



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE HN DEL RUBULAVIRUS PORCINO  
COMO CANDIDATA PARA UN INMUNÓGENO EN  
CERDOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ROCÍO LARA ROMERO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA  
FES-CUAUTITLÁN**

**COMITÉ TUTORAL**

**DRA. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO  
CENID-MA, INIFAP  
DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA  
FMVZ**



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.

## Tabla de contenido

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1. ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD.....	6
1.2. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE OJO AZUL .....	7
1.3. AGENTE ETIOLÓGICO.....	9
1.4. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL PORPV .....	13
1.5. INMUNIDAD AL PORPV .....	16
1.6. VACUNACIÓN CONTRA EL PORPV .....	17
2. JUSTIFICACIÓN .....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HN DEL PORPV.....	22
5.2. DETECCIÓN DEL GEN HN DEL PORPV EN <i>E. COLI</i> KRX.....	23
5.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE <i>E. COLI</i> KRX .....	24
5.4. CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	24
5.5. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> BL21.....	24
5.6. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA HN EN <i>E. COLI</i> KRX Y <i>E. COLI</i> BL21.....	25
5.7. DETERMINACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN EN <i>E. COLI</i> KRX.....	25
5.8. WESTERN-BLOT .....	26
5.8.1. <i>Electroforesis en gel de acrilamida</i> .....	26
5.8.2. <i>Tinción con azul de Coomassie</i> .....	26
5.8.3. <i>Transferencia de proteínas a membrana PVDF</i> .....	26
5.8.4. <i>Revelado de membrana PVDF para detectar la inmuno reactividad de la proteína HN</i> ....	27
5.9. PURIFICACIÓN .....	27
5.10. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES .....	28
5.11. ACTIVIDAD NEURAMINIDASA .....	28
5.12. DIÁLISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	29
5.13. LIOFILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HN DEL PORPV .....	29
5.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
6. RESULTADOS .....	30
7. DISCUSIÓN .....	41
8. CONCLUSIONES.....	46
9. ANEXO .....	47
10. REFERENCIAS.....	51

## Lista de abreviaturas

$\mu\text{M}$	Micromolar
3'UTR	Región 3' no codificante
5'UTR	Región 5' no codificante
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
CENID	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
C-I	Cepa I del PorPV CINVESTAV
C-II	Cepa II del PorPV CINVESTAV
C-III	Cepa III del PorPV CINVESTAV
C-IV	Cepa IV del PorPV CINVESTAV
dNTPs	Desoxidonucleótidos
DPI	Dietilpirocarbonato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EOA	Enfermedad del Ojo Azul
<i>et al</i>	Y otros
F	Fusión
FES-C	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
HN	Hemoaglutinina-Neuraminidasa
IgG	Inmunoglobulina G
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
L	Proteína de Alto Peso Molecular
LB	Luria Bertani
LPMV	Virus La Piedad Michoacán

M	Proteína de Matriz
mBar	Milibar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal	Ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 a galactosa
NeuAc $\alpha$ 2-6Gal	Ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-6 a galactosa
NP	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
PAC	Producción Animal Cerdos
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrogeniones
PorPV	Porcine Paramixovirus, Rubulavirus porcino
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SN	Seroneutralización
TaqPol	Polimerasa Taq
TBS	Tris Buffer Salino
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

## Resumen

En 1980 en granjas ubicadas en La Piedad Michoacán, México, se aisló un Paramixovirus, especie *Rubulavirus porcino* (PorPV) agente etiológico de la enfermedad del Ojo Azul, considerada la cuarta más importante que afecta la industria porcina mexicana, debido a las pérdidas económicas por la baja fertilidad, aumento de hasta el 19% de lechones nacidos muertos, 30% más de momias, hasta -4.1 lechones nacidos vivos y un aumento de hasta el 50% de mortalidad en la primera semana de vida de los lechones. El PorPV es un virus ARN que codifica para seis proteínas estructurales NP, P, M, F, HN y L. La proteína más inmunógena es la HN, la cual es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y tiene un peso de 66 kDa. El objetivo de este trabajo fue producir y purificar la proteína recombinante HN del PorPV para posteriormente evaluar si es una candidata para ser utilizada como inmunógeno en cerdos. Para detectar el gen HN en el vector pDual®GC se realizó una PCR para la identificar las colonias de *E. coli* KRX que contenían el plásmido donde ya se encontraba clonado el gen HN del PorPV, posteriormente esas colonias se aislaron y se purificó su ADN para que con este se pudiera realizar la transformación de la cepa BL21 de *E. coli* utilizando cloruro de calcio y cloruro de magnesio. Se realizó la evaluación para determinar si la proteína recombinante se expresaba formando cuerpos de inclusión dentro de la bacteria. Y se determinó la cuantificación de la proteína de ambas cepas de *E. coli* mediante un método modificado de Bradford. Posteriormente se realizó el proceso de purificación por columna de afinidad utilizando la resina Chelating Sepharose Fast Flow de GE Healthcare y se hizo el western blot utilizando como anticuerpo primario anti-myc marcado con peroxidasa y suero de cerdo positivo al PorPV revelando por quimioluminiscencia. Finalmente se evaluó la actividad neuraminidasa de la proteína recombinante. Mediante western blot y cuantificación se detectó que la inducción con IPTG en el plásmido pDual®GC que contiene clonado el gen HN del PorPV, produce una sobre expresión de la proteína recombinante, dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión en la bacteria. El análisis estadístico mediante *t de student* determinó que la cepa de *E. coli* BL21 produjo una mayor cantidad de cuerpos de inclusión ( $p < 0.05$ ) que la cepa KRX. Se logró estandarizar el proceso de purificación de la proteína HN recombinante, determinado por el cromatograma de purificación y el western blot de las fracciones recuperadas de la purificación. Los anticuerpos producidos por el PorPV, fueron capaces de reconocer la proteína HN recombinante con un peso de 66 kDa. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre el estudio de la proteína recombinante HN del PorPV dan pauta al escalamiento en la producción, y la elaboración de un inmunógeno en cerdos

**Palabras clave:** Rubulavirus porcino, proteína HN recombinante.

## Abstract

In 1980, the pig farms located in La Piedad, Michoacan, México a new Paramyxoviridae was isolated and latter classified as porcine Rubulavirus (PorPV) and the disease was named Blue Eye Syndrome. There are more than 16 million pigs in at least one third of them are affected. The disease is concentrated in the central states of México. In newborn pigs 19% of the animals are born dead or mummified and of those born alive, up to 50% are killed by the PorPV. The virus is an RNA one that codifies six structural proteins (NP, P, M, F HN and L). The most immunogenic of the proteins is HN which is capable of eliciting neutralizing antibodies. In SDS-PAGE it has a MW of 60 KD. Our aim was to purify a high amount of a previously developed bacterial clone with the recombinant protein and evaluate it as a candidate immunogen for pigs. To detect the HN gen in the pDual®GC Expression Vector PCR was conducted in order to identify the *E. coli* KRX colonies that contained the insertion. These colonies were separated, purified and their DNA purified to transfect the BL21 strain of *E. coli*. We used Calcium and Magnesium Chloride. An evaluation was conducted in order to determine the expression of the protein within the bacterial cells. Once determined, the protein was quantified by a modified Bradford Method. The *E. coli* strain that that was found the highest producer, it was grown to a large volume, the cells lysed and the protein purified by affinity chromatography using the resin Chelating Sepharose resin, Fast Flow from GE Health Care". The protein was identified by indirect peroxidase reaction using as a primary antibody anti-myc labeled with horse radish peroxidase and Pig anti PorPV and was developed by chemiluminescence. Finally the neuraminidase activity of the protein was evaluated. With western blot and protein quantification, the highest expression of the recombinant HN protein was detected in intracellular inclusion bodies. By the Student T test it was determined that the highest producer of intracellular inclusion bodies was the *E. coli* BL21 strain ( $P = <0.05$ ) than the KRX. The purification process was standardized where we do not loss the recombinant HN protein, this determined by purification chromatography and western blot for the purified protein. The antibodies of the PorPV were capable of recognizing a 66kDa recombinant protein. The use of vaccines is an important tool in the control and possible eradication of diseases. We think that the recombinant HN protein from PorPV is a candidate as a good immunogen in pigs.

**Key words:** porcine Rubulavirus, HN recombinant protein.

## 1. Introducción

La carne de cerdo es la más consumida en el mundo y su producción mundial duplica la del ganado bovino. El cerdo (*Sus scrofa*) es una especie de gran importancia para la industria pecuaria mexicana, tiene un rendimiento en canal de hasta el 75%, incluso mayor en comparación con la del ganado bovino. La especie porcina se caracteriza por su prolificidad, ya que una cerda es capaz de parir más de 20 lechones cada año, con una conversión alimenticia de 3.5 Kg de alimento por Kg de crecimiento, en donde finalmente cada uno de estos lechones puede ser sacrificado 6 meses después proporcionando 100 Kg de peso. Hasta 1980 prácticamente solo existía una zona de importancia en la producción porcina en el país, tanto por su concentración porcina como por el número de personas relacionadas con dicha explotación y que representaba cerca del 80% de la actividad económica de la región. Dicha zona abarcaba parte de los estados de Guanajuato (51%), Michoacán (21%), Querétaro (16%) y Jalisco (9%) y cuyo centro mayor de actividad estaba localizado en la ciudad de La Piedad Michoacán y poblaciones del estado de Guanajuato que quedan en la ruta de La Piedad-Irapuato. Actualmente los estados con mayor crecimiento en producción porcina son: Yucatán, Puebla, Sonora y Guanajuato, mientras que Michoacán, Estado de México y Jalisco han disminuido su producción (Bobadilla *et al.*, 2010; Flores, 1993; Koeslag, 2006).

La enfermedad de ojo azul (EOA) sólo ha sido reportada en México, sin embargo se han encontrado paramixovirus porcinos estrechamente relacionados en otros países como Australia, Canadá, Japón e Israel (CFSPH, 2006). Desde la aparición de la EOA, la prevención y el control en las granjas infectadas se ha basado en estándares de sanidad e higiene, junto con la producción de vacunas experimentales y comerciales (Correa-Girón *et al.*, 2002). Desde que se le identificó por primera vez, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de las características moleculares del virus, las propiedades patológicas, biológicas e inmunológicas de la enfermedad (Hernández *et al.*, 2004).

## 1.1. Antecedentes de la enfermedad

En 1980 en una granja de 2500 vientres ubicada en La Piedad Michoacán se dieron a conocer los primeros brotes de una enfermedad con un cuadro clínico de incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad corneal en lechones de maternidad, de los cuales se aisló un virus hemoaglutinante. Sin embargo desde 1972 hay evidencias serológicas de que el agente etiológico ya se encontraba presente en la República Mexicana. Seis años después del primer brote en México esta enfermedad se diseminó a otros estados de la República Mexicana: Querétaro, Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Hidalgo, Tlaxcala y el Distrito Federal. En 1988 se demostró que la enfermedad era causada por un paramaixovirus, en cual afectaba severamente a los lechones menores de 21 días y en cerdas gestantes el virus era responsable de trastornos reproductivos (Stephano *et al.*, 1981; 1988; Rosales *et al.*, 1988).

Estudios serológicos en 1991, 1992 y 1998 mostraron que los cerdos de los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sonora, Tlaxcala, Tabasco y Zacatecas presentaron anticuerpos positivos a anticuerpos contra el PorPV. Sin embargo, los brotes de esta enfermedad solo fueron reportados en los estados centrales de nuestro país, principalmente en Michoacán, Guanajuato y Jalisco. Incluso ocasionalmente en otras áreas se encontraron animales seropositivos que no presentaron ningún signo clínico (Carreón y Fuentes 1991; Fuentes *et al.*, 1992; Correa *et al.*, 1997). Para el año de 1999 y el 2000 se demostró mediante pruebas serológicas que el virus causante de la enfermedad de ojo azul se encontraba presente en áreas con una alta población porcina, como lo son el estado de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo y Querétaro (Morilla *et al.*, 2002). En el año 2011, Escobar-López y colaboradores encontraron que existe una seroprevalencia del PorPV del 9% al 23.7% en los estados de Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por lo que la enfermedad continua siendo endémica principalmente en la región central y occidental de la República Mexicana.

La EOA es considerada una de las enfermedades más importantes que afectan la industria porcina mexicana. El impacto negativo en los parámetros reproductivos y la mortalidad asociada con los brotes en la granjas afectadas, es causa de importantes pérdidas económicas (Correa-Girón *et al.*, 2002; Stephano, 2002), las cuales después de una infección por el PorPV, se encuentran relacionadas a la baja fertilidad, al aumento del porcentaje de lechones nacidos muertos (hasta 19%), aumento en el número de momias (hasta 30%) y se reduce el número de lechones nacidos vivos (-4.1), además de que durante la primera semana de vida la mortalidad de los lechones se incrementa hasta en 50% (Kirkland and Stephano, 2006).

El primer aislamiento obtenido del PorPV fue caracterizado por Moreno-López y colaboradores en 1986, y se denominó LPMV. Desde su aparición el PorPV sólo ha permanecido en el centro de la República Mexicana, provocando signos nervios, respiratorios y reproductivos en animales de diferentes edades y generando millonarias pérdidas económicas en esta zona del país (Sánchez *et al.*, 2003). Además debido a que la EOA es endémica en México, actualmente representa una barrera comercial que afecta notablemente la producción y comercialización de la industria porcícola mexicana (APHIS, 2007). Hasta la fecha, en México no existe programa o norma oficial para controlar o erradicar esta enfermedad.

## **1.2. Descripción de la enfermedad de ojo azul**

En 1981 Stephano y colaboradores reportaban en cerdos recién nacidos y lactantes la EOA que se caracterizaba por encefalitis, neumonía y opacidad corneal, la cual generalmente comienza con aparición repentina de fiebre, lomo arqueado, postración y depresión, estos signos son seguidos de enfermedad neurológica progresiva con debilidad, ataxia, temblores musculares, postura anormal y rigidez, especialmente de las patas traseras; algunos lechones se encuentran hipersensibles y realizan movimientos de pedaleo cuando son manipulados. Entre 1 y 10 % de los lechones desarrollan opacidad corneal unilateral o bilateral, incluso se puede observar conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, constipación y diarrea. Con frecuencia los lechones afectados mueren dentro de las primeras 48 horas de

la aparición de los primeros signos clínicos; posteriormente se observan muertes después de 4 a 6 días de la enfermedad.

