresión de citocinas antivirales. Y de esta forma comprender los mecanismos que limitan la infección y la evasión de la respuesta inmunitaria. Esto determinará nuevas estrategias para desarrollar vacunas más eficaces.

## 11.1 Análisis de expresión relativa TLR4

Los resultados indican que el péptido GP5T3-PMA induce la sobreexpresión del gen TLR4 a las 2 horas post estimulación, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a Control y DMSO. Los resultados indican que el péptido encapsulado podría activar el receptor TLR4. Sin embargo, GP5T3 no indujo una expresión estadísticamente diferente de TLR4, por lo tanto, será necesario dilucidar si este efecto es por las nanopartículas o por el GP5T3. Se ha reportado que el uso de nanopartículas funciona muy bien como coadyuvante y por lo tanto provocan una respuesta inmunitaria a través del receptor TLR4 (Uto *et al.*, 2011). De igual manera, glicoproteínas virales pueden activar a este receptor (Olejnik *et al.*, 2018).

El estímulo control LPS indujo la mayor sobreexpresión de TLR4 como era esperado, ya que es el ligando por excelencia de este receptor. Diversos autores han demostrado que TLR4

reconoce al LPS de las bacterias Gram negativas e induce la expresión de este gen (Martin *et al.*, 2013; Olejnik *et al.*, 2018).

Por último, a las 8 horas post estimulación no se observa un aumento de expresión de este gen con ningún estímulo y tampoco hay diferencias estadísticamente significativas. Incluso con el estímulo LPS, el cuál fue el que tuvo un mayor aumento de expresión de TLR4 a las 2 horas. Esto concuerda con Bonin *et al.*, 2013 ya que se observó este mismo comportamiento en un experimento *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica de caballos, estimuladas con LPS, en el cual se observó que el pico de expresión de TLR4 fue en la primera hora post estimulación y a partir de ahí, la expresión disminuyó hasta ser indetectable.

Los resultados sugieren la participación de TLR4 en respuesta a la estimulación con GP5T3, por lo que futuros experimentos serán necesarios para definir las características de esta respuesta.

## 11.2 Análisis de la expresión relativa de IFN- $\alpha$ 1

Los resultados indican que hay un incremento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 y 8 horas post estimulación con el péptido GP5T3, lo cual concuerda con los resultados de la investigación de Piña, 2021, en donde evaluaron la activación de macrófagos de ratón *in vitro*, en respuesta al estímulo de tres péptidos sintéticos de GP5 de PRRSV. En esta investigación se observó un aumento de expresión relativa de IFN- $\alpha$ 1 a partir de la primera hora post estimulación.

En el caso de GP5T3-PMA, se observó un incremento de la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación al igual que lo observado para el péptido solo. El aumento de esta citocina fue estadísticamente diferente con respecto a los demás estímulos a excepción del péptido GP5T3 solo. Con este resultado, podemos inferir que las nanopartículas no tienen una influencia en el nivel de expresión de IFN- $\alpha$ 1.

Los estímulos control LPS y DEXA también indujeron un aumento de la expresión de este gen a las 2h post estimulación que es estadísticamente diferente del Control y DMSO. Este comportamiento es esperado, ya que estos estímulos control fueron establecidos durante la estandarización del ensayo de estimulación. Además, concuerdan con los resultados obtenidos por Piña *et al.* 2021 en macrófagos de ratón.

Por último, el péptido GP5T3 indujo la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 8 horas post estimulación. Esto concuerda con los resultados de Piña, 2021. Es interesante explorar en futuros experimentos si la expresión es constante, durante 8 horas, o intermitente.

Con base en los datos obtenidos podemos sugerir que el péptido GP5T3 solo o encapsulado aumenta la expresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 2 horas post estimulación y solo a las 8 horas cuando no está encapsulado.

### 11.3 Análisis de la expresión relativa de IFN- $\gamma$

Los resultados indican que el péptido GP5T3 encapsulado induce la mayor sobreexpresión de IFN- $\gamma$  a las 2 horas post estimulación en comparación con GP5T3 y los controles positivos. Aunque el péptido con las nanopartículas induce un mayor nivel de expresión en comparación con el péptido GP5T3 solo y esto es estadísticamente significativo. Por lo que, este aumento de expresión podría deberse a las nanopartículas de pMA. Ya que, en otros estudios se ha reportado que las nanopartículas podrían inducir una mayor respuesta inmune (Binjawadagi *et al.*, 2014; Nan *et al.*, 2017). Aunque también se ha reportado que péptidos de la glicoproteína GP5 indujeron la sobreexpresión de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica aisladas de 22 cerdos infectados con dos cepas de PRRSV genéticamente divergentes (Vashisht *et al.*, 2008).

