



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

IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5
DEL BETAARTERIVIRUS SUID 2 MEDIANTE HERRAMIENTAS
BIOINFORMÁTICAS Y SU EVALUACIÓN ANTIGÉNICA

TESIS

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

PRESENTA:

Mariana Garcia Plata

Tutor

José Ivan Sánchez Betancourt (FMVZ-UNAM)

Comité tutor:

Gladis del Carmen Fragoso González.
Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Juan Joel Mosqueda Gualito.
Universidad Autónoma de Querétaro



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.

DEDICATORIAS

Dedico con mucho amor y cariño este trabajo a mis padres, que han caminado junto a mí a lo largo de mi vida, gracias por creer en mí y siempre apoyarme incondicionalmente.

Con dedicatoria especial, a Fernando que ha sido un gran ser humano conmigo y me ha enseñado amar la vida, gracias por amarme, respetarme e impulsarme. Has hecho de mí una mejor versión, porque "Somos de quien nos encuentra en pedazos y nos ama hasta dejarnos completos, de quien no nos cambia, pero nos hace mejores".

Dedico este trabajo a quien considero un mentor, el Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello. Gracias por escucharme y ensañarme que la gente grande como usted, siempre te impulsara a serlo.

A Guadalupe Patiño Vega, gracias por tantas y tantas horas de charlas y platicas sin fin, por mostrarme siempre tu apoyo y confianza. Te lo agradeceré siempre.

Agradezco al Dr. José Ivan Sánchez Betancourt por ser sincero y paciente conmigo. Después de 5 años a su lado, uno aprende tantas cosas.

Dedico este trabajo a la Dra Yolanda Medina por abrirme las puertas de su laboratorio, conocí grandes y hermosas personas, como usted y Olga a quien también le doy las gracias, al igual que el Señor Mario y todos aquellos que me ayudaron estando ahí, Nunca me había sentido tan feliz trabajando. Gracias infinitas!!

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus puertas 8 años.

Al Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico en especial a la Dra. Yolanda Medina.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías (CONACYT) por la beca otorgado durante los estudios

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para la presentación de mi trabajo en Colombia.

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

IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL BETAARTERIVIRUS SUID 2 MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SU EVALUACIÓN ANTIGÉNICA

RESUMEN

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino desde su comienzo hasta la fecha ha causado grandes pérdidas económicas en la industria porcina en todo el mundo. Las vacunas activas atenuadas comerciales disponibles en el país, no proporcionan una protección útil, especialmente contra cepas genéticamente heterólogas. Por lo tanto, se han utilizado varios enfoques para desarrollar vacunas de PRRSV más efectivas, dentro de ellos el uso de herramientas bioinformáticas para identificar epítomos prometedores a ser utilizados en una vacuna recombinante.

En el presente estudio se utilizaron herramientas bioinformáticas y se logró identificar cuatro epítomos de la proteína GP5 del virus. Se sintetizaron como péptidos lineales para evaluar la antigenicidad de estos mismos por ensayos de ELISA. Los resultados muestran que los cuatro epítomos tienen un grado de conservación mayor al 96% y son capaces de ser reconocidos por anticuerpos específicos en sueros de cerdos provenientes de cinco Estados del país diagnosticados como positivos. Además, se observaron sueros diagnosticados como negativos, positivos a diferentes epítomos utilizados.

Estos datos proporcionan bases importantes para el desarrollo de vacunas con epítomos de la proteína GP5 que pueden servir como inmunogénicos atractivos en cerdos para controlar la enfermedad.

ABSTRACT

The Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus since its beginning on to date has caused great economic losses in the swine industry throughout the world. The commercial attenuated active vaccines available in the country do not provide useful protection, especially against genetically heterologous strains. Therefore, several approaches have been used to develop more effective PRRSV vaccines, including the use of bioinformatics tools to identify promising epitopes to be used in a recombinant vaccine.

In the present study, bioinformatic tools were used and four epitopes of the virus GP5 protein were identified. They were synthesized as linear peptides to evaluate the antigenicity of these by ELISA assays. The results show that the four epitopes have a degree of conservation greater than 96% and are capable of being recognized by specific antibodies in sera of pigs from five States of the country diagnosed as positive. In addition, sera were diagnosed as negative, positive to different epitopes used.

These data provide important bases for the development of vaccines with epitopes of the GP5 protein that can serve as attractive immunogenic in pigs to control the disease.

CONTENIDO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>VI</u>
<u>LISTA DE CUADROS</u>	<u>VI</u>
<u>LISTA DE GRÁFICAS</u>	<u>VI</u>
<u>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
<u>AGENTE ETIOLÓGICO</u>	<u>6</u>
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE BETAARTERIVIRUS SUID 2	11
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE BETAARTERIVIRUS SUID 2	14
<u>MARCO DE LECTURA ABIERTO 5 (ORF5)</u>	<u>17</u>
<u>CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>26</u>
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<u>OBJETIVO 1: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS MEXICANAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS BETAARTERIVIRUS SUID 2.</u>	<u>28</u>
<u>OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID</u>	<u>2</u>
	<u>30</u>

<u>OBJETIVO 3: ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA CON CADA UNO DE LOS EPÍTOPOS SELECCIONADOS (PÉPTIDOS EPÍTOPICOS).</u>	32
<u>OBJETIVO 4: EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS EPÍTOPICOS IDENTIFICADOS EN SUEROS DE CERDOS DEL PAÍS.</u>	38
<u>CAPÍTULO III: RESULTADOS</u>	39
<u>OBJETIVO 1: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS MEXICANAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS BETAARTERIVIRUS SUID 2.</u>	39
<u>OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID 2.</u>	42
<u>OBJETIVO 3: ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA CON CADA UNO DE LOS EPÍTOPOS SELECCIONADOS (PÉPTIDOS EPÍTOPICOS).</u>	49
<u>RESULTADOS DE ELISA</u>	51
PÉPTIDO EPÍTOPICO 1	51
PÉPTIDO EPÍTOPICO 3	53
PÉPTIDO EPÍTOPICO 35	54
PÉPTIDO EPÍTOPICO 40	55
<u>OBJETIVO 4: EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS EPÍTÓPICOS IDENTIFICADOS EN SUEROS DE CERDOS DEL PAÍS.</u>	57
PÉPTIDO EPÍTOPICO 1	60
PÉPTIDO EPÍTOPICO 3	60
PÉPTIDO EPÍTOPICO 35	61
PÉPTIDO EPÍTOPICO 40	62

<u>DISCUSIÓN</u>	<u>63</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>72</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>73</u>
<u>ANEXO 1: SOLUCIONES.</u>	<u>80</u>
<u>ANEXO 2. CUADROS</u>	<u>81</u>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Organización genómica de BETAARTERIVIRUS SUID 2</i>	7
<i>Figura 2: Genoma de Betaarterivirus suid 2, transcripción y traducción.</i>	10
<i>Figura 3: Estructura de la proteína GP5 y la unión a la proteína M por el enlace disulfuro.</i>	19
<i>Figura 4: Descripción grafica de los sitios HVR y epítomos de GP5.</i>	22
<i>Figura 5: Principales entidades productoras de carne de cerdo</i>	38
<i>Figura 6: Resultado del análisis de conservación y variabilidad de cada aminoácido</i>	40
<i>Figura 7: Predicción del péptido señal de la proteína GP5 de VR-2332 por el programa SignalP 4.1.</i>	41
<i>Figura 8: Predicción de la estructura secundaria de la proteína GP5 de VR-2332 y su nivel antigénico e hidrofílico. Con la identificación de los cuatro péptidos seleccionados.</i>	47
<i>Figura 9: Análisis estructural de la proteína GP5 y la distribución de los epítomos (péptidos) elegidos en lo que sería un dibujo grafico de la proteína en estructura secundaria</i>	48

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1: Epítomos de la proteína GP5 de Betaarterivirus suid 2</i>	24
<i>Cuadro 2: Nombre asignado a cada uno de los epítomos seleccionados</i>	44
<i>Cuadro 3: interpretación de los resultados del análisis realizado en el programa de Protean 3D..</i>	47
<i>Cuadro 4: Resultados por péptido epitópico.</i>	57
<i>Cuadro 5: Resultados de ELISA por estado y epítomo.</i>	59
<i>Cuadro 6: Resultados de ELISA para sueros positivos Anticuerpos específicos a Vacuna y Campo</i>	59
<i>Cuadro 7: SECUENCIAS DE GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID 2 OBTENIDAS DEL GENBANK</i>	81
<i>Cuadro 8: DATOS OBTENIDOS EN LA PREDICCIÓN DEL PÉPTIDO SEÑAL Y PUNTO DE CORTE PARA CADA SECUENCIA</i>	90
<i>Cuadro 9: DATOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANALES</i>	92

LISTA DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 1.</i>	52
<i>Gráfica 2: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 3.</i>	53
<i>Gráfica 3: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 35.</i>	55
<i>Gráfica 4: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 40.</i>	56

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
HP-PRRS	cepa de PRRSV altamente patógenas de China
DMZC	Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos
ELISA	Del ingles Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
RT-PCR	Del ingles Reverse transcription polymerase chain reaction
MSD	Del inglés Mystery Swine Disease
SIRS	Síndrome de Infertilidad y Respiratorio Porcino
Ac	anticuerpos
PRRSV-1	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino 1
PRRSV-2	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino 2
LDV	Virus elevador del lactato deshidrogenasa
N	Nucleocápside
ORF'S	marcos de lectura abiertos
UTR	Del ingles untranslated region
aa	aminoácidos
Sn	Sialoadhesina
NSP	proteínas no estructurales

RTC	complejo de replicación y transcripción
RE	Retículo Endoplásmico
GP5	Glicoproteína de envoltura 5
tm	dominios transmembranales
HVR-1,2	De sus siglas en inglés HVR Hypervariable regions
AcN	Anticuerpos Neutralizantes
A	Asparagina
K	Lisina
SLA	Antígeno Leucocitario Porcino
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad porcino
NK	células asesinas naturales
CMI	de sus siglas en ingles cell-mediated immune
CTL	linfocitos T citotóxicos
NH4OH	Hidróxido de amonio
OD	Densidad óptica

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

Desde que fue descrita por primera vez en Carolina del Norte, USA, en el año de 1987 hasta la fecha, la enfermedad del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es considerada la enfermedad más importante dentro de la porcicultura ya que, se considera uno de los principales patógenos que afectan a las industrias porcinas que en la mayoría de los países productores se presenta como una enfermedad endémica y causa graves pérdidas económicas en todo el mundo (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017; Herrera Martín del Campo, 2012; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Piron, De Koker *et al.*, 2014; Wang, Qui *et al.*, 2014; Q. Zhang and Yoo, 2015; Zimmerman, 2003). Una de sus características más importante, es que es capaz de infectar y producir enfermedad en cerdos de todas las edades, causando desde infecciones subclínicas hasta el fallo reproductivo en cerdas y enfermedad respiratoria severa en los lechones que pueden causar la muerte (Herrera Martín del Campo, 2012; Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Wang, Qui *et al.*, 2014; Zimmerman, 2003). Dicho efecto se ha vuelto aún más significativo con la identificación de una cepa de PRRSV altamente patógenas de China (HP-PRRS), la cual surgió por primera vez en 2006 y actualmente está presente en toda China. Esta cepa se caracteriza por inducir fiebre alta, alta morbilidad y mortalidad en cerdos de todas las edades (Li, Wang *et al.*, 2009; Yu, Chen *et al.*, 2012) lo que agrava aún más la economía en la porcicultura (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017; Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Wang, Qui *et al.*, 2014). Dado que las nuevas variantes de PRRSV están

emergiendo constantemente de los brotes, las estrategias actuales para controlar el PRRSV han sido en gran parte inadecuadas, a pesar de los conocimientos en la evolución y la respuesta inmune del huésped al virus (Adams, Lefkowitz et al., 2017; Harding, Ladinig et al., 2017; Popescu, Tribble et al., 2017).

El control del PRRSV se centra en la administración de vacunas profilácticas para minimizar el impacto clínico de una infección. Las vacunas actualmente utilizadas en el campo consisten en vacunas de virus inactivo y de virus activo. Las vacunas comerciales de virus inactivado son seguras y pueden proporcionar cierta protección contra los virus homólogos, pero son totalmente ineficaces contra las cepas heterólogas. Las vacunas atenuadas disponibles, sin embargo, son muy efectivas contra los desafíos homólogos y, hasta cierto punto, incluso protegen contra las cepas heterólogas, pero plantean problemas de seguridad debido a su contenido viral activo. La vacuna atenuada puede recuperar su actividad y causar infección en el rebaño vacunado en lugar de prevenirla. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de una vacuna contra el PRRSV adaptable, segura y eficaz, tal como una vacuna de subunidad modificada (Piron, De Koker *et al.*, 2014). Así, PRRS se ha introducido y hecho endémico en una gran proporción de la población porcina en un periodo de 30 años sin saber con exactitud la fuente original del virus y las circunstancias que llevaron a que la enfermedad se extendiera a nivel mundial (Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Q. Zhang and Yoo, 2015). En México existen varios estudios sobre filogenias de nuevas cepas aisladas basadas solo en el ORF5, pero se desconocen las consecuencias de las mutaciones encontradas sobre el hospedador.

Dentro del equipo de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos (DMZC), desde el año 2012 se comenzó la investigación del virus de PRRS en

general y se enfocaron las investigaciones en los cambios genómicos del virus.

En el mismo año, se recibió un caso clínico en el laboratorio de diagnóstico del DMZC en donde el propietario reportaba cerdos enfermos con signología presuntiva del PRRS. Las muestras fueron admitidas para realizar diagnóstico serológico (ELISA) y molecular (RT-PCR). El diagnóstico serológico se realizó por medio de Kits comerciales disponibles en México, pero los resultados se reportaban como negativos; en cambio, el diagnóstico molecular (PCR) resultaba positivo. Por lo anterior se realizó un ensayo de aislado viral en células MA-104 y se logró aislar una cepa de PRRS de campo, la cual fue utilizada para la estandarización de un kit de ELISA, llamado ELISA-UNAM, con base en el Manual de Animales Terrestres de la OIE.

Con este kit, en el año 2016 se lograron analizar más de 18,000 muestras de suero de cerdos provenientes de todos los estados del País y se pudo demostrar, con estudios comparativos con los Kits comerciales que existe una alta variación de la antigenicidad de las cepas circulantes en el país (Martínez-Bautista, Sciutto-Conde *et al.*, 2018).

Antecedentes Generales

El PRRS fue descrito por primera vez en los Estados Unidos de Norteamérica en los rebaños de Carolina del Norte en 1987 donde se informó de brotes clínicos catastróficos; el síndrome incluye pérdidas reproductivas graves, extensa neumonía post-destete, reducción del rendimiento del crecimiento y aumento de la mortalidad (Zimmerman, *et al.*, 2012). En ausencia de un agente causal se le conoció

inicialmente como "Enfermedad Misteriosa Porcina" (MSD, del inglés Mystery Swine Disease)(Goyal Sagar, 1993; Rossow, Collins *et al.*, 1995; Zimmerman, 2003).

Inicialmente una variedad de etiologías se propusieron para MSD incluyendo el virus de la encefalomiocarditis, virus de la peste porcina clásica, enterovirus porcino, parvovirus porcino, virus de la pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky) y la contaminación de los piensos con micotoxinas. La identificación de la etiología se complica por el hecho de que uno o más de los patógenos sospechosos, así como otros agentes infecciosos, fueron comúnmente aislados de casos de MSD (Christianson, 1994; Zimmerman, 2003).

Para 1991 la pandemia estaba presente en la mayoría de los países productores y registraban más de 3000 brotes en los Países Bajos, Reino Unido, Francia y Dinamarca, pero aún no se conocía un agente etiológico. En el mismo año una serie de términos descriptivos para la enfermedad con base en signos clínicos se produjo y fue llamada entre otros: enfermedad porcina de orejas azules, enfermedad del oído azul, epidemia de aborto tardío de las cerdas (Alemania), enfermedad porcina azul (Francia) y peste porcina (Goyal Sagar, 1993; Hurd, Bush *et al.*, 2001; Zimmerman, 2003).

La etiología de la MSD se determinó en junio de 1991 con el aislamiento del virus Lelystad de fetos y lechones afectados provenientes de cerdas gestantes por Wensvoort y colaboradores junto con en el Instituto Veterinario Central de los Países Bajos (Christianson, 1994; Hurd, *et al.* 2001; Heydeck, 2015).

En el primer Simposio Internacional de 1992 sobre el Síndrome de Infertilidad y Respiratorio Porcino (SIRS) celebrado en St. Paul, Minnesota, participantes del simposio tomaron la decisión de llamar al agente causal Síndrome Reproductivo y

Respiratorio Porcino (PRRS) y al agente causal virus del PRRSV. Actualmente se le conoce con este nombre a nivel mundial (Goyal Sagar, 1993; Rossow, Collins *et al.*, 1995).

Así, en un periodo de 10 años, el PRRSV se introdujo y se hizo endémico en una gran proporción de la población porcina doméstica mundial. La fuente original del virus y las circunstancias que llevaron a que el virus se introdujese en la población porcina doméstica son desconocidas. Un animal salvaje que actuase como reservorio como el Jabalí (*Sus scrofa*) se consideraría que fuera la especie candidata más razonable. Sin embargo, en Estados Unidos de 1976 a 1993 no hubo evidencia de la infección en muestras de suero procedentes de jabalís, evidenciando que los jabalís aparentemente no son la fuente y PRRSV existía previamente antes de su entrada en el cerdo doméstico, desconociendo la entrada del virus (Morilla, 2003).

En México, Milán y colaboradores (1994) realizaron un estudio serológico con inmunofluorescencia indirecta para identificar la presencia de anticuerpos (Ac) contra el virus en diferentes granjas provenientes de nueve estados del país. Los estados positivos fueron Sonora, Jalisco, Guanajuato y Aguascalientes con un 8.1% de prevalencia, indicando que los cerdos muestreados tuvieron contacto con animales portadores o con el virus.

En México PRRS fue descrito clínicamente por primera vez en 1992, aunque se sospecha que pudo entrar a finales de la década de 1980 y confundirse con enfermedades como ojo azul, influenza porcina A, fiebre porcina clásica y Aujeszky y originarse de animales importados según un reporte de la presencia de anticuerpos contra PRRSV en México en 1992 (López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015).

Agente Etiológico

Clasificación del virus de PRRS (PRRSV)

El PRRSV tiene dos genotipos bien reconocidos: Tipo 1, o tipo europeo (prototipo Lelystad) y Tipo 2, o tipo norteamericano (prototipo VR-2332) (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017). Recientemente, el análisis de este virus aislado en Europa y América y sus diferencias en las secuencias genómicas ha llevado a la designación de dos virus diferentes: Betaarterivirus suid 1, antes PRRSV-1 y Betaarterivirus suid 2, antes PRRSV-2. Betaarterivirus suid 2 se reclasificó dentro del International Committee on Taxonomy of Viruses, en el Orden: Nidovirales, Suborden: Abnidoirineae, Familia: Arteriviridae, Subfamilia: Variarterivirinae, Género: Betaarterivirus, Subgénero: Ampobartevirus sin compartir género con alguna otra enfermedad (King, Lefkowitz *et al.*, 2018).

Este virus tiene cuatro características importantes: 1) Tienen una alta variabilidad genética y antigénica 2) Sus células blanco son los monocitos-macrófagos 3) Induce infecciones persistentes y 4) Tiene la capacidad de modular el sistema inmune (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017; Harding, Ladinig *et al.*, 2017; Kappes and Faaberg, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Meulenberg, 2000).