En 1985, Stephano y Gay observaron que los cerdos destetados de más de 30 días de vida mostraban signos moderados y transitorios que podían incluir anorexia, fiebre, tos, estornudos y, ocasionalmente, opacidad corneal. Los signos neurológicos eran poco comunes en este rango de edad, sin embargo se observaba depresión ocasional, ataxia y marcha en círculos.

En 1988 se reportó que las lesiones macroscópicas no eran muy evidentes, mientras que microscópicamente se observó encefalomiелitis no supurativa, neumonía intersticial y uveítis anterior con edema corneal. En las cerdas adultas se presentó una disminución en la tasa de concepción debida al retorno al estro, abortos, muerte fetal, aumento de mortinatos y fetos momificados (Stephano *et al.*, 1988).

Ramírez-Mendoza (1997) realizó una infección experimental en verracos y demostró que las lesiones ocasionadas por el PorPV resultan en una inflamación en la cabeza del epidídimo a los 15 días post infección (DPI), reducción en la concentración y motilidad de los espermatozoides (21 DPI) asociada a la formación de granulomas, orquitis y fibrosis (70-80 DPI), incluso cuando la infección se torna crónica se genera degeneración de túbulos seminíferos con infiltración linfocitaria (30 DPI) y atrofia testicular.

Del 2000 al 2003 ocurrieron brotes atípicos de la enfermedad de ojo azul en un total de 22 granjas multi-sitio ubicadas en el estado de Jalisco, en las cuales el 60% de los cerdos de 3 a 4 meses de edad presentaron signos neumónicos, de estos animales el 20% presentaron signos de encefalitis y la mortalidad se incrementó en un 30% durante este brote. Este incremento en la neurovirulencia del PorPV puede estar asociado a las mutaciones observadas en el gen HN del PorPV en las variantes PAC6-PAC9 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Para el 2004, Hernández-Jaúregui realizó estudios en cerdas de 6 a 10 semanas de gestación, en donde nueve cerdas fueron inoculadas con la cepa PAC 3 del PorPV. Las

lesiones encontradas correspondían a congestión y hemorragia en placenta y endometrio. El PorPV fue aislado de pulmones, tonsilas, ovarios, placenta, útero y nodos linfoides de las cerdas, y de los fetos se logró aislar de cerebro, pulmones e hígado.

En el año 2013 Rivera-Benítez y colaboradores (a) mediante una infección experimental en cerdos de seis semanas de edad demostraron la patogenicidad y distribución de la infección en el aparato respiratorio ocasionada por el PorPV, en donde la excreción vial se detectó en fluidos nasales hasta 23 DPI. Se detectó una alta carga viral en amígdalas, paladar blando y nodos linfoides. Las lesiones principales se encontraban en pulmón y correspondían a una neumonía intersticial e hiperplasia asociada a tejido linfoide.

### **1.3. Agente etiológico**

El Rubulavirus porcino es el agente causal de la EOA, el cual está clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus porcino* (Rima *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2004). Es un virus ARN, envuelto, en sentido negativo de una hebra no segmentada, formada por 15180 pares de bases, que actúan como molde para la síntesis del ARN mensajero (Wang *et al.*, 2007). Está dividido en 6 genes (3'-NP-P-M-F-HN-L-5') que codifican para seis proteínas estructurales y 3 no estructurales (Linné *et al.*, 1992), cuyas características moleculares se muestran en el cuadro 1.

Las proteínas estructurales son tres correspondientes a proteínas asociadas a la nucleocapside: la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L) y tres asociadas a membrana del PorPV: proteína de matriz (M), la hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) (Moreno-López *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1990).

El gen P puede dar origen a una proteína estructural (P) y a tres no estructurales: V, I y C. Datos experimentales indican que los péptidos V y C se encuentran involucrados en la regulación de la replicación y la transcripción viral, además, se relacionan con la actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa viral y en la inhibición de las cascadas de

activación del interferón en la célula hospedera como respuesta a la infección. La función de la proteína I aun es desconocida (Hernández *et al.*, 2004). La proteína V, de 249 aminoácidos, es codificada por una copia exacta del gen P. La adición de dos guaninas no codificadas, entre las posiciones 586 a 591 de la secuencia genómica, permite que el marco de lectura se alargue para dar lugar a la expresión de la proteína P, de 404 aminoácidos. El marco de lectura que da origen a la proteína I se forma de manera similar al de la proteína P, sólo que en lugar de añadir dos guaninas se añade una, lo que ocasiona que el marco de lectura termine antes que cualquiera de los otros dos, originando un péptido de 174 aminoácidos. Por último, la proteína C (126 aminoácidos) se genera de un marco de lectura más pequeño contenido dentro de los tres anteriores. (Berg *et al.*, 1992).

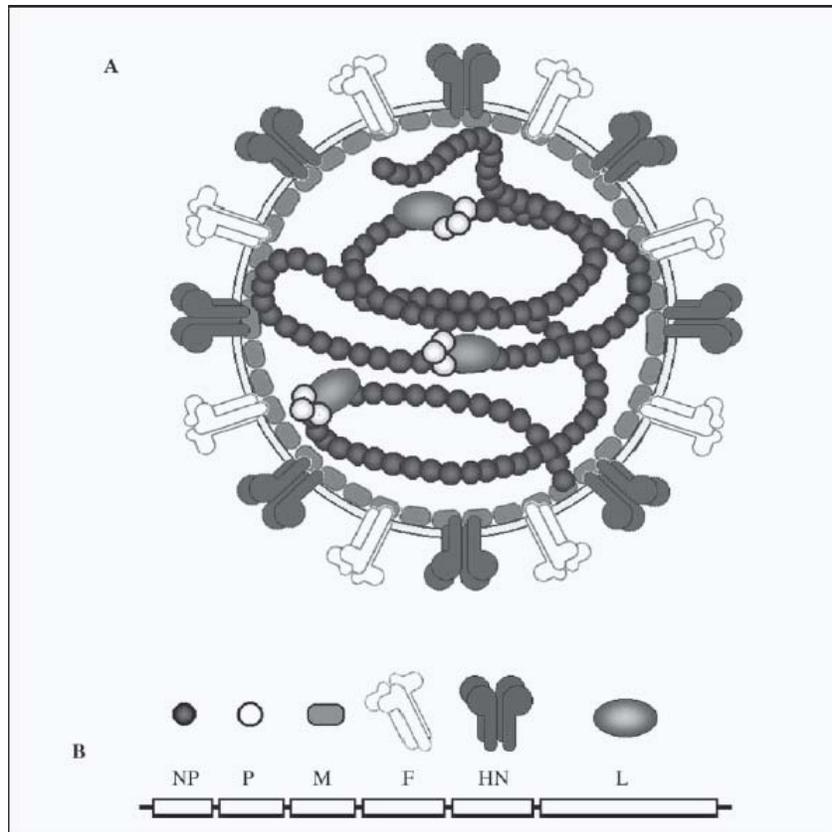
La nucleoproteína tiene un peso molecular de 68 kDa y está constituida por 545 aminoácidos. Forma parte integral de la nucleocápside y se encuentra asociada al genoma del PorPV. Tiene la capacidad de no desprenderse durante los procesos de replicación y transcripción y cada molécula de la NP se encuentra unida a seis nucleótidos y su afinidad es tan alta que impide que el genoma del RVP se encuentre desnudo dentro de la célula hospedadora, lo cual protege al ARN viral de un posible reconocimiento antiviral en la célula (Santos-López *et al.*, 2004).

El gen que codifica para la proteína L es altamente conservado en comparación con otros paramixovirus. La proteína L es la más grande del PorPV y tiene una actividad catalítica en la síntesis de ARN genómico y ARNm, además la gran similitud con el virus de la estomatitis vesicular sugiere que la proteína tiene actividades de metiltransferasa, cinasa y poliadenilsintetasa (Svenda *et al.*, 1997).

La proteína F es una glicoproteína transmembranal altamente conservada entre la familia de los paramixovirus, la cual participa con la glicoproteína HN, en la fusión de la envoltura viral a la membrana celular, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y posteriormente se puedan formar células multinucleadas debido a la fusión de las membranas celulares. La glicoproteína F (precursor inactivo F<sub>0</sub>) tiene un sitio de escisión His-Arg-Lys-Lys-Arg, el cual es cortado por una proteasa, dando origen a los polipéptidos

F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, el extremo N-terminal de la subunidad F<sub>1</sub> está relacionado directamente al ataque inicial de la membrana celular para dar lugar a la fusión (Berg *et al.*, 1997).

La proteína hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) tiene una capacidad hemoaglutinante, neuraminidasa y promotora de fusión de la membrana de la célula y del virus. Es una glicoproteína transmembranal responsable de reconocer y adherirse al receptor específico en la célula. Es capaz de aglutinar debido a los receptores de ácido siálico en la superficie de eritrocitos de cerdo, carnero, bovino, cuyo, canino, conejo, ratón, rata, hámster y humano tipo A, B y O (Moreno-López *et al.*, 1986, Stephano *et al.*, 1988). La actividad neuraminidasa de la HN le permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares, lo que permite la liberación del virus de la célula infectada (Santos-López *et al.*, 2004). Esta glicoproteína fue purificada y se determinó que está constituida por 50.5% de aminoácidos no polares, 13.3% de aminoácidos polares sin carga y 13.6% de aminoácidos polares con carga y está organizada en una región intracelular (aminoácido 1 al 25), en una región hidrofóbica transmembranal (del aminoácido 26 al 47) y una región extracelular que posee la actividad hemoaglutinante y neuraminidasa (48 al 576) (Reyes-Leyva *et al.*, 1999; Zenteno-Cuevas *et al.*, 1998). La HN tiene una afinidad a los residuos del ácido N-acetil neuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 a galactosa (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal), este dominio de reconocimiento a este receptor es altamente conservado en los paramixovirus (Reyes-Leyva *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004). Este receptor da lugar a las diferencias patológicas del PorPV entre distintos grupos de edad de cerdos, debido a que en el sistema nervioso central de cerdos neonatos y aparato reproductor de cerdos adultos se expresan abundantes receptores del NeuAc $\alpha$ 2-3Gal, sin embargo, la maduración del sistema nervioso central de los lechones incluye cambios drásticos en la expresión del ácido siálico, dando como consecuencia la disminución de los receptores NeuAc $\alpha$ 2-3Gal y el aumento del isómero NeuAc $\alpha$ 2-6Gal (Vallejo *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Esquema del rubulavirus porcino (A) y mapa genético (B).

<b>Gen</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Longitud (nucleótidos)</b>	<b>Tamaño (aminoácidos)</b>
<b>NP</b>	68	1785	545
<b>P</b>	52	1372	404
<b>M</b>	40	1340	369
<b>F</b>	F <sub>1</sub> 59 F <sub>2</sub> 12	1838	541
<b>HN</b>	66	1862	576
<b>L</b>	200	6786	2251

**Cuadro 1.** Características moleculares de los genes del PorPV y sus productos (Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Los paramixovirus tienen la habilidad de establecer infecciones persistentes *in vitro*, así como *in vivo*, este aspecto resulta importante por el riesgo que implica en la perpetuación del virus y la posibilidad de que animales persistentemente infectados que liberen el virus en forma esporádica (Hjetner, 1998; Cuevas *et al.*, 2000; 2009). En las infecciones por paramixovirus, se espera que el virus conserve la capacidad de codificar las proteínas funcionales involucradas en la transcripción y replicación viral. Debido a su modo de replicación de los paramixovirus, las infecciones persistentes pueden conducir a enfermedades crónicas (Randall y Russell, 1991). Estudios demuestran que el PorPV puede mantener una infección persistente en el sistema nervioso, respiratorio, genitourinario, órganos linfoides, tracto reproductor de verracos y semen (Cuevas *et al.*, 2009; Hjetner, 1997; Rivera-Benítez *et al.*, 2013(b); Wiman *et al.*, 1998). Este aspecto resulta importante dado que cerdos infectados por el PorPV de manera crónica y natural fueron capaces de transmitir el virus a cerdos sanos, esto al detectar ARNm del gen NP y P (Cuevas *et al.*, 2014). En la infección crónica producida por otro paramixovirus, el virus del sarampión, las proteínas involucradas en la persistencia son NP, P y L (Randall y Russell, 1991).