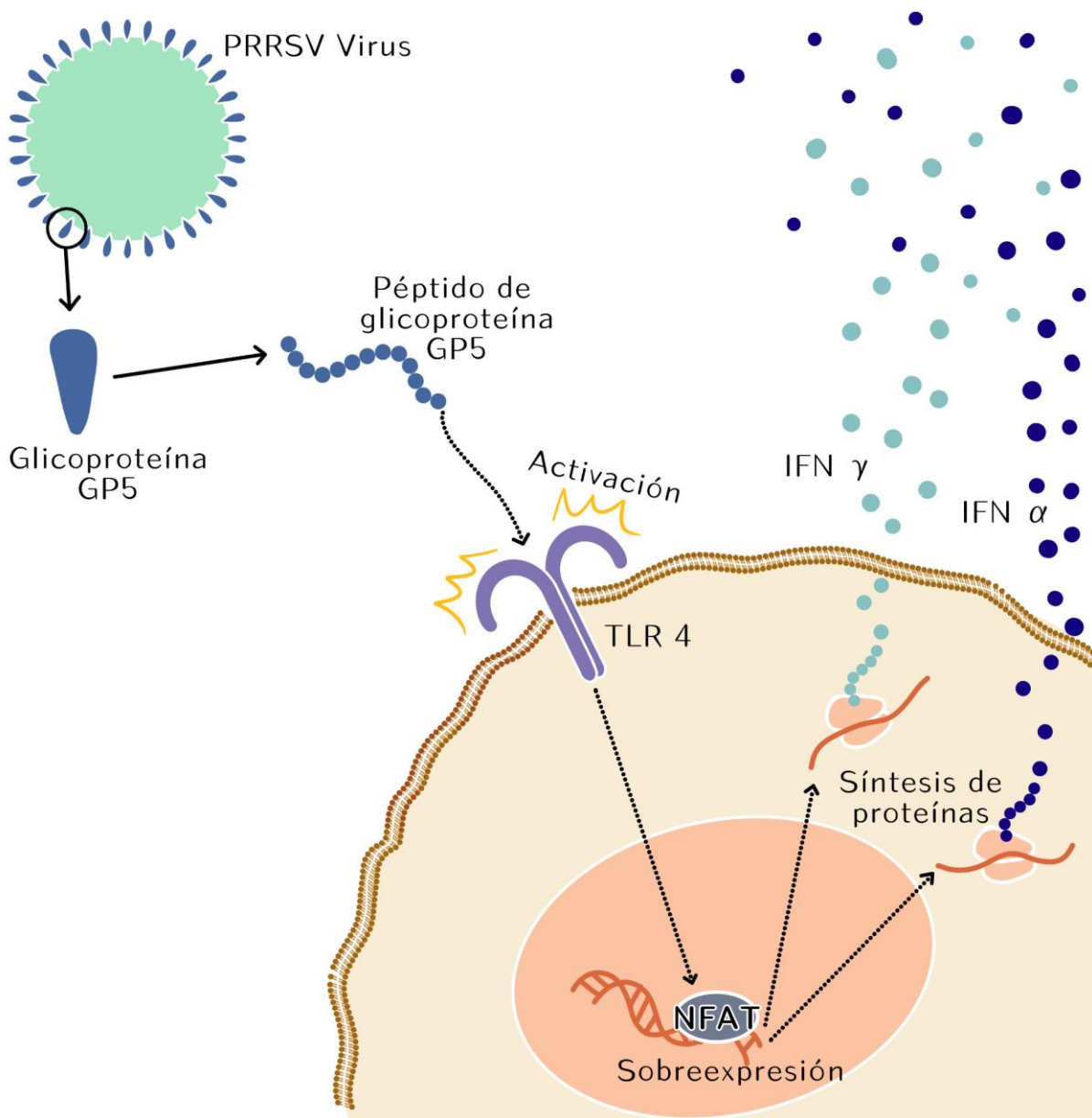
Con respecto a los estímulos control, en el estímulo DEXA no se observó un efecto en la expresión de IFN- $\gamma$  ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa con el Control y el DMSO. Este resultado concuerda con experimentos previos en los que se evaluó la expresión de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo con DEXA en macrófagos de ratón, en donde no se registró cambio en la expresión de este gen (Fertsch *et al.*, 1987). Sin embargo, la expresión inducida por el estímulo LPS a las 2 horas post estimulación si muestra una diferencia estadísticamente significativa con el Control, pero ninguna con DMSO. Esto concuerda con los resultados de Fultz, M.*et al.*, 1993 en los que observaron un aumento de la expresión de este gen al estimular macrófagos de ratón de la cepa CH3/OuJ con LPS.