Estructura y morfología de Betaarterivirus suid 2

El virus Betaarterivirus suid 2 es un virus pequeño envuelto formado por una cadena ARN de sentido positivo con alrededor de 15 kb de longitud, tiene una morfología pleomórfica y el virión tiene una forma esférica a oval de 50-70nm de diámetro, con proyecciones pequeñas que cubren toda su superficie. Su estructura consiste en una

Nucleocápside (N) que encierra la cadena de ARN, la proteína de la nucleocápside está rodeada por una bicapa lipídica de aproximadamente 4.5 nm y es donde se encuentran las proteínas estructurales: proteína E de envoltura, la proteína M de membrana, y un complejo trimérico de las proteínas GP2-GP3-GP4 y un heterodímero formado por GP5 y M (Figura 1) (Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépez-Plascencia *et al.*, 2006; Morilla, 2003; Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012).

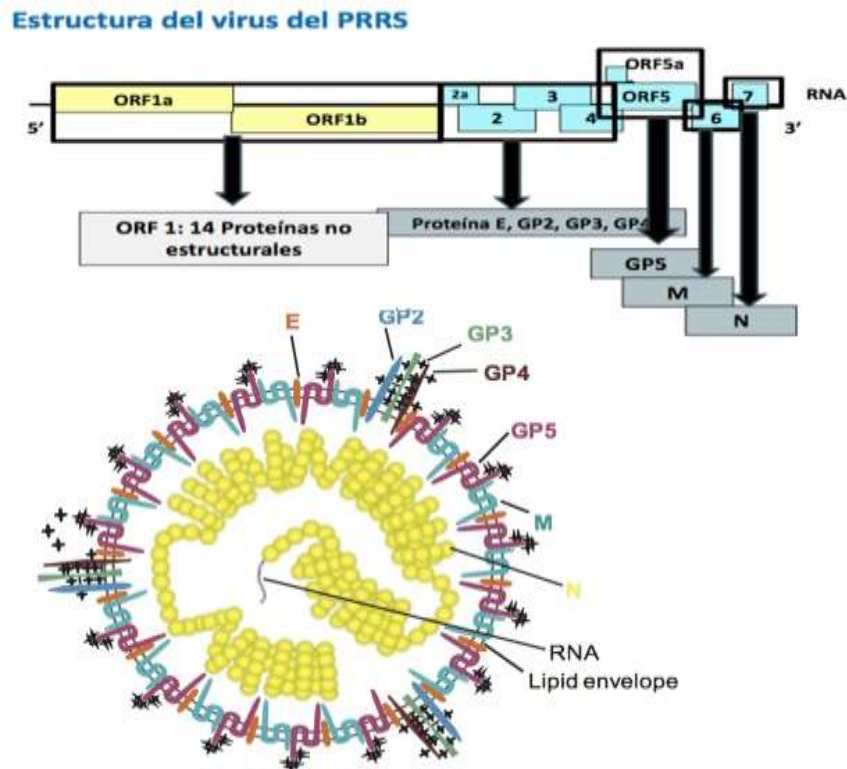


Figura 1: Organización genómica de BETAARTERIVIRUS SUID 2
 Modificada de: <http://chil.org/blogs/liveblogsepor/383/by-tag/feria-industrial> y Spilman, Welbon, Nelson, & Dokland, 2009.

Organización genómica y proteínas de Betaarterivirus suid 2

Betaarterivirus suid 2 se expresa a través de un conjunto de transcritos de ARNm subgénicos (mRNA1-mRNA7), cada uno utilizado para la traducción de uno o dos marcos de lectura abiertos (siglas en inglés ORFs) (Dokland, 2010; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006).

El PRRSV contiene diez ORFs conocidos en la dirección 5' a 3' y presenta en el extremo 5' una región corta no traducible (UTR, por sus siglas en inglés, (untranslated region) de 188-191 aminoácidos (aa) (Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015) seguida de los denominados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6, ORF7 (figura 1) y en el extremo 3' una UTR seguida de una cola de poli A (Butler, Lager *et al.*, 2014; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012).

Ciclo de replicación de Betaarterivirus suid 2

Se sabe que los cerdos son los huéspedes naturales del Betaarterivirus Suid 2 y los macrófagos alveolares porcinos (MAP'S) son las células blanco de la infección. Hasta el momento se sabe de seis moléculas descritas como receptores potenciales para la infección del virus de PRRS en MAP'S, que incluye heparán sulfato, vimentina, CD151, CD163, sialoadhesina (Sn) (Siglec-1, también conocido como CD169) y DC-SIGN (molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas, también conocida como CD209) (Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; Meulenberg, 2000; Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Q. Zhang and Yoo, 2015).

Como primer paso de la infección se sabe de una baja afinidad de unión del complejo M/GP5 con heparán sulfato. Este paso no es absolutamente necesario para la infección, pero puede concentrar el virus en la superficie celular para una posterior unión a un receptor de mayor afinidad (Harding, Ladinig *et al.*, 2017; Kappes and Faaberg, 2015; Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Q. Zhang and Yoo, 2015). Una vez que esta interacción ha tenido lugar, el complejo GP5/M viral se une a CD169 lo que desencadena la endocitosis dependiente de clatrina mediada por receptor, la interacción depende de la capacidad de unión de CD169 a ácidos siálicos en GP5 (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017; Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; Welch and Calvert, 2010; Yun and Lee, 2013; Q. Zhang and Yoo, 2015).

En la replicación de PRRSV, CD163 desempeña un papel esencial ya que participa en la eliminación del revestimiento del virión (Prather, Rowland *et al.*, 2013; Welch and Calvert, 2010). Los estudios sugieren que CD163 es probablemente el receptor esencial y central y a diferencia de los anteriores receptores, CD163 no se une con el complejo GP5/M, sino con el complejo trimérico de GP2a, GP3 y GP4; Una vez internalizadas, las partículas se transportan a los endosomas tempranos que en combinación con una disminución del pH permite la liberación del genoma viral al citosol (Adams, Lefkowitz *et al.*, 2017; Butler, Lager *et al.*, 2014; Kappes and Faaberg, 2015; Loving, Osorio *et al.*, 2015; Prather, Rowland *et al.*, 2013; Yun and Lee, 2013; Q. Zhang and Yoo, 2015). Una vez que el genoma ingresa al citosol, el ARN de longitud completa (ARNm1) se usa para la traducción de dos marcos de lectura abiertos: ORF1a y ORF1b, ubicadas en las tres cuartas partes próximas al 5' del genoma viral (Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Yun and Lee, 2013). La traducción de ORF1a produce la poliproteína pp1a y pp1b; El

procesamiento de estos precursores genera al menos 14 proteínas no estructurales (NSP): 10 codificados en ORF1a (NSP1 α , NSP1 β , NSP2 a NSP6, NSP7 α , NSP7 β y NSP8) y 4 codificados en ORF1b (NSP9 a NSP12). Este procesamiento proteolítico está mediado por cuatro proteasas virales que residen en NSP1 α , NSP1 β , NSP2 y NSP4. La mayoría, si no todos, los NSP se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC) de doble membrana derivadas de retículo endoplásmico (RE) inducidas por virus. El RTC dirige tanto la amplificación del genoma ("replicación") como la síntesis del ARNm subgenómico ("transcripción") produciendo un conjunto anidado de seis ARNm subgenómicos principales (Figura 2) (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Yan Sun, Mingyuan Han, Chiyong Kim, Jay G. Calvert, 2012; Yun and Lee, 2013).

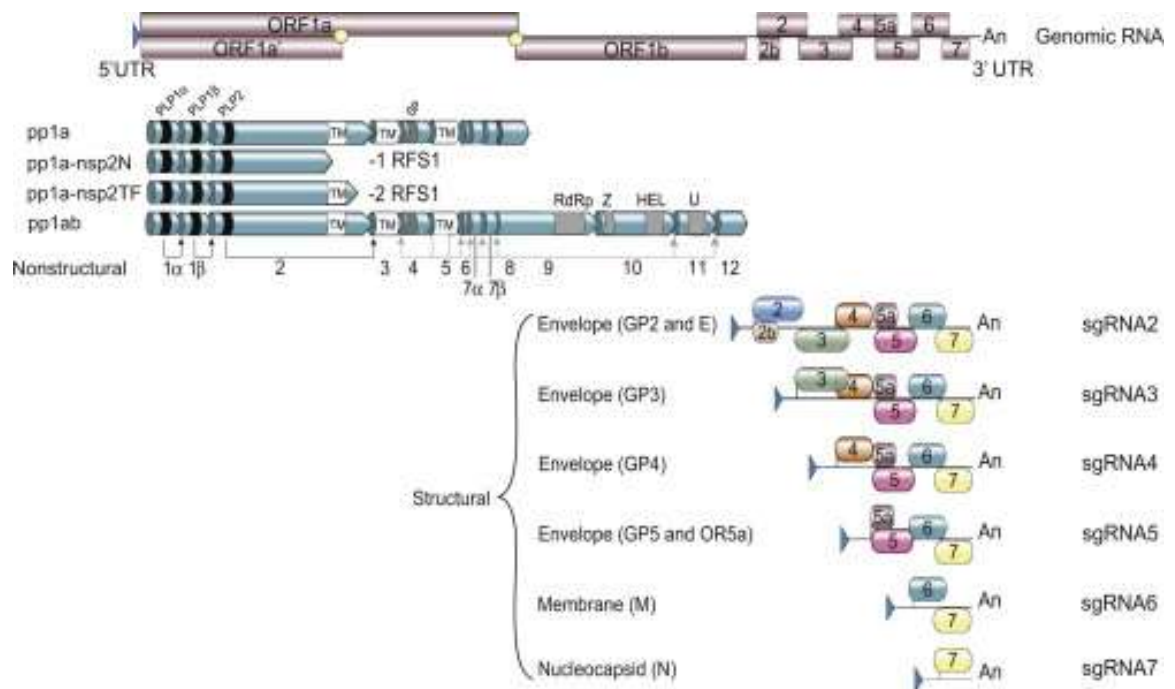


Figura 2: Genoma de Betaarterivirus suid 2, transcripción y traducción. obtenida de: (Kappes and Faaberg, 2015)

Cada ARNm subgenómico se utiliza para la traducción de uno o dos ORF's que codifican ocho proteínas estructurales que constituyen el virión infeccioso, es decir, cuatro componentes menores codificados en ORF2a (GP2/2a), ORF2b (E), ORF3 (GP3) y ORF4 (GP4) y tres componentes principales codificados en ORF5 (GP5) y ORF5a, ORF6 (M, membrana), y ORF7 (N, Nucleocápside). En la última etapa de la replicación viral, copias múltiples de las proteínas N se unen al ARN genómico recién sintetizado para forman un complejo de nucleocápside, que brota en el lumen del RE y/o Golgi y adquiere las seis proteínas de envoltura viral, es decir, E, M y GP2 a GP5. Finalmente, los viriones de la progenie acumulados en los compartimientos de la membrana intracelular se liberan en el espacio extracelular a través de la exocitosis (Yun and Lee, 2013).

Una característica notable del genoma de PRRSV ha sido la tasa de diversificación mutacional. Se ha estimado que el ARN de PRRSV puede haber evolucionado a un ritmo mayor a $4.7-9.8 \times 10^{-2}$ /aa/año en comparación con otros virus de ARN que mutan 10^{-3} -- 10^{-5} /aa/año (Butler, Lager *et al.*, 2014; Kappes and Faaberg, 2015; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012) La frecuencia de mutación influye no sólo en una simple mutación, sino también por una alta tasa de recombinación (Butler, Lager *et al.*, 2014).

Proteínas no estructurales de Betaarterivirus suid 2

La traducción de ORF1a y ORF1b produce la poliproteína pp1a y pp1ab respectivamente las cuales son procesadas para liberar 14 proteínas no estructurales (NSP's) las cuales incluyen cuatro proteasas (NSP1 α , NSP1 β , NSP2 y NSP4), la RNA polimerasa dependiente (NSP9), una helicasa (NSP10) y una endonucleasa (NSP11)

(Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Meulenberg, 2000; Morilla, 2003; Yun and Lee, 2013; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012).

Proteínas no estructurales: NSP1 α y NSP1 β

La estructura NSP1 α contiene un dominio de cisteína proteasa (PCP α), y la estructura NSP1 β contiene un dominio cisteína proteasa de tipo papaína (PCP β). En el Betaarterivirus Suid 2, la inactivación de la actividad de PCP α en NSP1 α bloquea la síntesis de ARNm subgenómico sin alterar la replicación del genoma, mientras que cuando se elimina la actividad de PCP β en NSP1 β , no se observa ningún signo de síntesis de ARN viral; por lo tanto, ambas actividades de proteasa de PCP son aparentemente necesarias para la síntesis productiva de ARN viral. Tanto NSP1 α como el NSP1 β se trasladan al núcleo en células infectadas (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Yan Sun, Mingyuan Han, Chiyong Kim, Jay G. Calvert, 2012; Yun and Lee, 2013).

Proteínas no estructurales: NSP2 y NSP3

NSP2 de PRRSV tiene un dominio de proteasa de cisteína N-terminal que se escinde en la unión NSP2/3 y que es crucial para el ciclo de replicación viral. En las células infectadas NSP2 se localiza en las membranas perinucleares, que presumiblemente derivan del RE y están involucradas en la formación del RTC unido a la membrana, donde se produce la síntesis de ARN viral. Los estudios bioquímicos y morfológicos de la replicación de Arteritis Viral Equina (EAV de sus siglas en ingles) han

demostrado que las NSP que contienen dominios transmembranales (por ejemplo, NSP2, NSP3 y NSP5) son parte del RTC unido a la membrana, lo que sugiere que desempeñan un papel importante en el reclutamiento de otros componentes virales del RTC que carecen de los dominios que abarcan la membrana. *In vitro*, los RTC aislados de células infectadas requieren un factor citosólico para la síntesis de ARN viral, que reproduce la síntesis tanto del genoma viral como de los ARNm subgenómicos. Curiosamente, la NSP2 de PRRSV contiene un grupo de Epítomos lineales de células B que pueden modular la respuesta inmunitaria del huésped (Yun and Lee, 2013).

Proteínas no estructurales: NSP4, NSP9, NSP10 y NSP11

La proteína no estructural 4 (NSP4) de PRRSV contiene la proteasa principal responsable de todo el procesamiento de NSP, excepto las uniones NSP1 α /1 β , NSP1 β /2 y NSP2/3. La estructura cristalina de NSP4 revela un pliegue similar a la quimiotripsina que puede estar involucrada en la regulación del procesamiento de poliproteínas virales (Yun and Lee, 2013).

NSP9 incluye la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013). En PRRSV, el dominio RdRp se encuentra en la región C-terminal, que contiene una región N-terminal ascendente de función desconocida (Yun and Lee, 2013).

Se sabe que NSP10 de PRRSV expresado en bacterias posee actividad de helicasa y pueden desenrollar el dsRNA y el dsDNA en una dirección de 5' a 3' (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Yun and Lee, 2013). En EAV, el dominio de unión a zinc contiene un

conjunto de 13 residuos Cys y His conservados y es crítico para la síntesis de ARN viral y el dominio enlazador se ha implicado en la síntesis de ARNm subgenómico (Yun and Lee, 2013).

La NSP11 expresada en bacterias se ha utilizado para mostrar que la actividad endonucleasa del Betaarterivirus Suid 2 exhibe una amplia especificidad de sustrato *in vitro* (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013). Recientemente, se ha demostrado que la inmunidad innata del huésped mediada por IFN α está modulada por un panel de NSP PRRSV (es decir, NSP1 α , NSP1 β , NSP2, NSP4 y NSP11) con diferentes intensidades. En el caso de PRRSV NSP2, se ha demostrado que la cisteína proteasa que contiene el dominio OTU posee desubiquitinación y actividad antagonista del interferón, evitando así la inmunidad innata dependiente de ubiquitina e ISG15 (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Yun and Lee, 2013).

Proteínas estructurales de Betaarterivirus suid 2

Glicoproteína 2 y Glicoproteína 2a (GP2 y GP2a)

ORF2a codifica para la glicoproteína GP2 (también llamada GP2a) y ORF2b codifica para la proteína pequeña de cubierta no glicosilada (E) (Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; Yun and Lee, 2013). La proteína GP2 es poco antigénica en comparación con las otras proteínas menores de la envoltura (Macías, María José; *et al.*, 2006). La proteína E tiene una propiedad tipo proteína de canal iónico y está incrustada en la membrana viral, presumiblemente promoviendo la eliminación del revestimiento del virión y la liberación del genoma viral en el citoplasma (Veit,

Matczuk *et al.*, 2014; Yun and Lee, 2013). Recientemente se determinó que la proteína E es esencial para la producción de virus infeccioso ya que la inactivación de la expresión de E impide la incorporación del complejo GP2/3/4 a partículas similares a virus (VLP). Por lo tanto, la proteína E y el complejo GP2/3/4 parecen interactuar estructuralmente o al menos funcionalmente durante el ensamblaje del virus (Veit, Matczuk *et al.*, 2014)

Glicoproteína 3 (GP3)

GP3 es una proteína fuertemente glicosilada envolvente expuesta en la superficie viral y cuyos glicanos en la superficie viral evitan el reconocimiento de epítopos neutralizando anticuerpos y junto con GP2 son poco antigénicas (Dokland, 2010; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Yun and Lee, 2013). Un subconjunto de las proteínas GP3 se secreta a partir de las células como una forma soluble no asociada al virus (Yun and Lee, 2013).

Glicoproteína (GP4)

ORF4 codifica para la glicoproteína estructural GP4. GP4 tiene un epítipo neutralizante en la región hipervariable que podría estar asociado con las proteínas E, GP2 y GP3 a través de interacciones no covalentes (Meulenberg, 2000; Yun and Lee, 2013).

Proteína de membrana (M)

ORF6 codifica una proteína de membrana no glicosilada (M), es el gen más conservado entre las cepas americanas (100% de identidad a nivel nucleótidos) y no

presenta diversidad genética; La proteína M se cree que actúa como pegamento para unir todos los componentes del virión y también ha sido implicada en la neutralización viral (Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Meulenberg, 2000).

Nucleocápside (N)

El ORF 7 codifica para la proteína de la nucleocápside (N). Este gen tiene 372 pares de bases y es el principal elemento estructural dentro del virión de PRRSV que forma homodímeros unidos a disulfuro, funcionales para empaquetar el ARN genómico viral (gRNA), y es la única proteína estructural conocida que no tiene un dominio transmembrana o que no tiene un ectodominio sobre el virión del PRRSV, Es más probable que participe en la encapsulación y la gemación del RE (Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015) y es considerada la proteína más inmunogénica por lo cual induce elevada producción de anticuerpos sin actividad protectora evidente (López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012). Los residuos 41 a 47 de la proteína N del PRRSV se identificaron como una señal de localización nuclear que interactúa con los transportadores nucleares. Varias proteínas del huésped interactúan con la proteína N del PRRSV incluidas la fibrilarina, la nucleolina y la proteína de unión a poli (A), pero las implicaciones funcionales de estos hallazgos aún no se han estudiado. Usando la genética reversa, se diseñó un mutante knockout para la señal de localización nuclear en la proteína N del PRRSV. Los cerdos infectados con este

mutante desarrollaron una viremia reducida y títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos (Snijder, Kikkert *et al.*, 2013).

