



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA BASADA EN EPÍTOPOS DE LA
PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y
RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)

TESIS

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

PRESENTA:
NAYELI MEDINA HERRERA

TUTOR PRINCIPAL:
JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACUTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR:
RENÉ ÁLVARO SEGURA VELAZQUEZ
FACUTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SERGIO ROSALES MENDOZA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



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.

DEDICATORIA

A mis amados padres, quienes me han dado su amor y apoyo sin condiciones, los que desde pequeña me animaban a participar en concursos, quienes pagaban entrada para ver mis shows, que disfrutaban ver como ponía mi alberca y me preparaba mi limonada con rodaja, quienes me dejaban tener cuanto mascota se me ocurría porque desde pequeña supe que quería ser veterinaria, aquellos que aguantaban 10 horas por verme bailar solo 1. Gracias por siempre creer en mí, por abrazarme y limpiar mis lágrimas, por reír conmigo, por darnos siempre lo mejor. Gracias por siempre alentarme a cumplir mis sueños. Los amo papás.

A mi hermano Fede, quién siempre tiene algo para hacerme reír. Que siempre me apapacha y nunca me juzga.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt, gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted e incluirme en el grupo de investigación, por escucharme y brindarme su apoyo aun para cosas que no tenían nada que ver con la maestría. Ha sido un gran ejemplo para mí y estoy muy feliz de poder decir que el Dr. Iván fue mi tutor de maestría, un gran guía, un gran maestro, un gran ser humano.

Dr. René Álvaro Segura Velázquez, gracias por todo su apoyo para el desarrollo de este trabajo, por haberme puesto en contacto con el Dr. Sergio Rosales para llevar a cabo mi estancia en San Luis Potosí. Como usted lo predijo, regresé más capaz, no solo en la parte académica o profesional, sino también en lo personal.

Dr. Sergio Rosales Mendoza, por aceptarme en su laboratorio en San Luis Potosí, por brindarme todo lo necesario para el desarrollo del proyecto, por su paciencia cuando no entendía algún concepto. La estancia que realicé con usted me enseñó muchísimo y la llevo en mi corazón.

Dra. Dania O. Govea Alonso, gracias por todas tus enseñanzas, paciencia y dedicación. Llevar tus proyectos y además estar al pendiente de lo que requieren los demás no es cosa fácil. Toda mi admiración para ti, porque además de ser una excelente doctora, eres una super mamá. De no haber tenido tu apoyo, este proyecto no hubiera tenido éxito.

Dra. Jaqueline Cervantes Torres, por ser un gran ejemplo de dedicación y esfuerzo, por ayudarme con paciencia a resolver todas mis dudas.

Adrian Salomón Figueroa Castellanos, por cada risa, cada mirada y cada paso que damos juntos. Gracias por creer en mí, por brindarme tu apoyo incondicional. Tu fishie siempre (P.aérea).

Alejandra Wong-Arce, Andrea Narváez y Andrea Romero, gracias por todo su apoyo en la parte académica y personal, mi estancia fue más bonita gracias a ustedes.

Dra. Karla Ivon Solís Andrade, gracias por tu tiempo y todas las enseñanzas, por introducirme de una manera liviana al mundo de las microalgas y plantas.

Dra. María Josefina Contreras Luna, por tu apoyo y tus palabras de aliento en los momentos más difíciles. La maestría no es solo educación, es la posibilidad de encontrar a personas sorprendentes y tú eres una de ellas. Te quiero mucho Maryyyyyy.

Brenda Maya y Memo, gracias a ambos por sus sabios consejos, por su amistad tan bonita.

Al grupo de investigación del departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos, gracias por hacerme parte de ustedes y tener siempre un buen comentario o aportación para este trabajo.

A la Unidad de Investigación de la FMVZ, por todo el apoyo y consejos para este trabajo.

Al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB), por permitirme desarrollar este proyecto dentro de sus instalaciones.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme permitido ingresar al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca y la beca de movilidad nacional para el desarrollo de la estancia en San Luis Potosí.

RESUMEN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad viral de mayor impacto en la industria porcina a nivel mundial con pérdidas económicas de 640 millones de dólares por año debido al aumento en la mortalidad, disminución en la eficiencia reproductiva, presencia de enfermedades secundarias, así como al incremento en los costos de medicación, vacunación y diagnóstico.

Debido a la diversidad genética del virus que se traduce en una alta variación antigénica no ha sido posible el control y el desarrollo de vacunas efectivas. Actualmente, las vacunas comerciales, no protegen al 100% pero disminuyen los signos clínicos y la viremia, contra virus homólogos, pero no evitan la infección contra virus heterólogos.

En este estudio se diseñó la construcción genética LTB-PRRSV, la cual incluye la secuencia de 4 péptidos previamente identificados en la proteína GP5 del virus de PRRS (PRRSV), optimizada para el uso de codones en plantas. La construcción también incluye espaciadores de glicina y prolina, y como acarreador inmunogénico, la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB), que brindará un mayor tamaño molecular al antígeno de interés, incrementando su inmunogenicidad y funcionando como un adyuvante de mucosas. Con esta construcción se procedió a la transformación de la planta de tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, obteniendo callos, brotes y plantas resistentes al agente de selección, los cuales fueron analizados mediante PCR para comprobar el estado de transgénesis.

Palabras clave: LTB, PRRS, GP5, tabaco transgénico.

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is the viral disease with the greatest impact in swine industry worldwide with economic losses of 640 million dollars per year due to increase in mortality, decrease in reproductive efficiency, presence of secondary diseases, as well as an increase in medication costs, vaccination and diagnosis.

Due to genetic diversity of the virus and antigenic variation, it has not been possible to control and develop effective vaccines. Currently, commercial vaccines do not protect 100% but reduce clinical signs and viremia against homologous viruses, but do not prevent infection against heterologous viruses.

In this study, the genetic construction LTB-PRRSV was designed, it includes the sequence of 4 previously evaluated peptides of GP5 protein of the PRRS virus (PRRSV), optimized for the use of codons in plants. The construct also includes glycine and proline spacers, and as an immunogenic carrier, the B subunit of the heat labile toxin of *E. coli* (LTB), which will provide a larger molecular size to the antigen of interest, increasing its immunogenicity and functioning as an adjuvant of mucous membranes. With this construction, we proceeded to the transformation of tobacco mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, obtaining callus, shoots and plants resistant to selection agent, which were analyzed by PCR to verify transgenesis state.

Keywords: LTB, PRRSV, GP5, Transgenic tobacco

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
IMPACTO ECONÓMICO.....	1
AGENTE ETIOLÓGICO	2
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NSP) DEL PRRSV	3
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL PRRSV	4
REPLICACIÓN VIRAL	6
DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL PRRSV	10
RESPUESTA INMUNE	12
RESPUESTA INMUNE INNATA	13
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA	15
VACUNAS CONTRA EL PRRSV	17
VACUNAS ATENUADAS ó MLV	17
VACUNAS INACTIVADAS.....	19
VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN	19
ANTECEDENTES.....	22
TECNOLOGÍA RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFARMACÉUTICOS A GRAN ESCALA	23
TABACO COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN	25
GENERALIDADES DE LA PLANTA DE TABACO (<i>Nicotiana tabacum</i>)	25
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TABACO	26
VECTORES.....	27
ESTRATEGIAS PARA LA EXPRESIÓN EFICIENTE.....	28
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	30
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
DISEÑO Y SÍNTESIS DE LA QUIMERA CON LOS EPÍTOPOS DE LA GP5	34
PLÁSMIDOS	35
pBI-121	35
pUC57MultiPRRS	36
CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	37
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	38

CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV PARA TRANSFORMACIÓN NUCLEAR	39
DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	39
CLONACIÓN DEL INSERTO MULTIPRRS EN EL VECTOR BINARIO pBI-121	39
PCR.....	40
PERFIL DE RESTRICCIÓN.....	41
TRANSFORMACIÓN DE <i>A. TUMEFACIENS</i> CON LA CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV	41
PCR.....	42
OBTENCIÓN DE EXPLANTES	42
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DEL TABACO	42
OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	43
ANÁLISIS DE TRANSFORMANTES.....	43
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	43
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	43
PROTOCOLO DE PCR	44
RESULTADOS	44
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	44
CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV PARA TRANSFORMACIÓN NUCLEAR	45
DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	45
CLONACIÓN DEL INSERTO MULTIPRRS EN EL VECTOR BINARIO pBI-121	47
PCR.....	47
PERFIL DE RESTRICCIÓN.....	48
TRANSFORMACIÓN DE <i>A. TUMEFACIENS</i> CON LA CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV	48
PCR.....	49
OBTENCIÓN DE EXPLANTES	49
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DEL TABACO	50
OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	50
ANÁLISIS DE TRANSFORMANTES.....	51
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES	61
PROSPECTIVAS.....	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia del virus de PRRS	14
Tabla 2. Comparación de las características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las plantas propuestas como biorreactores	24
Tabla 3. Niveles de expresión en plantas transgénicas para diferentes antígenos de enfermedades animales	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del PRRSV	3
Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del PRRSV.	9
Figura 3. Respuesta inmune a la infección por el PRRSV	16
Figura 4. Transformación genética del tabaco mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .28	
Figura 7. Estructura de pUC57MultiPRRS.	37
Figura 8. Calidad del ADN plasmídico del vector pBI-121	45
Figura 9. Calidad del ADN plasmídico del vector pUC57MultiPRRS	45
Figura 10. Digestión del vector pBI-121 y pUC57 con las enzimas <i>Sma</i> I y <i>Sac</i> I.	46
Figura 11. Calidad de la purificación de banda.....	46
Figura 12. PCR para detección de clonas transformadas.	47
Figura 13. Perfil de restricción con <i>Hind</i> III y <i>Sac</i> I.	48
Figura 14. PCR para confirmar transformación de bacterias <i>A. tumefaciens</i>	49
Figura 15. Formación de brotes y callos de tabaco a partir de hojas infectadas con el plásmido binario LTB-PRRSV.....	50
Figura 16. Representación esquemática de la transformación del tabaco vía <i>A. tumefaciens</i> y regeneración de la planta mostrando el tiempo acumulado para llegar a cada una de las etapas.....	51
Figura 17. Detección por PCR de las plantas transgénicas portadoras del gen LTB-PRRSV.	52

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AD5	Adenovirus tipo 5
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
AN	Anticuerpos neutralizantes
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico genómico
ARNsg	Ácido ribonucleico segmentado
BA	Benciladenina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin de <i>Mycobacterium bovis</i>
BF	Biofarmacéuticos
DMZC	Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
DNTPS	Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
DPI	Días post infección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU	Europeo
EUA	Estados Unidos de América
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GP	Glicoproteína
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus
IFN	Interferones
LB	Medio Luria Bertani