#### **1.4. Biología molecular del PorPV**

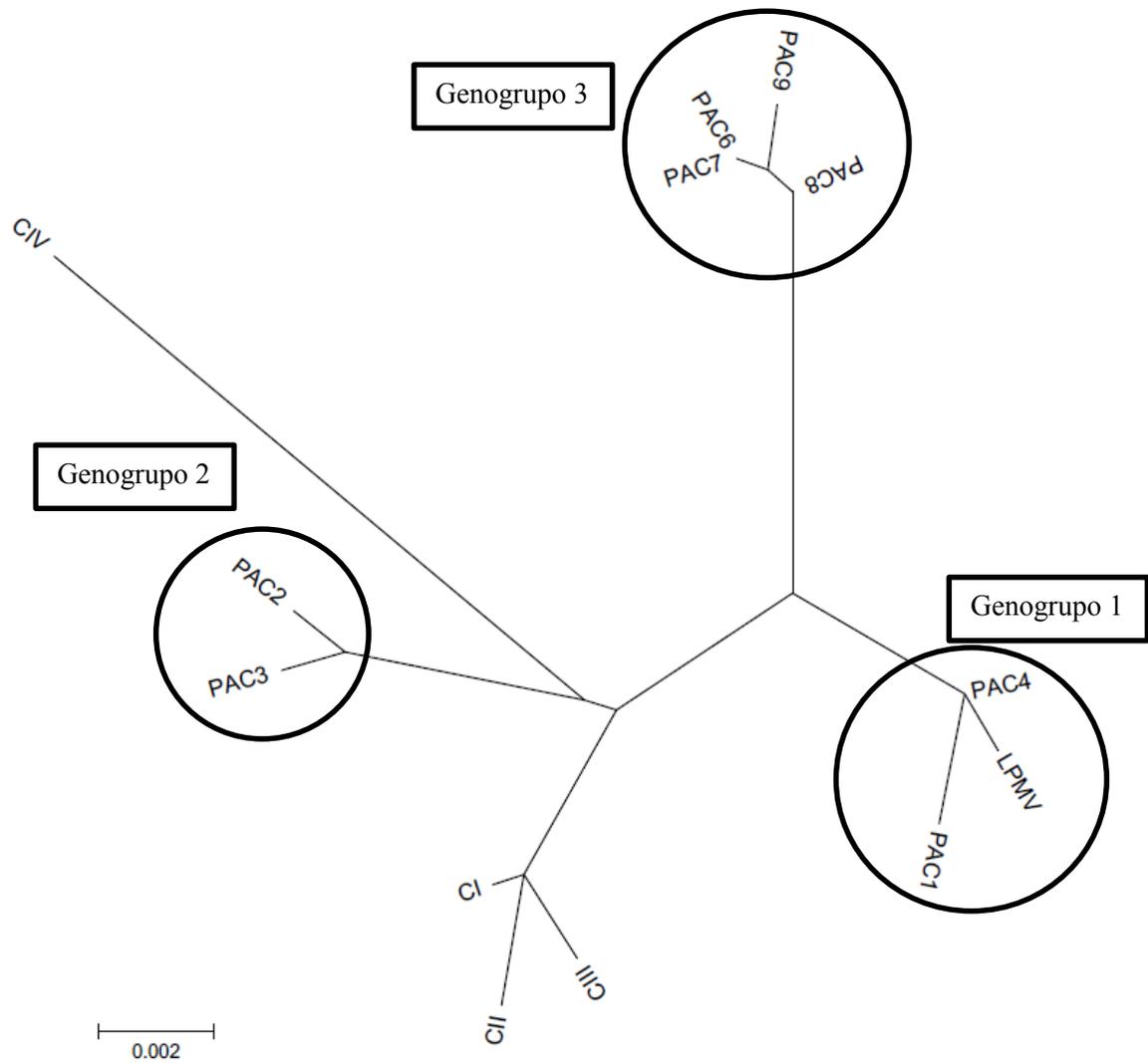
Desde que el PorPV-LPMV fue aislado por primera vez en 1984, se ha encontrado una variabilidad del gen hemaglutinina-neuraminidasa respecto a diferentes aislamientos del PorPV obtenidos desde 1990 y hasta el 2003. La realización de estudios de biología molecular y de secuenciación del gen HN de diferentes aislamientos del virus ha permitido identificar variantes genéticas. Actualmente se encuentran reportadas 12 secuencias diferentes del gen HN del PorPV (Cuadro 2), respecto al primer virus aislado en La Piedad Michoacán (Moreno-López *et al.*, 1986; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Estas 13 secuencias se han dividido en tres genogrupos, los cuales se han asociado con las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad de ojo azul. El primer genogrupo está asociado con trastornos neurológicos en lechones provocados por la cepa LPMV, PAC1 y PAC 4, caracterizada por presentar trastornos respiratorios en cerdos en crecimiento. El segundo genogrupo incluye a la PAC 2 y PAC 3, relacionadas con fallas reproductivas en

cerdos adultos. Y en el tercer genogrupo se incluyen las variantes PAC6, PAC7, PAC8 y PAC9, las cuales están asociadas con la presentación de signos neurológicos en cerdos en crecimiento y cerdos adultos. Sin embargo, de las cepas CI, CII, CII y CIV, no se han realizado estudios que permitan incluirlas en algún genogrupo (Figura 2) (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Rivera-Benítez *et al.*, 2013 (c); Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

<b>Cepa del PorPV</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Número de acceso en el GenBank</b>	<b>Estado donde se aisló la cepa</b>
<b>LPMV</b>	1984	S77541	Michoacán
<b>C-I</b>	1991	AY463798	Jalisco
<b>C-II</b>	1991	AY487249	Jalisco
<b>C-III</b>	1999	AY487251	Michoacán
<b>C-IV</b>	1999	AY487250	Michoacán
<b>PAC1</b>	1990	KP229773	Michoacán
<b>PAC2</b>	1990	EF413172	Michoacán
<b>PAC3</b>	1992	EF413173	Michoacán
<b>PAC4</b>	1993	EF413174	Michoacán
<b>PAC6</b>	2001	EF413175	Jalisco
<b>PAC7</b>	2002	EF413176	Jalisco
<b>PAC8</b>	2002	EF413177	Jalisco
<b>PAC9</b>	2003	EF413178	Jalisco

**Cuadro 2.** Variabilidad genómica del gen HN (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Paniagua-Buelnas, 2000; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008; Santos-López *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Árbol filogenético de las variantes del PorPV en el gen de la HN donde se muestran los tres diferentes genogrupos del Rubulavirus porcino.

## 1.5. Inmunidad al PorPV

Hay una especificidad de los anticuerpos hacia las proteínas HN (Hemaglutinina-Neuraminidasa), M (Matriz) y NP (Nucleoproteína) del virus, pero está demostrada la inmunodominancia de la proteína HN (Hernández *et al.*, 2004).

La respuesta humoral contra el PorPV se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana posinfección. Durante las primeras 4 semanas los títulos se incrementan entre 4 y 6 unidades logarítmicas en base 2 y a partir de la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 unidades logarítmicas. Los anticuerpos generados están dirigidos principalmente contra las proteínas HN y NP. Los anticuerpos contra HN son capaces de inhibir la hemoaglutinación y neutralizar la infección viral (Hernández *et al.*, 1998). En la infección natural se han encontrado anticuerpos hasta 18 meses después de presentarse los signos clínicos de la enfermedad (Stephano *et al.*, 1988). Los anticuerpos contra el PorPV pueden ser inducidos utilizando como antígeno virus inactivado con formalina y esta inmunidad puede transmitirse de la madre a los hijos al vacunar a cerdas en gestación. Los anticuerpos adquiridos pasivamente de la madre, a través de la placenta o al consumir el calostro y la leche, logran controlar la infección y reducir los índices de morbilidad y mortalidad en los lechones nacidos de cerdas vacunadas (Hernández-Jaúregui *et al.*, 1992). Ensayos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos contra el PorPV o contra determinantes antigénicos de la proteína HN poseen actividad neutralizante (Zenteno *et al.*, 1998).

El primer cambio que se observa en la respuesta inmune celular después de la infección con PorPV es un aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8+). Esto ocurre durante la primera semana, demostrando la importancia de estas células en el control de la infección. Además de la reducción en el número de linfocitos CD4+ que ocurre en la tercera semana post infección. Este fenómeno puede estar ligado a dos eventos: por un lado, las células específicas para antígenos virales son reclutadas a los tejidos infectados para participar en el control de la infección. Esto es sugerido por la abundancia de linfocitos y monocitos observados en los tejidos infectados en el tracto de los verracos (Ramírez-

Mendoza *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que los linfocitos CD4+ estimulados por el virus se transforman en linfocitos CD4+CD8+. Los estudios realizados demuestran que esta población de linfocitos T responden de manera específica al virus para convertirse en células de memoria productoras de citocinas de tipo 2 (principalmente interleucina 10), las cuales inducen una respuesta inmune mediada por anticuerpos (Hernández *et al.*, 2001; 2002). Éste tal vez sea un mecanismo inducido por los rubulavirus para modular la respuesta antiviral y sobrevivir en el hospedero evitando la actividad citolítica de los linfocitos T. La importancia de la respuesta inmune celular en el control de la infección viral fue evaluada midiendo la capacidad proliferativa de células inmunes en respuesta al antígeno viral y a los mitógenos concanavalina A y fitohemaglutinina. Una fase de inmunosupresión pasajera fue identificada en los animales infectados, representada por índices de proliferación muy bajos con los dos mitógenos (Hernández *et al.*, 1998). Esta inmunosupresión puede ser la razón de que se haya descrito un incremento en la susceptibilidad a padecer infecciones secundarias en los animales infectados con PorPV (Hernández-Jaúregui *et al.*, 2001). El análisis de los valores de los diferentes tipos de leucocitos en los animales infectados mostró que durante la tercera semana de la infección se presenta una disminución del 19% de linfocitos T, de 28% de linfocitos B y de 53% de monocitos en comparación con los valores promedios observados en los animales sanos utilizados como testigos (Hernández *et al.*, 1998). La identificación de antígeno viral en el interior de células mononucleares circulantes y en células inmunes de nódulos linfáticos, indica que el mismo sistema inmune es blanco de la infección viral, aunque no se presente una notable alteración en los mecanismos de respuesta como ocurre en virus verdaderamente inmunosupresores (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

## **1.6. Vacunación contra el PorPV**

Actualmente existen dos vacunas comerciales, sin embargo, se han desarrollado varias vacunas experimentales. Una de ellas corresponde a una vacuna inactivada y con un adyuvante oleoso desarrollada en 1990 en el CENID-Microbiología Animal del INIFAP, reportan que la vacuna protegió al 100% de los lechones desafiados provenientes de madres

vacunadas, y que se lograron controlar dos brotes agudos de ojo azul, en donde los casos clínicos y muertes terminaron a los seis y ocho días de la vacunación respectivamente (Correa-Giron *et al.*, 2002).

Fuentes y colaboradores (1994) elaboraron otra vacuna experimental inactivada con la cepa POA-87, en donde se midió la respuesta inmune humoral de los cerdos mediante seroneutralización (SN) teniendo como resultados que la media de anticuerpos fue de 1:32. De igual forma se vacunaron cerdas gestantes y se les realizó la prueba de SN a sus lechones en donde se tuvo un título de 1:16 y a los 38 días ya no se encontraron anticuerpos. En la prueba de desafío hubo una protección del 71.4% en los lechones de madres vacunadas.

## **2. Justificación**

La EOA en cerdos sólo se ha reportado en México y es endémica en la región central de país. Hasta el 2002 fue considerada la cuarta enfermedad más importante en la industria porcina, debido a las graves pérdidas económicas que produce. Actualmente, representa una barrera arancelaria para la exportación de cerdo y subproductos. Por lo tanto es importante buscar alternativas de prevención y control de la enfermedad, siendo el uso de vacunas una herramienta muy importante para lograrlo. Es por esto que la proteína HN del rubulavirus porcino, al ser inmunodominante, podría ser una buena alternativa para ser utilizada como inmunógeno y de esta forma brindar otra alternativa de control de la enfermedad.

### **3. Hipótesis**

Si se logra la producción y purificación de la proteína HN recombinante inmunodominante del PorPV y se determina su inmuno reactividad *in vitro* entonces puede ser una buena candidata para ser usada como inmunógeno en cerdos.

## 4. Objetivos

General:

Producir y purificar la proteína recombinante HN del rubulavirus porcino y su reactividad *in vitro*

Particulares:

- Identificar las colonias de *E. coli* KRX que expresen el gen HN del PorPV en el vector pDual®GC.
- Identificar la expresión de la proteína HN en *E. coli* KRX.
- Transformar la cepa de *E. coli* BL21 con el vector de expresión pDual®GC que contenga en gen HN clonado y comparar su expresión y producción de proteína con la cepa *E. coli* KRX.
- Estandarizar el proceso de producción y purificación mediante columna de afinidad para la proteína recombinante HN.
- Detectar de la proteína recombinante HN mediante pruebas de Western-blot.
- Identificar la actividad *in vitro* de la proteína HN recombinante

## 5. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología y Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo de la UNAM FES-Cuautitlán, laboratorio de Epizootiología del CENID Microbiología Animal, INIFAP y en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la BUAP.

### 5.1. Expresión y producción de la proteína recombinante HN del PorPV

El gen que codifica para la proteína HN del PorPV fue clonado en el vector pDual®GC (Figura 3) y esta construcción se utilizó para transformar la bacteria *Escherichia coli* cepa KRX, la cual tiene como característica tener una expresión controlada y eficiente de proteínas recombinantes.

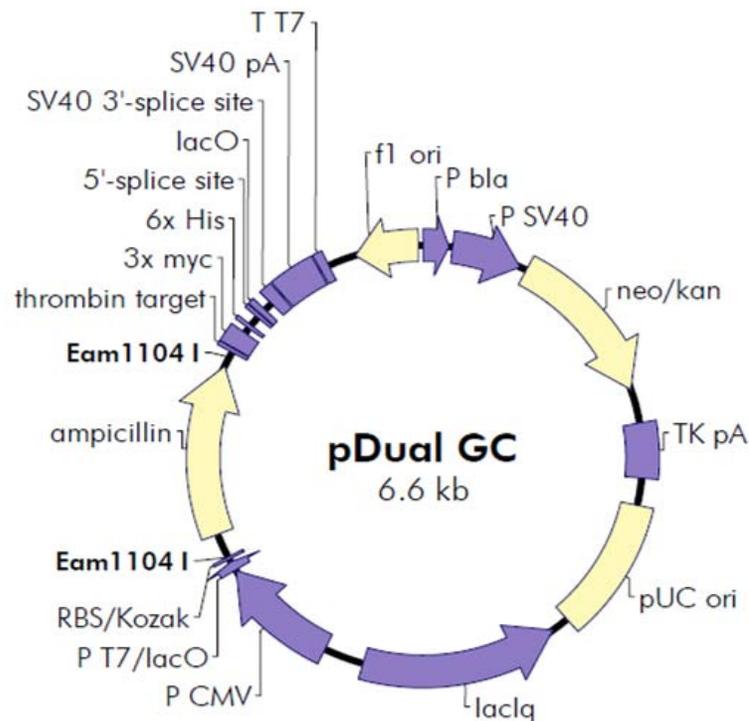


Figura 3. Mapa del vector p Dual GC donde se clonó y expresó el gen HN del PorPV.