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que el péptido GP5T3 encapsulado en nanopartículas de pMA aumenta el nivel de expresión de este gen mucho más que el péptido de la glicoproteína GP5T3 sin encapsular.





En la **figura 12** se propone una vía de señalización de NFAT activada a través del receptor TLR4 por medio de los péptidos de la glicoproteína GP5 de PRRSV.



**Figura 12.** Propuesta la vía de señalización de NFAT activada a través del receptor TLR4 por medio de los péptidos de la glicoproteína GP5 de PRRSV. En la figura se muestra la propuesta de un mecanismo de inmunomodulación del péptido GP5T3, en donde los péptidos de la glicoproteína GP5 de PRRSV activan el receptor TLR4 y este a su vez inicia una cascada de señalización que activa el factor de transcripción NFAT, el cual induce la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias, especialmente IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$ .

Por último, los resultados sugieren que la vía de señalización de NFAT puede activarse a través del receptor TLR4. Ya que la sobreexpresión de TLR4, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ 1 por parte del

péptido GP5T3 sugiere que GP5 de PRRSV desencadena la activación de vías de señalización inmunitarias innatas con efectos antivirales.

## 12. Conclusiones

En este trabajo se observó que el péptido GP5T3 solo o encapsulado induce la sobreexpresión de los genes TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  a las dos horas post estimulación. Además, se observó que el péptido GP5T3 induce la sobreexpresión de IFN- $\alpha$ 1 a las 8 horas, aunque menor a la expresada a las 2 horas post estimulación. Estos resultados sugieren que la vía de señalización de NFAT puede activarse a través del receptor TLR4 por medio de péptidos de la glicoproteína GP5.

## 13. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo son muy importantes ya que un mejor entendimiento de los mecanismos de la respuesta inmune innata mediada por TLR4, IFN- $\alpha$ 1 e IFN- $\gamma$  contra el PRRSV puede ayudar a comprender los mecanismos que limitan la infección y la evasión de la respuesta inmunitaria, esto determinará nuevas estrategias para desarrollar vacunas más eficaces.

Por ultimo para futuros experimentos, será importante estudiar el efecto de las nanopartículas en la expresión de estos genes, ya que, para el caso de TLR4 e IFN- $\gamma$ , la sobreexpresión fue inducida únicamente por el péptido encapsulado.

## 14. Bibliografía

1. Acosta Sánchez, V. A. (2017). Implementación de la técnica de cultivo celular para la identificación de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
2. Alcamí, J., Coiras, M., Diez, F., Primo, E., Bojo, C., & Pérez-Gómez, B. (2020). Informe técnico, anticuerpos neutralizantes frente a SARS-CoV-2.
3. Binjawadagi, B., Dwivedi, V., Manickam, C., Ouyang, K., Torrelles, J. B., & Renukaradhya, G. J. (2014). An innovative approach to induce cross-protective immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs through adjuvanted nanotechnology-based vaccination. *International journal of nanomedicine*, vol 9, p.1519.
4. Bonin, C. P., Baccarin, R. Y., Nostell, K., Nahum, L. A., Fossum, C., & de Camargo, M. M. (2013). Lipopolysaccharide-induced inhibition of transcription of tlr4 in vitro is reversed by dexamethasone and correlates with presence of conserved NFκB binding sites. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(2), 256-261.
5. Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29, 23-39.
6. Carlsson, E., Ding, J. L., & Byrne, B. (2016). SARM modulates MyD88-mediated TLR activation through BB-loop dependent TIR-TIR interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(2), 244-253.
7. Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A., & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1, 22-25.
8. Chareerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology*, 1(1), 23.
9. Cui, J., O'Connell, C. M., Smith, J. D., Pan, Y., Smyth, J. A., Verardi, P. H., & Garmendia, A. E. (2016). A GP5 Mosaic T-cell vaccine for porcine reproductive and respiratory syndrome virus is immunogenic and confers partial protection to pigs. *Vaccine Reports*, 6, 77-85.