LTA	Subunidad A tóxica
LTB	Subunidad B de la toxina termolábil de <i>E. coli</i>
M	Proteína de Matriz
PVDF	Membrana de fluoruro de polivideno
MG+	Ion magnesio
MLV	Vacunas de virus vivo modificado
MS	Medio de enraizamiento
μL	Microlitros
MVA	Virus modificado Vaccinia Ankara
NA	Norteamericano
NAHMS	National Animal Health Monitoring System
NK	Células Asesinas Naturales
NSP	Proteínas no estructurales
ONC	Oncogenes
ORF	Marcos de lectura abiertos
Pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Post-infección
PLÁSMIDO TI	Inductor de tumores
PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio porcino
PRRSV	Virus de PRRS
PRV	Virus de la pseudorrabia
PTS	Proteína Total Soluble,
REGIÓN VIR	Región de Virulencia

RMOP

Medio de Regeneración

T- ADN

ADN de transferencia inductor de tumores

UTR

Región corta no traducida (por sus siglas en inglés, untranslated region)

WT

Wild type

INTRODUCCIÓN

IMPACTO ECONÓMICO

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es una enfermedad que se caracteriza por falla reproductiva en hembras, neumonía en cerdos jóvenes y aumento en la mortalidad pre-destete. La enfermedad tiene una alta importancia económica debido a los efectos adversos graves sobre la producción porcina, provocando un aumento del 20 al 30% en la tasa de muerte fetal y en lechones (Goyal SM, 1993). Neumann (2012), reportó que las pérdidas anuales en EUA por PRRS se estimaban en 300 millones de dólares, es decir 52 y 2 dólares por hembra y cerdo destetado, respectivamente. En México, un estudio reveló que las pérdidas económicas ascienden a \$3,000 pesos por hembra al año (Amador G., 2016).

Un estudio acerca de las operaciones de producción de carne de cerdo realizado por el Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal de EUA (NAHMS, National Animal Health Monitoring System), concluyó que el PRRSV es el segundo causante de problemas de salud en el ámbito reproductivo, reportándose en el 21.4% de las granjas (Leaflet AS, 2005).

Por otra parte, en un estudio realizado en EUA por Neumann *et al.* (2005), se evaluó el impacto económico en piaras de pie de cría y crecimiento que fueron afectadas por esta enfermedad, tomando en cuenta la disminución en la salud reproductiva, aumento en la mortalidad, así como, la reducción en la tasa de crecimiento. Los resultados mostraron que el impacto económico anual de las pérdidas por PRRS en el cerdo se estima en 66.75 millones de dólares en pie de cría y 493.57 millones de dólares en las poblaciones de crecimiento y engorda de cerdos.

AGENTE ETIOLÓGICO

De acuerdo con la reciente clasificación por parte del Comité Internacional de Taxonomía de los virus (ICTV, por sus siglas en inglés de International Committee on Taxonomy of Viruses), el PRRSV pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Betaarterivirus* (ICTV, 2020).

Se trata de un virus envuelto con un genoma de ARN de cadena sencilla (figura 1), polaridad positiva de aproximadamente 15 Kb. Su genoma se compone en el extremo 5' de una región corta no traducida (UTR, por sus siglas en inglés de *untranslated region*) seguida de nueve marcos de lectura abiertos (ORF) llamados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7 (Moormann RJ, 1993).

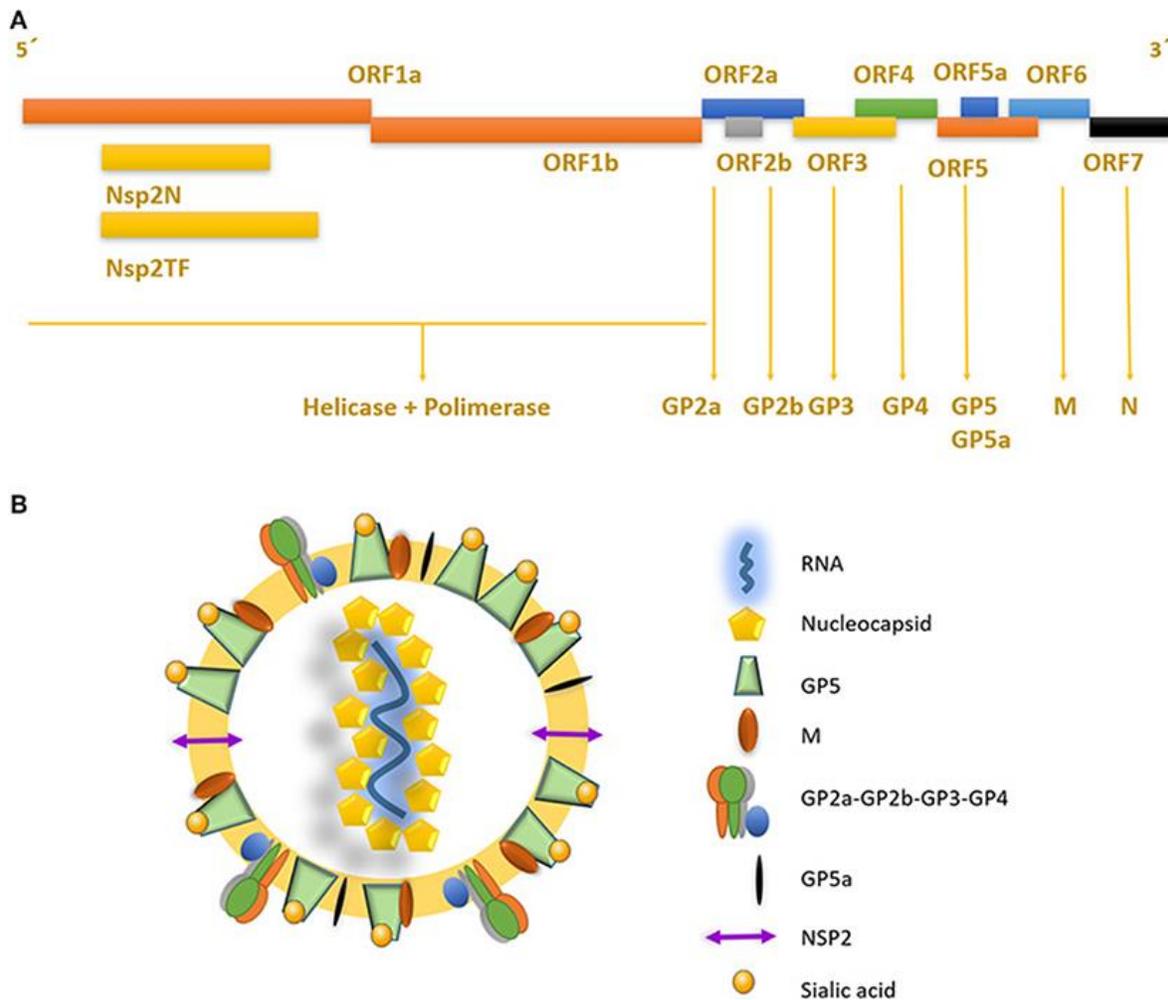


Figura 1. Representación esquemática del PRRSV, organización genómica (A) y estructura del virión (B). Tomado de Montaner-Tarbes, 2019.

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NSP) DEL PRRSV

Los ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente 75% del tamaño del genoma y codifican poliproteínas con diversas funciones, tales como, actividad de ARN polimerasa, forman parte de las proteínas NSP, participan en actividades proteolíticas que procesan otros productos de unión a NSP y en actividades durante la transcripción y replicación viral (Brown E, *et al.* 2009).

Cabe resaltar que algunos estudios muestran que la NSP2 presenta una región de alta variabilidad (en las posiciones de aminoácidos 324 a 814) solamente con 40%

de similitud de aminoácidos entre genotipos europeos y americanos, lo que representa el gen con la mayor tasa de variabilidad del PRRSV (Flores L, Hernández J., 2010). Por otra parte, NSP1, NSP4 y NSP11 se han relacionado con la inhibición de la producción de los interferones (IFN) de tipo I. En la infección por este virus, la IL-10 parece estar regulada positivamente en las células mononucleares de sangre periférica y en las células dendríticas; y su expresión podría estar inversamente relacionada con la respuesta del IFN- γ . Estos efectos inhibitorios se han relacionado con la capacidad del virus para evadir la respuesta inmune de los cerdos (Burgara *et al.*, 2013).

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL PRRSV

Los ORF 2a y 3 al 7 codifican para las glicoproteínas estructurales (GP) 2a, GP3, GP4, GP5 y las proteínas no glicosiladas 2b, la proteína M de membrana y la N de la nucleocápside, respectivamente. También en el extremo 3' del genoma hay una región no traducida seguida de una cola de poli A (Snijder EJ, Meulenberg JJ., 1998).

El ORF2 contiene un marco de lectura interno que codifica para una proteína no glicosilada conocida como 2b. Se ha identificado la presencia de esta proteína en células infectadas, así como una respuesta anti-2b en cerdos infectados con PRRSV (Wu, W. H., Fang, 2005). Recientemente se demostró que la proteína 2b es un componente estructural menor del PRRSV (Wu, W. H., Fang, 2005).

La GP3 es la proteína más glicosilada con siete sitios de N-glicosilación, ésta ha sido detectada en el virión de algunas cepas europeas; sin embargo, en cepas americanas su presencia aún se cuestiona (Mardassi, H. *et al.*, 1998; Gonin, P. *et al.*, 1998). Por su parte, la GP4 tiene cuatro sitios de N-glicosilación y se han identificado anticuerpos neutralizantes (AcN) anti- GP4; sin embargo, éstos son menos efectivos que los inducidos por GP5 (Weiland, E. *et al.*, 1999).

La glicoproteína 5 de envoltura (GP5) contiene 200 aminoácidos, y es la que adhiere el virus a los macrófagos y es un blanco importante para los AcN. Esta

proteína exhibe una variación genética muy marcada dentro de su secuencia relativamente corta de 600 pares de bases, por lo que es comúnmente utilizada para la identificación y la construcción de árboles filogenéticos (Shi M, 2010; Batista L. 2003). La variabilidad en GP5 podría estar asociada a la ineficiencia de una protección cruzada con el uso de vacunas (Lunney JK, 2010). Fue reportado el cambio de un solo nucleótido en el ectodominio de la proteína GP5 durante la infección de cerdos con la cepa VR2332 de PRRSV. Este hallazgo sugiere que la variabilidad genética en el ectodominio del ORF5 puede deberse a fuerzas de selección positivas o negativas, como la selección por anticuerpos u otras defensas del huésped (Meng XJ, 2000).