## 5.2. Detección del gen HN del PorPV en *E. coli* KRX

Para detectar el gen HN del PorPV clonado en el vector pDual®GC se realizó un PCR punto final utilizando el kit Go Taq® (Promega, Madison, WI) a las colonias bacterianas transformadas de *E. coli* KRX, el cual amplifica una secuencia de 2000 pares de bases mediante la utilización de iniciadores (delantero: 5'-TAC TCT TCA ATG TCT CAA TTA GGG ACT GAT-3'; reverso 5'-TAC TCT TCT AAG ATA GCG TGA TTG AAT CTT AAT-3'). Como ADN molde se utilizó una muestra de la colonia bacteriana colocándola directamente en el tubo de reacción de PCR. La mezcla de reacción se muestra en el cuadro 3 y protocolo de amplificación en el cuadro 4.

Reactivo	Volumen en $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	18.25
10x Buffer	2.5
dNTPs (10 $\mu$ M)	0.5
Iniciador delantero (10 $\mu$ M)	0.5
Iniciador reverso (10 $\mu$ M)	0.5
MgCl <sub>2</sub>	2.5
TaqPol	0.25

Cuadro 3. Condiciones de la reacción de PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Amplificación	95°C	30 segundos	35
	60°C	30 segundos	
	72°C	2.5 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

Cuadro 4. Protocolo de amplificación del gen HN mediante PCR punto final.

### **5.3. Extracción y purificación del ADN de *E. coli* KRX**

La extracción total del ADN se realizó mediante la utilización del kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification System Promega, de acuerdo al protocolo de manufactura.

### **5.4. Cuantificación del ADN plasmídico**

La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 2000® de Thermo Scientific®, utilizando 2.0 µl de muestra de ADN.

### **5.5. Transformación de *E. coli* BL21**

Para preparar a las células *E. coli* BL21 (EMD Biosciences/Novagen, Madison, WI) competentes se sembraron en una placa de agar Luria Bertani (LB) y se incubó por 16 horas a 37°C. Estas bacterias se inocularon en 25 ml de medio LB, el cual se dejó incubar a 37°C en agitación constante (250 rpm) hasta que alcanzó 0.35 unidades de absorbancia a 600nm (aproximadamente tres horas después de la inoculación). Posteriormente se transfirió el cultivo a un tubo estéril de 50 ml y se colocó en hielo durante 10 minutos, después se centrifugó a 4100 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 15 ml de una solución fría de MgCl<sub>2</sub> a 80mM y CaCl<sub>2</sub> a 20mM. Se centrifugó a 4100 rpm durante 10 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante y resuspender en 1.0 ml de solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.1M. Esta resuspensión se transfirió a un micro tubo de 1.5 ml. Las células se mantuvieron en esta suspensión durante 12 horas a 4°C.

Posterior a este tratamiento se procedió a realizar la transformación de las células BL21 tomando 200 µl de las células competentes y pasándolas a un micro tubo de 1.5 ml y añadiéndole 50 µg de ADN plasmídico extraído y purificado de las células KRX, el cual se resuspendió suavemente. Esta mezcla se colocó en incubación a 42°C durante exactamente 90 segundos y después se transfirió a hielo durante 2 minutos, a las cuales se les adicionó 800 µl de medio LB y se dejó crecer por 45 minutos a 37°C. Se transfirieron 200 µl de este

cultivo a una placa de LB-kanamicina y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta su evaporación para finalmente incubar a 37°C durante 16 horas (Graham & Van der Eb, 1973).

### **5.6. Producción de la proteína HN en *E.coli* KRX y *E. Coli* BL21**

Una vez seleccionadas mediante PCR las colonias bacterianas transformadas con el gen plasmídico HN se realizó un cultivo bacteriano de estas *E. coli* en medio LB bajo en sales (ver anexo) con 200 µl de kanamicina (10mg/ml), el cual se dejó crecer durante 18 horas. De este cultivo se tomaron 250 µl para inocular en 75 ml de medio LB bajo en sales y se incubó en agitación continua (250 rpm) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se agregaron 250 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y 50 µl de L-Ramosa al 20% para nuevamente mantenerlos en agitación continua (250 rpm) durante 18 horas a 37°C (Larentis *et al.*, 2011).

### **5.7. Determinación cuerpos de inclusión en *E. coli* KRX.**

Después de la inducción de la expresión, las células se recuperan por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos y el pellet celular se lavó con 5 ml de agua destilada estéril, se recuperó nuevamente por centrifugación a 6000 rpm 10 minutos y el pellet se resuspendió en 5 ml de sacarosa al 20%, se pasó a agitación continua (250 rpm por 10 minutos), para posteriormente centrifugar a 8000 rpm por 20 minutos, de este proceso se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de un buffer de tris-HCl 5 mM pH 7.5. Se agregaron perlas de vidrio en un volumen igual al de la suspensión anterior (aproximadamente 5 ml) y se rompieron las células en un homogeneizador por 1 hora, las perlas de vidrio fueron filtradas y el extracto se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos, para posteriormente separar el sobrenadante (extracto proteico soluble) y se guarda para su análisis. Al pellet (extracto proteico insoluble) se le añadieron 5 ml de tritón al 1% y se mantuvo en agitación constante (250 rpm 10 min), para después centrifugar a 8000 rpm 20 minutos. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 5 ml de agua destilada estéril en agitación constante (250 rpm 10 min), se centrifugó a 8000 rpm 20 minutos, se

eliminó el sobrenadante y se disolvió el pellet en 5 ml de un buffer de solubilización pH 7.0 (ver anexo) y se mantuvo en agitación constante (250 rpm 24 horas). Al finalizar se centrifugó a 8000 rpm 20 minutos y se recuperó el sobrenadante (Dunn *et al.*, 2004).

## **5.8. Western-blot**

### **5.8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Las proteínas expresadas y purificadas se separaron y evaluaron mediante una electroforesis en geles de acrilamida al 12% utilizando un equipo Bio-Rad, con un separador de 1.0 mm. Se prepararon dos geles, uno para realizar una tinción de Coomassie y otro para la transferencia a membranas de PVDF (Immobilon-P, Merck Millipore). Se preparó y se colocó el gel separador, una vez que polimerizó se colocó el gel concentrador y el peine para las muestras, una vez polimerizado se introdujo en la cámara de electroforesis, a la cual se le añadió el buffer de corrida 1x (ver anexo) y las muestras fueron cargadas, las cuales anteriormente habían sido desnaturalizadas mediante la utilización del buffer reductor Laemmli de Bio-Rad (Laemmli, 1970).

La electroforesis se realizó a 70 volts en la fracción del gel concentrador y 150 volts para la fracción gel de corrida.

### **5.8.2. Tinción con azul de Coomassie**

Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie (ver anexo) durante una hora en ligera agitación y después el gel se pasó a una solución de desteñido durante 30 minutos en agitación continua para poder observar las proteínas totales y las proteínas de interés (Zacharius *et. al.*, 1969).

### **5.8.3. Transferencia de proteínas a membrana PVDF**

Posterior a la electroforesis se armó el cassette para realizar la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF. Se humedecieron dos esponjas y seis papel filtro en buffer de transferencia (ver anexo) para después armar el cassette de la siguiente manera: del lado de

la tapa negra se colocó una esponja, tres filtros, el gel de acrilamida con las proteínas de interés, membrana PVDF (previamente activada con metanol por 30 segundos, lavada con agua destilada por 5 minutos y lavada con buffer de transferencia por 10 minutos), tres papel filtro y por último una esponja. Se colocó en la cámara con buffer de transferencia y se le aplicaron 200 mA por dos horas (Towbin *et. al.*, 1979).

#### **5.8.4. Revelado de membrana PVDF para detectar la inmuno reactividad de la proteína HN**

Para confirmar la expresión de la proteína recombinante HN del PorPV la membrana de PVDF se bloqueó con una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS durante una hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados de diez minutos cada uno con solución de TBS-Tween 0.05%, posteriormente se dejó la membrana incubando con el anticuerpo primario anti-myc conjugado con peroxidasa en una dilución 1:5000 en TBS (ver anexo) durante toda la noche a 4°C, para nuevamente realizar tres lavados con solución TBS-Tween 0.05% y revelar mediante quimioluminiscencia (Raffo *et. al.*, 1995).

Para saber si nuestra proteína recombinante era reconocida por anticuerpos contra el PorPV, la membrana de PVDF se bloqueó, como se describió anteriormente, se realizaron tres lavados con solución TBS-Tween 0.05% y se incubó con suero de cerdo infectado experimentalmente con la cepa PAC 3 en dilución 1:2 en PBS estéril durante toda la noche a 4°C, posteriormente se lavó la membrana y se colocó el anticuerpo secundario anti IgG acoplado a fosfatasa alcalina producido en conejo en dilución 1:5000 en solución TBS, se lavó la membrana y se reveló utilizando el sustrato para fosfatasa alcalina Western-Blue de PROMEGA (Blake *et. al.*, 1984).

### **5.9. Purificación**

Se adicionaron a la columna 2.5 ml de los cuerpos de inclusión solubilizados a 2.0 unidades de absorbancia 280 nm en una columna con resina Chelating Sepharose Fast Flow de GE Healthcare previamente sanitizada, con la resina activada y equilibrada. Posterior a la

adición de los cuerpos de inclusión se realizó el lavado de la columna y por último la elusión para la obtención de la proteína HN purificadas (ver anexo) (Dunn *et al.*, 2004).

### 5.10. Determinación de proteínas totales

Para realizar la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método de Sedmak y Grossberg reportado en 1977, mediante una curva de calibración de albúmina a una concentración de 0.1 mg/ml y azul de Coomassie G-250 en ácido perclórico (ver anexo). Las muestras se midieron a una absorbancia de 620nm y se calculó su concentración mediante la interpolación con la curva de albúmina.

### 5.11. Actividad neuraminidasa

Para determinar si la proteína recombinante HN del PorPV tenía actividad neuraminidasa se realizó la mezcla de reacción como se muestra en el cuadro 5.

Buffer de acetatos de sodio 0.4M a pH 4.0	50 $\mu$ l
Fetuina 10 mg/ml	50 $\mu$ l
Muestra	50 $\mu$ l
Agua	50 $\mu$ l

**Cuadro 5.** Reactivos utilizados para la determinación de la actividad neuraminidasa.

Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos, se pasó a ebullición por 2 minutos y se le agregó 50  $\mu$ l de ácido peryódico (5.7 mg/ml de ácido peryódico en HCl 125 mM preparado al momento), después se incubó nuevamente 37 °C durante 30 minutos y se le agregó 40  $\mu$ l de arsenito de sodio al 2% en HCl 0.5 M, 200  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico 0.1M pH 9 y se puso en ebullición 10 minutos hasta aparición de un color rosa, se pasó a un choque térmico en hielo durante 2 minutos y se regresó a ebullición unos segundos hasta recuperar el color rosado. Posteriormente se le agregó 500  $\mu$ l de n-butanol en HCl 0.5 y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Al final se tomaron 250  $\mu$ l de la fase acuosa y se midió absorbancia a 550 nm (Kalbfuss *et al.*, 2008).

### **5.12. Diálisis de la proteína recombinante**

Para eliminar las sales y el imidazol de la proteína HN recombinante purificada se realizó el proceso de diálisis utilizando membranas de celulosa regenerada Spectra/Por, las cuales son capaces de retener partículas de un peso mayor a 14 kDa. La proteína en la membrana de diálisis se colocó en agitación continua a 4.0°C durante 24 horas haciéndole pasar por cada mililitro de muestra 500 ml de agua destilada desionizada (Nelson *et.al*, 2008).

### **5.13. Liofilización de la proteína recombinante HN del PorPV**

La muestra de proteína recombinante purificada y dializada se colocó en frascos de vidrio y posteriormente en la liofilizadora Cryodos Telstar® durante 24 horas a 0.013mBar y -88.0°C en promedio.

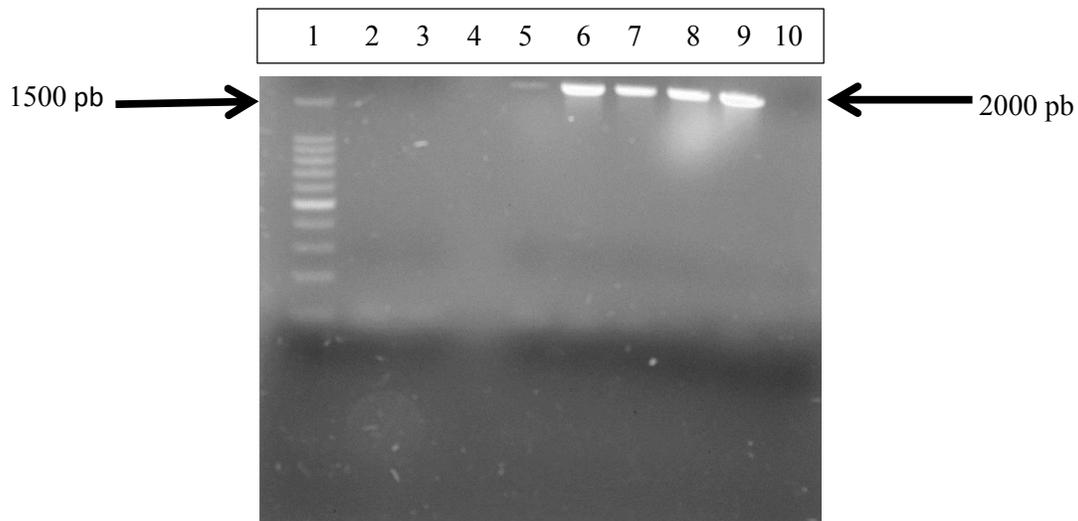
### **5.14. Análisis estadístico**

Al utilizar dos cepas de *E. coli* (KRX y BL21) especializadas en la sobre expresión de proteínas recombinantes y transformadas con el plásmido fue necesario determinar cuál de las dos produjo la mayor cantidad de cuerpos de inclusión. Para esto se realizó la sobre expresión con IPTG para la producción de la proteína recombinante HN y se extrajeron los cuerpos de inclusión de ambas cepas. De este ensayo se realizaron tres repeticiones para la cepa KRX y BL21 y se comparó la cantidad obtenida de cuerpos de inclusión mediante estadística descriptiva de los datos obtenidos utilizando la prueba *t de student* (Daniel, 2004).