La proteína N es la más utilizada para análisis genéticos, siendo el gen que la codifica el segundo más conservado entre cepas americanas que va del 95 a 100%. Contiene entre 123-128 aminoácidos y es la proteína más pequeña de todas pesando en promedio 15 kDa (López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 2012).

MARCO DE LECTURA ABIERTO 5 (ORF5)

Dentro del ORF5, se encuentra el ORF5a que codifica para una pequeña proteína no glicosilada que se requiere para la infectividad viral, la proteína GP5a. ORF5 codifica para la mayor glicoproteína de envoltura, conocida como glicoproteína de la cápsula: GP5 (Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Van Breedam, Delputte *et al.*, 2010).

El gen ORF5 está formado por una secuencia de 600 pares de bases que codifican para 200 aa con un peso molecular aproximadamente de 25 kDa (Meulenberg, 2000; Veit, Matczuk *et al.*, 2014). Es el gen con mayor variabilidad debido a mutaciones y recombinaciones dentro de su secuencia genómica, en donde el porcentaje de identidad entre secuencias de Betaarterivirus suid 2 a nivel aminoácidos es de 88 a 97% siendo así, la más variable de las seis proteínas de la estructura, con lo cual se han podido identificar hasta nueve subtipos (Shi, Tsan-Yuk Lam *et al.*, 2010). Además

de ser la proteína más variable, es la proteína de unión MAP's (Q. Zhang and Yoo, 2015).

Dentro de la estructura de la proteína GP5, se encuentra un péptido señal escindible N-terminal que dirige la síntesis de la proteína al RE y que abarca del residuo 1 y puede variar del aa 27 al 32 (Plagemann, 2004; Veit, Matczuk *et al.*, 2014), seguido del ectodominio putativo corto de 30 aa aproximadamente en donde existen dos regiones hipervariables que rodean a una región bastante conservada, que contiene los enlaces de disulfuro de cisteína completamente conservados a M y dos sitios potenciales de N-glicosilación (Veit, Matczuk *et al.*, 2014). Posterior al ectodominio hay un largo tramo de residuos hidrófobos (63-127 aa) que se puede subdividir en una, dos o tres hélices que abarcan la membrana (dominios transmembranales (TM)) basadas en los análisis estructurales (Veit, Matczuk *et al.*, 2014; Wang, Qui *et al.*, 2014). Por último se localiza la parte C-terminal que es hidrofílica y se encuentra en el citosol que va del aa 126 al 200 (Butler, Lager *et al.*, 2014; Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002; Plagemann, 2004; Wang, Qui *et al.*, 2014) (Figura 3). Se ha demostrado que el dominio conservado alberga un dominio de neutralización viral, y la secuencia N-terminal se ha denominado como epítipo señuelo que no neutraliza. in embargo, dado que el dominio conservado está rodeado por oligosacáridos complejos, está protegido de la neutralización de anticuerpos (Butler, Lager *et al.*, 2014). GP5 y M forman un heterodímero unido por enlaces disulfuro en la Cisteína 9 de M y la Cisteína 48 de GP5 (Figura 3) constituyendo el complejo de proteína predominante en la superficie del virión necesario para el transporte de GP5/M desde el RE al aparato de Golgi, lo que indica que solo los complejos GP5/M ensamblados correctamente pueden pasar el sistema de calidad del RE y la mutagénesis de la

cisteína 8 en M anula por completo la liberación de partículas de virus infecciosos (Butler, Lager *et al.*, 2014; Snijder, Kikkert *et al.*, 2013; Veit, Matczuk *et al.*, 2014). La glicosilación y la estructura compleja probablemente comprometen el acceso de los anticuerpos a la proteína completamente procesada (Ansari, Kwon *et al.*, 2006; Butler, Lager *et al.*, 2014; Dokland, 2010; Kappes and Faaberg, 2015; López-Heydeck, Alonso-Morales *et al.*, 2015; Macías, Yépiz-Plascencia *et al.*, 2006; Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Wang, Qui *et al.*, 2014).

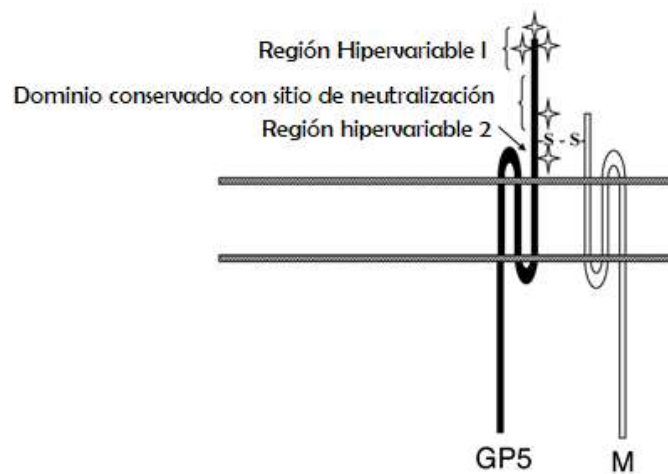


Figura 3: Estructura de la proteína GP5 y la unión a la proteína M por el enlace disulfuro.
Obtenida de: (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2016).

Epítomos de la proteína GP5

La importancia de un anticuerpo neutralizante (AcN) al proporcionar protección contra la infección por PRRSV fue analizada por primera vez por Ostrowski *et al.*, 2002, quienes demostraron que la administración pasiva de un concentrado de suero hiperinmune específico de PRRSV era suficiente para proteger a las cerdas gestantes de la exposición al virus, aunque, la protección se describió como homóloga ya que

los cerdos estaban protegidos contra el mismo virus utilizado en la preparación del suero hiperinmune. GP5 contiene algunos epítomos implicados en la neutralización del virus en el ectodominio N-terminal al igual que contiene algunos epítomos no neutralizantes. En la actualidad se busca el reconocimiento de epítomos inmunodominantes activadores de células T que sean capaces de provocar una respuesta significativa de interferón para poder ser utilizados como biológico (Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Vashisht, Goldberg *et al.*, 2008; Wang, Qui *et al.*, 2014).

Las regiones hipervariables presentes en el ectodominio son HVR-1 y HVR-2 (de sus siglas en inglés HVR Hypervariable regions). HVR-1 abarca del aa 25 al 31, y contiene un epítomo inmunodominante, variable y no neutralizante que va del aa 27 al 30 conocido como "Epítomo A" (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002; Vashisht, Goldberg *et al.*, 2008; Veit, Matczuk *et al.*, 2014), HVR-1 también es el principal sitio de reconocimiento e induce un aumento rápido de Ac sin actividad neutralizante (Figura 5) (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002). Presumiblemente, la hipervariabilidad dentro de la corta secuencia de aa del Epítomo A le permite funcionar como un señuelo inmunológico que estimula continuamente la activación de nuevas células B debido a su alta inmunogenicidad expresada rápidamente después de la infección y su hipervariabilidad (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002).

HVR-2 abarca del aa 51 al 61, su secuencia de 10 aa contiene un sitio conservado de N-glicosilación, en la posición 51 (Figura 5) (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002).

Además, de las regiones hipervariables, en el ectodominio de GP5 está presente el "Epítomo B" en los aminoácidos 37 al 45, una secuencia de aminoácidos altamente conservada pero no es inmunodominante (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002; Plagemann, 2004; Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Vashisht, Goldberg *et al.*, 2008; Veit,

Matczuk *et al.*, 2014). Plagemann *et al.*, 2002 en un estudio de mapeo demostró que el principal epítipo de neutralización de PRRSV se encuentra en los aminoácidos 36 a 52, donde hay una región altamente neutralizante y conservada. En otros estudios se ha descrito que los residuos H38 y I42, Y43 y N45 son el principal sitio de reconocimiento en el epítipo B y los aminoácidos 38, 39 y 42 bloquean la interacción con los AcN (Ostrowski, Galeota *et al.*, 2002; Plagemann, 2004). Este epítipo también está caracterizado como epítipo señuelo generando AcN, pero evita que el virus sea neutralizado generando una viremia más larga. Este epítipo de neutralización tiene identificados varios sitios de glicosilación unidos a N, que son probablemente importantes para el plegamiento correcto, la orientación, y la actividad biológica de la proteína (Plagemann, 2004; Popescu, Tribble *et al.*, 2017).

Popescu y colaboradores (2017) en un estudio para investigar los cambios de aminoácidos en GP5 en los epítipos de neutralización, identificaron variantes de escape de neutralización homólogas con cambios de aminoácidos no conservados en las posiciones L56P y N57D que están situadas dentro de la HVR-2. Basándose en estos resultados, propusieron que HVR-2 es la localización de un tercer epítipo, el "Epítipo C", que funciona como un objetivo para la neutralización homóloga. Los anticuerpos que se unen al epítipo C bloquean probablemente la accesibilidad de los AcN contra el epítipo B. Las mutaciones en HVR-2 dentro del epítipo C resultan en escape de la neutralización homóloga y explican tanto el rebote del virus como la persistencia (Figura 4) (Popescu, Tribble *et al.*, 2017; Veit, Matczuk *et al.*, 2014) .

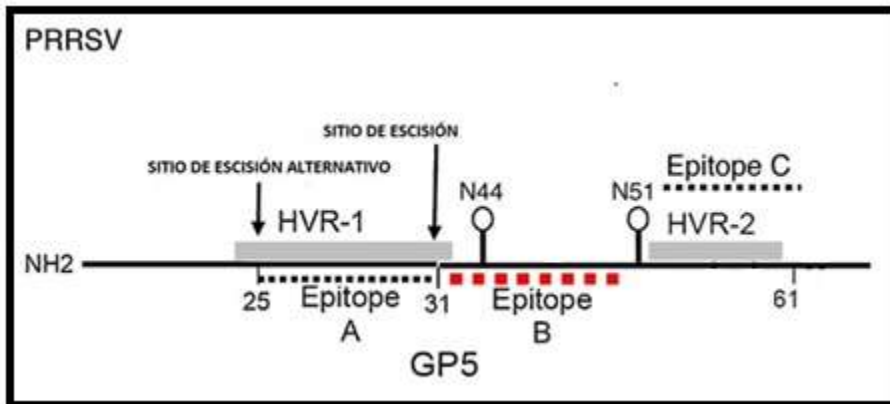


Figura 4: Descripción grafica de los sitios HVR y epítomos de GP5. OBTENIDAD DE: (Popescu, Tribble *et al.*, 2017)

Los sitios de glicosilación ligada a N, en general, son importantes para el plegamiento correcto, la orientación, y la actividad biológica de las proteínas. En muchos virus con envoltura, las proteínas de superficie son capaces de modificarse por adición de restos de azúcares y por la glicosilación ligada a N. Esta glicosilación desempeña diversas funciones en glicoproteínas virales tales como unión al receptor, fusión de membrana y penetración en células. Pero también se ha convertido en un mecanismo importante para la evasión del sistema inmune y persistencia viral utilizado por varios virus envueltos para escapar, bloquear o minimizar la respuesta de AcN del virus (Ansari, Kwon *et al.*, 2006; Li, Wang *et al.*, 2009). En un estudio de Wang *et al.* (2010) se determinó que GP5 contiene tres sitios de glicosilación: N34, N44 y N51 (Meulenber, 2000). Ellos observaron en su estudio que las mutaciones en cinco de sus aislados generaban que solo tuvieran dos sitios de glicosilación ligada a N (N34 y N51) y es debido a una mutación del sitio de glicosilación N44 en donde se cambió una asparagina (A) por una lisina (K) revelando así, que la adición

de glicanos en el sitio N44 es absolutamente esencial para la recuperación del PRRSV infeccioso, mientras que la eliminación de N51 hace que crezcan en títulos más bajos (Li, Wang *et al.*, 2009; Veit, Matczuk *et al.*, 2014). Además, mostraron que los aislados hipoglicosilados de GP5 son sensibles a la neutralización por anticuerpos (Ansari, Kwon *et al.*, 2006).

Estos datos sugieren que la infección natural con PRRSV puede implicar una evasión inmune basada en mecanismos de “glicano-blindaje” como se ha descrito previamente para otros virus, lo que ayuda a explicar la respuesta inmune humoral protectora bastante ineficaz que se observa en animales infectados con PRRSV (Veit, Matczuk *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente el “epítotope B” contiene uno de los sitios de N-glicosilación (N44), lo que sugiere que su alto grado de glicosilación enmascara un epítotope neutralizante. Además, el estudio realizado por Ansari, I., (2006) evidenció que los tres sitios de glicosilación son necesarios para generar la proteína GP5 de PRRSV totalmente madura. Por lo tanto, se ha postulado que la glicosilación de las proteínas de la envoltura viral desempeña un papel esencial durante la biosíntesis de glicoproteínas. En un caso, la falta de glicanos implica defectos de la glicoproteína y, por tanto, en la infectividad global de la cepa viral y en el segundo caso, los glicanos sirven potencialmente para proteger a las proteínas virales contra la neutralización por anticuerpos (Ansari, Kwon *et al.*, 2006; Loving, Osorio *et al.*, 2015).

Durante mucho tiempo se ha tratado de caracterizar los epítotos mayormente inmunogénicos de GP5, para generar una vacuna que sea capaz de inducir anticuerpos que neutralicen al virus. En el Cuadro 1, se enlistan algunos de los epítotos reportados en la literatura.

Cuadro 1: Epítomos de la proteína GP5 de Betaarterivirus suid 2

AA	DESCRIPCIÓN	AUTOR
27 a 30	Epítome señuelo inmunodominante ubicado en la Región hipervariable (HVR-1). Epítome de células B	(Ansari, Kwon <i>et al.</i> , 2006; Ostrowski, Galeota <i>et al.</i> , 2002; Popescu, Tribble <i>et al.</i> , 2017; Vashisht, Goldberg <i>et al.</i> , 2008)
27-31	Epítome A Inmunodominante y no neutralizante	(Ostrowski, Galeota <i>et al.</i> , 2002; Popescu, Tribble <i>et al.</i> , 2017)
31-51	Epítome neutralizante lineal, ampliamente neutralizante	(Popescu, Tribble <i>et al.</i> , 2017)
37-44	Epítome B Epítome de células B, no inmunodominante Epítome neutralizante principal	(Ansari, Kwon <i>et al.</i> , 2006; Ostrowski, Galeota <i>et al.</i> , 2002; Plagemann, 2004; Vashisht, Goldberg <i>et al.</i> , 2008)
36 a 52	Epítome de neutralización	(Plagemann, 2004)
51-61	Epítome C ubicado en HVR-2 objetivo para la neutralización homóloga.	(Popescu, Tribble <i>et al.</i> , 2017)
117-131	Epítome de células T inmunodominante	(Vashisht, Goldberg <i>et al.</i> , 2008; W. J. Zhang, Lin <i>et al.</i> , 2011)
149-162	Epítome de células T inmunodominante	(Vashisht, Goldberg <i>et al.</i> , 2008; W. J. Zhang, Lin <i>et al.</i> , 2011)
151-156	Epítome conservado	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)
152-156	Aislado china	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)
169-178	Aislado china	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)
196-200	Aislado china	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)

171-179	Epítotoe conservado	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)
187-200	Epítotoe de células B	(Vashisht, Goldberg <i>et al.</i> , 2008; Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)
195-200	Epítotoe conservado	(Wang, Qui <i>et al.</i> , 2014)

CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

Justificación

El impacto económico que PRRS genera en la porcicultura nacional, la alta variabilidad identificada en el ORF5 del PRRSV que resulta en nuevas cepas circulantes en granjas del país hacen que sea de suma importancia la identificación de epítomos de secuencias mexicanas, que tengan el potencial de ser usados para generar una vacuna que proteja contra cepas heterólogas circulantes en nuestro país.

Hipótesis

El identificar epítomos conservados altamente antigénicos de la proteína GP5 del Betaarterivirus suid 2 por herramientas bioinformáticas y medir su antigenicidad, permitirá proponer al menos uno que evidencie el reconocimiento de anticuerpos generados por virus heterólogos.

Objetivo

Identificar por herramientas bioinformáticas epítomos conservados de la proteína GP5 de secuencias mexicanas del Betaarterivirus suid 2 y determinar por ensayos serológicos cuáles son los epítomos más antigénicos.

Objetivos específicos

1. Obtención y análisis bioinformático de secuencias mexicanas de la proteína GP5 del virus Betaarterivirus suid 2.
2. Identificación por herramientas bioinformáticas de epítomos conservados de la proteína GP5 de Betaarterivirus suid 2.
3. Estandarización de un ELISA con cada uno de los epítomos seleccionados (péptidos epítomicos).
4. Evaluación de la antigenicidad de los péptidos epítomicos identificados en sueros de cerdos del país.

OBJETIVO 1: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS MEXICANAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS BETAARTERIVIRUS SUID 2.

Secuencias de la proteína GP5 del Betaarterivirus suid 2 mexicanas

Se obtuvieron un total de 183 secuencias: 20 obtenidas en el Laboratorio del DMZC, 162 más disponibles en el GenBank y la secuencia de referencia VR-2332 de la proteína (No. De acceso U87392) (Cuadro 7).

Análisis Bioinformático

Para identificar los posibles epítomos candidatos, las secuencias fueron analizadas en una serie de pasos con diferentes programas bioinformáticos disponibles en la web.

El primer paso del análisis fue el alineamiento de las 183 secuencias para la identificación de las zonas conservadas y las zonas variables dentro de las secuencias utilizadas.

Alineamiento de las secuencias

- a) MEGA7 (Kumar, Stecher *et al.*, 2016)
- b) DNASTAR Navigator 15

Zonas conservadas y variables

- a) MEGA 7 (Kumar, Stecher *et al.*, 2016)
- b) The ConSurf Server (Ashkenazy, Abadi *et al.*, 2016)

Como segundo paso, se determinaron los siguientes dominios de 20 secuencias más la secuencia de referencia (VR-2332).

Péptido señal

- a) LipoP 1.0 (Juncker, Willenbrock *et al.*, 2017)
- b) SignalP 4.1 (Nielsen, 2017)
- c) SMART (Letunic and Bork, 2018)
- d) SIGNAL 3L (Y. Z. Zhang and Shen, 2017)
- e) HMMER (Finn, Clements *et al.*, 2011)

Dominios transmembranales

- a) SMART (Finn, Clements *et al.*, 2011)
- b) HMMER (Finn, Clements *et al.*, 2011)
- c) TMHMM (Hofmann and Stoffel, 1993)
- d) PHOBIUS PREDICTION (Käll, Krogh *et al.*, 2007)
- e) ODSEKI (Käll, Krogh *et al.*, 2007)
- f) TMPred (Hofmann and Stoffel, 1993)
- g) CCTOP (Dobson, Reményi *et al.*, 2015)

OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID 2

Para la identificación de los epítomos de la proteína GP5, se hizo lo siguiente: una vez que las secuencias se analizaron como anteriormente se mencionó. Se trabajaron con los siguientes programas que identifican epítomos de células B.

Programas de epítomos B

- a) ABC PRED (Saha and Raghava, 2006)
- b) Bcpred (El-Manzalawy, Dobbs *et al.*, 2008)
- c) Antigenic (Kolaskar and Tongaonkar, 1990)
- d) IEDB (Larsen, Lund *et al.*, 2006)
- e) Bce-Pred (Saha and Raghava, 2004)

Análisis tipo BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica, de sus siglas en inglés)

Después de la identificación de los epítomos por los programas analizados, las secuencias resultantes como posibles candidatas fueron sometidas a:

- a) Un análisis tipo BLAST de la proteína GP5 con la finalidad de saber que la secuencia del epítome solo alineaba con secuencias de la misma proteína del virus.

b) Análisis tipo BLAST de proteínas de cerdo (*Sus Scrofa Domesticus*), con la finalidad identificar aquellas secuencias que alineen en más de tres aminoácidos con secuencias de proteínas de cerdo. Además, solo las secuencias de epítomos que tuvieron una alineación con secuencias de la proteína GP5, se les realizaron este segundo BLAST.