Esta glicoproteína se puede dividir en varios dominios: un péptido señal, un ectodominio (con un número variable de sitios potenciales de glicosilación), una región transmembranal y un endodominio (Balasuriya UB y MacLachlan NJ, 2004; Meulenbergg JJ, *et al.*,1995). En el ectodominio se han detectado dos epítopes que inducen la producción de anticuerpos, de los cuales sólo un tipo es neutralizante. Estos epítopes se denominan A y B (epítope B- neutralizante) (Ostrowski M, *et al.*, 2002). Este último es conservado entre los aislamientos de PRRS; sin embargo, no es inmunodominante, contrario al epítope A, el cual es inmunodominante e hipervariable. Estos epítopes se encuentran separados por siete aminoácidos. Los cerdos infectados con el PRRSV primeramente desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítope A y tiempo después (cuatro semanas aproximadamente) aparecen los AcN contra el epítope B. En tal contexto, el epítope A funciona como señuelo del virus, distraiendo de manera momentánea la respuesta neutralizante (Plagemann PG, 2004). Se ha observado que la GP5 forma heterodímeros con la proteína M en las partículas virales. Estos heterodímeros también se han relacionado con la infección celular por su unión a moléculas de heparán sulfato y sialoadesina, principalmente en macrófagos (Mardassi H, Massie B y Dea S, 1996).

Es importante resaltar que se ha demostrado que las cepas norteamericanas y europeas de PRRSV inducen apoptosis en células de riñón de mono susceptibles y

cultivos primarios de PAMs (Suárez P, *et al.*, 1996). *In vivo*, los estudios han demostrado que la apoptosis inducida por PRRSV ocurre en pulmones y tejidos linfoides (Sur JH, *et al.*, 1997), pero también en testículos donde el PRRSV es capaz de replicarse en macrófagos residentes, así como en células germinales, causando un abundante agotamiento de células germinales y muerte de células por apoptosis (Sur JH, Doster AR, Osorio FA, 1998). Se desconoce el mecanismo de la apoptosis inducida por el PRRSV en las células transeúntes, pero puede implicar la liberación local de citocinas apoptogénicas por los macrófagos infectados (Sur JH, Doster AR, Osorio FA, 1998).

El ORF 6 codifica para la proteína no glicosilada de matriz (M), es la proteína más conservada con 78-81 % de identidad de aminoácidos entre la cepa americana y la europea.

Por su parte, la proteína N codificada por el ORF7 constituye entre 20 - 40 % del contenido proteínico del virión. Esta proteína contiene 26% de residuos básicos en el extremo N terminal, lo cual puede facilitar su interacción con el ARN del genoma.

REPLICACIÓN VIRAL

Los virus pertenecientes a la familia de los arterivirus tienen en común la capacidad para inducir una viremia prolongada, infecciones persistentes y replicación en los macrófagos (Cho JG y Dee SA, 2006).

Para la replicación de todos los arterivirus, los macrófagos son la principal célula blanco mientras que para el aislamiento en cultivos celulares presentan una especificidad restringida en cuanto a la célula huésped. El PRRSV se replica en macrófagos alveolares, células de riñón de mono verde africano (MA-104) y en sus derivados (CL2621 o MARC 145) al ser líneas celulares permisivas a la replicación de este virus (Van Breedam W, *et al.*, 2010). No obstante, se ha reportado replicación del virus en otros macrófagos residentes del pulmón (macrófagos intersticiales e intravasculares), subpoblaciones de macrófagos de diferentes

órganos linfoides (tonsila, nódulos linfáticos y bazo), macrófagos intravasculares de la placenta, cordón umbilical y células dendríticas.

El PRRSV ingresa a las células huésped a través de la endocitosis mediada por clatrina (figura 2). El genoma viral se libera en el citosol después de la acidificación del endosoma y la fusión de la membrana (Nauwynck HJ, *et al.*, 1999).

La entrada viral mediada por el receptor se ha estudiado ampliamente (Welch SK, y Calvert JG, 2010) determinando que CD163 es el principal receptor que media la internalización viral y el desnudamiento. Mientras que la sialoadhesina (CD169) puede servir como receptor para mediar la internalización viral a través de la interacción con los ectodominios que forman el heterodímero GP5/M (Van Breedam W, 2010). Después de la entrada a la célula, el PRRSV causa una serie de modificaciones intracelulares para completar su ciclo de replicación, que incluye reordenamientos de organelos de membrana intracelular para generar el complejo de replicación y transcripción (RTC). Estos cambios o reordenamientos incluyen la formación de vesículas perinucleares de doble membrana aparentemente derivadas del retículo endoplásmico, síntesis de ARN genómico (ARNg), transcripción de ARN subgenómico (ARNsg) y la expresión de proteínas virales (Yun S-I, Lee Y-M, 2013; Kappes MA, Faaberg KS, 2015). El ciclo de replicación de los arterivirus se inicia con la expresión de las replicasas ORF1a y ORF1b, que se encuentran en el primer marco de lectura abierto, en el ARNm genómico. La traducción del ORF1b requiere un marco de lectura ribosomal antes de que finalice la traducción del ORF1a (Kappes MA, Faaberg KS, 2015). Los virus requieren la capacidad de regular selectivamente los procesos de transcripción y traducción tanto temporal como cuantitativamente en un proceso altamente ordenado y equilibrado (Pasternak *et al.*, 2000). Los mecanismos de expresión entre las proteínas replicasa no estructurales y las proteínas estructurales están fundamentalmente separados dentro del genoma del PRRSV, lo que facilita la expresión rápida de nsp del ARNg y la posterior amplificación de los ARNsg transcritos a través de una cascada de transcripción diferencial (Pasternak *et al.*, 2004). Los ARNsg son sintetizados por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral a través de un proceso altamente

ordenado codificado dentro del genoma del PRRSV. El conjunto de ARNs gánidos codifica una secuencia de ARN g no contigua que incluye tanto la 5' UTR como la 3' UTR poliadenilada, así como uno o más ORF de la región 3' del genoma (ORF2-7), pero carecen de toda la región codificante de la replicasa grande de 12 kb (ORF1a / b) (Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; Van Berlo *et al.*, 1982).

En las últimas etapas de la replicación, los viriones maduros se acumulan en los compartimentos de la membrana intracelular y luego se liberan en el espacio extracelular a través de la exocitosis (Thanawongnuwech R, *et al.*, 1997).

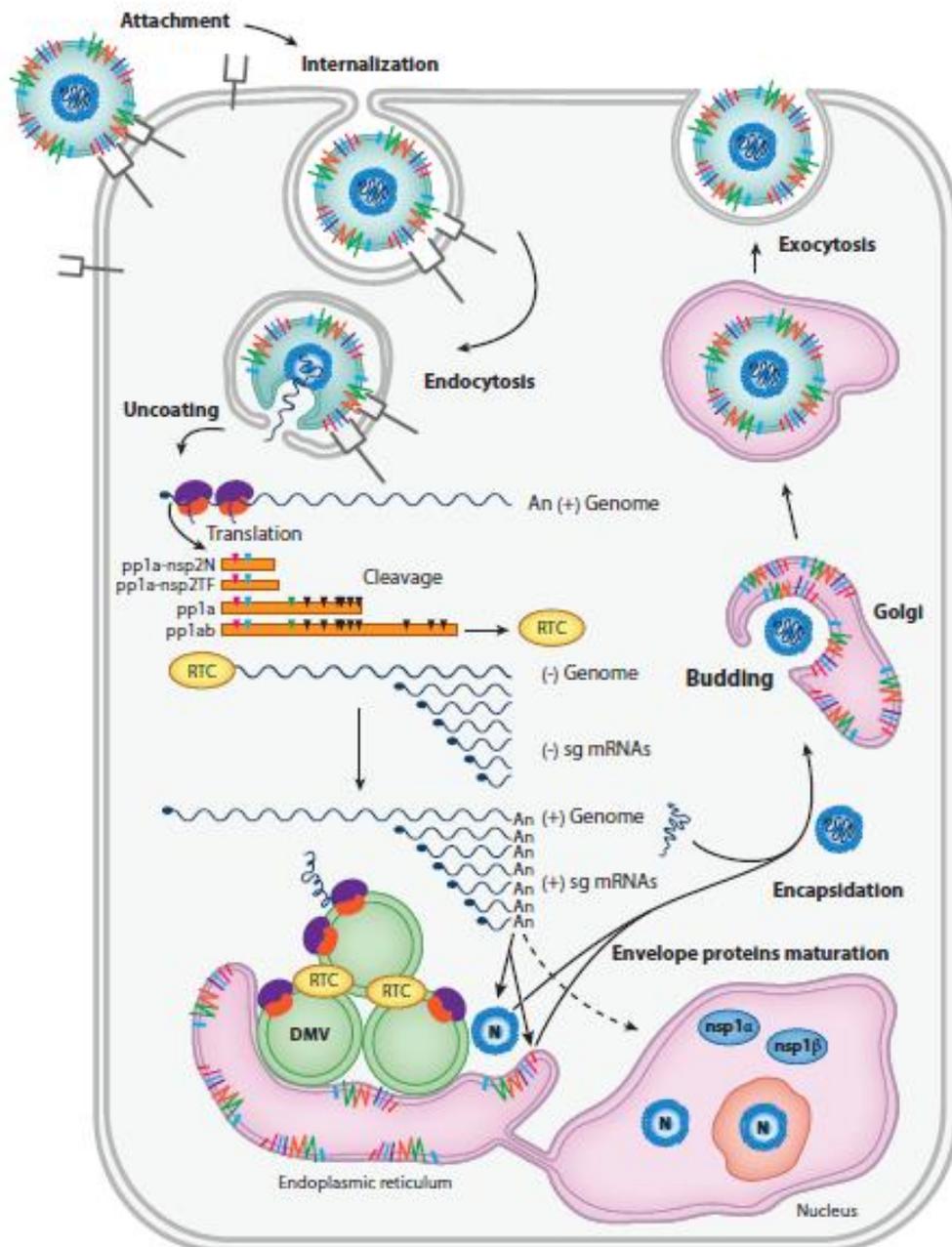


Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del PRRSV. Tomado de Lunney KJ, *et al.*, 2016.