## 6. Resultados

### Gen HN

Mediante la amplificación por PCR punto final se logró la identificación de cinco colonias de *E. coli* KRX positivas al gen HN (Figura 4), con las cuales se comenzó a trabajar para la producción de la proteína y la purificación del ADN plasmídico.

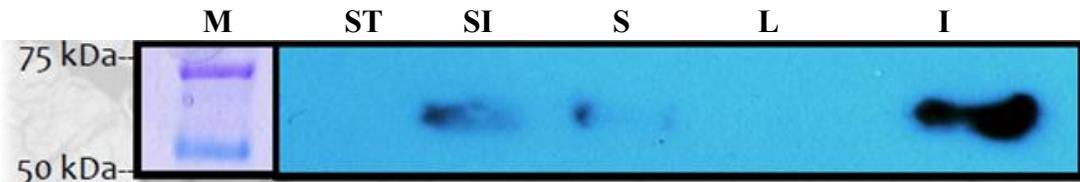


**Figura 4.** Productos de PCR en gel de agarosa al 0.8%. 1: marcador de pares de bases. 2-4: colonias de *E. coli* KRX negativas. 5-9: colonias de *E. coli* KRX positivas. 10: control negativo.

### Determinación de cuerpos de inclusión en cepas transformadas de *E. coli*

Debido a que la sobre expresión de genes clonados puede derivar en la formación de agregados proteicos insolubles en los sistemas bacterianos para la expresión de proteínas recombinantes, como es el caso de *Escherichia coli*, se tuvo que determinar en donde se encontraba la mayor cantidad de proteína HN recombinante del PorPV. Para esto se utilizaron muestras de la cepa bacteriana sin transformar, sin inducir, fracción proteica soluble del lisado bacteriano transformado e inducido, fracción de lavados del extracto proteico insoluble del lisado bacteriano transformado e inducido y una fracción del extracto proteico insoluble del lisado bacteriano transformado e inducido. Estas muestras se

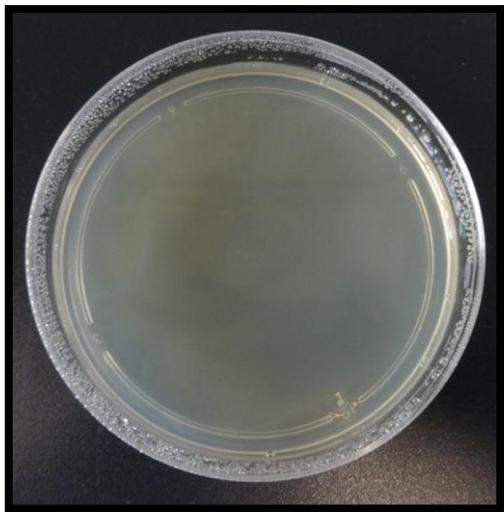
corrieron en un gel SDS-PAGE y se reveló utilizando quimioluminiscencia (Figura 5). Se logró determinar que la proteína HN del PorPV se encuentra en mayor cantidad en el extracto proteico insoluble, por lo que para poder ser utilizada posteriormente se necesita solubilizar utilizando urea.



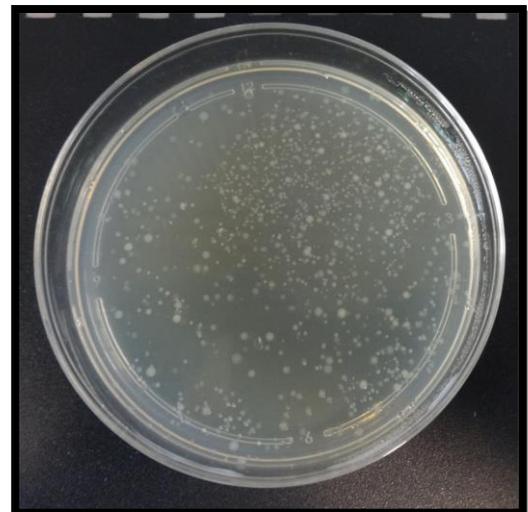
**Figura 5.** Western-blot revelado mediante quimioluminiscencia. **M:** marcador de peso molecular. **ST:** cepa *E. coli* *KRX* sin transformar. **SI:** cepa de *E. coli* *KRX-HN* sin inducir. **S:** fracción proteica soluble del lisado *E. coli* *KRX-HN*. **L:** fracción de lavados del lisado de *E. coli* *KRX-HN*. **I:** fracción proteica insoluble de *E. coli* *KRX-HN*.

#### **Transformación de la cepa *E. coli* BL-21 con el vector de expresión pDual-HN**

Debido a que los cuerpos de inclusión y la proteína extraída de la cepa de *E. coli* *KRX* no eran de la calidad y de la cantidad deseada, se realizó la transformación de una cepa de *E. coli* BL21. Se utilizó como control negativo la cepa nativa de BL21 (Figura 6) y la cepa transformada se creció en una placa de agar LB con kanamicina (Figura 7).



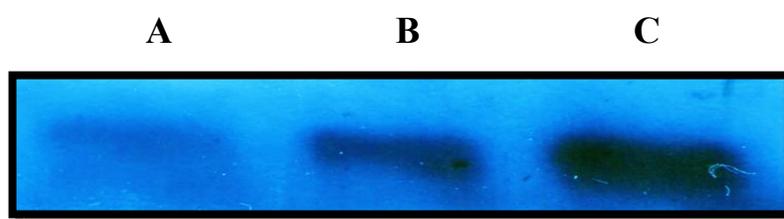
**Figura 6.** Control negativo (células competentes de *E. coli* BL21 en medio LB+kanamicina)



**Figura 7.** Transformación (células competentes de *E. coli* BL21 + pDual-HN en medio LB+kanamicina)

### Comparación de la expresión de *E. coli* KRX y BL-21

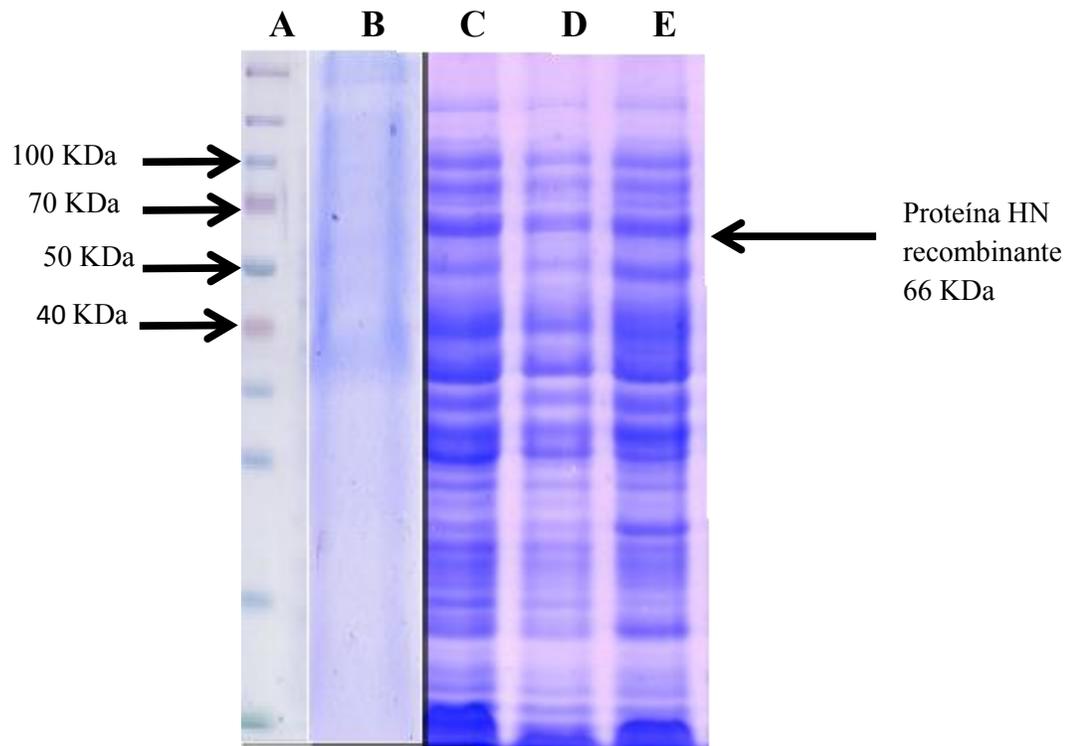
Mediante un SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12% se comparó la expresión de la proteína HN recombinante del PorPV de las cepas transformadas de *E. coli* KRX y BL-21 (Figura 10 y 11). Las bandas de las proteínas extraídas de la cepa de *E. coli* BL21-HN y de sus cuerpos de inclusión se encontraron mejor definidas. Y en cuanto al western-blot revelado mediante la técnica de quimioluminiscencia se logró observar una mayor intensidad en las bandas de la proteína recombinante HN del PorPV (Figura 8 y 9).



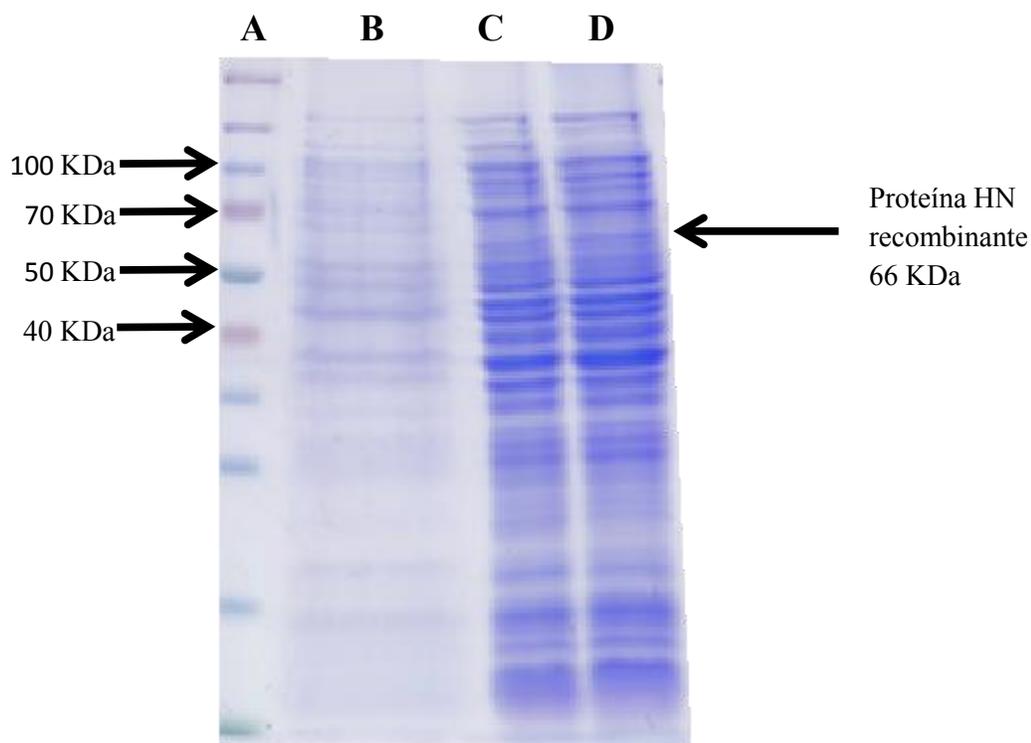
**Figura 8.** Western-blot revelado mediante quimioluminiscencia. A: cepa de *E. coli* KRX-HN sin expresar. B: cepa de *E. coli* KRX-HN inducida durante 8 horas. C: cepa de *E. coli* KRX-HN inducida durante 16 horas.



**Figura 9.** Western-blot revelado mediante quimioluminiscencia. A: cepa de *E. coli* BL21-HN sin inducir. B: cepa de *E. coli* BL21-HN inducida durante 16 horas.



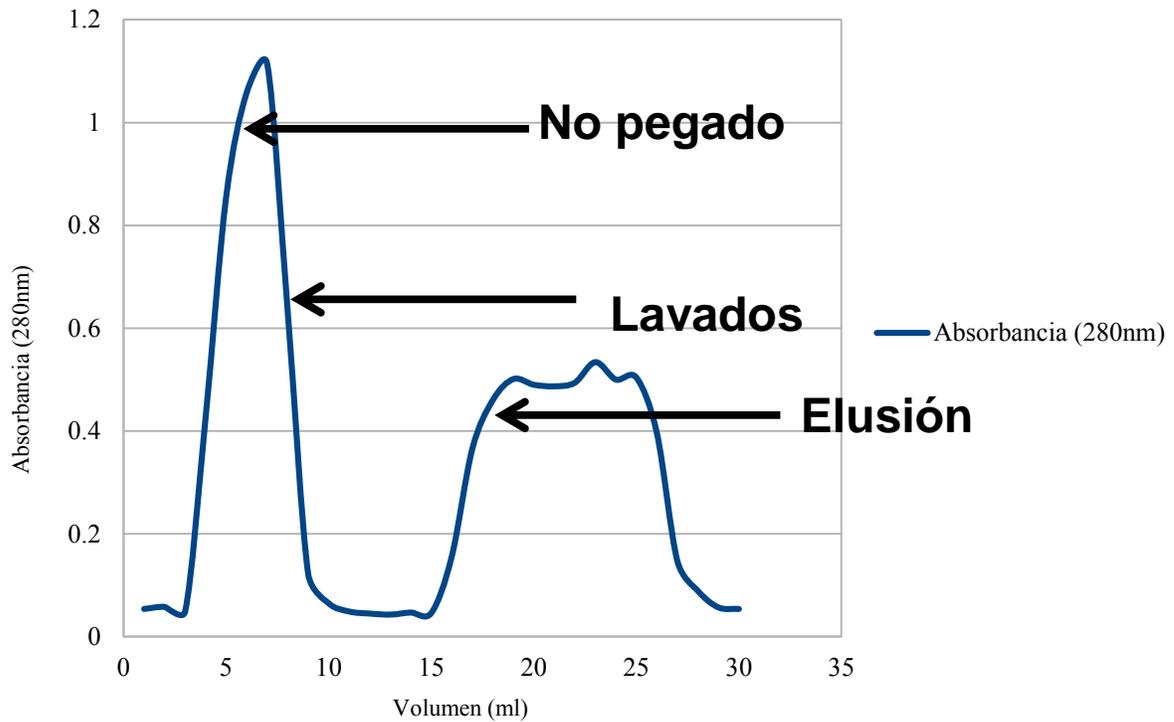
**Figura 10.** Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie para *E. coli* KRX-HN. **A:** Marcador de peso molecular. **B:** Cuerpos de inclusión. **C:** *E. coli* KRX-HN sin inducir. **D:** *E. coli* KRX-HN inducidas por 8 horas. **E:** *E. coli* KRX-HN inducida durante 16 horas.