10. De la Cruz Conde, J. C. (2014). Citocinas proinflamatorias: participación en la modulación de la actividad del melanoma experimental B16. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
11. Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508.
12. Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus research*, 154(1-2), 86-97.
13. Elloumi, H. Z., Maharshak, N., Rao, K. N., Kobayashi, T., Ryu, H. S., Mühlbauer, M., Li, F., Jobin, C., & Plevy, S. E. (2012). A cell permeable peptide inhibitor of NFAT inhibits macrophage cytokine expression and ameliorates experimental colitis. *PloS one*, 7(3), e34172.
14. Fertsch, D., Schoenberg, D. R., Germain, R. N., Tou, J. Y., & Vogel, S. N. (1987). Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha/beta and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA. *The Journal of Immunology*, 139(1), 244-249.
15. Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Med. integral (Ed. impr.)*, 39(2), 63-71.
16. Fultz, M. J., Barber, S. A., Dieffenbach, C. W., & Vogel, S. N. (1993). Induction of IFN- $\gamma$  in macrophages by lipopolysaccharide. *International immunology*, 5(11), 1383-1392.
17. Gagnon, C. A., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B., & Dea, S. (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archives of virology*, 148(5), 951-972.
18. Gerner, W., Käser, T., & Saalmüller, A. (2009). Porcine T lymphocytes and NK cells—an update. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(3), 310-320.
19. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*, 17(18), 2205-2232.

20. Kiani, A., Garcia-Cózar, F. J., Habermann, I., Laforsch, S., Aebischer, T., Ehninger, G., & Rao, A. (2001). Regulation of interferon- $\gamma$  gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98(5), 1480-1488.
21. Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S., & Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology*, 133(3), 477-483.
22. Kim, H., Kim, H. K., Jung, J. H., Choi, Y. J., Kim, J., Um, C. G., ... & Song, D. S. (2011). The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virology journal*, 8(1), 1-12.
23. Klasse, P. J., & Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology*, 83(9), 2091-2108.
24. Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336-341.
25. Lager, K. M. (2002). Patogenia y epidemiología reproductiva del PRRSV. *MUNDO GANADERO*.
26. Longworth, L. G., & MacInnes, D. A. (1939). Electrophoresis of Proteins by the Tiselius Method. *Chemical Reviews*, 24(2), 271-287.
27. López Heydeck, S. M., Huitrón Bravo, G. G., Lagunas Bernabé, S., Soriano Vargas, E., Cabrera Torres, A., & de la Cruz Valdés, F. (2013). Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 4(4), 469-488.
28. López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS): Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 6(1), 69-89.
29. Lopez, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 155-163.

30. Loving, C. L., Brockmeier, S. L., & Sacco, R. E. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*, 120(2), 217-229.
31. Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
32. Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhy, G. J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*, 4(1), 129-154.
33. Ma, J., Ma, L., Yang, M., Wu, W., Feng, W., & Chen, Z. (2021). The Function of the PRRSV–Host Interactions and Their Effects on Viral Replication and Propagation in Antiviral Strategies. *Vaccines*, 9(4), 364.
34. Martín, E. R., Martín, A. P., Martín, D. D., & Soto, M. Á. M. (2013). Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1760-1767.
35. Martín, A. P., Escudero, J. B., Girón, S. H., & Sanz, J. M. (2017). Respuesta inmune adaptativa y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(24), 1398-1407.
36. Mata-Espinosa, D. A., & Hernández-Pando, R. (2008). Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica*, 60(5), 421-431.
37. Meulenber, J. J. (2000). PRRSV, the virus. *Veterinary research*, 31(1), 11-21.
38. Minus, R. H. Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase.
39. Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*, 0(FEB), 38.
40. Montenegro, S. C. (2017). Nanopartículas de oro y de oro/plata para terapia fototérmica (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).