Tras la entrada por endocitosis mediada por receptor y el desnudamiento, la traducción del genoma produce poliproteínas replicasa pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas son escindidas por proteinasas internas virales para generar al menos 14 proteínas no estructurales, que se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC). El RTC primero se involucra en la síntesis de ARN de cadena negativa para producir ARN de cadena negativa y subgenómico (sg) de longitud completa. Posteriormente, los ARNm sg sirven como plantillas para la síntesis de ARNm sg de cadena positiva necesarios para expresar los genes de proteínas estructurales que residen en el cuarto proximal 3' del genoma. Los genomas de ARN recién generados se empaquetan en nucleocápsides que quedan envueltas por la gemación de las membranas intracelulares. Los nuevos viriones se liberan de la célula mediante la vía exocítica.

DIVERSIDAD GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL PRRSV

Las diferencias en las secuencias genómicas del PRRSV lo dividen en dos genotipos, Europeo (EU o tipo I) representado por la cepa prototipo Lelystad y Norteamericano (NA o tipo II) representado por la cepa prototipo VR-2332; las cuales comparten el 63 % de su identidad genómica (con variaciones del 55 al 70 % comparando todo el genoma) (Shi M, *et al.*, 2010). El grado de heterogeneidad genética sugiere un período prolongado de evolución independiente en ambos continentes. Aún cuando a la infección clínica se manifiesta de manera similar, difieren significativamente en términos de propiedades antigénicas y contenido genético; pudiendo presentarse mutaciones o recombinaciones entre cepas de campo y vacunales (López-Heydeck, *et al.*, 2015; Shi, *et al.*, 2010).

Estas diferencias entre cepas europeas y norteamericanas son sorprendentes, ya que el PRRSV apareció en ambos continentes aproximadamente al mismo tiempo, siendo transmitido de manera similar y causando aparentemente la misma enfermedad reproductiva. Sin embargo, existen algunas diferencias notables entre ellos, por ejemplo, los virus de tipo II se aíslan de forma cotidiana en células epiteliales de riñón de simio (MA-104) y sus subclonadas células MARC-145, mientras que los virus de tipo I fueron difíciles de adaptar al cultivo de células de simio. El PRRSV tipo I causa principalmente enfermedades reproductivas en cerdas de gestación tardía, mientras que el PRRSV tipo II causa tanto enfermedades reproductivas en cerdas de gestación tardía como enfermedades respiratorias en cerdos en crecimiento. El PRRSV tipo I pareció cambiar lentamente, mientras que el PRRSV tipo II dio lugar periódicamente a formas más virulentas. Un muestreo más extenso de aislamientos de campo de tipo I mostró que la diversidad genética de tipo I es mayor que la de tipo II (Stadejek *et al.*, 2006b, 2008).

Esta amplia diversidad genética de cepas NA y EU ha ocasionado problemas en términos de control de la enfermedad, tanto para el diseño de vacunas como para su diagnóstico.

Murtaugh y colaboradores (2010), reportaron que la tasa calculada de sustitución de nucleótidos del PRRSV tipo II fue de $4.7-9.8 \times 10^{-2}$ /sitio/año, siendo la más alta reportada hasta ahora para un virus de ARN.

Como se mencionó anteriormente, el ORF5 es el que presenta mayor variabilidad debido a su alta tasa de mutación y recombinación, por lo cual, es ideal para identificar aislados y establecer relaciones filogenéticas. Estas mutaciones se encuentran principalmente en el ectodominio de la proteína GP5, la cual es la clave para la inducción de anticuerpos neutralizantes. En este sentido, Martínez B. y colaboradores (2018) encontraron diferencias significativas en secuencias de aislados mexicanos y de referencia respecto al ORF 5 y ORF 7 debido a inserciones y sustituciones en posiciones determinantes para el reconocimiento, estructura y función del virus.

La recombinación del ARN puede proporcionar un mecanismo poderoso y eficaz para la evolución de un virus de ARN. La capacidad de intercambiar información genética puede permitir que los virus ARN se adapten a un entorno cambiante y escapen de la presión de selección, como con los anticuerpos neutralizantes, proporcionando así al virus recombinante una ventaja evolutiva. Estudios anteriores han demostrado que se produce una recombinación genética entre cepas vacunales atenuadas de PRRSV que han sido propagadas en cultivo (Murtaugh MP, *et al.*, 2002). Li Bin y colaboradores (2009) demostraron por primera vez que puede ocurrir una recombinación natural entre vacuna y cepas de campo, lo que sugiere que las vacunas atenuadas tienen la capacidad de moldear la evolución del PRRSV mediante la recombinación homóloga con el virus circulante.

Por otra parte, Macías y colaboradores (2006) encontraron gran variación al comparar la secuencia de nucleótidos de un aislamiento viral con la cepa VR-2332, obteniendo un 82% de similitud.

Se podría pensar que cada genotipo es exclusivo de cada continente, sin embargo, se han descrito virus de genotipo americano en Europa y Asia, así como virus de genotipo europeo en América (Macías, *et al.*, 2006).

RESPUESTA INMUNE

La infección por el PRRSV se puede dividir en al menos tres etapas distintas: infección aguda, persistencia y extinción, que son únicas en términos inmunológicos, virológicos y de enfermedad clínica. La primera etapa está representada por una infección aguda, durante la cual el pulmón sirve como un sitio preferencial para la infección (Lunney JK, *et al.*, 2016). El PRRSV se replica principalmente en macrófagos y células dendríticas en los pulmones y en el tracto respiratorio superior, lo que produce viremia entre las 6 y 12 h post-infección (PI). La viremia puede durar varias semanas a pesar de la presencia de anticuerpos circulantes (Wills RW, *et al.*, 1997; Allende R, *et al.*, 2000; Rowland RRR, *et al.*, 2003). Durante la segunda etapa de la infección persistente, la replicación del virus disminuye hasta el punto en que el virus ya no se detecta en sangre y pulmones, sin signos evidentes de enfermedad clínica. En esta etapa, la replicación viral se localiza principalmente en los órganos linfoides, incluidas las tonsilas y linfonodos, pero no en el bazo (Wills RW *et al.*, 1997; Allende R, *et al.*, 2000; Rowland RRR, *et al.*, 2003). La replicación continua del virus en los linfonodos regionales explica la transmisión eficiente del virus a los cerdos susceptibles a través de las secreciones nasales, orales y semen (Christopher-Hennings J, *et al.*, 2008). Posteriormente, la replicación del virus decae gradualmente hasta que el virus se extingue. La eventual desaparición del virus representa la etapa final de la infección. No se sabe exactamente cuándo desaparece el virus, pero la replicación se puede mantener hasta 250 días después de la infección (Wills RW, *et al.*, 2003). Por lo tanto, la replicación del PRRSV no establece un equilibrio, sino que disminuye gradualmente con el tiempo, con los órganos linfoides como el sitio del último vestigio de replicación del virus antes de la extinción viral. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en el contexto del entorno típico de producción porcina, en el cual los cerdos se mantienen durante 250 días, el PRRSV establece una infección durante toda la vida del animal (Wills RW *et al.*, 1997; Allende R, *et al.*, 2000; Rowland RRR, *et al.*, 2003).

RESPUESTA INMUNE INNATA

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa del huésped contra las infecciones virales. Está constituido por barreras físicas, como la piel y las membranas mucosas; barreras químicas, como péptidos antimicrobianos, pH, lípidos y enzimas; y las células inmunes, como los monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK) (Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S, 2008).

La infección por PRRSV provoca una respuesta inmune innata y adaptativa deficiente, asociada con la modulación inmunitaria y la excreción viral incompleta en la mayoría de los cerdos, dependiendo de su edad y estado inmunitario (Renukaradhya GJ, *et al.*, 2010). Los lechones son el grupo más afectado debido a su sistema inmune innato pobremente desarrollado. La respuesta inmune innata activada en mucosas desempeña un papel importante en la inducción de la inmunidad protectora contra infecciones entéricas y respiratorias (Klinge KL, *et al.*, 2009). Muchos virus porcinos modulan la inmunidad innata del huésped y a su vez, la inmunidad adaptativa, lo que resulta en infecciones persistentes (Wills RW, *et al.*, 2003; Fahrion AS, *et al.*, 2014). De hecho, el estado inmunitario modulado por el PRRSV favorece las infecciones microbianas secundarias y la enfermedad del complejo respiratorio porcino, lo que conduce a una grave morbilidad (Mann JFS, *et al.*, 2009).

La infección con ciertas cepas de PRRSV induce una supresión significativa de la actividad citotóxica de las células NK. La regulación de la función de las células NK durante las infecciones virales está coordinada principalmente por las citocinas, IFN α/β , IL-12 e IL-15 (Lunney JK, *et al.*, 2016). Se ha descrito que la cantidad secretada de citocinas en cerdos infectados con el PRRSV es significativamente menor que con otras infecciones virales y es dependiente de la cepa (Gerner, *et al.* 2009). Se ha observado que la expresión temprana de IL-8, IL-1 β e IFN γ se correlaciona con una eliminación rápida del virus (Lunney JK, *et al.*, 2010). En el caso de la infección por PRRSV, la producción deficiente de IFN α permanece bajo a lo largo del curso de la infección causado por la acción de algunas nsp, como se

ha descrito en cerdos infectados con diversos aislados de campo (**Tabla 1**) (Albina E, Carrat C, Charley B, 1998; Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckerman F, 2002; Loving CL, Osorio FA, Zuckerman FA, 2015).