Como condiciones generales para los análisis tipo BLAST, los resultados arrojados por el análisis debían de ser mayores a 4000 con el fin de tener resultados de un gran número de secuencias con las que se pudo haber alineado el epítome.

Características de estructura secundaria e índice antigénico e hidrofílico

Con apoyo del programa Protean de DNASTAR, las secuencias se analizaron para obtener el índice de hidrofobicidad, antigenicidad, probabilidad de superficie y regiones flexibles.

Una vez que se eligieron los epítomos candidatos, estos fueron identificados en el análisis resultante del programa Protean.

Características Físicoquímicas de los epítomos seleccionados

La predicción de las características físicoquímicas de cada uno de los epítomos seleccionados se realizó con apoyo del programa en línea Peptide property calculator.

OBJETIVO 3: ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA CON CADA UNO DE LOS EPÍTOPOS SELECCIONADOS (PÉPTIDOS EPÍTÓPICOS).

Una vez identificados los epítomos candidatos, se seleccionaron para ser evaluados por ensayos serológicos (ELISA) utilizando 100 sueros de cerdo provenientes de Jalisco, Guanajuato, Sonora, Michoacán y Yucatán con la finalidad de saber cuál o cuáles epítomos son mayormente antigénicos para las cepas circulantes en México.

Por ello, como primer paso, los epítomos fueron sintetizados como péptidos lineales para utilizarse como antígeno de placa ("péptidos epitópicos"). Posteriormente se estandarizó para cada uno de los péptidos epitópicos seleccionados un ELISA de tipo indirecta. Para posteriormente evaluar la antigenicidad de cada uno de ellos.

Como pasos generales para la estandarización del ELISA fueron consultados el manual *Current Protocols in Immunology* (Hornbeck, 2015) y el Manual de animales terrestres de la OIE (OIE, 2014).

PROTOCOLO BÁSICO

- I. Con el uso de una pipeta multicanal recubrir las placas con 100 μ l de la solución de antígeno (péptidos epitópicos) en cada pocillo con una concentración óptima.
- II. Envolver las placas con plástico y dejar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- III. Realizar 4 lavados con una solución de lavado PBS-Tween 20 al 0.05% (Anexo 1). Después de ser lavadas se deben envolver cada placa en una toalla de

papel grande y agitando suavemente boca abajo sobre varias toallas de papel que ponen en la mesa de trabajo para quitar el residuo de la solución de lavado.

- IV. Bloquear la capacidad de unión de la placa con la solución PBS con leche al 0.5% (anexo 1) colocando 200 μ l en cada pocillo e incubando durante 60 minutos a 37 °C.
- V. Realizar 4 lavados como en el paso III
- VI. Agregar 100 μ l de reactivo secundario (suero) diluido en PBS filtrado e incubar 90 minutos a 37 °C.
- VII. Realizar 4 lavados como en el paso III
- VIII. Agregar 100 μ l de reactivo terciario (conjugado) diluido en PBS-Tween 0.05% a cada pocillo e incubar 60 minutos a 37 °C
- IX. Lavar las placas como en el paso III
- X. Añadir 100 μ l sustrato y medir la hidrólisis obtenida
- XI. Detener la hidrólisis con 100 μ l de NaOH 0.2M

Análisis de dilución en serie para determinar las concentraciones óptimas de reactivos

Para la estandarización del ELISA, se debe realizar un análisis de valoración de dilución en serie para determinar las concentraciones óptimas de reactivos:

- i. Reactivo primario: recubrimiento de placa con antígeno, también conocido como fase sólida. El antígeno de placa será cada péptido lineal.
- ii. Reactivo secundario: Dilución óptima a utilizar del suero de cerdo. Los sueros de cerdo a utilizar contienen anticuerpos contra el virus de Betaarterivirus suid

2, se buscó encontrar al epítoto que reconoce mayor cantidad de anticuerpos presentes en el suero.

- iii. Reactivo terciario: dilución del conjugado con enzima (IgG). El conjugado se une a los anticuerpos de cerdo, ya que es un anti-Pig IgG.

Reactivo primario

El reactivo primario utilizado fue de cada uno de los péptidos epitópicos lineales. Estos péptidos vienen liofilizados y como primer paso se deben de reconstituir.

Dado sus características fisicoquímicas, los péptidos que sean ácidos (carga neta negativa) se deben de reconstituir en agua de calidad molecular o PBS. Si esa primera opción falla, se añadirá Hidróxido de amonio (NH₄OH) (excepto en los casos en los que el péptido contenga residuos de Cys). Si el péptido sigue sin disolverse, se añadirá un disolvente orgánico como DMSO hasta conseguir solubilizarlo, y posteriormente se diluirá hasta conseguir la concentración deseada.

Los péptidos básicos (carga neta positiva) liofilizados fueron reconstituidos en agua calidad molecular. Como segunda opción, se intentaron disolver en una solución de ácido acético al 25% y si el péptido seguía sin disolverse, se intentó solubilizar en una pequeña cantidad de DMSO y posteriormente se diluyó hasta conseguir la concentración deseada.

Los péptidos neutros (carga neta igual a cero) se reconstituyeron en un disolvente orgánico como DMSO y posteriormente se diluyeron con agua hasta conseguir la concentración deseada (Abyntek, 2018).

Una vez reconstituidos se buscó la concentración óptima para recubrir las placas con los siguientes pasos:

- i. En un tubo preparar una solución con 5 ml de Buffer de carbonatos (Anexo 1) a una concentración de péptido de 20 μ g/ml.
- ii. En una placa de microtitulación de 96 pozos en forma de U y utilizando una pipeta multicanal, dispensar 100 μ l de Buffer de carbonatos de la fila 2 a la 12.
- iii. En la fila 1, agregar 200 μ l de la solución preparada en 20 μ g/ml, posteriormente con ayuda de una pipeta multicanal, tomar 100 μ l de la fila 1 y transferirlos a la fila dos, pipetear de 5 a 6 veces y transferir 100 μ l a la fila 3 y continuar hasta la fila 12. los pozos ahora contienen el reactivo de recubrimiento en una concentración de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 y 0.15 μ g/ml.
- iv. Dejar este recubrimiento toda la noche a 4 °C
- v. Al día siguiente lavar como en el paso III y bloquear las placas con buffer de bloqueo (PBS-Tween 0.05% con leche descremada al 0.5%).

Reactivo secundario

Para determinar la dilución óptima del suero de cerdo, los pasos a seguir son los siguientes:

- i. En un tubo preparar una dilución 1/1600 con 2 ml de PBS (Anexo 1) y 1.25 μ l de suero de sueros positivos y realizar lo mismo para suero de negativo.
- ii. En una placa de microtitulación de 96 pozos en forma de U y utilizando una pipeta multicanal, dispensar 100 μ l de PBS de la fila 2 a la 6 y de la 7 a la 12.

- iii. En la fila 1 y 6, agregar 200 μl de la dilución preparada de suero positivo y negativo respectivamente, posteriormente con ayuda de una pipeta multicanal, tomar 100 μl de la fila 1 y transferirlos a la fila dos, pipetear de 5 a 6 veces y transferir 100 μl a la fila 3 y continuar hasta la fila 6, realizar lo mismo con la dilución el pozo 6 hasta la fila 12 y desechar los 100 μl de excedente. Los pozos ahora contienen una dilución de 1/1600, 1/800, 1/400, 1/200, 1/100 y 1/50. Incubar 90 minutos a 37 °C
- iv. Lavar como en el paso III del protocolo básico.

Reactivo terciario

En este ensayo de ELISA el objetivo fué detectar la mayor cantidad de los anticuerpos que se unan a los péptidos elegidos.

El reactivo terciario utilizado fué el Anti-Pig IgG Fc Secondary Antibody, HRP® (SIGMA-ALDRICH) que está acoplado a peroxidasa. El anticuerpo seleccionado está dirigido a IgG totales de cerdo y se realizaron diluciones seriadas a partir de 1/1000.

Reacción enzimática

La prueba debe lograr una buena separación de los valores de densidad óptica (OD), representando todo el intervalo de funcionamiento de la actividad de anticuerpos. Es especialmente importante obtener una separación suficiente entre las muestras negativas y las positivas débiles. El valor de OD en el extremo inferior del intervalo de funcionamiento debe ser de 0,1 o menos para el control negativo en el ELISA indirecto. Los valores de OD en el extremo superior del intervalo de funcionamiento

no deben ser superiores a 2,0, puesto que por encima de este valor los lectores de placa empiezan a ser bastante inexactos. Por tal motivo se busca un valor superior a 1,0 pero inferior a 2,0 (OIE, 2014).

Se empleó como sustrato de la peroxidasa el reactivo OPD (o-Phenylenediamine) (Invitrogen) con la finalidad de evaluar los niveles de anticuerpos en función de la absorbancia obtenida. Las placas se lavan y se agregan 100 µl de OPD a cada pocillo. Para leer la hidrólisis, se siguen cinéticas de lecturas cada 5 minutos hasta llegar a un máximo de 30 minutos. La reacción se detiene empleando una solución de ácido sulfúrico 0.2M y se captura la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 492nm.

Una vez que se determinan las concentraciones óptimas de reactivos que se utilizarán en determinadas condiciones de ensayo, estas variables se mantienen constantes para la evaluación de los cien sueros de diferentes estados del país (Hornbeck, 2015).

OBJETIVO 4: EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS EPÍTÓPICOS IDENTIFICADOS EN SUEROS DE CERDOS DEL PAÍS.

Para evaluar la antigenicidad de cada uno de los péptidos epítópicos identificados, se seleccionaron 100 sueros de cerdo pertenecientes a cinco estados del país que se consideran altamente productores de cerdo. Se utilizaron 10 sueros positivos y 10 sueros negativos de cada uno de los cinco estados enlistados a continuación. Estos sueros, anteriormente fueron diagnosticados como positivos y negativos por el Kit de ELISA desarrollado en la UNAM (ELISA-UNAM) (García Plata, 2016).

Los estados seleccionados se encuentran dentro de los primeros 7 estados productores de carne de cerdo hasta octubre del 2018 (Figura 5) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018), es por ello que fueron seleccionados: Jalisco, Guanajuato, Yucatán, Sonora y Michoacán

**Top 10 en volumen de producción
Principales entidades productoras**

Rank	Entidad federativa	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2015-2016
	Total nacional	1,376,199	4.1
1	Jalisco	285,093	10.7
2	Sonora	237,889	3.9
3	Puebla	163,396	0.9
4	Yucatán	134,230	9.1
5	Veracruz	120,724	1.6
6	Guanajuato	111,722	2.6
7	Michoacán	44,339	6.9
8	Oaxaca	27,873	0.2
9	Chiapas	26,137	0.0
10	Guerrero	21,895	-1.8
	Resto	202,901	-1.3

Figura 5: Principales entidades productoras de carne de cerdo

CAPÍTULO III: RESULTADOS

OBJETIVO 1: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS MEXICANAS DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS BETAARTERIVIRUS SUID 2.

Alineamiento de secuencias

Como primer paso, se realizó un alineamiento de las 183 secuencias de nucleótidos en formato FASTA con el programa MEGA7, utilizando la herramienta de ClustalW.

Posteriormente, las secuencias de nucleótidos fueron transformadas a secuencia de aminoácidos y de igual forma se alinearon con ClustalW.

Zonas conservadas y variables

Con las secuencias transformadas a proteína, se realizó el análisis de los aminoácidos conservados y variables.

En el programa MEGA se obtuvieron las zonas que entre todas las secuencias fueron conservadas.

Este análisis dio como resultado que el grado de conservación entre las 183 secuencias es de tan solo el 25%, siendo consistente con lo reportado en la literatura en donde se dice que es la proteína más variable del virus (Shi, Tsan-Yuk Lam *et al.*, 2010).

Con el programa disponible en línea The ConSurf Server (<http://consurf.tau.ac.il/2016/>) se obtuvo la variabilidad por aminoácido con base en las 183 secuencias, es decir, el programa estableció la variabilidad y conservación que existe dentro de las 183 secuencias en cada uno de los 200-203 aminoácidos (Figura 6: Resultado del análisis de conservación y variabilidad de cada aminoácido en el análisis de las 183 secuencias de la proteína GP5.).

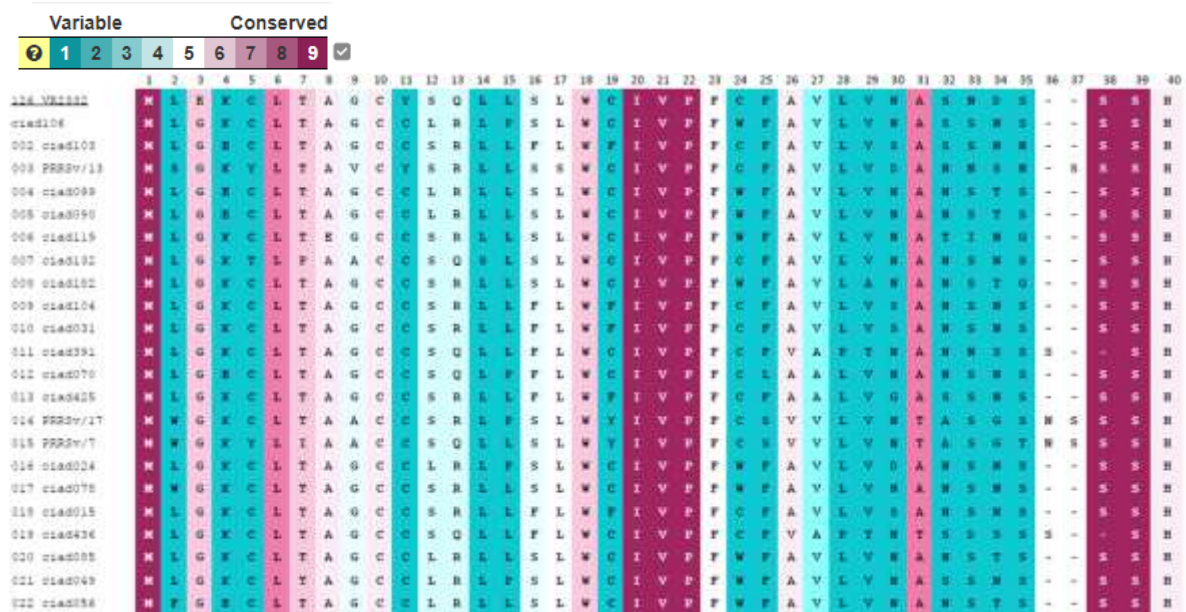


Figura 6: Resultado del análisis de conservación y variabilidad de cada aminoácido en el análisis de las 183 secuencias de la proteína GP5. El color indica el grado de variabilidad de los aminoácidos con base en la secuencia de referencia, el color 1 (azul) indica alta variabilidad y el color 9 (rosa mexicano) indica un grado de conservación cercano al 100%.

Péptido señal

Mediante el análisis en cinco diferentes programas disponibles en línea, se obtuvo el péptido señal de cada una de las secuencias. Con base en los resultados de los programas y sacando un promedio del tamaño del péptido predicho por los

programas, se determinó que el tamaño del péptido señal es de 31 aa para cada una de las secuencias (Figura 7) (Cuadro 8).

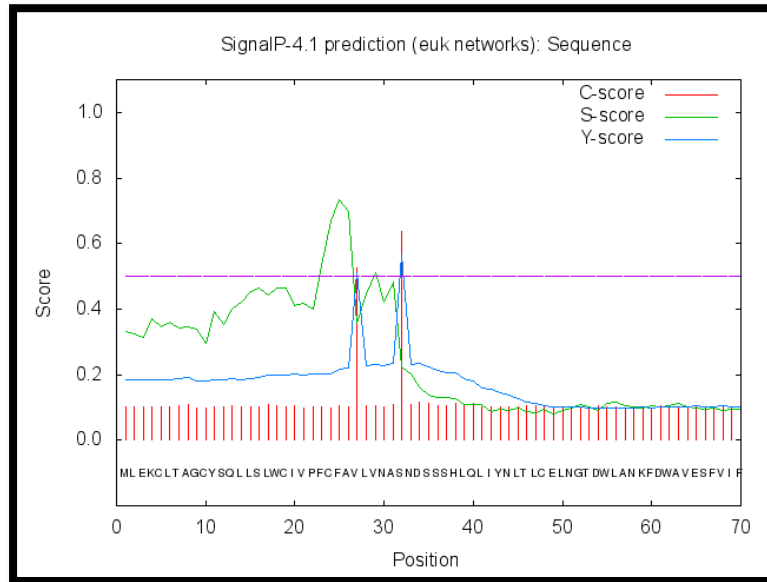


Figura 7: Predicción del péptido señal de la proteína GP5 de VR-2332 por el programa SignalP 4.1.

Dominios transmembranales

Dentro del análisis estructural, para cada una de las secuencias se obtuvieron los dominios transmembranales. Una vez determinados los dominios, su secuencia fue descartada dentro de la proteína para poder seleccionar los epítomos.

Para predecir la región transmembranal, solo se analizaron las secuencias de la proteína madura, es decir, a cada una de las secuencias se le quitó el péptido señal y solo se trabajó con la proteína madura (Cuadro 9)

OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN POR HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DE LA PROTEÍNA GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID 2.

Para la predicción de epítomos, se utilizaron 5 diferentes programas (ABC PRED, Bcpred, antigenic, IEDB y Bce-Pred). Para Bce-Pred, también se obtuvo la hidrofobicidad, la accesibilidad y la antigenicidad.

Para cada una de las secuencias se ocuparon los cinco programas.

Elección de epítomos

Para la elección de los epítomos candidatos se tomaron en consideración los siguientes criterios:

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

Con el análisis de toda la información obtenida, se eligieron nueve secuencias distribuidas dentro de la proteína sin considerar los dominios transmembranales y tomando en cuenta los tres puntos anteriores.

Como segundo paso, para cada una de las nueve secuencias se analizaron sus variantes, es decir, las mutaciones que presentaba esa misma región en las 183 secuencias estudiadas.

Al final, de las nueve secuencias, con sus respectivas mutaciones resultaron 66 epítomos diferentes para ser analizados.

Análisis tipo BLAST

Para el análisis de los 66 posibles epítomos, se realizaron los siguientes análisis tipo BLAST de forma individual para cada secuencia candidata:

- i. Análisis de tipo BLAST para similitud de secuencias de la proteína GP5.
- ii. Análisis de tipo BLAST para similitud de secuencias de proteínas de cerdo (*Sus Scrofa Domesticus*).

En el análisis tipo BLAST, aquellas secuencias que coincidían con secuencias que no fueran específicas de la proteína GP5, no fueron consideradas. Solo aquellas que alineaban con secuencias de la proteína GP5 se les realizó un segundo BLAST de proteínas de cerdos. Las proteínas que arrojaba el análisis se analizaban tomando en cuenta su e-value, % de identidad y % de cobertura. Así, aquellas secuencias de proteínas que tuvieran valores significativos de las características anteriormente mencionados como un e-value cercano a 0, % de identidad mayor al 70% y de cobertura mayor al 50% eran seleccionadas para realizar un alineamiento con la

secuencia del epítopo como anteriormente se menciona en el programa MEGA y se identificaba la cercanía y similitud del epítopo con las proteínas del cerdo. Con este criterio, los epítopos que tenían más de tres aminoácidos consecutivos idénticos a la secuencia de alguna proteína fueron descartados.