41. Morgan, S. B., Graham, S. P., Salguero, F. J., Cordon, P. S., Mokhtar, H., Rebel, J. M. J., Weesendorp, E., Bodman-Smith, K.B., Steinbach, F., & Frossard, J. P. (2013). Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Veterinary Microbiology*, 163(1-2), 13-22.
42. Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y. J., & Zhou, E. M. (2017). Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective. *Frontiers in microbiology*, 8, 1635.
43. Olejnik, J., Hume, A. J., & Mühlberger, E. (2018). Toll-like receptor 4 in acute viral infection: Too much of a good thing. *PLoS pathogens*, 14(12), e1007390.
44. Oliveira, C. M. B. D., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61, 260-265
45. Oroz, M. M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 33-41). Real Sociedad Española de Química.
46. Piña, M. (2021). Estudio de la respuesta inmune adaptativa celular a la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. [Tesis de maestría no publicada]. Universidad michoacana de san Nicolás de hidalgo facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
47. Potter, H., & Heller, R. (2018). Transfection by electroporation. *Current protocols in molecular biology*, 121(1), 9-3.
48. Rayees, S., Joshi, J. C., Tauseef, M., Anwar, M., Baweja, S., Rochford, I., Joshi, B., Hollenberg, M. D., Reddy, S. P., & Mehta, D. (2019). PAR2-mediated cAMP generation suppresses TRPV4-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in alveolar macrophages to resolve TLR4-induced inflammation. *Cell reports*, 27(3), 793-805.
49. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: minipreparation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4084.

50. Sánchez, O. M., Vivas-Ruiz, D., Neira, M., Sandoval, G. A., Marín-Machuca, O., Rodríguez-Landauro, A. J., & Chacón, R. D. (2019). Rol de los interferones tipo I y tipo III: Una revisión de conceptos. *Revista Científica Ágora*, 6(2), e6-e6
51. Shi, M., Lam, T. T. Y., Hon, C. C., Murtaugh, M. P., Davies, P. R., Hui, R. K. H., Li, J., Wong, L. T. W., Yip, C. W., Jiang, J. W., & Leung, F. C. C. (2010). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of virology*, 84(17), 8700-8711.
52. Strauss, W. M. (1996). Transfection of mammalian cells via lipofection. In *YAC Protocols* (pp. 307-327). Humana Press.
53. Meier, W., Wheeler, J., Husmann, R. J., Osorio, F., & Zuckermann, F. A. (2000). Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus. *Veterinary Research*, 31(1), 41-41.
54. Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., & Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon- $\gamma$  response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, 309(1), 18-31.
55. Morilla, A., González-Vega, D., Diosdado, F., & Estrada, E. (2003). Seroepidemiology of PRRS in México. In *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*. Rome (Vol. 59).
56. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71.
57. Rock, D. L. (2007). Report: Colloquium on Prospects for Development of an Effective PRRS Virus Vaccine. Perry, IA: American Association of Swine Veterinarians.
58. Swift, M. L. (1997). GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of chemical information and computer sciences*, 37(2), 411-412.

59. Uto, T., Akagi, T., Yoshinaga, K., Toyama, M., Akashi, M., & Baba, M. (2011). The induction of innate and adaptive immunity by biodegradable poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles via a TLR4 and MyD88 signaling pathway. *Biomaterials*, 32(22), 5206-5212.
60. Van Breedam, W., Delputte, P. L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., & Nauwynck, H. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91(7), 1659-1667.
61. Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747-4753.
62. Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M. A., Ter Laak, E. A., Bloemraad, M., De Kluyver, E. P., ... & Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 13(3), 121-130.
63. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134.
64. Yoon, J., Joo, H. S., Goyal, S. M., & Molitor, T. W. (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 289-292.

# 15. Anexos

## 15.1 Preparación de estímulos.

**Control:** Medio RPMI 2% SFB.

**LPS 2ug/mL:** Se utilizó 1.998 mL de medio RPMI 2% SFB con 2 microlitros de la solución stock LPS 2 mg/mL.

**Dexametasona 1ug/mL:** Se utiliza 9.99 mL de medio RPMI 2% SFB con 10 microlitros de Stock Dexametasona 1 mg/mL.

**Péptidos 1.25 ug/mL:** Se utilizó 2.5 mL de medio RPMI 2% SFB con 2.5 mL de la solución stock de péptido GP5T3 2.5 ug/mL.