Gen	Proteína	Características /función
ORF1a	nsp1 α	Reguladora de la síntesis de ARNm sg; antagonista potencial del interferón (IFN)
	nsp1 β	Antagonista potencial del interferón (IFN)
	nsp2	Enzima desubiquitinante; antagonista potencial de IFN; proteína transmembrana involucrada en la modificación de la membrana que forma el complejo de replicación
	nsp3	Proteína de dominio transmembranal (TM) implicada en la modificación de la membrana; formación del complejo de replicación
	nsp4	Inductora de apoptosis; antagonista potencial de IFN
	nsp5	Posiblemente involucrada en la modificación de la membrana
ORF2a	GP2a	Proteína estructural glicosilada menor; esencial para la infectividad del virus; incorporada al virión como un complejo multimérico con GP3-4; proteína de unión viral
ORF2b	E	Proteína estructural menor no glicosilada; esencial para la infectividad del virus; incorporada al virión como un complejo multimérico; posee propiedades similares a canales iónicos y puede funcionar como una viroporina en la envoltura
ORF3	GP3	Proteína estructural glicosilada menor; esencial para la infectividad del virus; altamente antigénica y puede estar involucrada en la neutralización viral; incorporada en viriones como un complejo multimérico con GP2a y GP4; un subconjunto de GP3 podría secretarse como una proteína soluble no asociada al virión
ORF4	GP4	Proteína estructural glicosilada menor; esencial para la infectividad del virus; formación del complejo GP2a-3-4 para incorporar al virión; proteína de unión viral y puede implicar la neutralización viral
ORF5	GP5	Proteína estructural glicosilada mayor; Proteína TM con un número variable de sitios potenciales de N-glicosilación; la proteína estructural más variable; formación de un heterodímero unido por disulfuro con proteína M
ORF6	M (Matriz)	Proteína estructural no glicosilada mayor; muy conservada; La heterodimerización de GP5-M es crucial para la infectividad del virus; juega un papel clave en el ensamblaje y la gemación del virus
ORF7	N (Nucleocápside)	Proteína estructural no glicosilada y fosforilada; componente de la cápside viral; altamente antigénica; antagonista potencial de IFN

Tabla 1. Factores de virulencia del virus de PRRS (Lunney JK, *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que al infectar células mononucleares con el PRRSV se induce la expresión de IL-10, la cual es una citocina antiinflamatoria que logra inhibir la expresión de la IL-1 β y el TNF- α , y además participa en la diferenciación de células T reguladoras (Mcguirk P, *et al.*, 2002). La falta de una respuesta inflamatoria y la débil o nula respuesta antiviral (inducida por los interferones tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa.

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La infección con el PRRSV induce una respuesta de anticuerpos dirigidas contra la GP5 y la proteína N entre 7 y 9 días posinfección (dpi) pero sin evidencia de protección (Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA, 2015). Los anticuerpos neutralizantes (AcN) del suero aparecen posteriormente, típicamente después de 28 dpi (figura 3). La participación de los AcN en la protección contra el PRRSV se ha evaluado ampliamente, y existe cierta controversia respecto de su participación en la protección contra el PRRSV. Hay grupos que describen que éstos no participan en el control del virus, debido a que en cerdos que presentan un título elevado de AcN fue posible aislar el virus de sangre. En el caso contrario, con un título indetectable de AcN se logró resolver la viremia (Vezina SA, *et al.*, 1996). Sin embargo, otros grupos han demostrado que la transferencia pasiva de AcN a cerdas gestantes infectadas con PRRSV es capaz de bloquear la infección trasplacentaria (Osorio FA, *et al.*, 2002). En otras palabras, los AcN no son los únicos responsables de la resolución de la viremia, son importantes para evitar la infección. Los posibles mecanismos responsables de la aparición retardada de AcN, incluyen: la presencia de un epítipo señuelo inmunodominante en la GP5, facilitación dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés Antibody-dependent enhancement) que aumenta el número de células infectadas, y la carga vírica, supresión de la respuesta inmune innata y pobre desarrollo de células B (Ostrowski, *et al.*, 2002; Cancel-Tirado, *et al.*, 2004; Sang Y, Rowland RRR, Blecha F, 2011). Por otro lado, los anticuerpos contra las nsp son predominantemente dirigidos hacia las nsp1 (α/β), nsp2 y nsp7 (α/β); las otras nsp inducen respuestas de bajo nivel anticuerpos

o incluso indetectables (Figura 3). La respuesta inmune mediada por células (CMI) es débil al principio y alcanza su pico después de la infección por PRRSV, con la secreción de IFN γ , células NK, células T $\gamma\delta$ tempranas, seguida de las células T $\alpha\beta$.

La inmunidad a través de la exposición natural o la vacunación proporciona solo una protección limitada contra un desafío secundario. La producción de niveles protectores de AcN generalmente requiere múltiples vacunaciones o infecciones repetidas (Lunney JK, *et al.*, 2016). Además, los AcN suelen ser específicos para la cepa vacunal (homóloga), con títulos menores o sin títulos de anticuerpos neutralizantes contra cepas heterólogas (Vu HL, *et al.*, 2011).

La respuesta inmune mediada por células aparece algunas semanas después del inicio de la infección por PRRSV, con la participación de células NK, células T $\gamma\delta$ tempranas, seguida de las células T $\alpha\beta$ secretoras de IFN γ (figura 3).

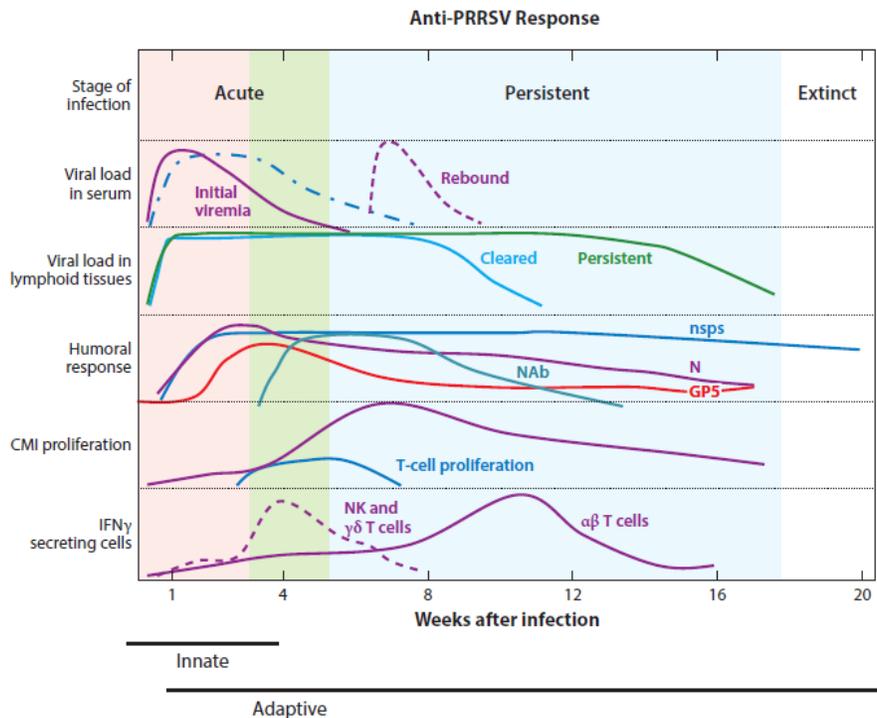


Figura 3. Respuesta inmune a la infección por el PRRSV. Tomado de Lunney *et al.*, 2016.

VACUNAS CONTRA EL PRRSV

Las vacunas son biológicos elaborados a partir de un microorganismo completo atenuado o inactivado, o con fracciones de él, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera contra dicho microorganismo. Para que las vacunas puedan prevenir o controlar una enfermedad, tienen que estimular eficazmente el sistema inmunitario e inducir memoria inmunológica. Se puede hacer una clasificación de las vacunas teniendo en cuenta la tecnología biotecnológica empleada en su diseño y producción, dentro de esta clasificación podemos encontrar a las vacunas de virus activo modificado (MLV, por sus siglas en inglés), vacunas inactivadas, ADN, subunidades y vectorizadas (Rogan D y Babiuk LA, 2005).

A lo largo del tiempo y con la ocurrencia de diversos brotes, se han originado nuevas variantes del PRRSV que hace complejo su control a través de la vacunación aunado a que, las estrategias actuales para controlar la infección han sido en gran medida inadecuadas a pesar de la comprensión que se tiene sobre la partícula viral, su evolución y la respuesta inmune del hospedero. Mientras tanto, la experiencia práctica ha revelado numerosas preocupaciones sobre la seguridad y eficacia de las vacunas actualmente autorizadas, tales como la eliminación del virus cuando se aplican MLV, reversión a virulencia, recombinación entre cepas de campo y MLV, y la falta de protección contra virus heterólogos. Por lo tanto, se necesita con urgencia una vacuna eficaz contra la infección por este virus (Nan Y, *et al.*, 2017).

VACUNAS ATENUADAS ó MLV

La vacuna más utilizada contra el PRRSV es del tipo MLV, atenuado por pases múltiples en cultivo celular. Las vacunas atenuadas son más eficientes que las inactivadas debido a que inducen mayor respuesta inmune celular y humoral; sin embargo, esta respuesta es insuficiente para proteger completamente contra la infección frente a virus heterólogos (Cano JP, *et al.*, 2007).

La vacunación en cerdos utilizando vacunas atenuadas de tipo americano o europeo estimulan la respuesta celular. Sin embargo, la proporción de células productoras de IFN- γ es muy baja (especialmente en cepas europeas) y su inducción lenta si se compara con otras vacunas atenuadas como la empleada contra el virus de Aujeszky; en la cual la producción de células productoras de INF- γ es de dos a cuatro veces mayor después de la vacunación (Royae AR, *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Zuckermann FA y colaboradores (2007) reportaron que los animales vacunados con MLV exhibieron una respuesta de IFN- γ específica de PRRSV moderada pero significativa a los 28, 35 y 42 días después de la primera vacunación. Los anticuerpos neutralizantes sólo aparecen en algunos animales vacunados; sin embargo, algunos autores detectaron AcN después de desafiar a cerdos vacunados (Charerntantanakul W, *et al.*, 2006). Actualmente se encuentran disponibles varias vacunas atenuadas contra el PRRSV; Sin embargo, existen resultados mixtos con respecto a la eficacia de estas vacunas contra las cepas de campo genéticamente diversas del PRRSV. Osorio *et al.* (1998) compararon tres vacunas comerciales en su capacidad para inducir protección contra cepas de PRRSV de alta virulencia, y encontraron que estas vacunas confieren protección contra la enfermedad clínica, pero no contra infección.

A pesar de lo anterior, varios experimentos han demostrado que el uso de la vacuna MLV reduce significativamente las lesiones y signos clínicos frente al desafío con cepas homólogas del PRRSV (Cano JP, *et al.*, 2007). Además, muestra una reducción en la proporción de cerdos infectados en forma persistente y en el tiempo de excreción viral utilizando cepas homólogas del virus vacunal (Nodelijk G, *et al.*, 2001). Sin embargo, es claro que la vacuna no previene la reinfección con cepas homólogas, sólo disminuye los signos de la enfermedad. Frente a cepas heterólogas, se presenta el mismo escenario, pero la protección es menor (Flores L, Hernández J. 2010). Un problema importante relacionado con la seguridad de esta vacuna es el hecho de que, en algunos casos, los virus atenuados pueden revertir a virulencia y ocasionar la propagación del virus en la población porcina favoreciendo la recombinación con las cepas de campo.