**Figura 11.** Gel de acrilamida al 12% tenido con azul de Coomassie para *E. coli* BL21-HH. **A:** Marcador de peso molecular. **B:** Cuerpos de inclusión. **C:** *E. coli* BL21-HN sin inducir. **D:** *E. coli* BL21-HN inducida durante 16 horas.

### **Cromatograma del proceso de purificación resina GE sepharosa**

Mediante la determinación de la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones de la purificación se logró graficar el proceso, dando como resultado tres secciones importantes, la primera de ellas corresponde a totalidad de las proteínas de los cuerpos de inclusión, la segunda corresponde a las proteínas que no tienen ninguna afinidad al níquel que se encuentra en la resina de la columna y se van perdiendo en los lavados que se le dieron a la columna y la tercera corresponde a la elusión, en donde recuperamos la proteína de interés, que en este caso corresponde a la HN recombinante del PorPV (Figura12).



**Figura 12.** Cromatógrama del proceso de purificación de la proteína recombinante HN del PorPV.

### Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas extraídas de las cepas KRX y BL21 de *E. coli* que se cuantificaron mediante la técnica modificada de Sedmak y Grossberg (1977).

A los resultados mostrados en el cuadro 6 se les realizó estadística descriptiva utilizando la prueba de *t de student* para diferencia de medias de BL21 y KRX con un valor de confianza de 0.05. El valor p obtenido fue de 0.02212, lo que nos indica que la cantidad de cuerpos de inclusión producida por la cepa de *E. coli* BL21 fue mayor que la de KRX.

Repetición	KRK ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	BL21 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1	0.2528	0.7618
2	0.2489	0.5430
3	0.0657	0.4087
Media	0.1891	0.5711

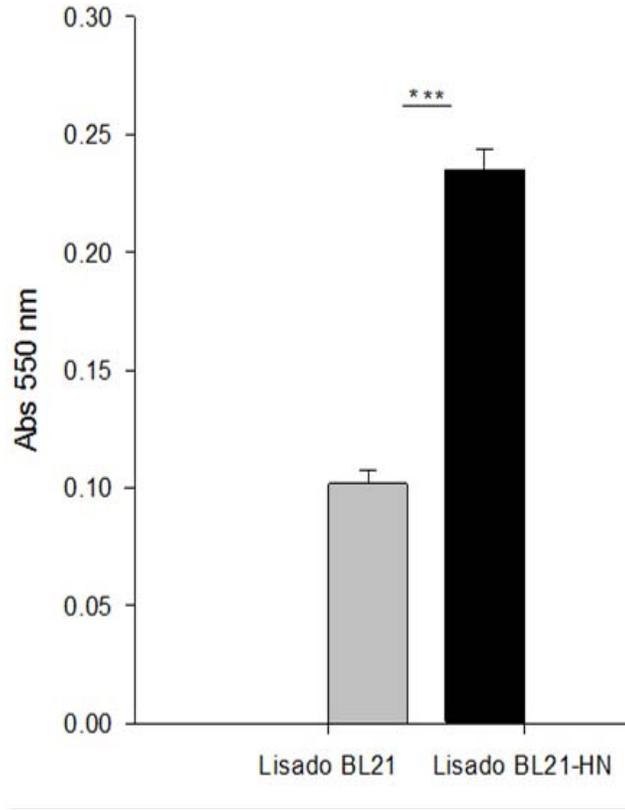
**Cuadro 6.** Cantidad ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de cuerpos de inclusión obtenidos de las dos cepas de *E. coli*.

### Actividad neuraminidasa

Se midió la actividad neuraminidasa de las proteínas HN recombinantes de las cepas de *E. coli* KRX y BL21. Se realizó el ensayo por triplicado. La proteína de la KRX no presentó actividad, sin embargo, la proteína obtenida de BL21 arrojó actividad (Cuadro 7 y Figura 13). Como control negativo de esta prueba se utilizó agua y como control positivo fue usado el virus de influenza A VR-1469 (Puerto Rico 1934).

Muestra	Absorbancia 550nm	Actividad nMol/min
1 Lisado BL21-HN	0.253	0.218
2 Lisado BL21-HN	0.282	0.237
3 Lisado BL21-HN	0.297	0.249
1 Lisado BL21	0.038	0.094
2 Lisado BL21	0.045	0.099
3 Lisado BL21	0.06	0.112

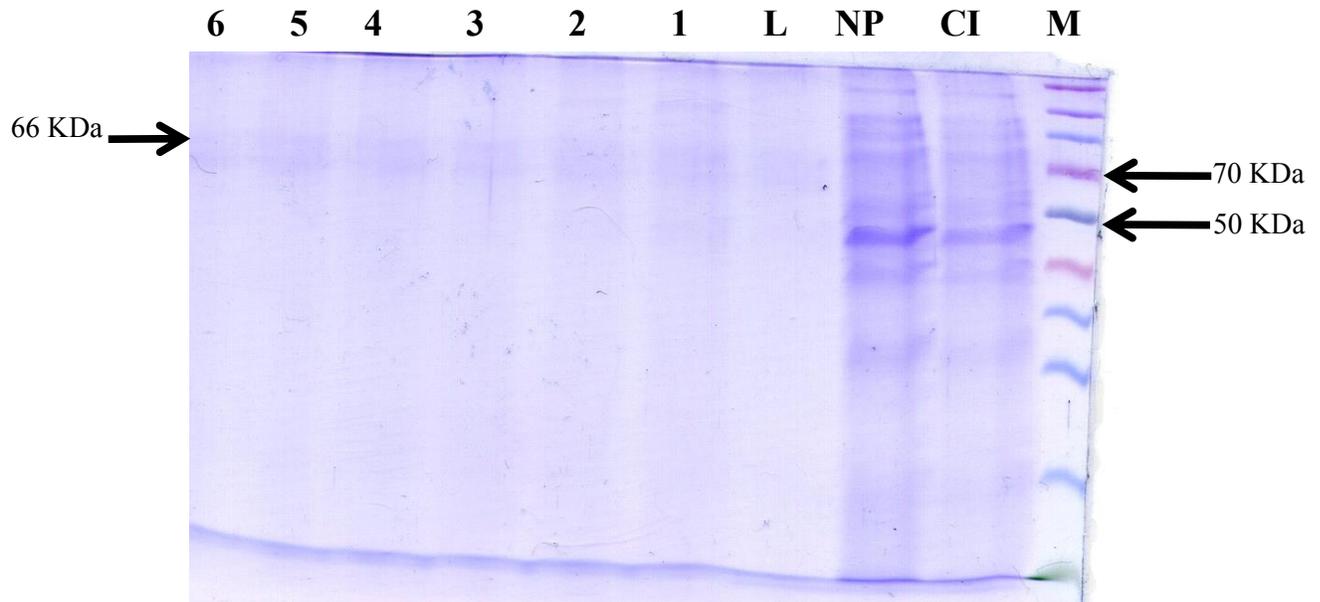
**Cuadro 7.** Actividad neuraminidasa de la proteína recombinante HN del PorPV obtenida de la cepa de *E. coli* BL21.



**Figura 13.** Gráfica de barras en donde se compara la actividad neuraminidasa entre *E. coli* BL21-HN y BL21 en donde  $P < 0.001$ .

### Tinción de Coomassie

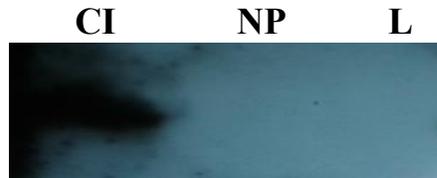
Se realizó una tinción con Azul de Coomassie a las fracciones del proceso de purificación mediante columna de afinidad de la proteína HN recombinante del PorPV extraída de la cepa *BL21-HN* para verificar que el proceso de extracción y purificación fue correcto. En la fracción de los cuerpos de inclusión se observaron varias bandas que corresponden a proteínas propias de *E. coli* BL21, en la fracción de no pegado de la columna se observó una gran cantidad de proteínas que no se lograron unir al níquel contenido en la resina, la fracción de lavados mostró muy poca cantidad de proteína y en las eluciones se observan dos bandas que corresponden a la proteína HN, una de las bandas corresponde al peso esperado de la proteína, el cual es de 66 kDa (Figura 14).



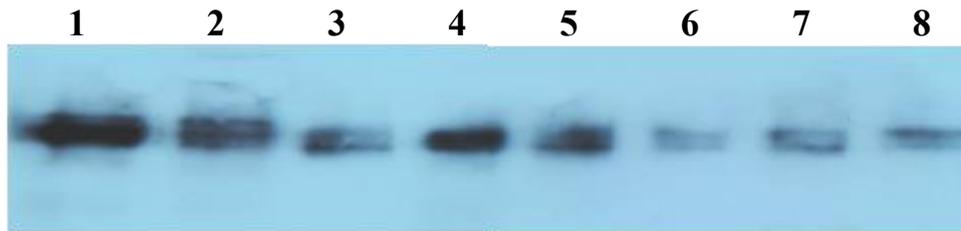
**Figura 14.** Gel de poliacrilamida al 12% tenido con Azul de Coomassie de diferentes fracciones obtenidas del proceso de expresión de la proteína recombinante HN. **M:** marcador de peso molecular. **CI:** cuerpos de inclusión de *BL21-HN*. **NP:** fracción de proteínas no pegadas a la columna de purificación. **L:** fracción de lavados de la columna. **1-6:** número de eluciones realizadas a la columna de purificación en donde se observa la proteína HN recombinante del PorPV.

### Western-blot

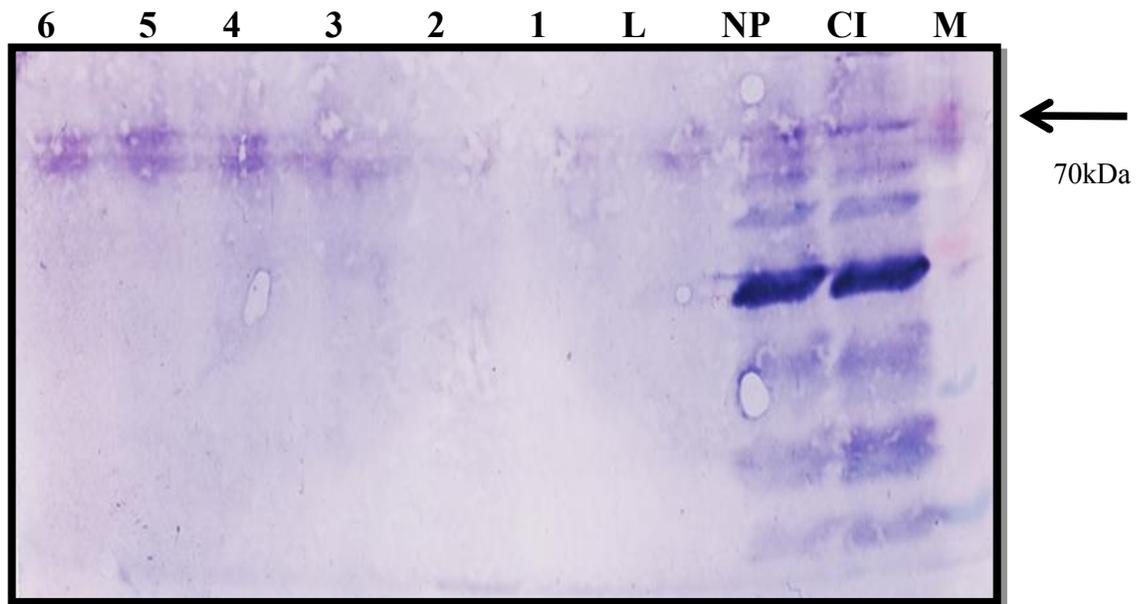
Las muestras obtenidas de la purificación se corrieron en un SDS-PAGE y se revelaron mediante la utilización de dos anticuerpos primarios, el anti-myc acoplado a peroxidasa y suero de cerdo positivo a PorPV. El anti-myc fue revelado utilizando quimioluminiscencia y se logró la detección de la proteína recombinante HN en los cuerpos de inclusión y en las eluciones. En las fracciones de no pegado y lavados del proceso de purificación no se logró la detección de la proteína HN (Figura 15). En las eluciones se lograron observar dos bandas, una de ellas corresponde al peso esperado de 66 KDa (Figura 16). Mediante un revelado con sustrato para fosfatasa alcalina se logró el reconocimiento de la proteína HN mediante anticuerpos de cerdo positivos a PorPV en el peso esperado, de igual manera al reconocimiento por anti-myc, se identificaron dos bandas, una de ellas correspondiente al peso esperado (Figura 17).



**Figura 15.** Western-blot revelado mediante quimioluminiscencia. **CI:** cuerpos de inclusión de *E. coli BL21-HN*. **NP:** fracción de proteínas no pegadas al níquel en el proceso de purificación. **L:** fracción de lavados del proceso de purificación.



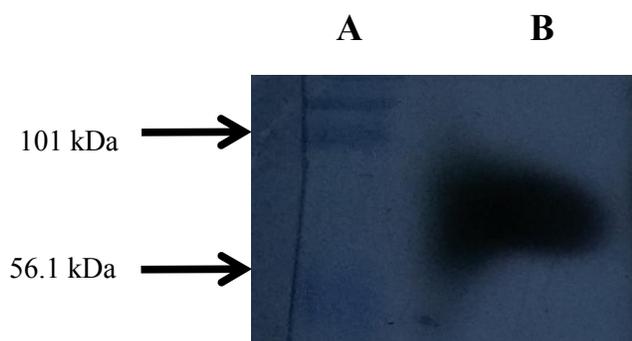
**Figura 16.** Western-blot revelado mediante quimioluminiscencia. **1-8:** eluciones realizadas del proceso de purificación de la proteína HN mediante columna de afinidad al níquel.