Considerando todos los puntos anteriores y analizando la información obtenida, se seleccionaron cuatro epítopos (Cuadro 2).

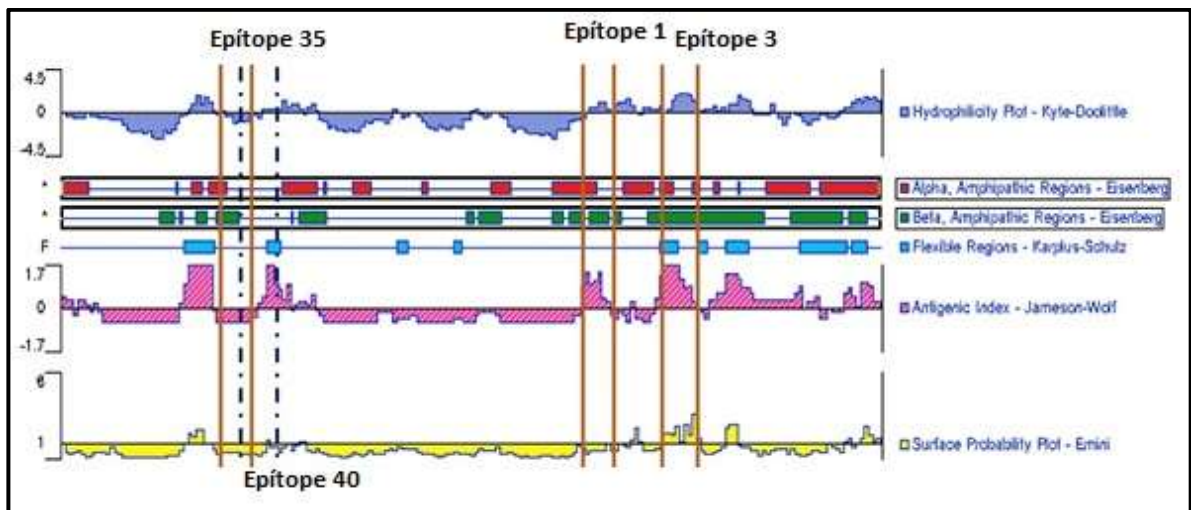
NOMBRE	Ubicación	Longitud	No. De programas	BLAST de Proteína
PEPTIDO 1	C-terminal	8	4	100%
PEPTIDO 3	C-terminal	10	4	100%
PEPTIDO 35	Ectodominio	9	3	100%
PEPTIDO 40	Ectodominio	8	4	100%

Cuadro 2: Nombre asignado a cada uno de los epítopos seleccionados, así como, sus características que comprenden la ubicación dentro de la proteína GP5, el número de aminoácidos por los cuales están compuestos, aa de inicio y termino, número de programas que identificaron el epítopo y el porcentaje de similitud del análisis tipo BLAST

Características de estructura secundaria e índice antigénico e hidrofílico

Por medio del programa PROTEAN 3D (DNASTAR, 2018), se obtuvieron diferentes características de la secuencia de referencia de la proteína GP5 del Betarterivirus suid

2 (



Figura

8).

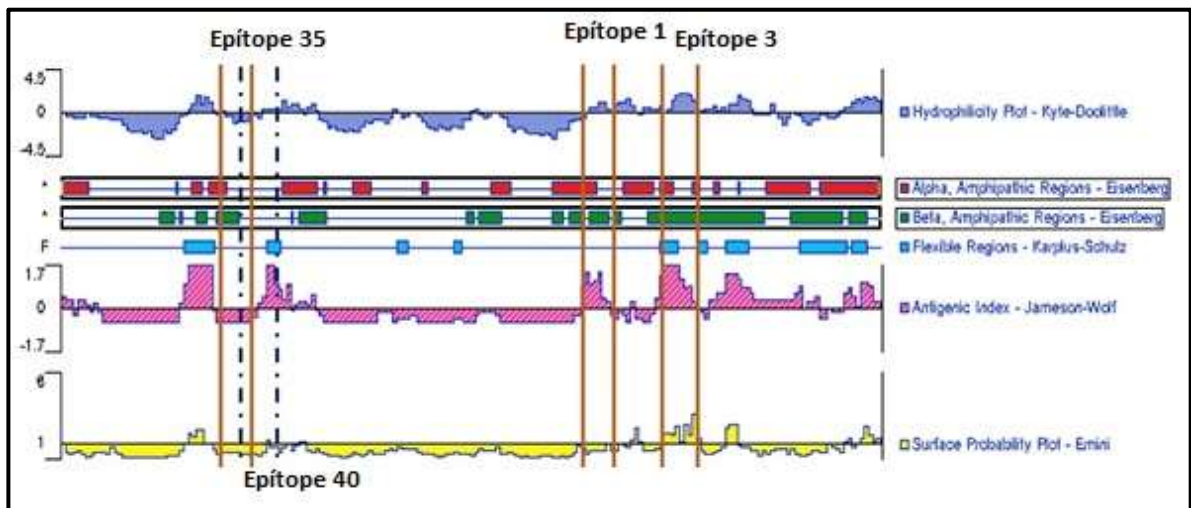


Figura 8: Predicción de la estructura secundaria de la proteína GP5 de VR-2332 y su nivel antigénico e hidrofílico. Con la identificación de los cuatro péptidos seleccionados.

Las características estimadas son:

1. **Hidropatía (Kyte-Doolittle):** Predice la hidropatía regional de las proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. Los valores positivos se consideran

hidrofóbicos mientras que los valores negativos se consideran hidrofílicos (DNASTAR, 2018).

2. **Región anfipática Alfa y Beta (Eisenberg):** Los momentos hidrofobos son cantidades semi-empíricas basadas en cálculos y mediciones experimentales, que describen la distribución de grupos de residuos hidrófilos e hidrófobos en una proteína. Describen la asimetría de la hidrofobicidad o la antipatía (DNASTAR, 2018).

3. **Flexibilidad (Karplus-Schulz):** Este método es útil para determinar sitios antigénicos, ya que estas regiones tienden a estar entre las más flexibles en una secuencia polipeptídica (DNASTAR, 2018).

4. **Antigenicidad (Jameson-Wolf):** Predice posibles determinantes antigénicos. Los resultados del método aparecen como múltiples picos en el gráfico del Índice Antigénico, donde cada pico representa un determinante antigénico potencial. El gráfico resume las regiones antigénicas utilizando un valor de umbral de 1,0 (DNASTAR, 2018).

5. **Probabilidad de superficie (Emini):** La Probabilidad de la superficie (Emini) predice la probabilidad de que una región determinada se encuentre en la superficie de una proteína (DNASTAR, 2018).

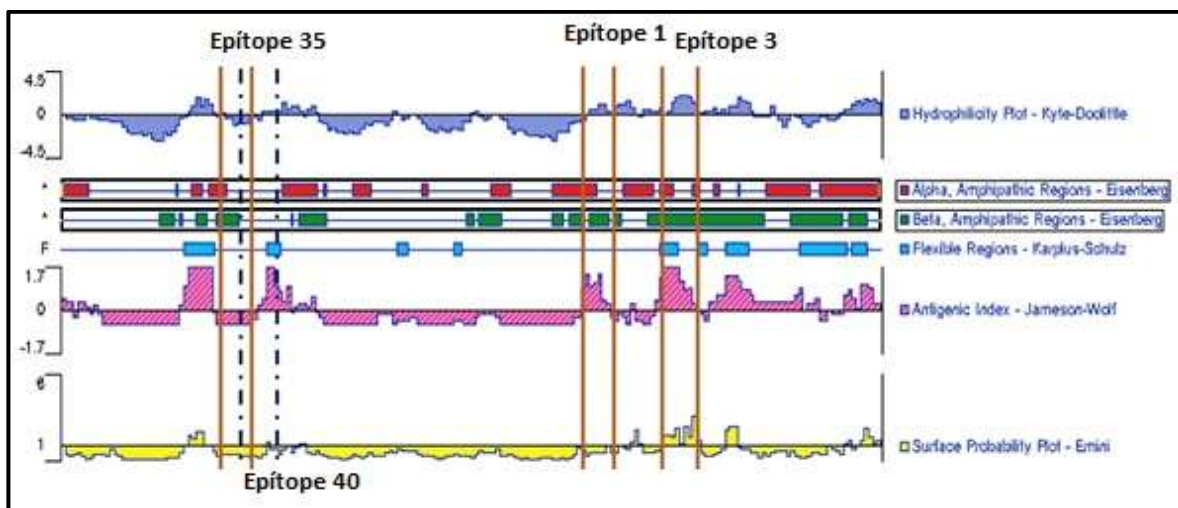


Figura 8: Predicción de la estructura secundaria de la proteína GP5 de VR-2332 y su nivel antigénico e hidrofílico. Con la identificación de los cuatro péptidos seleccionados.

En el siguiente cuadro se describen cada uno de los valores y escalas estimadas para los cuatro epítotos seleccionados.

EPÍTOPE	Hidropatía (Kyte-Doolittle)	Región anfipática Alfa y Beta (Eisenberg)	Flexibilidad (Karplus-Schulz)	Antigenicidad (Jameson-Wolf)	Probabilidad de superficie (Emini)
1	Valor positivo aprox. de 2 Es hidrofóbico (se localiza dentro del virión).	Pocos aminoácidos alfa Mayormente Beta anfipáticos.	La secuencia no es flexible.	Valor aprox. de 1.7 Se predice como altamente antigénica	No se encuentra en la superficie
3	Valor positivo aprox. de 3. Es hidrofóbico (se localiza dentro del virión).	100% de aminoácidos beta anfipáticos.	Un par de aminoácidos flexibles al inicio de la secuencia	Valor de 1.7 Altamente antigénico.	Valor aprox. de 2 Se localiza en la superficie.
35	Valor negativo Es hidrofílico (se localiza expuesto en el virión)	Pocos aminoácidos anfipáticos Beta.	No tiene aminoácidos flexibles	Valor negativo aprox. 2 Es antigénico	No se localiza en la superficie
40	Valor negativo Es hidrofílico (se localiza expuesto en el virión)	Sin aminoácidos anfipáticos Beta.	Últimos aminoácidos flexibles.	Valor de 1.7 Altamente antigénico.	No se localiza en la superficie

Cuadro 3: interpretación de los resultados del análisis realizado en el programa de Protean 3D..

Distribución de los epítomos elegidos en la proteína GP5

Se elaboró un diagrama donde se pudiera observa los dominios de la proteína GP5 y la distribución de los epítomos elegidos ().

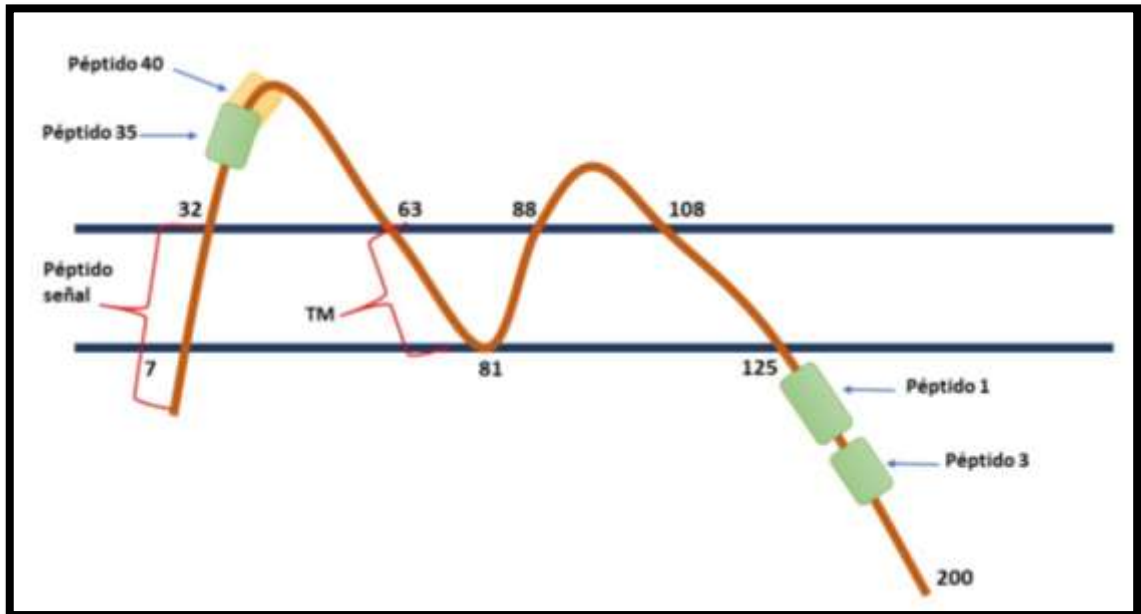


Figura 9: Análisis estructural de la proteína GP5 y la distribución de los epítomos (péptidos) elegidos en lo que sería un dibujo grafico de la proteína en estructura secundaria

OBJETIVO 3: ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA CON CADA UNO DE LOS EPÍTOPOS SELECCIONADOS (PÉPTIDOS EPÍTOPICOS).

Reactivo primario

El reactivo primario utilizado fue cada uno de los péptidos epítópicos, estos péptidos fueron reconstituidos en agua inyectable estéril. Cada péptido epítópico tenía una concentración inicial de 1mg de péptido en 1ml de agua inyectable.

Una vez reconstituidos se realizó una titulación de cada uno de los péptidos epítópicos usando una concentración inicial de 20µg/ml y realizando diluciones dobles hasta la concentración de 0.15 µg/ml. Utilizando 100µl por pozo.

Una vez analizados los resultados, se decidió trabajar con una concentración de 10µg/ml de cada uno de los péptidos epítópicos.

Reactivo secundario

Para determinar la dilución óptima del suero de cerdo a utilizar, se emplearon sueros negativos y positivos. Ha estos sueros se les realizó una titulación con diluciones dobles seriadas comenzando en una dilución 1/50 hasta 1/1600 utilizando 100µl por pozo.

Una vez obtenidos los resultados se decidió trabajar con la dilución del suero en 1/1000.

Reactivo terciario

Como anticuerpo secundario, se utilizó el Anti-Pig IgG Fc Secondary Antibody, HRP® (SIGMA-ALDRICH) que esta acoplado a peroxidasa y que está dirigido a IgG totales de cerdo.

Para determinar la dilución optima, se realizó una titulación del conjugado con diluciones dobles seriadas comenzando en 1/1000 hasta 1/492000. Utilizando 100µl por pozo.

Con los resultados obtenidos, se decidió trabajar con una dilución 1/4000 pero además después de realizar varios ensayos y observar que los sueros negativos tenían una DO alta, se realizaron más ensayos con la dilución del conjugado pero esta vez realizando la dilución con leche en diferentes % de inclusión en PBS-Tween 0.05%.

Una vez observada una DO óptica de los negativos baja, se decidió trabajar con leche al 5% con una dilución de conjugado en 1/4000.

Reacción enzimática

Para la detección de hidrólisis se empleó el reactivo OPD (o-Phenylenediamine), como lo estipula el fabricante. En una concentración de 100µl por pozo. Se determinó además el tiempo óptimo de hidrólisis dejando como resultado a los 20 minutos y una vez transcurrido este tiempo la reacción fue detenida empleando una solución de ácido sulfúrico 0.2M. Una vez detenida la hidrólisis la absorbancia era medida en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 492nm.

Los resultados de las densidades ópticas eran analizadas y graficadas.

Resultados de ELISA

Como anteriormente se mencionó la estandarización del ELISA, se utilizaron estos parámetros para cada uno de los péptidos, además, al no tener sueros testigos específicos de cada uno de los péptidos, se utilizaron sueros tanto positivos como negativos que anteriormente fueron diagnosticados como tales con otro kit de ELISA. Además, se utilizó un suero hiper inmune generado con la vacuna comercial en cerdo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en cada ensayo se obtuvo el punto de corte.

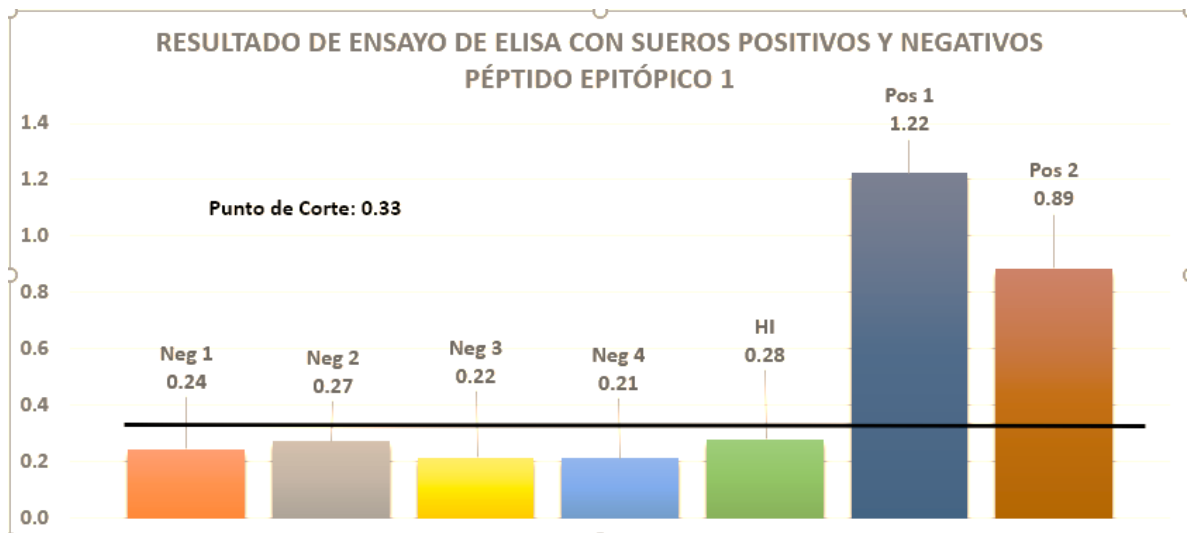
Péptido epítópico 1

El epítopo 1 se encuentra localizado en la región C- terminal, con lo cual, según la descripción de la proteína, este epítopo no se encuentra expuesto.

En la Gráfica 1 se pueden observar las DO de los controles utilizados una vez estandarizada la técnica de ELISA para el epítopo 1.

Se utilizaron 4 controles negativos, el suero hiperinmune y dos controles positivos, mismo que fueron utilizados como controles en todos los epítopos.

En este epítope, tomando en consideración que cada control fue trabajado por triplicado y para la obtención del punto de corte se consideraron tres desviaciones estándar (99%), el punto de corte resulto de 0.33, ejemplificado con la raya color negro en el centro de la gráfica



Gráfica 1: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 1. Las barras de color naranja, gris, amarillo y azul claro representan los controles negativos que se localizan por debajo del punto de corte, mientras que los positivos coloreados en color azul fuerte y terracota se muestran muy por encima del punto de corte.

Los resultados de la gráfica muestran que se tiene una buena detección de anticuerpos dirigidos hacia el epítotope 1 y la separación entre DO de los controles positivos y negativos es visible.

La DO de los controles positivos nos muestra que existen una gran cantidad de Ac que se unen al epítotope 1.