VACUNAS INACTIVADAS

La principal ventaja de estas vacunas es que no pueden revertir a la virulencia, pues utilizan virus inactivado. Un estudio reportó que no existió diferencia en la excreción viral en cerdos previamente infectados con el PRRSV aún después de haber sido aplicada la vacuna inactivada. Sin embargo, el número de células productoras de IFN- γ fue ligeramente mayor en los grupos vacunados que en el grupo no vacunado en los días 42 y 63. Estas observaciones sugieren que la vacuna no tuvo ningún efecto sobre la diseminación del virus, pero los cerdos previamente infectados sí respondieron inmunológicamente a la vacuna, lo cual fue demostrado por el aumento en los títulos de anticuerpos y las células productoras de IFN- γ (Nilubol D, *et al.*, 2004).

Las vacunas inactivadas de cepas americanas no son capaces de inducir una respuesta humoral protectora; aún cuando se observa un aumento de anticuerpos después del desafío, éstos no son neutralizantes (Christopher-Hennings J, *et al.*, 1995). Sin embargo, las vacunas inactivadas de cepas europeas inducen una ligera producción de AcN, aunque esto último no se refleja ni en la disminución de la viremia ni en la carga viral en tejidos (Plana-Duran J, *et al.*, 1995, Nilubol *et al.*, 2004; Zuckermann *et al.*, 2007).

VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

Se han evaluado varios sistemas de expresión de antígenos del PRRSV incluyendo bacterias, baculovirus (Meulenberg JJ, *et al.*, 1995), adenovirus y el sistema del virus Ankara (MVA, por sus siglas en inglés) en busca de una alternativa para utilizarse como vacunas (Meulenberg JJ, *et al.*, 1995; Kwang J, *et al.*, 1999; Jiang Y, *et al.*, 2006; Gagnon CA *et al.*, 2003; Jiang W, *et al.*, 2006). Se han utilizado bacterias como *Salmonella typhimurium* y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* como vectores en la expresión de la GP5 y la proteína M del PRRSV, utilizando ratones como modelo de estudio (Bastos RG, *et al.*, 2002).

También se ha evaluado el uso de virus como vectores de expresión para las proteínas GP5 y M del PRRSV en cerdos (Tian ZJ, *et al.*, 2005). Por ejemplo, el virus causante de la enfermedad de Aujeszky fue utilizado como vector de expresión, se le insertó la secuencia de la GP5 y se obtuvo una vacuna doble dirigida al virus de Aujeszky y a la GP5 del PRRSV. Esta vacuna redujo los daños causados por el virus en pulmón en cerdos infectados; sin embargo, no se detectaron niveles de anticuerpos (Qiu HJ, *et al.*, 2005).

Los adenovirus de serotipo 5 (Ad5) son excelentes sistemas para la expresión de genes de interés en el desarrollo de vacunas. Por ello también se han utilizado en el diseño de vacunas contra el PRRSV (Gagnon CA, *et al.*, 1997). Una de las ventajas del sistema de Ad5 sobre los otros sistemas utilizados consiste en que la expresión se lleva a cabo en células eucarióticas, lo cual hace que la conformación de la proteína sea similar a la del virus, facilitando la exposición de los epítopes neutralizantes.

Las vacunas de ADN están insertadas en plásmidos que pueden expresar proteínas o una fracción de interés y no son infecciosos. Las vacunas de ADN tienen algunas características que les confieren ciertas ventajas frente a las convencionales, entre ellas la facilidad de producción, bajo costo, estables al calor, entre otros. Las vacunas de ADN han demostrado inducir anticuerpos séricos y una fuerte respuesta de células T cooperadoras y citotóxicas contra varios antígenos: virus, bacterias, parásitos y algunos tumores (Kwang J, *et al.*, 1999; Jiang Y, *et al.*, 2006). Barfoed y colaboradores (2004) caracterizaron la contribución de cada proteína viral en el desarrollo de una respuesta protectora. Sólo se encontró una respuesta de anticuerpos en los cerdos vacunados con el plásmido que contenía el ORF7 después del desafío con una cepa homóloga del PRRSV. También se observaron anticuerpos dirigidos a Nsp2 y GP4 tras la inoculación; sin embargo, después de desafiar a los cerdos con una cepa del PRRSV no se observó ninguna respuesta específica.

En cuanto a la tecnología de ADN recombinante junto con la tecnología de cultivo de tejidos han constituido una alternativa viable para la producción económica de

proteínas heterólogas en plantas. Por ejemplo, se llevó a cabo un estudio en células embriogénicas de plátano que fueron transformadas con el gen ORF5 de la GP5 del PRRSV mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*. La administración oral de las hojas del plátano transgénicas durante tres dosis consecutivas seguida de un desafío con PRRSV registró una disminución de la viremia y carga viral tisular en comparación con los cerdos alimentados con hojas de plátano sin transformar. (Chan HT, *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

El PRRSV es caracterizado por su alta variabilidad genética y antigénica. El genoma de PRRS tiene una tasa de mutación de 10^{-2} /sitio/año (Butler *et al.*, 2014). En México, se sabe muy poco sobre la existencia de nuevas cepas circulantes de este virus, sin embargo, estudios recientes realizados para evidenciar las variaciones que ha tenido a lo largo del tiempo muestran que, el ectodominio de la GP5 está sujeto a recombinación genética y bajo presión inmunológica logrando evadir la respuesta inmune del cerdo (Macías *et al.*, 2006 y Martínez-Bautista, *et al.*, 2018).

Basado en estos estudios, en el grupo de investigación del DMVZ se lograron identificar 4 epítomos de la proteína GP5 mediante herramientas bioinformáticas, los cuales presentaron un grado de conservación mayor al 96%, fueron sintetizados como péptidos lineales y evaluados en su capacidad antigénica por ensayos de ELISA (García Plata 2019). Los resultados mostraron que los 4 epítomos fueron capaces de reconocer anticuerpos específicos en sueros de cerdos previamente diagnosticados como negativos por kits comerciales.

Considerando la importancia de la glicoproteína 5 en la inducción de anticuerpos protectores y considerando estos resultados, se decidió explorar el potencial de estos epítomos con miras de desarrollar una vacuna eficiente empleando sistemas novedosos como la tecnología de ADN recombinante.

TECNOLOGÍA RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFARMACÉUTICOS A GRAN ESCALA

Actualmente, la demanda de productos encaminados a mejorar la calidad de vida de los seres humanos y animales va de la mano con el incremento de la población y la necesidad de evitar enfermedades que afectan su bienestar. Hasta hace algunos años, los medicamentos empleados para combatir estas enfermedades se obtenían principalmente de fuentes naturales. Sin embargo, con el incremento de la población, las fuentes naturales se han visto superadas, por lo que se ha recurrido a la biotecnología, la cual, también ha tenido un fuerte impacto en la producción de proteínas recombinantes (es decir, obtenidas por la tecnología de ADN recombinante) de interés médico, cuya demanda generó tan sólo en 2006 ventas por aproximadamente 40 mil millones de dólares en los Estados Unidos, con una tasa de crecimiento anual del 20 por ciento entre 2001 y 2006 (Rivera, *et al.*, 2011). Para finales de 2010 las ventas estimadas de esta clase de productos habrían alcanzado los 53 mil millones de dólares. Esta demanda difícilmente se podría satisfacer de no ser por esta tecnología, mediante la cual se ha logrado la manipulación genética de diversos organismos para producir una mayor cantidad de proteínas de interés médico respecto a las que se podrían obtener de las fuentes originales. Entre los organismos modificados que actúan como “reactores biológicos” capaces de sintetizar proteínas recombinantes se encuentran las bacterias, levaduras, insectos, plantas y mamíferos; así como líneas celulares obtenidas de los tres últimos. Cada sistema de producción posee diferentes características en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción, por lo que cada uno tiene diferentes ventajas y desventajas. En la tabla 2 se hace una comparación de las características que presentan los organismos empleados comúnmente como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo a las plantas como una nueva alternativa para este fin (Rivera, *et al.*, 2011).

Organismo	Características						
	Costo de producción	Tiempo de producción	Capacidad de escalamiento	Calidad del producto	Capacidad de glucosilación	Riesgo de contaminación	Costo de almacenamiento
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	Bajo	No	Endotoxinas	Moderado
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Medio	Sí	Bajo	Moderado
Células de insectos	Alto	Medio	Medio	Alto	Sí	Alto	Costoso
Células de mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Muy alto	Sí	Virus-Priones	Costoso
Animales	Alto	Muy largo	Bajo	Muy alto	Sí	Virus-Priones	Costoso
Células de plantas	Bajo	Corto	Alto	Alto	Sí	Bajo	Poco costoso
Plantas	Muy Bajo	Largo	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso
Microalgas	Muy Bajo	Corto	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso

Tabla 2. Comparación de las características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las plantas propuestas como biorreactores. Tomado de Rivera, *et al.*, 2011.

En la actualidad la biotecnología vegetal ha tomado un papel relevante gracias al desarrollo de herramientas de ingeniería genética, biología molecular, cultivo de tejidos y técnicas de fermentación que han permitido el crecimiento de las células bajo condiciones controladas dando origen a la producción de materiales de alto potencial clínico e industrial (García, 2010). Entre las plantas más empleadas para llevar a cabo la expresión de moléculas de interés terapéutico se encuentran las especies de *Nicotiana*, las cuales son la opción más popular para los enfoques de expresión transitoria debido al alto rendimiento de biomasa y el fácil crecimiento (Ma *et al.* 2003). Sin embargo, los cultivos comestibles son ideales cuando se persigue el desarrollo de una vacuna oral. Algunos de los cultivos comestibles que se han utilizado con frecuencia incluyen lechuga, zanahoria, tomate, maíz y arroz, entre otros (Fischer *et al.* 2004).

TABACO COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN

GENERALIDADES DE LA PLANTA DE TABACO (*Nicotiana tabacum*)

Nicotiana tabacum es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia de las solanáceas, caracterizadas por tener un alto contenido de alcaloides, entre los que destacan la nicotina. Algunas ventajas del tabaco sobre otras plantas incluyen su facilidad de manipulación genética, rápida regeneración *in vitro* y la producción de gran número de semillas (hasta un millón por planta) (Loza-Rubio y Gómez-Lim, 2006). Sin embargo, es importante mencionar que una desventaja de esta planta es la producción de compuestos tóxicos como los alcaloides (Lal P, *et al.*, 2007).