**Figura 17.** Western-blot revelado utilizando sustrato para fosfatasa alcalina. **M:** marcador de peso molecular. **CI:** cuerpos de inclusión de *E. coli BL21-HN*. **NP:** fracción de proteínas no pegadas al níquel en el proceso de purificación. **L:** fracción de lavados del proceso de purificación. **1-6:** fracciones de elusión del proceso de purificación mediante columna de afinidad en donde se muestran las dos bandas correspondientes a la proteína recombinante HN del PorPV.

## Verificación de la inmuno reactividad *in vitro* de la proteína recombinante HN del PorPV

Una vez que se obtuvo la proteína HN recombinante purificada y dializada se realizó un último ensayo de western blot, utilizando como anticuerpo primario suero de cerdo positivo al PorPv en una dilución 1:2 incubando toda la noche a 4°C, como anticuerpo secundario un anti-pig producido en conejo marcado con peroxidasa en una dilución 1:5000 incubándolo durante una hora a 4°C y se revelo mediante quimioluminiscencia (Figura 18)



**Figura 18.** Western blot revelado mediante quimioluminiscencia. **A)** Marcador de peso molecular. **B)** Reconocimiento de la proteína HN recombinante purificada, dializada y liofilizada mediante anticuerpos contra el PorPV.

## 7. Discusión

La enfermedad de ojo azul es causada por el Rubulavirus Porcino (PorPV), el cual es un virus ARN cadena sencilla y con sentido negativo, que desde su extremo 3' a 5' codifica para seis proteínas estructurales en el siguiente orden: NP, P, M, F, HN y L. La proteína Hemoaglutinina-Neuraminidasa (HN) es la más inmunogénica y la que estimula los anticuerpos neutralizantes (Hernández *et al.*, 1998). El gen que codifica para esta proteína se ha estudiado y en base a diversos aislamientos se han logrado caracterizar 11 genotipos distintos, los cuales se encuentran reportados en el GenBank. El gen HN de la cepa LMPV del PorPV fue clonado e insertado en el vector de expresión pDual®GC 6.6kb de Agilent Technologies y con este vector se transformó de forma inicial la cepa *KRX* de *Escherichia coli*. Esta transformación se verificó mediante la técnica de PCR punto final al observarse una amplificación de 2000 pares de bases en un gel de agarosa al 0.8%, siendo que Wang y colaboradores en el 2007 indicaron que el tamaño del gen HN es de 1862 nucleótidos, el cual tiene un 5'UTR de 72 nucleótidos y un 3'UTR de 61 nucleótidos. Sin embargo el segmento clonado abarca regiones intergenómicas no codificantes del gen F y del L para asegurar que se clonaba el gen HN completo.

Se logró la sobre expresión de la proteína recombinante HN del PorPV mediante IPTG debido a que el vector de expresión pDual®GC consta de un promotor híbrido PT7//*lacO*, ya que el IPTG actúa como análogo no hidrolizable de la alolactosa, la cual es un metabolito isomero de la lactosa, permitiendo la sobre expresión de las proteínas codificadas por de dicho vector. Por esto el IPTG a diferencia de la lactosa es el inductor más comúnmente utilizado debido a que no se usa como sustrato ya que no puede ser metabolizado (Hansen *et al.*, 1998).

Para poder obtener la mayor producción de proteína recombinante, para realizar el estudio de la inmunoreactividad, fue necesario determinar si se estaba expresando en cuerpos de inclusión en el extracto proteico insoluble, o en el extracto proteico soluble, fue por eso que se corrió un western blot utilizando como anticuerpo primario el anti-myc marcado con peroxidasa y la mayor detección se dio en la fracción insoluble del lisado de la bacteria *E. coli* *KRX*. Se ha reportado que la sobre expresión de una proteína recombinante en sistemas

bacterianos, como es el caso de *E. coli*, conduce a la formación de cuerpos de inclusión y que la sobre expresión de genes codificados por plásmidos desencadena la transcripción de genes de choque térmico y la formación de proteasas, lo que a menudo resulta en la agregación de la proteína codificada como cuerpos de inclusión. La ventaja que nos proporcionan estos agregados es que se obtiene una gran cantidad de proteína y se encuentran protegidos de la actividad de las proteasas (Kane y Hartley, 1988; Villaverde y Carrió, 2003).

Los cuerpos de inclusión corresponden a proteína recombinante mal formada y agregada, por lo tanto es necesario transfórmalos en formas bioactivas solubles, ya que representan un obstáculo importante para la producción de proteínas con actividad biológica (Villaverde y Carrió, 2003; Vinogradov *et al.*, 2003). La solubilización se realiza mediante diversos métodos, algunos de ellos con agentes caotrópicos como los es la urea y el cloruro de guanidino, los cuales favorecen la biosolubilidad de las proteínas (Bernandez E, 1998). Es por esto que los cuerpos de inclusión obtenidos de KRX se solubilizaron utilizando urea 8M.

La KRX es una cepa de *E. coli* que contiene una copia del ADN cromosómico T7 de la ARN polimerasa dirigida por el promotor rhaBAD, el cual proporciona un control de la proteína expresada a través del promotor T7 y se reporta que los niveles de rendimiento de proteína son tan altos o mayores que los obtenidos de BL21 (Single Step (KRX) Competent Cells Technical Bulletin, PROMEGA). Sin embargo para tener una alternativa y comparar la expresión de la HN recombinante se decidió transformar la cepa BL21 ya que se menciona que tiene una deficiente producción de proteasas OmpT y Lon (BL21 competent *E. coli* Technical Bulletin, New England Biolabs Inc.). La cepa BL21 logró crecer en placas de agar LB con kanamicina debido al gen de resistencia contenido en el vector de expresión pDual®GC en donde se encontraba el gen HN.

En un gel de acrilamida teñido con de azul de Comassie se mostró la comparación de la expresión de los cuerpos de inclusión de ambas cepas transformadas. Los cuerpos de inclusión producidos por BL21 era de una mejor calidad que los de KRX, ya que se veían las bandas con una mayor definición. En western blot con una inducción después de 16 horas se observó una banda de mayor intensidad en la cepa de BL21. Sin embargo fue

necesario demostrar mediante estadística descriptiva que la cepa de BL21 producía mayor cantidad de cuerpos de inclusión, esto se logró mediante el ensayo de *t de student* comparando la media de las tres repeticiones de los ensayos de obtención de cuerpos de inclusión, dando como resultado que BL21 tuvo una mayor producción de cuerpos de inclusión ( $p < 0.05$ ) con  $0.5711 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en comparación con KRX que tuvo  $0.1891 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Shiloach y colaboradores reportaron un estudio en 1995, donde compararon la producción de la exotoxina A recombinante de *Pseudomona*, utilizaron la cepa de *E. coli* BL21 y la JM109, los resultados mostraron la superioridad de BL21 para la producción de un sistema de expresión de proteína recombinante. En otro estudio se establecieron sistemas de expresión para la Cota-lacasa recombinante de *Bacillus subtilis*, en donde se compararon cinco cepas de *E. Coli*, entre ellas KRX y BL21; en donde BL21 tuvo una mayor producción con  $0.159 \text{ mg/ml}$ , en comparación con  $0.125 \text{ mg/ml}$  de KRX (Brissos *et al.*, 2009).

En uno de los ensayos de western blot revelado por quimioluminiscencia se logró detectar expresión de la proteína recombinante en las cepas de KRX y BL21 de *E. coli* sin inducir, esto se debe a que el vector de expresión pDual®GC consta de la región del promotor y potenciador del citomegalovirus humano, el cual tiene una fuerte actividad promotora permitiendo la expresión constitutiva de los clones del vector, por lo que es uno de los más utilizados *in vitro* e *in vivo* (Radhakrishnan *et al.*, 2008).

Otro ensayo que se realizó para determinar con que cepa se seguiría trabajando fue el de actividad neuraminidasa. En donde en KRX no se encontró actividad, sin embargo en BL21 se detectó actividad neuraminidasa residual, esto al mostrarse una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la actividad detectada en una cepa de BL21 sin transformar. Lo que significa que la proteína HN recombinante del PorPV cepa LPMV expresada por BL21 es de mejor calidad, lo que se puede deber a que realiza un mejor proceso de transcripción, incluso podría llegar a realizar procesos post transcripcionales y adicionalmente que permite la sobre expresión de ARN de transferencia de codones raros (Evans & Min-Qun Xu, 2011). Ya que se sabe que la expresión de ARNm y ARNt es proporcional a la frecuencia del uso de los codones, sin embargo dentro de *E. coli* existe un sesgo en los 61 codones en comparación con los sistemas eucariontes, ya que

hay codones que son usados con una frecuencia de menos del 1% en *E. coli*, por lo que AGG, AGA, CUA, AUA, CGA o CCC pueden reducir la cantidad y calidad de la proteína sintetizada, incluso se pueden provocar problemas con la traducción (Kane, 1995). En la actualidad no hay reportes sobre actividad neuraminidasa en proteínas recombinantes.

Una vez obtenidos los cuerpos de inclusión solubilizados de BL21 se realizó el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad, ya que en el extremo C-terminal de la proteína HN recombinante se encuentran seis histidinas, las cuales tienen afinidad al níquel y como se ha descrito previamente (Hoffman & Roeder, 1991) estas proteínas recombinantes pueden purificarse con diversas resinas comerciales. Se utilizó el imidazol para realizar el lavado y la elusión, ya que a una concentración adecuada resulta ser una poderosa herramienta para afinar el proceso de purificación, para aumentar la pureza y para aumentar la especificidad (Arnau *et al.*, 2006). Con las fracciones obtenidas del proceso de purificación se realizó el cromatograma, el cual mostró un pico que corresponde a las proteínas que no se pegaron a la resina que actúa como soporte sólido inerte, la cual tiene como ligando de afinidad al níquel, seguido del proceso de lavado y un segundo pico que corresponde a las eluciones, donde observamos que la proteína de interés se obtiene en 8 ml aproximadamente. Estos resultados indican que el proceso de purificación es óptimo (Nelson *et al.*, 2008).

La tinción de azul de Coomassie realizada al gel donde por electroforesis se separaron las proteínas obtenidas del proceso de purificación permitió observar la detección de dos bandas, una de ellas a 66 kDa aproximadamente y otra a un peso menor. Se menciona que el hecho de que se obtuvieran dos productos pudiera ser a que la traducción inició en dos sitios diferentes, en el primer AUG y en el AUG que se encuentra en el codón 111 (Aguilar, 2001). Una vez que se detectó la proteína purificada se realizó un western blot a todas las fracciones del proceso de purificación utilizando como anticuerpo primario el anti-myc marcado con peroxidasa. Solo se detectó señal en los cuerpos de inclusión y en ocho eluciones donde la señal se observó a un peso aproximado de 66 kDa, tal y como se reporta el peso de la proteína viral HN (Sundqvist *et al.*, 1990). En la fracción de las proteínas no pegadas y los lavados no hubo reconocimiento. Lo que indica, junto al cromatograma, que en el proceso de purificación no perdemos la proteína recombinante.

Se realizó un segundo western-blot, para detectar si la proteína recombinante HN era reconocida por anticuerpos contra el PorPV, esto utilizando como anticuerpo primario suero de cerdo positivo al PorPV. Hubo detección en todas las fracciones de la purificación, sin embargo en las eluciones solo se observan dos bandas, y al igual que en la tinción con azul de Comassie y el reconocimiento con anti-myc, una de las bandas se observa a un peso aproximado de 66 kDa. En 2001 Aguilar *et al*, realizó la clonación del gen HN, y se expresó en tres sistemas, uno *in vitro* utilizando reticulocitos de conejo, el segundo en un sistema de baculovirus y el tercero mediante una transfección a células COS-1, estos dos últimos sistemas tienen como ventaja la posibilidad de realizar procesos post transcripcionales a diferencia de los sistemas bacterianos, sin embargo los productos obtenidos en ambos sistemas tuvieron una detección a un peso aproximado de 56 kDa mediante sueros monoclonales, no obstante, no hubo detección al utilizar el suero policlonal de cerdo.

El desarrollo de proteínas recombinantes ha demostrado ser muy difícil debido a la complejidad de la producción y purificación de proteínas, y a su limitada estabilidad física y química. Sin embargo para superar la barrera de la inestabilidad, las proteínas suelen transformarse en formas sólidas mediante la liofilización para lograr una vida útil aceptable, sin embargo, el proceso de liofilización puede desnaturar las proteínas en diversos grados (Wang, 2000). Es por esto que fue necesario realizar un ensayo donde las eluciones se liofilizaron, se resuspendieron y posteriormente se le realizó un western blot utilizando como anticuerpo primario suero de cerdo positivo al PorPV donde se observó reconocimiento al peso esperado de 66 kDa. Lo que indica en efecto, que el proceso de liofilización no afecta el reconocimiento de anticuerpos hacia la proteína recombinante HN del PorPV.

## 8. Conclusiones

Se lograron detectar las colonias de *E. coli* KRX que contenían el gen HN de la cepa LPMV en el vector de expresión pDual®GC mediante la amplificación de 2000 pb por PCR punto final.

La sobre expresión de la proteína recombinante HN del PorPV mediante la inducción con IPTG produce la formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*.

Se logró transformar la cepa BL21 de *E. coli* a partir de plásmido heterólogo obtenido de KRX.

La cepa de *E. coli* BL21, produjo una mayor cantidad de cuerpos de inclusión que KRX y presento actividad nauraminidasa residual.

Se logró estandarizar el proceso de purificación en donde no se pierde la proteína recombinante.

Se logró la detección de la proteína recombinante HN a un peso de 66 kDa,

Con este trabajo se establecieron las condiciones óptimas para el escalamiento de la producción y purificación de la proteína HN del PorPV.