Los resultados del suero hiper inmune de la vacuna muestran que tiene un comportamiento similar a los sueros negativos, y para este epítotope se considera negativo.

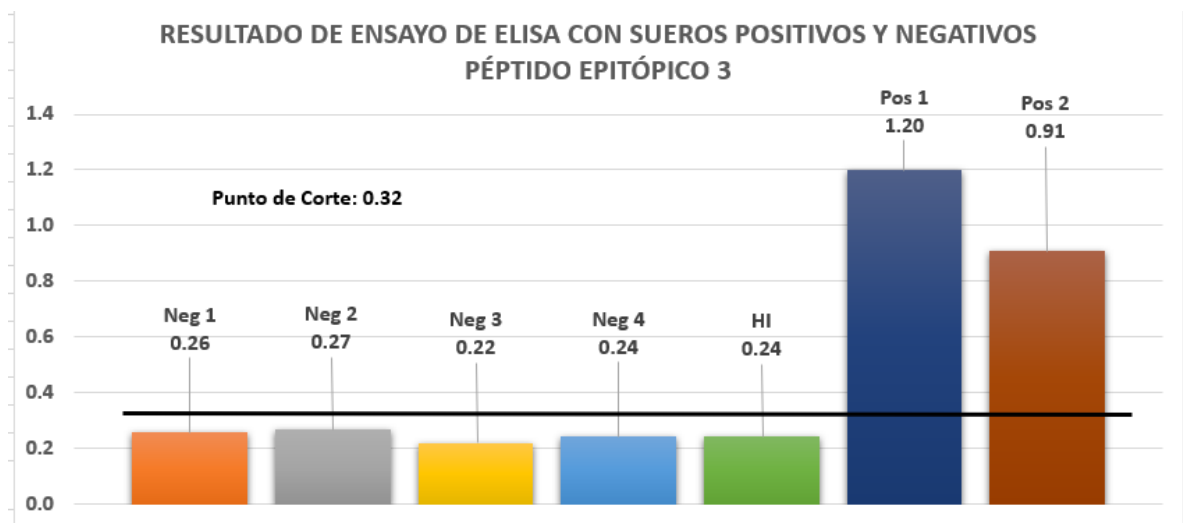
Péptido epítópico 3

El epítopo 3 se encuentra localizado en la región C- terminal, con lo cual, según la descripción de la proteína, este epítopo no se encuentra expuesto.

En la Gráfica 2 se pueden observar las DO de los controles utilizados una vez estandarizada la técnica de ELISA.

Se utilizaron 4 controles negativos, el suero hiperinmune y dos controles positivos, mismo que fueron utilizados como controles en todos los epítopos.

En este epítope, tomando en consideración que cada control fue trabajado por triplicado y para la obtención del punto de corte se consideraron tres desviaciones estándar (99%), el punto de corte resultó de 0.32, ejemplificado con la raya color negro en el centro de la gráfica (Gráfica 2).



Gráfica 2: Resultados de la estandarización del péptido epítópico 3. Las barras de color naranja, gris, amarillo y azul claro representan los controles negativos que se localizan por debajo del punto de corte, mientras que los positivos coloreados en color azul fuerte y terracota se muestran muy por encima del punto de corte.

La gráfica ilustra los resultados obtenidos en el ensayo, en donde se puede observar que se logra una detección de anticuerpos para este epítopo. Los sueros negativos se mantienen, pero el suero hiper inmune de vacuna se proyecta como negativo por debajo del punto de corte.

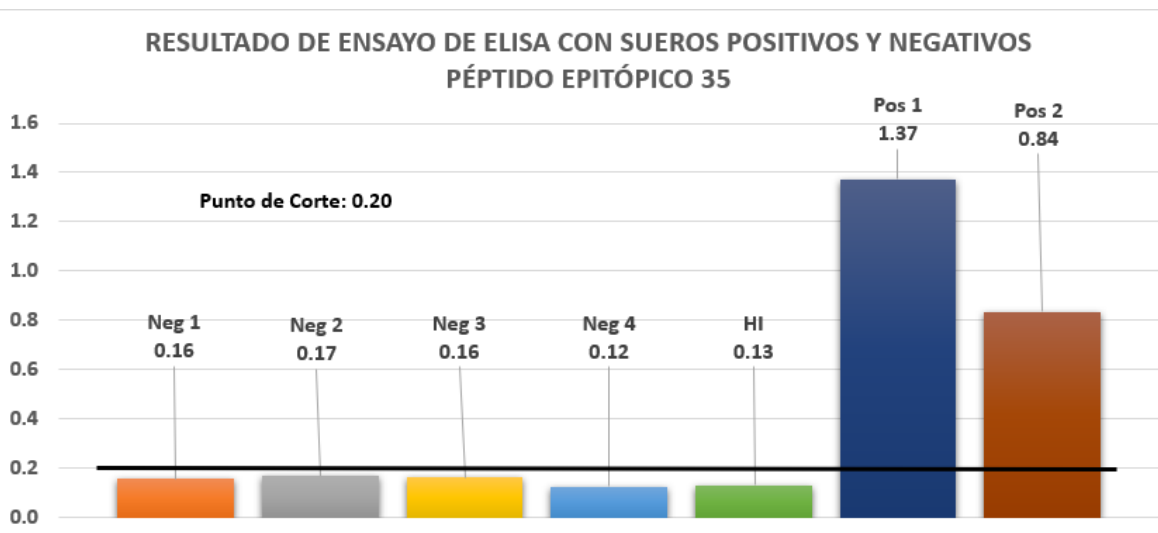
Péptido epítopico 35

El epítopo 35 se encuentra localizado en la región del ectodominio de la proteína GP5, con lo cual se encuentra expuesto en el virión y abarca un aminoácido que está N-glicosilado.

En la Gráfica 3 se puede observar las DO de los controles utilizados una vez estandarizada la técnica de ELISA.

Se utilizaron 4 controles negativos, el suero hiperinmune y dos controles positivos, mismo que fueron utilizados como controles en todos los epítopos.

En este epítopo, tomando en consideración que cada control fue trabajado por triplicado y para la obtención del punto de corte se consideraron tres desviaciones estándar (99%), el punto de corte resultó de 0.20, ejemplificado con la raya color negro en el centro de la gráfica (Gráfica 3).



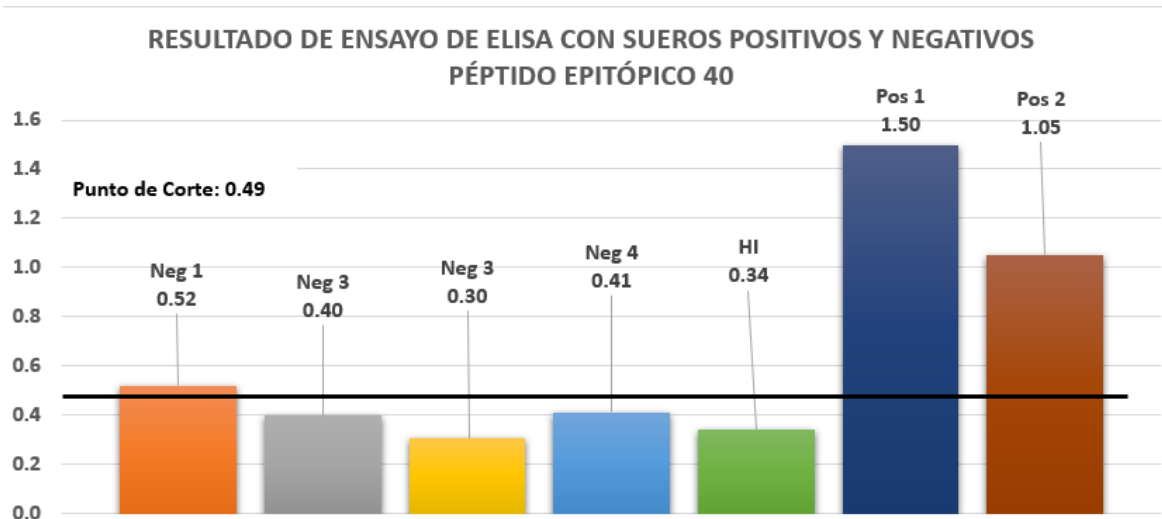
Gráfica 3: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 35. Las barras de color naranja, gris, amarillo y azul claro representan los controles negativos que se localizan por debajo del punto de corte, mientras que los positivos coloreados en color azul fuerte y terracota se muestran muy por encima del punto de corte.

De igual manera que para los epítomos anteriores, se puede observar que se tiene una detección de anticuerpos para este epítome, los controles negativos se mantienen por debajo del punto de corte y el suero hiper inmune de vacuna se considera negativo. En este epítome, se pudo tener una detección un poco más alta de anticuerpos en los sueros positivos, esta detección puede estar asociada a que este epítome se encuentra expuesto.

Péptido epitópico 40

El epítome 40 se localiza en el ectodominio de la proteína GP5 con lo cual está expuesto, además abarca un aminoácido glicosilado en N51.

En la Gráfica 4 se puede observar que se utilizaron los mismos 4 controles negativos, el suero hiperinmune y dos controles positivos. Para este ensayo el punto de corte fue de 0.49, ejemplificado con la raya color negro en el centro de la gráfica.



Gráfica 4: Resultados de la estandarización del péptido epitópico 40. Las barras de color naranja, gris, amarillo y azul claro representan los controles negativos que se localizan por debajo del punto de corte, mientras que los positivos coloreados en color azul fuerte y terracota se muestran muy por encima del punto de corte.

En el caso de este epítipo, se puede observar en la gráfica que el control negativo 1, se vuelve positivo, estando por arriba del punto de corte. El resto de los controles sigue siendo negativo al igual que el suero hiper inmune de vacuna.

Los controles positivos tienen una detección de anticuerpos mayor que el resto de los epítipos siendo este epítipo el de valores más alto. Esto puede deberse a que este epítipo se encuentra expuesto en la proteína y es un blanco importante para los anticuerpos del huésped.

OBJETIVO 4: EVALUACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PÉPTIDOS EPITÓPICOS IDENTIFICADOS EN SUEROS DE CERDOS DEL PAÍS.

Para evaluar la antigenicidad de cada uno de los péptidos epítópicos identificados y seleccionados, se utilizaron 10 sueros positivos y 10 sueros negativos de los cinco estados enlistados anteriormente, con un total de 100 sueros (50 positivos y 50 negativos). Como se mencionó anteriormente, los sueros fueron catalogados como positivos y negativos por el Kit de ELISA desarrollado en la UNAM (ELISA-UNAM) (García Plata, 2016).

Los 100 sueros se trabajaron para cada uno de los cuatro péptidos epítópicos y los resultados se muestran a continuación (Cuadro 4 y Cuadro 5).

SUEROS					
PÉPTIDO EPITÓPICO	(+)	(-)	Dobles (+) (KIT Y Epítopo)	Dobles (-) (KIT Y Epítopo)	TOTAL DE SUEROS
1	62	38	48	36	100
3	60	40	47	37	100
35	53	47	47	44	100
40	54	46	46	42	100
KIT	50	50			100

Cuadro 4: Resultados por péptido epítópico. Se muestran los sueros que son dobles positivos al kit y a cada uno de los epítopos, teniendo una concordancia muy similar a lo diagnosticado por el kit.

Como parte complementaria de estos cien sueros, se analizaron 10 sueros positivos a anticuerpos específicos a una infección de campo y 10 positivos a anticuerpos específicos de vacunación (Cuadro 6)

ESTADO	SONORA																				TOTAL		Dobles (+) (KIT Y péptido)	Dobles (-) (KIT Y péptido)
	POSITIVOS										NEGATIVOS										TOTAL			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	POSITIVOS	NEGATIVOS		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	13	7	10	7
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	12	8	10	8
35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	11	9	10
40	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	11	9	9	8
ESTADO	JALISCO																				TOTAL		TOTAL	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	13	7	10	7
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	12	8	10	8
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10
ESTADO	MICHOACAN																				TOTAL		TOTAL	
1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	12	8	9	7
3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	12	8	8	6
35	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	10	10	8	8
40	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	10	10	8	8
ESTADO	GUANAJUATO																				TOTAL		TOTAL	
1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	12	8	9	7
3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	12	8	9	7
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	13	7	10	7
40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	11	9	9	8

ESTADO	YUCATÁN										TOTAL		TOTAL											
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	12	8	10	8
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	12	8	10	8
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	9	10	9
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	12	8	10	8

Cuadro 5: Resultados de ELISA por estado y epítipo.

		SUEROS POSITIVOS A ANTICUERPOS																							
SUEROS	PÉPTIDO EPITÓPICO	VACUNALES										TOTAL		INFECCIÓN DE CAMPO										TOTAL	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	-	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	+	-
1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	10	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	6	4
3		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	2	8	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	5	5
35		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	9	1
40		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	10	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	7	3

Cuadro 6: Resultados de ELISA para sueros positivos Anticuerpos específicos a Vacuna y Campo

Péptido epítópico 1

Como se muestra en el Cuadro 4, el epítopo 1 tiene una concordancia de 48 sueros dobles positivos y 36 sueros dobles negativos con el kit ELISA-UNAM. Siendo esto muy importante ya que los resultados obtenidos son muy parecidos a los obtenidos por el gold estándar. Además, este epítopo detectó 62/100 muestras positivas, lo cual supera a los positivos por el gold estándar. Para determinar si son falsos negativos por el kit de ELISA, falta realizar más estudios.

En cuanto a la positividad por Estado, este epítopo fue el que mayor concordancia por estado tiene. Tiene una doble positividad de 10 sueros en Sonora, Jalisco y Yucatán (Tabla 5), en promedio detectó tres sueros positivos que se reportan como negativos.

En el Cuadro 6 se muestra que los 10 sueros de vacunación son reportados como negativos, pudiendo suponer que la vacunación no genera anticuerpos contra este epítopo. En cuanto a los sueros de campo, fue capaz de detectar 6/10 lo que quiere decir que el epítopo es presentado al sistema inmune en una infección natural y genera anticuerpos, es decir, es antigénico y se muestra como el epítopo que tuvo mayor concordancia con los resultados del kit ELISA-UNAM.

Péptido epítópico 3

Este epítopo tuvo una concordancia de 47 dobles positivos y 37 dobles negativos con el kit ELISA-UNAM (Cuadro 4), solo uno menos que el epítopo 1, estos resultados son semejantes a los obtenidos con el gold estándar.

De las 100 muestras totales, detecto 60 como positivas, teniendo una detección de 10 muestras más que el gold estándar, esto debe de ser comprobado para determinar si es capaz de detectar falsos negativos del kit ELISA-UNAM.

En cuanto a la positividad de los estados, este epítoto tiene una concordancia similar al anterior. Tiene una doble positividad de 10 sueros en Sonora, Jalisco y Yucatán y en promedio detectó dos sueros positivos que se reportan como negativos (Cuadro 5).

En los resultados de los sueros específicos a vacuna, solo dos fueron dobles positivos. Esto puede deberse a múltiples factores como el hecho de que los animales pudieron ser vacunados más de dos veces o que las muestras fueron tomadas en la fase persistente de la enfermedad. En cuanto a los sueros específicos de campo, la mitad fueron positivos, tal vez esto se deba a que es menos antigénico que el epítoto 1.

Péptido epítotico 35

El epítoto 35 tuvo una concordancia de 47 sueros dobles positivos y 44 sueros dobles negativos a los dos sistemas de ELISA (Cuadro 4), resultados muy similares a los del epítoto 3 y siendo muy semejantes a los del gold estándar. Además, detecto 53/100 sueros positivos siendo el más semejante a los resultados del gold estándar.

Para el análisis por estado, tuvo una doble positividad de 10 sueros en los estados de Jalisco, Guanajuato y Yucatán siendo el único epítoto que tiene una doble positividad de diez sueros en Guanajuato, ya que el suero tres reportado como positivo, resultó negativo para el resto de los epítotos. En promedio detecta dos sueros positivos que son reportados negativos.

En cuanto a los resultados de los sueros vacunales, este epítoto solo detectó uno como positivo, pero es el epítoto con mayor detección de sueros positivos a infección de campo

con 9 sueros (Cuadro 6). Es importante notar que el suero de campo número 12 que detectó como negativo, también lo es para el resto de los epítomos.

Estos resultados muestran que la vacuna es procesada de tal forma que este epítomo no es visible al sistema inmune, pero en infección de campo se muestra y genera anticuerpos. Deben realizarse mayor número de estudios para establecer si estos anticuerpos son protectores, en qué fase de la enfermedad son producidos y sobre todo si son neutralizantes para el virus. Por tanto, solo podemos decir que es antigénico.

Péptido epítomico 40

El epítomo 40 tiene una concordancia de 46 sueros dobles positivos y 42 dobles negativos, siendo el que menor concordancia con el gold estándar obtuvo, pero en los resultados globales obtuvo 54/100 sueros positivos siendo muy similares con los resultados del gold estándar.

Los resultados analizados por estado fue el que menos concordancia obtuvo, puesto que solo tuvo doble positividad con el estado de Jalisco y Yucatán. En el estado de Jalisco, junto con el epítomo 35 fueron los únicos que tuvieron tanto 10 dobles positivos como 10 dobles negativos (Cuadro 5).

La tabla 6 muestra que este epítomo no detectó ningún suero positivo vacunal, pero en los sueros de campo se detectaron 7 dobles positivos, con lo cual se muestra que es el segundo más antigénico y específico a una infección de campo.

DISCUSIÓN

La enfermedad de PRRSV, causa más de dos millones de casos de infección porcina anualmente en el mundo y le cuesta a la industria porcina de los EE. UU. aproximadamente 664 millones de dólares en pérdidas directas por año (Chen, Li *et al.*, 2013; Du, Nan *et al.*, 2017). En la actualidad el control de la enfermedad se centra en la administración de vacunas profilácticas para minimizar el impacto clínico de una infección, sin evitar que los cerdos sean infectados. Las vacunas actualmente utilizadas en el campo consisten en vacunas de virus inactivo y de virus atenuado activo. Las primeras son seguras y pueden proporcionar cierta protección contra los virus homólogos, pero son totalmente ineficaces contra las cepas heterólogas y las vacunas atenuadas de virus activo proporcionan una protección de moderada a fuerte contra un desafío homólogo, pero no es capaz de proporcionar protección cruzada contra desafíos heterólogos con un efecto protector sostenido, además tiene la desventaja de que la cepa de vacuna puede volver a la virulencia y comenzar a promover en lugar de prevenir la infección viral (Chen, Li *et al.*, 2013; Piron, De Koker *et al.*, 2014; Welner, Nielsen *et al.*, 2017).

Tras esta problemática se han evaluado varios enfoques para desarrollar vacunas contra la enfermedad, incluidos virus atenuados vivos, virus inactivados, sistemas de vacunas de subunidades recombinantes (basadas en plásmidos, bacterias, baculovirus, adenovirus, virus de la viruela aviar y virus de la pseudorabia que llevan varias proteínas estructurales del Betaarterivirus suid 2) y virus quiméricos (Chen, Li *et al.*, 2013; Welner, Nielsen *et al.*, 2017).