En el caso del PRRSV, Chia y col. (2010) evaluaron la inmunogenicidad de la GP5 de la cepa MD-001 expresada en plantas de tabaco. Seis cerdos de 6 semanas de edad fueron alimentados cuatro veces (días 0, 14, 28 y 42) con 50 g de hojas de tabaco transgénico (GP5-T) fresco y picado, correspondiente a 5.5 µg de proteína GP5-T. Se recolectaron muestras de suero, saliva y células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cell) en diferentes tiempos, antes y después de la vacunación oral inicial. Los cerdos alimentados con GP5-T también desarrollaron anticuerpos neutralizantes en suero contra el PRRSV con un título de 1: 4 a 1: 8 después de la cuarta vacunación con 48 días de diferencia respecto a la vacunación oral inicial. Se observó un aumento gradual similar dependiente de la vacunación en las respuestas de IgG e IgA totales anti-PRRSV en suero y saliva, respectivamente, y en los niveles de respuesta blastogénica específica de PRRSV de las PBMC en cerdos tratados con GP5-T; No se observó respuesta de anticuerpos anti-PRRSV detectable en los cerdos no inmunizados. Este estudio demostró que los cerdos alimentados con GP5-T podrían desarrollar respuestas inmunes humorales, celulares y de mucosas contra el PRRSV.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL TABACO

La ingeniería genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés, mediante la integración en el genoma vegetal, de segmentos de ADN foráneo proveniente de cualquier origen. Este ADN altera las características de la planta, mediante la modificación dirigida y controlada de su genoma, al añadir, eliminar o modificar alguno o algunos de sus genes (Danilova, 2007; Karimi *et al.*, 2007).

Para la transformación del tabaco ha sido utilizado el sistema *Agrobacterium* debido a su capacidad para infectar diversos organismos vegetales susceptibles (dicotiledóneas). Este es clasificado como un método indirecto y transitorio de transformación genética (Veluthambi *et al.* 2003; Rao *et al.* 2009). Para utilizar dicho sistema de transformación, se requiere de cepas de *Agrobacterium* desarmadas, que son aquellas en las que el T-ADN (ADN de transferencia inductor de tumores) ha sido eliminado. Para obtenerlas, el plásmido residente Ti (inductor de tumores) debe ser modificado mediante un proceso de recombinación, que permite eliminar los genes responsables de la formación de tumores en la planta, denominados oncogenes (ONC) y los genes para la síntesis de opinas, que se encuentran en la región del T-ADN. Para esto es introducido un plásmido foráneo con regiones de homología con el T-ADN y un gen para resistencia a antibióticos. Dado el proceso de recombinación entre el plásmido Ti y el plásmido foráneo, se elimina el T-ADN y se introduce en el plásmido Ti el gen para resistencia a antibióticos que, posteriormente, va a permitir identificar la bacteria desarmada, mientras que plásmido foráneo con la región T-ADN es eliminado (Gelvin, 2003; Jacobs, 2003; Pitzschke y Hirt, 2010).

La infección por *Agrobacterium* en una planta es el resultado de un proceso de evolución altamente especializado: para que se logre una transferencia efectiva del T-ADN es necesaria la expresión de los “genes Vir” contenidos en la región de virulencia (región Vir), la cual, se encuentra en el plásmido Ti (Gelvin, 2010).

Este proceso inicia cuando se producen heridas en las células de la planta que liberan al medio compuestos fenólicos y monosacáridos, que son reconocidos por

Agrobacterium, induciendo una unión entre la bacteria y las células vegetales. Estos compuestos son importantes para la activación del sistema de regulación de los componentes VirA/VirB, que activa la transcripción del regulón Vir (Valentine, 2003; Tzfira *et al.*, 2004). Posteriormente, por la acción cooperativa de las proteínas VirD1 y VirD2 permite la síntesis del T-ADN, la proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del T-ADN, mientras que la proteína VirE2 cubre a toda la hebra de T-ADN. Finalmente, este complejo es translocado a las células vegetales mediante un sistema de secreción tipo IV, que está constituido por un Pili y un canal de secreción, formados por las proteínas VirB y VirD4. Una vez que el T-ADN ha llegado a la célula vegetal, las proteínas VirE2 y VirD2 contribuyen al direccionamiento del T-ADN hacia el núcleo y su posterior integración en el genoma vegetal (figura 4). Cabe destacar que, durante todo el proceso de infección de *Agrobacterium* se da una continua interacción con las proteínas y sistemas propios de la célula vegetal a ser infectada.

VECTORES

Para la transferencia de genes se utilizan dos tipos de vectores, co-integrados y binarios, los últimos son los más utilizados, se derivan de plásmidos que se replican en *E. coli* y en *A. tumefaciens*, no necesitan integrarse al plásmido Ti y se mantienen como plásmidos independientes dentro de la célula bacteriana. Esta estrategia consiste en el uso de dos plásmidos en la bacteria, uno de ellos, el vector binario, contiene los bordes del T-ADN en el que se incluye el cassette de expresión o genes de interés y, el otro, el plásmido residente es el que contiene los genes “Vir”, que son los encargados de mediar la transferencia efectiva del cassette de expresión hacia las células vegetales (Hellens y Mullineaux, 2000; Komori *et al.*, 2007).

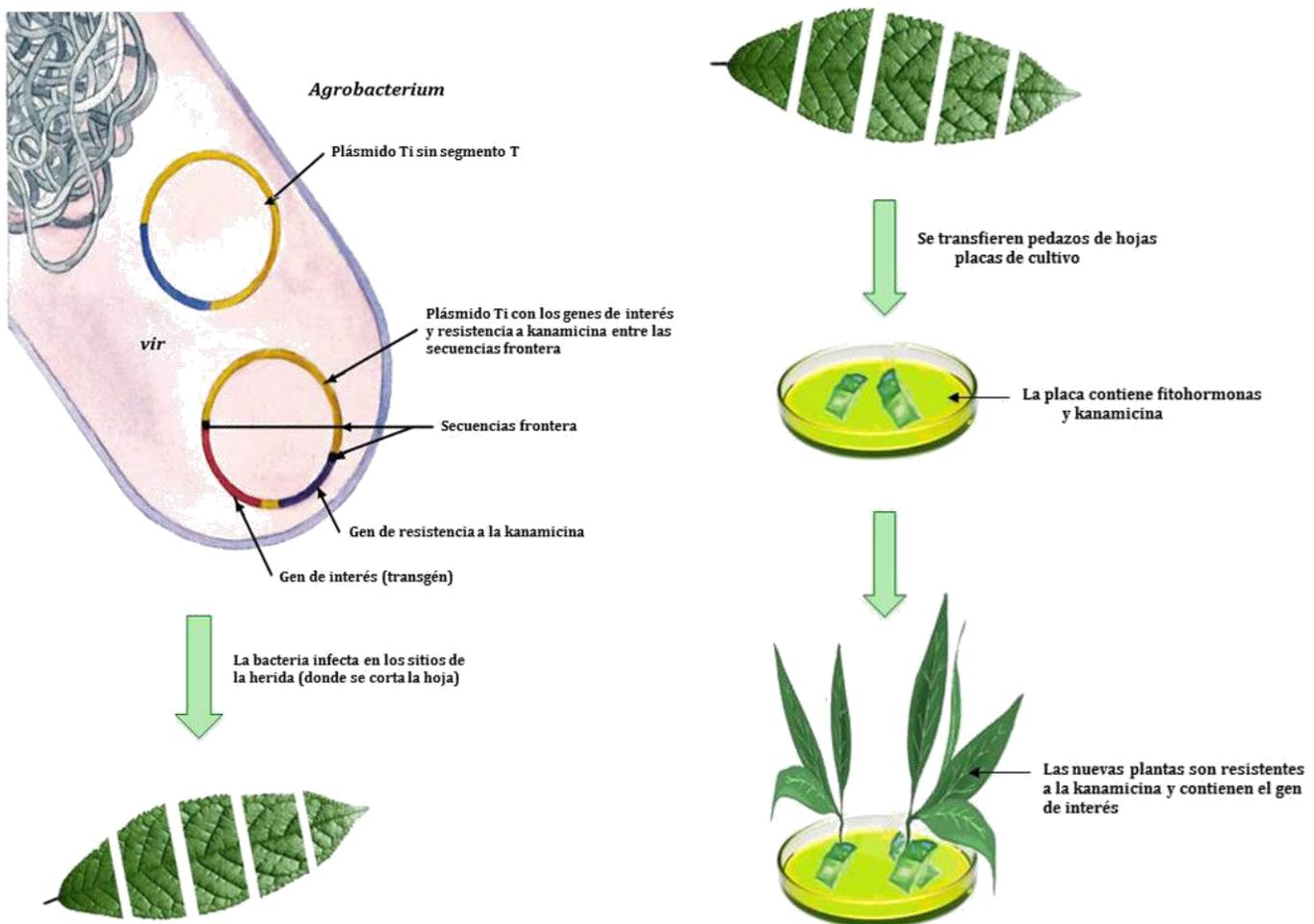


Figura 4. Transformación genética del tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tomado de Next Door Publishers.

ESTRATEGIAS PARA LA EXPRESIÓN EFICIENTE

Es importante mencionar que, la cantidad de tejido vegetal que constituya una dosis de vacuna debe ser pequeña. Por ello es importante alcanzar altos niveles de expresión del antígeno protector en el tejido vegetal. Se han utilizado diferentes estrategias para aumentar los niveles de expresión de los transgenes, por ejemplo, empleando diversas señales de regulación de la expresión genética como son la elección de promotores, integración de elementos reguladores, silenciamiento de genes y acción de las proteasas, así como la optimización en el uso de codones (Loza-Rubio y Gómez-Lim, 2006). En la siguiente tabla comparativa (tabla 3) se

muestran los niveles de expresión en plantas transgénicas para diferentes antígenos de enfermedades animales.

Agente patógeno	Antígeno	Planta	Órgano	Nivel de expresión	
				Proteína soluble total (%)	Peso fresco (g)
Virus de la rabia	Glicoproteína	Tomate	Hojas y frutos	1	0.1
Fiebre aftosa	Proteína estructural VP1	Patata	Hojas	0.01	0.001
	Péptido de la proteína estructural VP1 fusionado a β -glucuronidasa	Alfalfa	Hojas	0.004	0.0005
Virus de la gastroenteritis transmisible porcina	Glicoproteína S	Tabaco	Hojas	0.2	0.03
		Maíz	Semillas	0.002	0.00001
		Patata	Tubérculo	0.07	0.0005
Parvovirus canino	Péptido de la proteína de la cápside VP2 fusionado a β -glucuronidasa	Arabidopsis	Hojas	0.1	0.0003
	Péptido de la proteína 2L21 fusionado con la subunidad B de la toxina colérica	Tabaco	Hojas	31	7.49 mg/g

Tabla 3. Niveles de expresión en plantas transgénicas para diferentes antígenos de enfermedades animales (Ruíz O, *et al.*, 2005).