## 9. Anexo

### Medio LB bajo en sales

Bacto triptona.....10 gr

Extracto de levadura..... 5 gr

Cloruro de sodio..... 5 gr

Ajustar pH a 7.5

Aforar a 1000 ml en agua destilada

### Gel de acrilamida al 12% (para dos geles)

- **Gel separador:**

H<sub>2</sub>O destilada.....3.3 ml

Acrilamida al 30%/bis-acrilamida.....4.0 ml

Buffer de Tris 1.5M pH 8.8.....2.5 ml

SDS 10%.....100 µl

PSA 10%.....100 µl

TEMED.....4µl

- **Gel concentrador:**

H<sub>2</sub>O destilada.....2.77 ml

Acrilamida al 30%/bis-acrilamida.....0.83 ml

Buffer de Tris 0.5M pH 6.8.....1.26 ml

SDS 10%.....50 µl

PSA 10%.....50 µl

TEMED.....5µl

### Solución de acrilamida al 30%/bis-acrilamida

Acrilamida.....30 gr

Bis-acrilamida.....0.8 gr

Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Buffer de corrida para electroforesis 1x**

Tris base.....3.03 gr  
Glicina.....14.41 gr  
SDS.....1.0 gr  
Aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Buffer de transferencia 1x**

Tris base.....3.03 gr  
Glicina.....14.41 gr  
SDS.....1.0 gr  
Metanol.....200 ml  
Aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Solución de tñido azul de Coomassie G-250**

Azul brillante G-250.....0.12 gr  
Ácido acético.....20 ml  
Aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Solución de desteñido**

Ácido acético.....20 ml  
Metanol.....100 ml  
Aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O destilada

**Solución amortiguadora de trietanolamina (TBS)**

NaCl.....7.5 gr  
Trietanolamina.....2.8 ml  
MgCl.....0.1 gr  
CaCl.....0.02 gr  
Ajustar el pH a 7.2  
Aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada

### **Solución de revelado**

4-cloro-1-naftol.....	30 mg
Metanol.....	10 ml
TBS.....	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50 µl

### **Buffer de solubilización pH 7.00**

Imidazol.....	30mM
Urea.....	8M
Buffer de fosfatos.....	50mM pH 7.00
Cloruro de sodio.....	0.5M

### **Purificación**

Todas las soluciones se filtran previamente por membrana de nitrocelulosa 0.22µm de poro.

- Sanitización:

Agua destilada.....	4.5ml
EDTA 0.2M.....	750µl
NaCl 0.5M.....	3.0ml
Agua destilada.....	4.5ml
NaOH 0.5M.....	3.0ml
Agua destilada.....	4.0ml

- Activación de la resina:

NiCl 0.2M.....	1.0ml
Agua destilada.....	7.5ml
NaCl 0.5M.....	3.0ml

- Equilibrio:

Buffer de equilibrio.....	7,5ml
---------------------------	-------

- Muestra:  
2.5 ml de muestra a 2.0 Unidades de Absorbancia 580nm

- Lavado:  
Buffer de equilibrio.....7.5ml

- Elusión:  
Buffer de elusión.....8.0ml

### **Buffer de equilibrio**

Imidazol.....30mM

NaCl.....0.5M

Buffer de fosfatos.....50mM pH 7.00

### **Buffer de elusión**

Imidazol.....400mM

NaCl.....0.5M

Buffer de fosfatos.....50mM pH 8.00

### **Azul de Coomassie para determinación de proteínas**

Azul brillante G-250.....0.12 gr

Ácido perclórico 3%.....200 ml

## 10.Referencias

Abbas AK, Lichtman A H, Peber J. (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. 6° Edición. Editorial Elsevier.

Aguilar Martínez Elisa María del Carmen. (2001). *Expresión del gen HN del virus del síndrome del ojo azul en sistemas heterólogos*. CINVESTAV IPN. Tesis de maestría

APHIS. (2007) *Reglamento de Importación de Animales y Productos de Origen Animal de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA*.

Arnau J, Lauritzen C, Petersen G, Pedersen J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 48: 1-13.

Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73: 1195-1200.

Berg M, Bergvall C, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. (1997). Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus f proteins. *Virus Genes* 14: 55-61.

Bernardez E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion of Biotechnology*. 9: 157-163.

Bjorkman, C. *et al.*. *Parasite Immunology* (1994), vol. 16 (12), pp 643-648.

Blake S, Johnston H, Russell-Jones J, Gotschlich C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical biochemistry*. 136(1): 175-179.

Bobadilla E, Espinoza A, Martinez F. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Rev de Mex Cienc Pecu.*1(3): 251-268

Brissos V, Pereira L, Munteanu F, Cavaco-Paulo A, Martins L. (2009). Expression system

of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. *Biotechnol. J.* 4: 558-563.

Carreón RN, Fuentes MR, (1991). Frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos del altiplano y norte de México. *Veterinaria México*, 22:177-178.

CFSPH, (2006) Enfermedad de Ojo Azul.

Correa P, Pérez J, Martínez A. (1997). Encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. En: memorias del XXXII AMVEC, pp198-199.

Correa-Girón P, Martínez A, Pérez J, Coba A, Solis M. (2002) Vaccination against blue eye disease. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, pp. 65-70. Iowa State University Press, USA.

Cuevas S, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. (2009) Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine Rubulavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 127: 148-152.

Cuevas-Romero S, Hernández-Baumgarten E, Kennedy S, Hernández-Jáuregui P, Berg M, Moreno-López J. (2014). Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: The detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus research*, 188, 155-161.

Daniel W. (2004). *Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ta Ed. México: Editorial Limusa Wiler.

Dunn M, Ploegh L, Speicher W, Wingfield T. (2004). *Current protocols in protein science*. Wiley.

Escobar-López AC, Rivera-Benítez J F, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza, H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt JI. (2011) Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transboundary and*

Emerging Diseases.

Evans T & Xu MQ (Eds). (2011). Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols. Humana Press

Fauquet C, Bishop D, Ghabrial S, Jarvis A, Matelli G, Mayo M, Summers M. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Viena-Nueva York: Springer-Verlag.

Fuentes M, Gay M, Herradora M, Retana A. (1994). Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia, y medición de la inmunidad pasiva en lechones. Vet. Mex. 25(3): 243-246.

Fuentes M, Carreón R, Ramírez H, Trujillo E, Fraire I. (1992). Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. Veterinaria México, 23:37-39.

Flores-Méndez JA. (1983). Ganado Porcino, Editorial Limusa, Tercera Edición, México DF.

Graham L, & Van der Eb J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 52(2): 456-467.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jaúregui P, Zenteno E. (1998). Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. Veterinary Immunology and Immunopathology. 64: 367-381.

Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montañón LF, Zenteno E (2001). Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to Porcine Rubulavirus: Vet. Immunol. Immunopathol. 79: 249-259.

Hernández J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chávez R, Lascurain R, Vargas J, Zenteno E (2002). Peanut and Amaranthus leucocarpus lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol. 84: 71-82.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. (2004). Características de la respuesta inmune de los cerdos infectados con el Rubulavirus porcino. *Veterinaria México*. 35: 65-71.

Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J (1992). Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet. Mex.* 23: 217-222.

Hernández-Jáuregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J (2001). Uptake of porcine Rubulavirus (LPMV) by PK15 cells. *Arch. Med. Res.* 32: 400-409.

Hjetner B, Wiman A-C, Svenda M, Moreno-López J, Linné T. (1998). Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine Rubulavirus (LPMV). *Arch Virol.* 143(3): 425-439.

Kalbfuss B, Knöchlein A, Kröber T, Reichl U. (2008). Monitoring influenza virus content in vaccine production: precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals.* 36(3): 145-161.

Kane J. (1995). Effects of rare codon clusters on high level expression of heterologous proteins in *E. coli*. *Current Opinion of Biotechnology.* 6: 494-500.

Kane and Hartley. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology.* 6: 95-101.

Kirkland PD, Stephano A. (2006). Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D. *Diseases of swine*, 9th edn, pp. 455-459. Blackwell Publishing, USA.

Koeslag J. (2006). *Manuales para la educación agropecuaria. Porcinos*, Trillas, SEP, Tercera edición, México.

Hansen L, Knudsen S, Sørensen S. (1998). The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*. 36: 341–347.

Hoffman A & Roeder R. (1991). Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Research*. 19 (22): 6337-6338.

Laemmli K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680- 685.

Larentis L, Argondizzo C, dos Santos Esteves G, Jessouron E, Galler R, Medeiros A. (2011). Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein expression and purification*, 78(1): 38-47.

Linné T, Berg M, Bergball A, Hjertner B, Moreno-López J. (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*. 33: 263-273.

Morilla A, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. (2002). Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, pp. 59-64. Iowa State University Press, USA.

Nelson L, Lehninger L, Cox M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Paniagua-Buelnas NA. (2000). Estudio de la variación genética de la hemaglutinina-neudaminidasa (HN) del virus del síndrome del ojo azul (VSOA). Master Science Thesis, CINVESTAV, IPN, México.

Radhakrishnan P, Basma H, Klinkebiel D, Christman J, Cheng P . (2008). Cell type-specific activation of the cytomegalovirus promoter by dimethylsulfoxide and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40: 1944-1955.

Raffo J, Perlman Chen W, Day L, Streitman S, Buttyan R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research*. 55(19): 4438-4445.

Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. (1997). Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J Comp Pathol*. 1997 Oct; 117(3):237-252.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. (1997). NeuA $\alpha$ 2, 3Gal-Glyconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol*. 118B: 327-332.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, Zenteno E. (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J*. 16:517-522.

Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz M, Ramírez H, Vallejo V, Zenteno E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO.

Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez-Mendoza H, Hernández J. (2004). Detección de la viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet*. 36: 39-47.

Rivera-Benítez JF, Cuevas-Romero S, Pérez-Torres A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez-Mendoza H. (2013a). Respiratory disease in growing pigs after Porcine Rubulavirus experimental infection. *Virus Research*. 176: 137-143.

Rivera-Benítez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, García-Contreras A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez-Mendoza H. (2013b). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary microbiology*, 162(2): 491-498.

Rivera-Benítez JF, García-Contreras A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Sánchez-Betancourt I, Ramírez-Mendoza H. (2013c). Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the

nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. Archives of virology, 158(9): 1849-1856.

Rima B, Alexander D, Billeter M, Collins P, Kingsbury D, Limpkind M, Nagai Y, Örvell C, Pringle C, Ter-Mullen V. 1995. Family Paramyxoviridae, p. 265-274. In: F.A. Murphy, Fauquet C, Bishop D, Ghabrial S, Jarvis A, Matelli G, Mayo M, Summers M. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Viena-Nueva York: Springer-Verlag.

Rosales EF, Martínez LA, Correa GP. (1988). Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el “Síndrome de Ojo Azul”. Tec. Pec. 26: 304-311.

Ross, RF, (2003). Producción pecuaria en confinamiento y la salud de los animales, el consumidor y el ambiente. Resúmenes del simposio internacional “Fronteras de la Medicina Veterinaria”, FMVZ, UNAM, impartido en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del 14 al 16 de marzo de 2003; pp. 44-59.

SAGARPA (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Población Ganadera Porcino 2001-2010 [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=21&Itemid=330](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330).

Sánchez JI, Doporto JM, Trujillo OM, Reyes LJ, Becerra FA. (2003) Alteraciones reproductivas en hembras reproductoras después de un brote de Ojo Azul. Memorias XXXIX Congreso AMVEC 2003. Guadalajara Jal. Mex. Pg 251.

Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza S, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME. (2008). Molecular characterization of the Hemagglutinin-Neuraminidase gene of porcine Rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. Research in Veterinary Science. 2008; 85: 359-367.

Sanders, M. T. *et al.*. Immunology and Cell Biology (2005), vol. 83 (2), pp 119-128

Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello M, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. Arch. Med. Vet. 2004; 36(2): 119-136.

Santos-López G, Borraz-Arguello MT, Marquez-Dominguez L, Flores-Alonso JC, Ramirez-Mendoza H, Vallejo-Ruiz V, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. Neuraminidase activity in blue eye disease porcine rubulavirus: specificity, affinity and inhibition studies. Unpublished.

Sedmak y Grossberg. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. Analytical Biochemistry. Volume 79, Issues 1–2, 1 May 1977, Pages 544–552.

Shiloach J, Kaufman J, Guillard A, Fass R. (1995). Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth, and Recombinant Protein Production by *Escherichia coli* BL21 (hDE3) and *Escherichia coli* JM109. Biotechnology and Bioengineering. 49: 421-428.

Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jaúregui P, Linn T, Moreno-Lopez J. (1990) The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). Journal of General Virology. 71: 609-613.

Stephano H, Gay M, Ramírez C, Maqueda J. (1981). An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. Proc of the international pig veterinary society congress, Mexico, p 153.

Stephano HA, Gay GM, (1985). El síndrome del ojo azul en granjas engordadoras. Memorias 19th Congreso AMVEC. Mérida, México: 71-74.

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet Rec 122:6-10.

Stephano HA. (2002). Blue eye disease: clinical signs and lesions. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermann, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, pp. 47-50. Iowa State University Press, USA. 2002.

Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J. & Linné, T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48: 57-70.

Tesis de Maestría. Cuevas R. J. Análisis inmunopatológico de la infección crónica en cerdos infectados naturalmente por Rubulavirus porcino (LPMV). 2000. FES-C.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.

Villaverde A & Carrió M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* 25: 1385–1395.

Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez P, Delanoy P, Zenteno E. (2000). Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 415-424.

Vinogradov A, Kudryashova E, Levashov A, Dongen W. (2003). Solubilization and refolding of inclusion body proteins in reverse micelles. *Analytical Biochemistry.* 320: 234-238.

Wang L, Hansson E, Yu M, Chua K, Mathe N, Cramer G, Rima B, Moreno-López J, Eaton B. (2007). Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Archives of Virology.* 152: 1259-1271.

Wang W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics.* 203: 1-60.

Wiman A-C, Hjertner, B, Linné T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-López J, Berg M. Porcine Rubulavirus LPMV RNA persist in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *Journal of Neuro Virology*. 1998; 4 (5): 545-552.

Zacharius M., Zell E, Morrison H, Woodlock J. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 30(1): 148-152.

Zenteno-Cuevas R, Hernández J, Espinosa B, Reyes-Leyva J, Zenteno E. (1998). Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* 143: 333-352