En la actualidad cada vez es más necesario generar vacunas basadas en epítomos considerando su gran potencial de ser usadas para la prevención de enfermedades, diagnósticos y tratamientos con menos riesgos de inducir una infección. Sin embargo, dentro de la diversidad de epítomos en un patógeno, es importante notar que no todos los epítomos, incluso aquellos que parecen ser dominantes, tienen la misma capacidad para provocar la producción de anticuerpos. La producción de estas vacunas tiene ventajas tales como: se incluyen varios epítomos inmunoprotectores en una sola molécula, se descartan los epítomos inmunodominantes, pero no protectores, y los epítomos que ejercen efectos adyuvantes, como los epítomos promiscuos de células T, pueden incluirse para mejorar la inmunogenicidad. Estas características ofrecen la posibilidad de diseñar vacunas multitarget, altamente eficientes. Sin embargo, un requisito para el diseño de tales inmunógenos consiste en el descubrimiento de los epítomos inmunoprotectores y las variantes cuando la variabilidad genética es relevante para un patógeno particular (Soria-Guerra, Nieto-Gomez *et al.*, 2015). Actualmente no se dispone de una vacuna basada en epítomos sintéticos contra la infección por Betaarterivirus suid 2 en México. El presente estudio representa la primera investigación en el país del análisis y estudio de antigenicidad de péptidos epítomícos de células B conservados como posibles epítomos a utilizar en una vacuna prometedora que ayude a la industria porcina del país a controlar y de ser posible erradicar la enfermedad de PRRS, además utiliza nuevas formas de investigación como es la aplicación de herramientas bioinformáticas, que en el campo de veterinaria aun su uso es muy limitado y poco explorado.

La bioinformática es un campo de la ciencia en el que varias disciplinas como la biología, la informática y la tecnología de la información que convergen para organizar y almacenar grandes cantidades de información biológica impulsada por los avances generados en genética, biología molecular y biotecnología. Uno de los objetivos de la bioinformática es racionalizar e interpretar, de manera efectiva y oportuna, la información del genoma, transcriptoma y/o proteoma con el objetivo de promover beneficios para la salud, incluyendo el desarrollo de vacunas seguras y eficaces (Soria-Guerra, Nieto-Gomez *et al.*, 2015).

Dentro de los objetivos de este proyecto se realizó el análisis bioinformático de una de las principales y más importantes proteínas estructurales del Betaarterivirus suid 2: GP5. Estos análisis no solo fueron de gran aporte al proyecto, sino que se incorporó un nuevo campo de análisis de información para llegar a un objetivo particular. Esto como parte de abrir una nueva puerta de acceso a un campo aplicado a la ciencia y en particular a la ciencias veterinarias mostrando algunos de los programas bioinformáticos en línea más útiles y las bases de datos de búsqueda para los análisis de genomas, basados en nuestra propia experiencia y una laboriosa búsqueda en la literatura y en las bases de datos web, brindando una perspectiva de cómo estas herramientas han ayudado a el campo del desarrollo de vacunas, particularmente en el desarrollo de vacunas basadas en epítopos y que nos puedan brindar información relevante, que se pueda estar pasando por alto, y que sea una base para generar nuevo conocimiento que nos pueda permitir ganar la batalla a la enfermedad.

Como parte del análisis que se cubrió de todas las secuencias de la proteína GP5 del Betaarterivirus suid 2, se puede observar la gran variabilidad de esta proteína, ya que los análisis nos mostraron que el grado de conservación de las 183 secuencias es

solo del 25.6%, lo cual es un porcentaje muy bajo. Esto limitaba en gran parte el poder obtener epítomos conservados de esta proteína, pero se lograron identificar secuencias candidatas a epítomos de 8 a 10 aa con un grado de conservación mayor al 95%. Si bien, la proteína dentro de su forma de evasión al sistema inmune ocupa la alta variabilidad, también la proteína tiene funciones que la hacen conservar secuencias cortas durante el transcurso de los años. También se sabe que la proteína utiliza un epítomo señuelo (epítomo A) que engaña al sistema inmune del cerdo y es altamente antigénico (Dokland, 2010; Faaberg, Hocker *et al.*, 2006; Plagemann, 2004). La secuencia de este epítomo fue analizada y se descubrió que solo 68 de las 183 secuencias tienen la secuencia conservada de VR-2332 (²⁷VLVN³⁰). Sus cuatro aminoácidos de los que consta su secuencia son altamente variables y por cual solo el 37% de las secuencias estudiadas son idénticas en sus aa, lo cual coincide con la literatura, ya que se sabe que el virus evoluciona constantemente para causar nuevos brotes al evadir la inmunidad existente en las granjas vacunadas (Du, Nan *et al.*, 2017).

La caracterización de la proteína GP5 incluyó la determinación de los dominios transmembranales (TM), y al contrario de lo descrito en la literatura en donde se piensa que existen de dos a tres dominios TM, los resultados fueron coincidentes con las especulaciones de Veit *et al.*, 2014, en donde dice que solo la última parte de la región hidrofóbica de GP5 cumple con las propiedades de las regiones transmembrana típicas, donde una secuencia hidrófoba de ~20 aminoácidos está flanqueada en cada lado por un residuo de arginina (R) y la secuencia se muestra ¹⁰⁵**RYVLSSIYAVCALAALTCFVIR**¹²⁶. En el caso de las 183 secuencias analizadas la R105

tiene un grado de conservación de 99.4%, solo una secuencia muestra un cambio por una Glicina, y al ser solo una, tal vez se deba un error en la secuenciación. En el caso de R126, se presenta la misma situación con un grado de conservación de 99.4% y en este caso la mutación se da de una arginina por una lisina, quiere decir que las 183 secuencias tienen el dominio TM conservado.

La parte precedente de la región hidrófoba abarca de los aminoácidos 66-104, o eso se pensaba, pero de acuerdo con lo analizado en este proyecto, los programas bioinformáticos describían solo dos regiones transmembranales y en medio de ellas se notaba una secuencia expuesta. Algo un poco inusual porque se describe que esta secuencia se localiza citoplasmática, no siendo el caso con la especulación de Veit y colaboradores 2014, donde describe que solo existe una región transmembranal ya antes descrita y la segunda región precedente descrita como hidrofóbica o transmembranal se especula que forma un bucle en forma de horquilla que no atraviesa completamente la membrana. Esto debido a que, hay un residuo de prolina conservado (P71), que puede inducir un retorcimiento en la hélice del dominio TM que hará que regrese desde el interior de la membrana hasta el exterior del virus en el virión maduro. En este estudio, la P71 descrita tiene una conservación del 100% en las 183 secuencias. Además, hay un residuo de ácido aspártico (D89) 15 residuos del extremo de esta región hidrófoba, que es atípico para un tramo transmembrana y que en las 183 secuencias se encuentra 100% conservado. Este residuo cargado, Veit *et al.*, 2014 especula que puede estar expuesto a la fase hidrófila. Tal es el caso, que se presenta en las predicciones de los dominios TM, y coincide con lo descrito por el autor, quedando la región del bucle de horquilla de la región 65-88, la secuencia expuesta del 89-102 y la región TM del 103-125 (). Esta información es de

suma importancia, ya que al pensarse que la región de los aa 89-102 está dentro, podría estarse pasando por alto una región candidata a epítope B o T que pueda ayudar al control de la enfermedad.

Uno de los aspectos más importantes en el presente estudio fue la identificación y selección de los posibles epítomos candidatos predichos por programas bioinformáticos, se sabe que el uso de estas herramientas puede lograr una adecuada selección de epítomos *in silico* y contribuir al diseño de vacunas basadas en epítomos usando estas herramientas (Soria-Guerra, Nieto-Gomez *et al.*, 2015). Para la selección de epítomos de la proteína GP5 se excluían los dominios transmembranales, las secuencias del péptido señal y se buscaba elegir zonas altamente conservadas. Welner y colab. (2017) consideran que durante el desarrollo de una vacuna basada en epítomos se deben de considerar tres puntos esenciales. El primero de ellos es la elección de epítomos conservados para garantizar el más alto grado de cobertura de patógenos y excluir los epítomos que son prescindibles para el patógeno (Soria-Guerra, Nieto-Gomez *et al.*, 2015; Welner, Nielsen *et al.*, 2017). Un total de 66 epítomos con una longitud aproximada de 12 aa fueron identificados y seleccionados de la proteína GP5, además de la conservación se tomaron en cuenta otros puntos como fue (i) más de tres programas debía predecir la secuencia como epítomo (ii) el score arrojado por el programa debía de ser mayor al 0.7 (iii) los análisis tipo BLAST de la secuencia debían arrojar resultados en donde la secuencia se identificara en un 100% con secuencias de la misma proteína y las secuencias arrojadas de proteínas de cerdo no debían coincidir en más de tres aminoácidos en la secuencia del epítomo. Al final del análisis exhaustivo solo cuatro epítomos cumplieron las características mencionadas. Estos epítomos tienen un grado de

conservación \geq al 95%, con lo que se cumple lo descrito por el autor *Welner et al.*, 2017 en utilizar epítomos altamente conservados. Considerando que la proteína los ha conservado por más de 24 años, sugiere su utilidad en la proteína, ya sea para un plegamiento adecuado o podría tener una función de unión.

Los análisis tipo BLAST, muchas de las veces no son considerados en otros trabajos, pero son de suma importancia, en el caso de los BLAST de la proteína de estudio, el obtener resultados en donde la secuencia se alinee con secuencias de otros patógenos, puede comprometer la especificidad de la respuesta inmune y en el caso del BLAST de proteínas de cerdo, el que la secuencia del epítomo se identifique con más de tres aa seguidos con alguna proteína de cerdo, puede generar una reacción cruzada de la respuesta inmune.

Las herramientas bioinformáticas integradas en este estudio, tiene el objetivo de identificar epítomos B que produzcan una respuesta humoral y aunque los otros dos puntos (diversidad de genotipo e inmunogenicidad) no fueron comprobados en este estudio, la capacidad de que los epítomos son antigénicos y son reconocidos por anticuerpos específicos, si fue comprobado.

Los ensayos de ELISA mostraron que los cuatro péptidos epítomicos son antigénicos al igual que lo muestra el análisis de Protean, y son reconocidos por anticuerpos inducidos por la infección, comprobando que son epítomos B como se predijo por los programas bioinformáticos. Además, los ensayos demostraron ser capaces de detectar mayor número de muestras con anticuerpos dirigidos hacia cada uno de los epítomos en comparación con el kit de ELISA-UNAM. El epítomo 1 detectó mayor número de positivos con 62/100 sueros, posteriormente el epítomo 3 con 60/100

sueros, el epítipo 40 con 54/100 sueros, solo uno arriba del 35 que detectó 53/100 sueros. El hecho de que detectan mayor número de muestras positivas se puede deber a que el kit ELISA-UNAM utiliza una cepa de campo de virus completo, ampliando la unión de anticuerpos hacia diferentes proteínas del virus, en comparación con solo utilizar un epítipo de una proteína que es la más abundante. Esto sugiere que, el poner un virus completo en una prueba serológica solo dejará presente cada uno de los epítipos propuestos en este estudio una sola vez, en comparación con ponerlo muchas veces en el ensayo. Estamos seguros de que estos epítipos propuestos son antigénicos y despiertan una respuesta inmune en el huésped, aunque se necesita más investigación antes de poder ser candidatos ideales a utilizar en una vacuna, como el saber si son inmunogénicos, si producen anticuerpos neutralizantes, entre otros, pero con las pruebas de ELISA y los resultados obtenidos estamos seguros de que estos epítipos deben ser considerados para su uso en diagnóstico o la generación de una vacuna contra la enfermedad de PRRS en México.

Desde hace tiempo se sabe que la vacuna comercial de virus activo atenuado (MLV) disponible en México no protege contra la infección y esto pudo verse en el análisis de los sueros positivos anticuerpos de campo y de vacuna en donde la mayor parte de los sueros vacunales resultaban negativos y la mayor parte de los sueros de campo resultaban positivos en todos los epítipos propuestos, con lo que se suma mayor evidencia de que estos epítipos son antigénicos y mejor aún, son antigénicos en virus de campo que en su mayoría son los que infectan al hato productor, como lo evidencia Martínez-Bautista *et al.* 2018.

La vacuna dirigida por epítomos es un concepto atractivo que se está persiguiendo con éxito en un gran número de grupos de investigación, especialmente para el desarrollo de vacunas dirigidas a epítomos conservados en patógenos variables o que mutan rápidamente como es el caso del Betaarterivirus suid 2 que se caracteriza por tener un alto grado de diversidad genética y antigénica, lo que ha impedido el desarrollo de vacunas efectivas y de amplia cobertura utilizando métodos tradicionales. La rápida aparición de este patógeno viral subraya la necesidad de procesos mejorados y acelerados para desarrollar y producir vacunas, una necesidad que puede abordarse mediante los métodos descritos anteriormente, lo que permite un enfoque rápido y basado *in silico* para formular vacunas candidatas (Soria-Guerra, Nieto-Gomez *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Por medio de herramientas bioinformáticas se lograron identificar cuatro epítomos conservados de la proteína GP5 de Betaarterivirus Suid 2. Los cuales son antigénicos ya que son capaces de reconocer anticuerpos específicos generados por virus heterólogos en una gran variedad de sueros de cerdos pertenecientes a los Estados más productores del país.

REFERENCIAS

- Abyntek. (2018). CÓMO RECONSTITUIR PÉPTIDOS LIOFILIZADOS. Retrieved May 17, 2018, from <http://www.abynetek.com/reconstituir-peptidos-liofilizados/>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., ... Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*, *162*(8), 2505–2538. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>
- Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on Virus Infectivity , Antigenicity , and Ability To Induce Neutralizing Antibodies Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory. *Journal of Virology*, *80*(8), 3994–4004. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3994>
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., ... Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
- Butler, J. E., Lager, K. M., Golde, W., Faaberg, K. S., ... Zhang, Y. I. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An immune dysregulatory pandemic. *Immunologic Research*, *59*(1–3), 81–108. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5>
- Chen, C., Li, J., Bi, Y., Yang, L., ... Liu, W. (2013). Synthetic B- and T-cell epitope peptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with Gp96 as adjuvant induced humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, *31*(14), 1838–1847. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.049>
- DNASTAR. (2018). Protean 3D. Retrieved from <https://www.dnastar.com/manuals/protean3d>
- Dobson, L., Reményi, I., & Tusnády, G. E. (2015). CCTOP: A Consensus Constrained TOPOlogy prediction web server. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W408–W412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Research*, *154*(1–2), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>

- Du, T., Nan, Y., Xiao, S., & Zhao, Q. (2017). Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends in Microbiology*, 25(12), 968–979.
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *Journal of Molecular Recognition*, 21(4), 243–255. <https://doi.org/10.1002/jmr.893>
- Faaberg, K. S., Hocker, J. D., Erdman, M. M., Harris, H. D. L., ... Plagemann, P. G. W. (2006). Neutralizing Antibody Responses of Pigs Infected with natural GP5 N-glycan mutants of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *VIRAL IMMUNOLOGY*, 19(2), 294–304.
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39, 29–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>
- Garcia Plata, M. (2016). *DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN CONTRA DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Goyal Sagar, M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*, 5, 656–664.
- Harding, J. C. S., Ladinig, A., Novakovic, P., Detmer, S. E., ... Plastow, G. S. (2017). Novel insights into host responses and reproductive pathophysiology of porcine reproductive and respiratory syndrome caused by PRRSV-2. *Veterinary Microbiology*, 209, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.019>
- Herrera Martín del Campo, J. A. (2012). Impacto Economico de la nefermedad de PRRS en granjas porcinas. In Simposio Internacional de PRRS (Ed.). México.
- Hofmann, K., & Stoffel, W. (1993). TMbase: A Database of Membrane Spanning Protein Segments. *Biological Chemistry*, 374, 166. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1993.374.1-6.143>
- Hornbeck, P. V. (2015). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current Protocols in Immunology*, 2015(August), 2.1.1-2.1.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
- Hurd, H. S., Bush, E. J., Losinger, W., Corso, B., ... Burkgren, T. (2001). Outbreaks of porcine reproductive failure: Report on a collaborative field investigation. *J Swine Health Prod*, 9(3), 103–108.

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2016). No Title. Retrieved December 12, 2017, from <https://talk.ictvonline.org/>
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., ... Krogh, A. (2017). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, *1611*(8), 59–73. <https://doi.org/10.1110/ps.0303703.Biosynthesis>
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL.2), 429–432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>
- Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, *479–480*, 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>
- King, A. M. Q., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adams, M. J., ... Knowles, N. J. (2018). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Archives of Virology*, *163*(9), 2601–2631. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>
- Kolaskar, a S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic deteterminants on protein antigens. *Febbs Letters*, *276*(1,2), 172–174.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Larsen, J. E. P., Lund, O., & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, *2*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>
- Letunic, I., & Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D493–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>
- Li, Y., Wang, X., Jiang, P., Wang, X., ... Wang, K. (2009). Genetic variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 2002 to 2007 based on ORF5. *Veterinary Microbiology*, *138*(1–2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.001>

- López-Heydeck, S. M., Alonso-Morales, R. A., Mendieta-Zerón, H., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS): Revisión TT - Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6(1), 69–89. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242015000100005&lang=pt%5Cnhttp://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v6n1/v6n1a5.pdf
- Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>
- Macías, M. J., Yépiz-Plascencia, G., Osorio, F., Pinelli-Saavedra, A., & Reyes-Leyva, Julio; Hernández, J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet. Méx.*, 37(9), 197–208. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Martínez-Bautista, N. R., Sciotto-Conde, E., Cervantes-Torres, J., Segura-Velázquez, R., ... Sanchez-Betancourt, J. I. (2018). Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México. *Transboundary and Emerging Diseases*, (July 2017), 1–16. <https://doi.org/10.1111/tbed.12831>
- Meulenberg, J. J. M. M. (2000). Review article PRRSV , the virus, 31, 11–21.
- Morilla, A. (2003). Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. In *Ciencias Veterinarias* (pp. 197–227).
- Nielsen, H. (2017). Protein Function Prediction. In *Protein Function Prediction: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1611, pp. 59–73). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5>
- OIE. (2014). DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS. In *DIRECTRIZ SOBRE VALIDACION 3.6.1.* (pp. 1–15).
- Ostrowski, M., Galeota, J. a, Jar, a M., Platt, K. B., ... Lopez, O. J. (2002). Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP. *Journal of Virology*, 76(9), 4241–4250. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4241>

- Piron, R., De Koker, S., De Paepe, a, Goossens, J., ... Depicker, a. (2014). Boosting in planta production of antigens derived from the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and subsequent evaluation of their immunogenicity. *PLoS One*, 9(3), e91386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091386>
- Plagemann, P. G. W. (2004). The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(3), 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.011>
- Popescu, L. N., Tribble, B. R., Chen, N., & Rowland, R. R. R. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology*, 209(May), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>
- Prather, R. S., Rowland, R. R. R., Ewen, C., Tribble, B., ... Green, J. A. (2013). An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, 87(17), 9538–9546. <https://doi.org/10.1128/JVI.00177-13>
- Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M., Nelson, E. a, ... Benfield, D. a. (1995). Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infection in Gnotobiotic Pigs. *Veterinary Pathology*, 32(4), 361–373. <https://doi.org/10.1177/030098589503200404>
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2004). BcePred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *Artificial Immune Systems: Third International Conference, ICARIS 2004, Catania Sicily, Italy, September 13-16, 2004 Proceedings*, 197–204. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30220-9_16
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. *Proteins*, 65(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). Producción Ganadera. Retrieved from http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecConcentrado.jsp
- Shi, M., Tsan-Yuk Lam, T., Hon, C.-C., Kin-Hei Hui, R., ... Chi-Ching Leung, F. (2010).