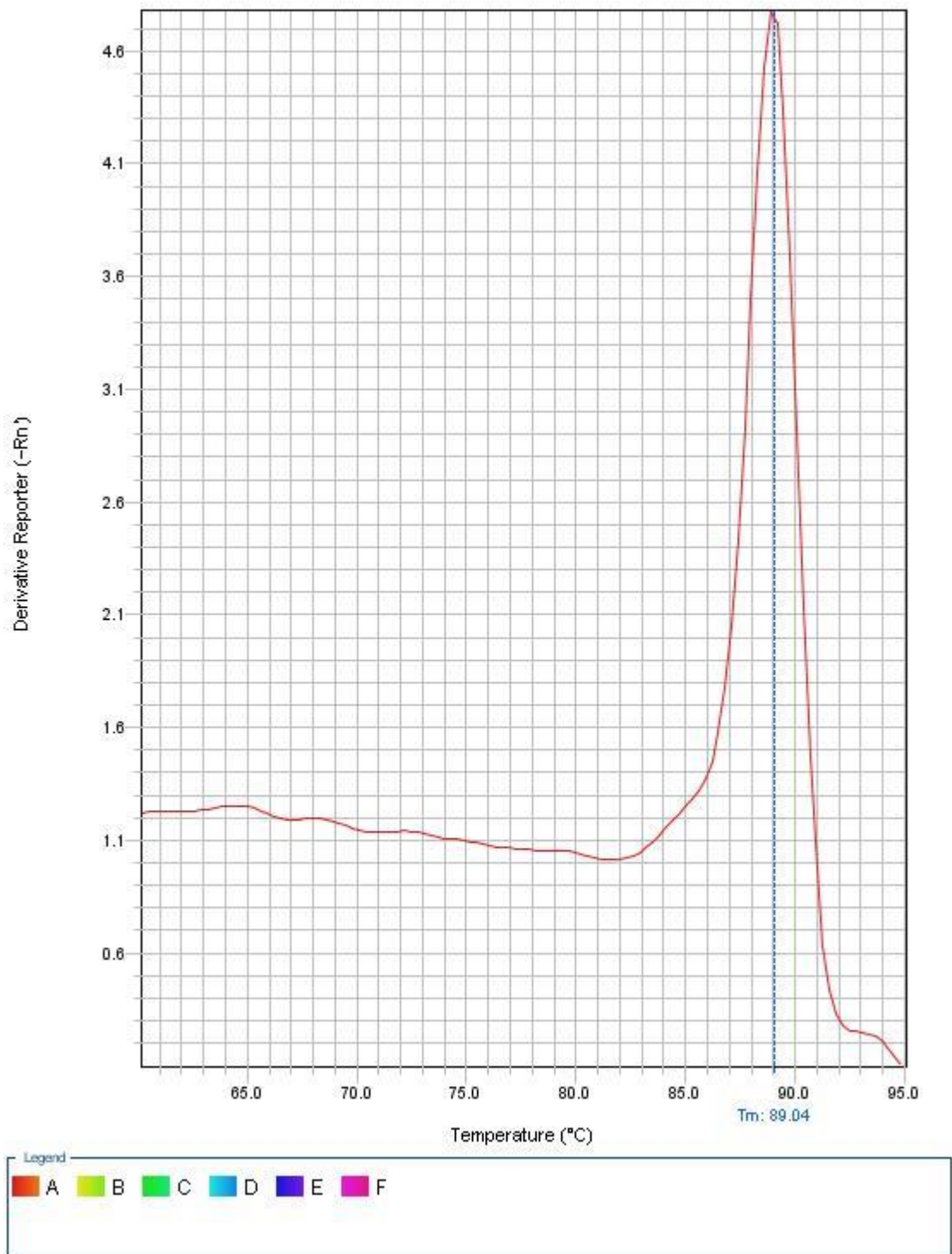
Para hacer esta solución stock de péptidos 2.5ug/mL se utilizó 9.9875 mL de medio RPMI 2% SFB con 12.5 microlitros de la solución stock original de péptido GP5T3, de una concentración de 2mg/mL.