- Molecular epidemiology of PRRSV : A phylogenetic perspective. *Virus Research*, 154(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014>
- Snijder, E. J., Kikkert, M., & Fang, Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of General Virology*, 94(PART10), 2141–2163. <https://doi.org/10.1099/vir.0.056341-0>
- Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
- Van Breedam, W., Delputte, P. L., Van Gorp, H., Misingo, G., ... Nauwynck, H. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91(7), 1659–1667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.020503-0>
- Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
- Veit, M., Matczuk, K. A., Chandrasekhar, B., Krause, E., & Thaa, B. (2014). Membrane proteins of arterivirus particles : Structure , topology , processing and function. *Virus Research*, 194, 16–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.010>
- Wang, X., Qui, L., Dang, Y., Xiao, S., ... Yang, Z. (2014). Linear epitope recognition antibodies strongly respond to the C-terminal domain of HP-PRRSV GP5. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 565–569. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.004>
- Welch, S. K. W., & Calvert, J. G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Research*, 154(1–2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.018>
- Welner, S., Nielsen, M., Rasmussen, M., Buus, S., ... Larsen, L. E. (2017). Prediction and in vitro verification of potential CTL epitopes conserved among PRRSV-2 strains. *Immunogenetics*, 69(10), 689–702. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1004-8>
- Yan Sun, Mingyuan Han, Chiyong Kim, Jay G. Calvert, and D. Y. (2012). Interplay between Interferon-Mediated Innate Immunity and Porcine Reproductive and

Respiratory Syndrome Virus. *Viruses*, 4, 424–446.
<https://doi.org/10.3390/v4040424>

- Yu, X., Chen, N., Wang, L., Wu, J., ... Tian, K. (2012). New genomic characteristics of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses do not lead to significant changes in pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 158(3–4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.036>
- Yun, S.-I., & Lee, Y.-M. (2013). Overview: Replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Microbiology*, 51(6), 711–723. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3431-z>
- Zhang, Q., & Yoo, D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 177(3–4), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.002>
- Zhang, W. J., Lin, Y., Bai, Y., Tong, T. G., ... Wu, D. L. (2011). Identification of CD8(+) cytotoxic T lymphocyte epitopes from porcine reproductive and respiratory syndrome virus matrix protein in BALB/c mice. *Viral J*, 8(1), 263. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-263>
- Zhang, Y. Z., & Shen, H. Bin. (2017). Signal-3L 2.0: A Hierarchical Mixture Model for Enhancing Protein Signal Peptide Prediction by Incorporating Residue-Domain Cross-Level Features. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(4), 988–999. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00484>
- Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, G. W. (2012). PRRSV. In G. W. Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso (Ed.), *Diseases of Swine* (pp. 461–486). John Wiley and Sons, Inc.
- Zimmerman, J. (2003). Historical overview of PRRS virus. *PRRS Compendium*, 1–7.

ANEXO 1: SOLUCIONES.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS 1x)

- 100mL PBS al 10x
- 900mL agua bidestilada
- Llevarlo a un Ph 7.2-7.4

PBS Tween 0.05%

- 1L PBS al 1x
- 500µL de Tween 20R

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS/ LECHE DESLACTOSADA al 5%

- 1L de PBS-tween 0.05%
- 50gr (5%) de Leche deslactosada
- Mantener a 4 °C

BUFFER DE CARBONATOS

- 1L de agua milliQ
- 3.8gr de NaHCO₃
- 1.92gr Na₂CO₃
- Llevar a Ph 9.6
- Filtrar y guardar a 4 °C

ANEXO 2. CUADROS

Cuadro 7: SECUENCIAS DE GP5 DE BETAARTERIVIRUS SUID 2 OBTENIDAS DEL GENBANK

No.	NOMBRE	GenBank	Protein	ORIGEN	AÑO	AUTOR
1	VR-2332	U87392	ABU87666.1	USA	1992	Murtaugh,M.P.
2	A16MX14	KU844095.1	APD32903.1	MEX	2016	Sotomayor-González, A.
3	A4MX14	KU844094.1	APD32902.1	MEX	2014	Sotomayor-González, A.
4	G2MX14	KU844097.1	APD32902.1	MEX	2014	Sotomayor-González, A.
5	VACMX14	KU844096.1	APD32904.1	MEX	2014	Sotomayor-González, A.
6	CIAD001	DQ250069.1	ABB54498.1	SON/MEX	2002	Hernández, J.
7	CIAD002	DQ250073.1	ABB54502.1	SON/MEX	2003	Hernández, J.
8	CIAD003	DQ250075.1	ABB54504.1	SON/MEX	2003	Hernández, J.
9	CIAD004	DQ250074.1	ABB54503.1	SON/MEX	2003	Hernández, J.
10	CIAD005	DQ250078.1	ABB54507.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
11	CIAD006	DQ250076.1	ABB54505.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
12	CIAD007	DQ250077.1	ABB54506.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
13	CIAD008	DQ250071.1	ABB54500.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
14	CIAD009	DQ250070.1	ABB54499.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
15	CIAD010	DQ250080.1	ABB54509.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.

16	CIAD011	DQ250081.1	ABB54510.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
17	ciad012	DQ250082.1	ABB54511.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
18	CIAD013	DQ250072.1	ABB54501.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
19	CIAD014	DQ250079.1	ABB54508.1	SON/MEX	2003	Hernández, J.
20	CIAD015	DQ250083.1	ABB54512.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
21	CIAD016	DQ250084.1	ABB54513.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
22	ciad017	GQ468670.1	ACX71341.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
23	ciad018	GQ468671.1	ACX71342.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
24	ciad019	GQ468672.1	ACX71343.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
25	ciad020	GQ468673.1	ACX71344.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
26	ciad021	GQ468674.1	ACX71345.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
27	ciad022	GQ468675.1	ACX71346.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
28	ciad023	GQ468676.1	ACX71347.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
29	ciad024	GQ468677.1	ACX71348.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
30	ciad025	GQ468678.1	ACX71349.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
31	ciad027	GQ468679.1	ACX71350.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
32	ciad028	GQ468680.1	ACX71351.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
33	ciad029	GQ468681.1	ACX71352.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
34	ciad030	GQ468682.1	ACX71353.1	SON/MEX	2004	Hernández, J.
35	ciad031	GQ468683.1	ACX71354.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
36	ciad032	GQ468684.1	ACX71355.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
37	ciad033	GQ468685.1	ACX71356.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.

38	ciad034	GQ468686.1	ACX71357.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
39	ciad035	GQ468687.1	ACX71358.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
40	ciad036	GQ468688.1	ACX71359.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
41	ciad037	GQ468689.1	ACX71360.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
42	ciad038	GQ468690.1	ACX71361.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
43	ciad039	GQ468691.1	ACX71362.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
44	ciad040	GQ468692.1	ACX71363.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
45	ciad041	GQ468693.1	ACX71364.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
46	ciad042	GQ468694.1	ACX71365.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
47	ciad043	GQ468695.1	ACX71366.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
48	ciad044	GQ468696.1	ACX71367.1	SON/MEX	2005	Hernández, J.
49	CIAD045	GQ468697.1	ACX71368.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
50	ciad046	GQ468698.1	ACX71369.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
51	ciad047	GQ468699.1	ACX71370.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
52	CIAD048	GQ468700.1	ACX71371.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
53	CIAD049	GQ468701.1	ACX71372.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
54	CIAD050	GQ468702.1	ACX71373.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
55	CIAD051	GQ468703.1	ACX71374.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
56	CIAD052	GQ468704.1	ACX71375.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
57	CIAD053	GQ468705.1	ACX71376.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
58	CIAD054	GQ468706.1	ACX71377.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
59	CIAD056	GQ468708.1	ACX71378.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.

60	CIAD057	GQ468709.1	ACX71379.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
61	CIAD058	GQ468710.1	ACX71380.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
62	CIAD060	GQ468711.1	ACX71381.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
63	CIAD061	GQ468712.1	ACX71382.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
64	ciad064	GQ468713.1	ACX71383.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
65	ciad065	GQ468714.1	ACX71384.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
66	ciad066	GQ468715.1	ACX71385.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
67	ciad068	GQ468716.1	ACX71386.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
68	ciad069	GQ468717.1	ACX71387.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
69	ciad070	GQ468718.1	ACX71388.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
70	ciad071	GQ468719.1	ACX71389.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
71	ciad072	GQ468720.1	ACX71390.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
72	ciad073	GQ468721.1	ACX71391.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
73	ciad074	GQ468722.1	ACX71392.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
74	ciad075	GQ468723.1	ACX71393.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
75	ciad076	GQ468724.1	ACX71394.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
76	ciad077	GQ468725.1	ACX71395.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
77	ciad078	GQ468726.1	ACX71396.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
78	ciad079	GQ468727.1	ACX71397.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
79	ciad080	GQ468728.1	ACX71398.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
80	ciad081	GQ468729.1	ACX71399.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
81	ciad083	GQ468730.1	ACX71400.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.

82	ciad084	GQ468731.1	ACX71401.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
83	ciad085	GQ468732.1	ACX71402.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
84	ciad086	GQ468733.1	ACX71403.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
85	ciad087	GQ468734.1	ACX71404.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
86	ciad088	GQ468735.1	ACX71405.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
87	ciad089	GQ468736.1	ACX71406.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
88	ciad090	GQ468737.1	ACX71407.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
89	Ciad092	GQ468738.1	ACX71408.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
90	ciad093	GQ468739.1	ACX71409.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
91	ciad094	GQ468740.1	ACX71410.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
92	ciad095	GQ468741.1	ACX71411.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
93	CIAD096	GQ468742.1	ACX71412.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
94	ciad097	GQ468743.1	ACX71413.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
95	ciad099	GQ468744.1	ACX71414.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
96	ciad100	GQ468745.1	ACX71415.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
97	ciad101	GQ468746.1	ACX71416.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
98	ciad102	GQ468747.1	ACX71417.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
99	ciad103	GQ468748.1	ACX71418.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
100	ciad104	GQ468749.1	ACX71419.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
101	ciad105	GQ468750.1	ACX71420.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
102	ciad106	GQ468751.1	ACX71421.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
103	ciad107	GQ468752.1	ACX71422.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.

104	ciad108	GQ468753.1	ACX71423.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
105	ciad111	GQ468754.1	ACX71424.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
106	ciad112	GQ468755.1	ACX71425.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
107	ciad113	GQ468756.1	ACX71426.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
108	ciad114	GQ468757.1	ACX71427.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
109	ciad116	GQ468758.1	ACX71428.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
110	ciad117	GQ468759.1	ACX71429.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
111	ciad119	GQ468760.1	ACX71430.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
112	ciad121	GQ468761.1	ACX71431.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
113	ciad122	GQ468762.1	ACX71432.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
114	ciad124	GQ468763.1	ACX71433.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
115	ciad132	GQ468764.1	ACX71434.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
116	ciad133	GQ468765.1	ACX71435.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
117	ciad134	GQ468766.1	ACX71436.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
118	ciad140	GQ468767.1	ACX71437.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
119	ciad141	GQ468768.1	ACX71438.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
120	ciad179	GQ468769.1	ACX71439.1	SON/MEX	2006	Hernández, J.
121	ciad180	GQ468770.1	ACX71440.1	SON/MEX	2008	Hernández, J.
122	ciad182	GQ468771.1	ACX71441.1	SON/MEX	2008	Hernández, J.
123	ciad183	GQ468772.1	ACX71442.1	SON/MEX	2008	Hernández, J.
124	ciad187	GQ468773.1	ACX71443.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
125	ciad188	GQ468774.1	ACX71444.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.

126	CIAD369	KF444474.1	AGX26612.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
127	CIAD370	KF444475.1	AGX26613.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
128	CIAD371	KF444476.1	AGX26614.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
129	CIAD386	KF444477.1	AGX26615.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
130	CIAD388	KF444478.1	AGX26616.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
131	CIAD389	KF444479.1	AGX26617.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
132	CIAD390	KF444480.1	AGX26618.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
133	CIAD391	KF444481.1	AGX26619.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
134	CIAD392	KF444482.1	AGX26620.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
135	CIAD394	KF444483.1	AGX26621.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
136	CIAD399	KF444484.1	AGX26622.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
137	CIAD402	KF444485.1	AGX26623.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
138	CIAD405	KF444486.1	AGX26624.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
139	CIAD412	KF444487.1	AGX26625.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
140	CIAD413	KF444488.1	AGX26626.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
141	CIAD416	KF444489.1	AGX26627.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
142	CIAD417	KF444490.1	AGX26628.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
143	CIAD419	KF444491.1	AGX26629.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
144	CIAD420	KF444492.1	AGX26630.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
145	CIAD423	KF444493.1	AGX26631.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
146	CIAD424	KF444494.1	AGX26632.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
147	CIAD425	KF444495.1	AGX26633.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.

148	CIAD426	KF444496.1	AGX26634.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
149	CIAD427	KF444497.1	AGX26635.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
150	CIAD428	KF444498.1	AGX26636.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
151	CIAD429	KF444499.1	AGX26637.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
152	CIAD430	KF444500.1	AGX26638.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
153	CIAD432	KF444501.1	AGX26639.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
154	CIAD434	KJ769642.1	AIH04806.1	SON/MEX	2010	Hernández, J.
155	CIAD436	KF444502.1	AGX26640.1	SON/MEX	2013	Hernández, J.
156	CIAD446	KF444503.1	AGX26641.1	SON/MEX	2013	Hernández, J.
157	CIAD447	KF444504.1	AGX26642.1	SON/MEX	2009	Hernández, J.
158	DMZC01/2015	MF279256.1	AVL27332.1	VER, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
159	DMZC02/2015	MF279257.1	AVL27333.1	VER, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
160	DMZC03/2015	MF279258.1	AVL27334.1	VER, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
161	DMZC04/2015	MF279259.1	AVL27335.1	VER, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
162	DMZC05/2015	MF279260.1	AVL27336.1	VER, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
163	DMZC06/2015	MF279261.1	AVL27337.1	PUE, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
164	DMZC07/2015	MF279262.1	AVL27338.1	PUE, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.

165	DMZC08/2015	MF279263.1	AVL27339.1	PUE, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
166	DMZC144/2016	MF279265.1	AVL27341.1	JAL, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
167	DMZC181/2015	MF279253.1	AVL27329.1	JAL, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
168	DMZC205/2015	MF279254.1	AVL27330.1	JAL, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
169	DMZC217/2015	MF279255.1	AVL27331.1	PUE, MEX	2015	Martinez-Bautista,N.R.
170	DMZC43/2016	MF279264.1	AVL27340.1	GTO, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
171	DMZCIN27-1/2016	MF279266.1	AVL27342.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
172	DMZCIN27-2/2016	MF279267.1	AVL27343.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
173	DMZCIN27-3/2016	MF279268.1	AVL27344.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
174	DMZCIN27-4/2016	MF279269.1	AVL27345.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
175	DMZCIN27-5/2016	MF279270.1	AVL27346.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
176	DMZCIN27-6/2016	MF279271.1	AVL27347.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
177	DMZCIN27-7/2016	MF279272.1	AVL27348.1	VER, MEX	2016	Martinez-Bautista,N.R.
178	variant1 gene	KP245832.1	AKE07598.1	MEX	2015	Toiber,A.L.

179	variant2 gene	KP245833.1	AKE07599.1	MEX	2015	Toiber,A.L.
180	variant3 gene	KP245834.1	AKE07600.1	MEX	2015	Toiber,A.L.
181	variant4 gene	KP245835.1	AKE07601.1	MEX	2015	Toiber,A.L.
182	variant5 gene	KP245836.1	AKE07602.1	MEX	2015	Toiber,A.L.
183	variant6 gene	KP245837.1	AKE07603.1	MEX	2015	Toiber,A.L.

Cuadro 8: DATOS OBTENIDOS EN LA PREDICCIÓN DEL PÉPTIDO SEÑAL Y PUNTO DE CORTE PARA CADA SECUENCIA

CEPA	LipoP 1.0	SignalP 4.1	SMART	SIGNAL 3L	HMMER	PUNTO DE CORTE
VR2332	31-32	32	1----31	31	NO	31
PRRSv/1	26-27	32	no	NO	31	31
PRRSv/2	26-27	27	1----26	26	NO	26
	31-32			31		
PRRSv/3	29-30	32	1----26	26	31	26
	26-27			31		
	31-32					
PRRSv/4	25-26	35	no	34	NO	34
	29-30					
PRRSv/5	25-26	35	no	34	22	34
	29-30					
PRRSv/6	29-30	30	1---29	29	29	29

PRRSv/7	25-26	35	no	34	NO	34
PRRSv/8	25-26	35	no	34	22	34
PRRSv/9	31-32	32	1----31	31	31	31
PRRSv/10	no tiene	32	1----31	31	NO	31
PRRSv/11	29-30	32	1----31	33	NO	31
PRRSv/12	26-27	32	1----31	31	31	31
PRRSv/13	31-32	32	1----31	31	NO	31
PRRSv/14	29-30	30	1----29	29	29	29
PRRSv/15	25-26	35	1----26	34	NO	26
	29-30					
PRRSv/16	25-26	35	no	34	NO	34
	29-30					
PRRSv/17	18-19	35	1---34	34	NO	34
PRRSv/18	25-26	35	1---31	34	NO	31
	26-27					
	29-30					
PRRSv/19	25-26	35	no	34	NO	34
PRRSv/20	25-26	35	1---31	34	NO	31
	26-27					
	29-30					

Cuadro 9: DATOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS TRANSMEMBRANALES

CEPA	SMART	HMMER	TMHMM	REGIÓN TRANSMEMBRANAL
VR2332	35---42	75-94	35-57	35-57
	72---94		72-94	72-94
PRRSv/1	35-57	75-96	35-57	35-57
	72-94		72-94	72-94
PRRSv/2	40-62		40-62	40-62
	82-101	80-101	82-101	82-101
PRRSv/3	40-62		40-62	40-62
	77-99	80-99	77-99	77-99
PRRSv/4	34-56		34-56	34-56
	71-93	74-95	71-93	71-93
PRRSv/5	34-56	74-95	34-56	34-56
	71-93		71-93	71-93
PRRSv/6	39-61	79-100	39-61	39-61
	76-98		76-98	76-98
PRRSv/7	34-56	74-95	34-56	34-56
PRRSv/8	34-56	74-95	34-56	34-56
	71-93		71-93	71-93
PRRSv/9	35-57	76-96	35-57	35-57
	77-96		77-96	77-96

PRRSv/10	35-57	36-56	35-57	35-57
	72-94	76-96	72-94	72-94
PRRSv/11	35-57	75-96	35-57	35-57
	72-94		72-94	72-94
PRRSv/12	35-57	31-51	35-57	35-57
	72-94	71-94	72-94	72-94
PRRSv/13	36-58	76-97	36-58	36-58
	73-95		73-95	73-95
PRRSv/14	39-61	79-100	39-61	39-61
	76-98		76-98	76-98
PRRSv/15	42-64	82-103	42-64	42-64
	84-103		84-103	84-103
PRRSv/16	34-56	74-95	34-56	34-56
	71-93		71-93	71-93
PRRSv/17	34-56	74-95	34-56	34-56
	71-93		71-93	71-93
PRRSv/18	37-59	77-98	37-59	37-59
	74-96		74-96	74-96
PRRSv/19	34-56	74-95	34-56	34-56
	71-93		71-93	71-93
PRRSv/20	37-59	77-98	37-59	37-59
	74-96		74-96	74-96