**Péptidos con nanopartículas pMA 5ug/mL:** Se utilizó 6 mL de medio RPMI 2% SFB con 4 mL de la solución stock del péptido GP5T3 encapsulado en nanopartículas de pMA 12.5 ug/mL.

**Control DMSO:** De igual forma que con el estímulo péptido 1.25 ug/mL se realizó este control de igual forma. Para ser un control de este estímulo. Se utilizó 2.5 mL de medio RPMI 2% SFB con 2.5 mL de la solución stock DMSO 2. Para hacer esta solución stock de DMSO se utilizó 10 mL de medio RPMI 2% SFB con 12.5 microlitros de DMSO puro.

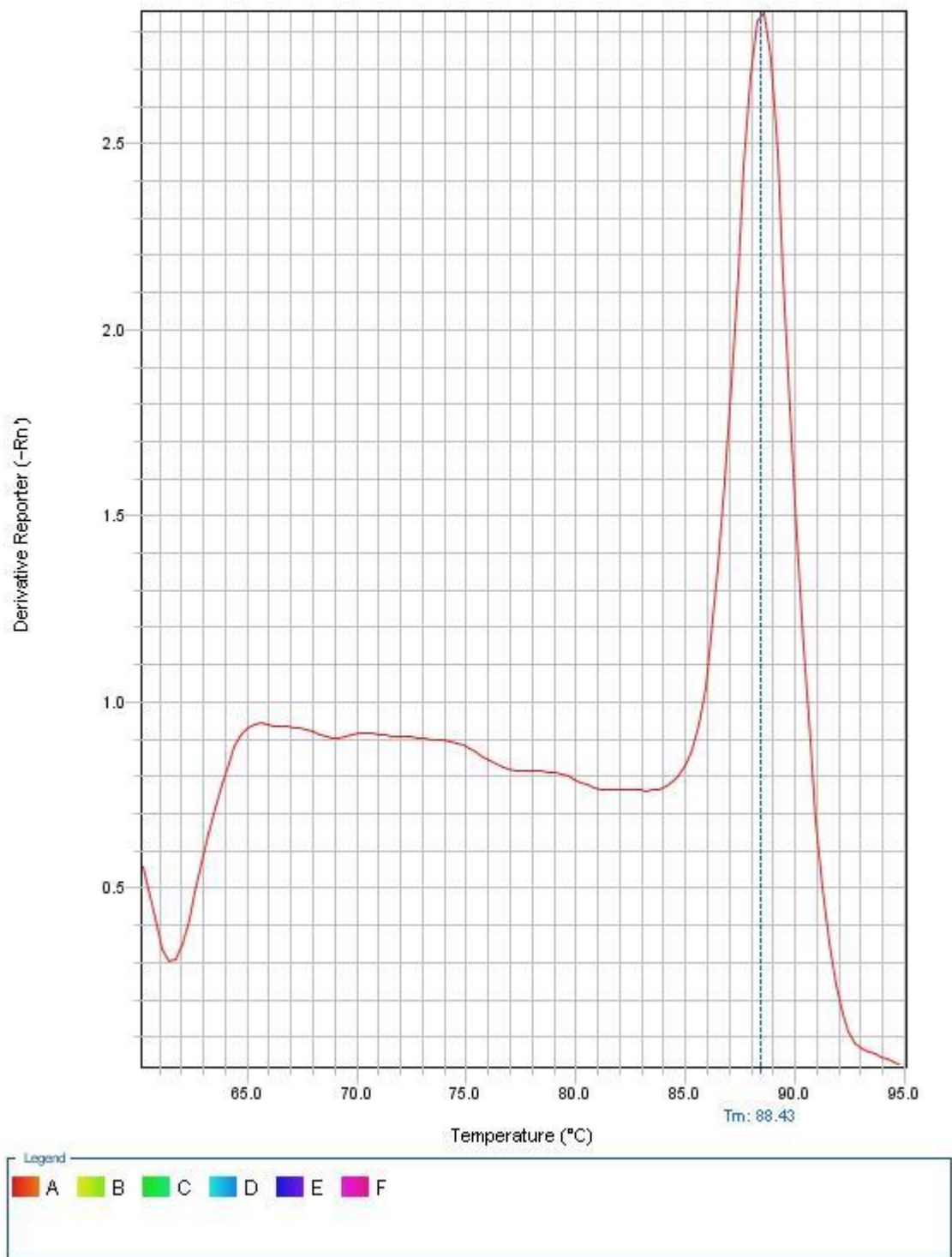
# Melt Curve GAPDH

## Melt Curve



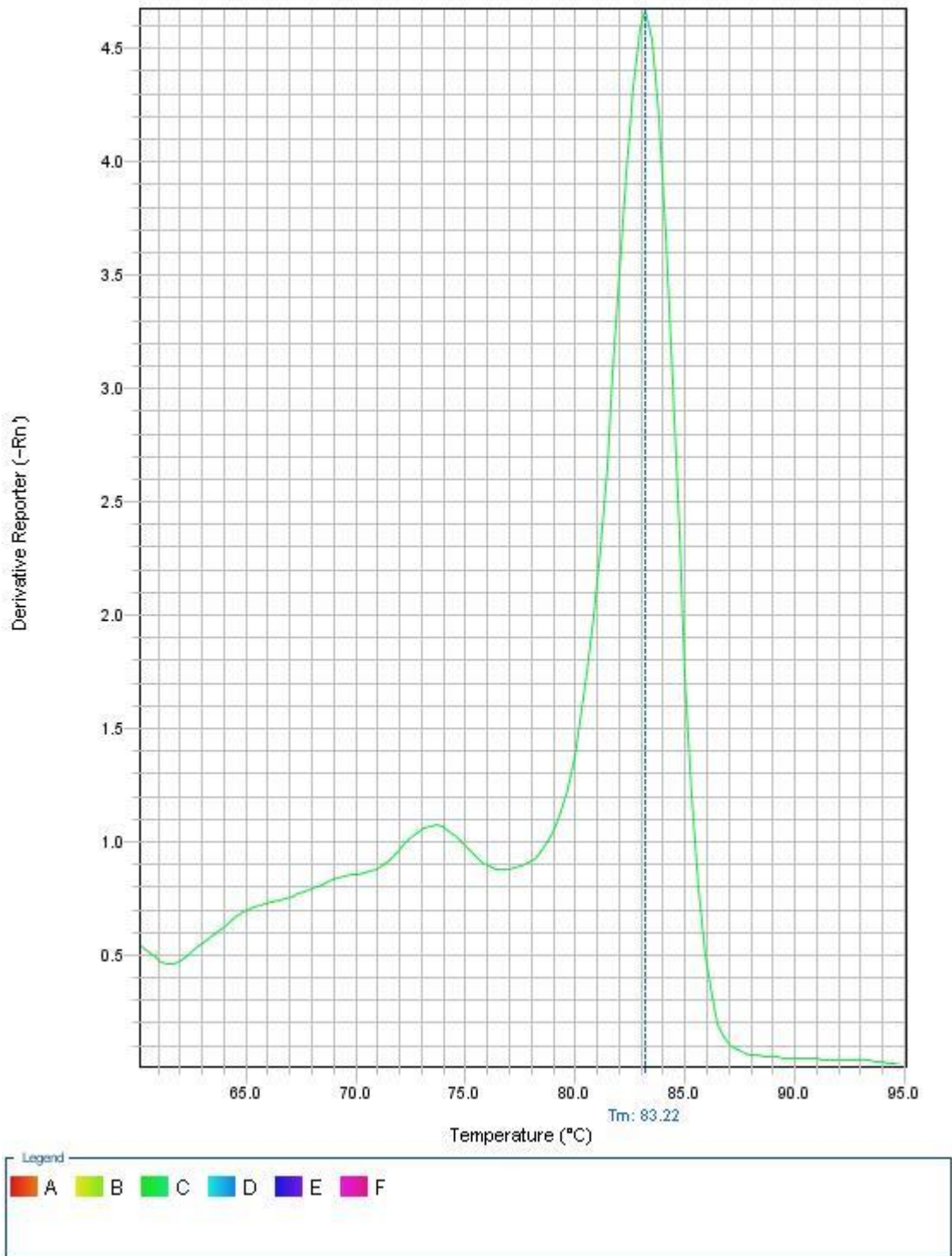
# Melt Curve IFN ALFA

## Melt Curve



# Melt Curve IFN GAMMA

## Melt Curve



# Melt Curve TLR4

## Melt Curve