La herramienta que se describe a continuación es utilizada para evaluar el estado de transgénesis en la planta.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la polimerasa, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa de distintas concentraciones para confirmar si el tamaño del amplicón corresponde a la región de interés (Tamay de Dios L, Ibarra C, y Velasquillo C, 2013).

Con base a estas características de este sistema de expresión, este trabajo de maestría tuvo como objetivo expresar los epítomos de la GP5 previamente identificados en el grupo de trabajo para proponer su uso como una alternativa de vacunación en contra de PRRS.

JUSTIFICACIÓN

La infección por el PRRSV provoca grandes afecciones clínicas y productivas en las granjas porcinas y está reportada como la enfermedad que mayor impacto económico genera a nivel mundial, sin contar con métodos de diagnóstico serológicos y vacunas de alta eficacia contra cepas heterólogas. Martínez B. y Cols., (2018) encontraron diferencias significativas entre las secuencias de los genes del ORF5 y ORF7 de un virus de campo y el virus de referencia debido a inserciones y mutaciones en posiciones clave para el reconocimiento, estructura y función del virus. Este estudio permite entender que la diversidad de cepas en el territorio mexicano, así como la distancia filogenética entre ellas ha impedido el control de la infección mediante el uso de las vacunas existentes.

El diseño racional de proteínas inmunogénicas del PRRSV y su expresión en sistemas novedosos es un enfoque que podría conducir al desarrollo de vacunas eficaces y de bajo costo. El sistema de expresión en plantas ha permitido disminuir los riesgos de contaminación por patógenos humanos, practicidad en cuanto al uso de equipos y/o materiales, disminución de costos y tiempos de producción, hacen que las plantas sean consideradas como una herramienta clave para la producción a gran escala de múltiples proteínas recombinantes.

Las vacunas a base de epítomos son un elemento atractivo para aquellos virus que presentan una alta tasa de mutación, como es el caso del PRRSV. García P. y Cols., (2019), lograron establecer una base para el desarrollo de este tipo de vacunas al seleccionar 4 epítomos altamente conservados de la GP5 dentro de un extenso análisis *in silico* de secuencias mexicanas. Lo anterior justifica el desarrollo de una vacuna recombinante de bajo costo producida en plantas de tabaco que expresen

estos epítomos de la GP5, que sin duda aportará grandes beneficios a la porcicultura del país.

HIPÓTESIS

Las plantas de tabaco sometidas a transformación nuclear serán capaces de expresar una proteína quimérica que comprende a la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (acarreador) y los epítomos de la proteína GP5 del PRRSV, lo que permitirá tener un candidato vacunal a ser evaluado posteriormente.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar y expresar en plantas de tabaco una proteína quimérica basada en epítomos de la proteína GP5 del PRRSV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Diseñar una proteína quimérica (LTB-PRRSV) que contenga epítomos seleccionados del PRRSV, así como la proteína acarreadora subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*.
- 2.- Obtener un gen que exprese la proteína LTB-PRRSV y llevar a cabo la construcción de un vector binario para su expresión en plantas.
- 3.- Obtener plantas de tabaco transformadas con el gen LTB-PRRSV mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
- 4.- Comprobar mediante PCR el estado de transgénesis en las plantas de tabaco desarrolladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO Y SÍNTESIS DE LA QUIMERA CON LOS EPÍTOPOS DE LA GP5

La construcción quimérica que contiene la secuencia de los 4 epítomos de la GP5 (1,3,35 y 40) fue sintetizada por la empresa GenScript en EUA, clonada originalmente en el vector pUC57 (figura 5).



Figura 5. Estructura de la quimera que incluye 4 epítomos de la GP5 del PRRSV.

La secuencia quimérica está conformada por los siguientes elementos:

- **Sitios de restricción para fines de clonación en pBI-121:** *Sma I*, *BamH I*, *Sac I*.
- **Péptido señal/-SEKDEL:** sirve para traslocar y acumular la proteína en el retículo endoplásmico.
- **Acarreador inmunogénico LTB (Subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*):** brinda un mayor tamaño molecular al antígeno de interés, aumentando así su inmunogenicidad; así mismo funcionando como adyuvante de mucosas.
- **Oligopéptidos del PRRSV de la GP5:** Pep1, Pep3, Pep35 y Pep 40.
- **Linkers de glicina y prolina:** funcionan como un espaciador entre los oligopéptidos para que sean reconocidos como elementos individuales por el sistema inmunológico.
- **Codón de paro:** señala el término de la traducción.

PLÁSMIDOS

El plásmido utilizado para la generación de la construcción del presente trabajo fue el siguiente:

pBI-121

El plásmido pBI-121 (Jefferson RA, *et al.*, 1987) consta de 14,758 pb y es un derivado del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (GUS) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS), clonados corriente abajo de un fragmento de 800 pb que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen NPTII (neomicin phosphotransferase II) que confiere resistencia a kanamicina en plantas (figura 6). Este vector ha circulado ampliamente en las primeras etapas de la transformación de plantas y los datos acumulados en la literatura sobre su uso satisfactorio han generado mucha confianza. Adicionalmente, una característica conveniente de pBI-121, es que el reemplazo del gen GUS por otro gen puede crear rápidamente un vector de sobreexpresión para el gen.

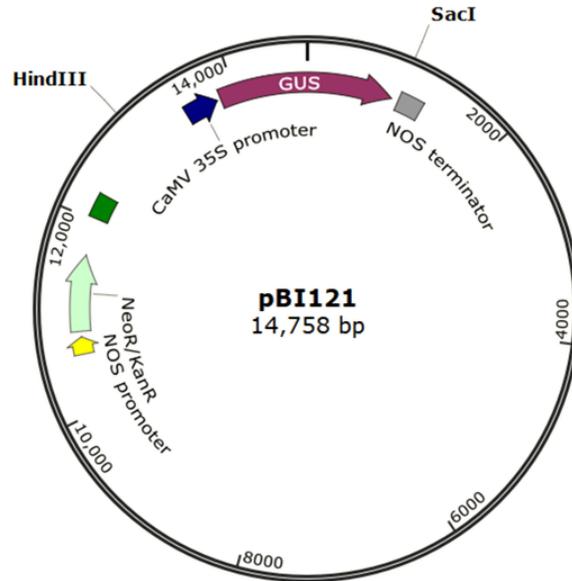


Figura 6. Estructura de pBI-121. Su tamaño es de 14,758 pb. Promotor 35S. NPTII. Neomicin fosfotransferasa. NOS- T. Sitio de terminación nopalinsintetasa. GUS β -glucuronidasa. NOS- P. Promotor nopalinsintetasa. Tomado de SnapGene Viewer.

pUC57MultiPRRS

El plásmido pUC57 es un derivado de pUC19 con 2710 pb de longitud. Contiene un marcador de resistencia a ampicilina más 6 sitios de restricción con extremos 3' salientes resistentes a la exonucleasa III de *E. coli*. Este vector está diseñado para la clonación y generación de eliminaciones de Exo III. Las posiciones exactas de los elementos genéticos se muestran en el mapa (codones de terminación incluidos) (figura 7). La replicación del ADN se inicia en la posición 890 (± 1) y procede en la dirección indicada. Adicionalmente, incluye la construcción quimérica de 4 péptidos de la GP5 del PRRSV previamente descritos. Cabe resaltar que en este trabajo se empleó únicamente para portar el inserto.

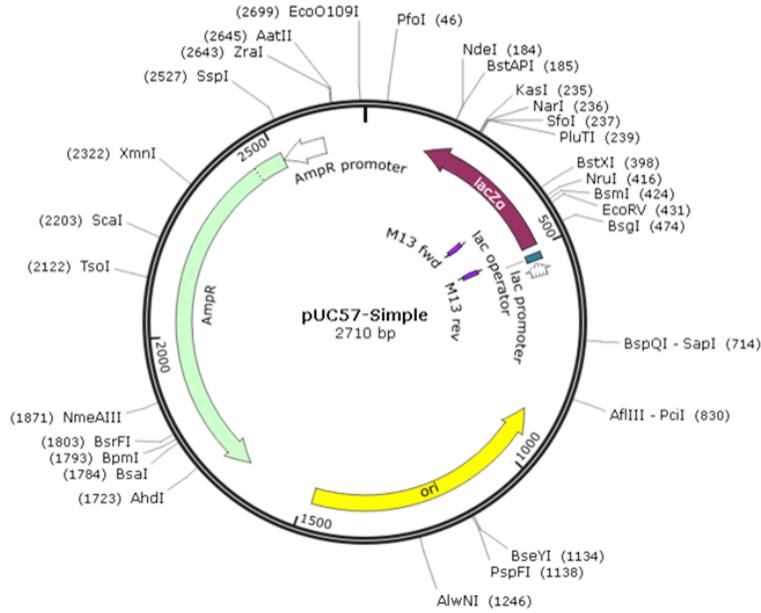


Figura 7. Estructura de pUC57MultiPRRS. AmpR. Marcador de resistencia a ampicilina. Ori. Origen de replicación. Promotor LacZ. Tomado de SnapGene Viewer.

CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La cepa bacteriana utilizada fue *Escherichia coli* TOP10. Entre los muchos sistemas disponibles para la producción de proteínas recombinantes, *Escherichia coli* es el más ampliamente utilizado en biotecnología debido a sus características de crecimiento rápido, alta densidad de producción y menor costo de los sustratos, además su genética está ampliamente caracterizada y aunado a esto, existe un gran número de cepas y vectores disponibles para su uso en este sistema (Baneyx, 1999). La cepa TOP10 de *E. coli* resulta ideal para la clonación y la propagación plasmídica de alta eficacia. Estas células permiten la replicación estable de plásmidos de alto número de copias.

Para obtener grandes cantidades del vector pBI-121, así como de pUC57MultiPRRS se procedió a la transformación por choque térmico de *E. coli* TOP10. Los viales de dichas células fueron descongelados y se agregaron 5 μ L de ambos plásmidos por separado, homogenizando las células con punta de micropipeta. Posteriormente, se

dejaron reposar en hielo 10 minutos y pasando este tiempo se colocaron los viales en baño María 1 min a 42°C, una vez realizado, los viales volvieron a permanecer en hielo por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 500 µL de medio líquido Luria Bertani (LB) (anexo 12) y se dejaron en incubación una hora a 37°C. El siguiente paso consistió en plaquear sobre agar LB kanamicina (100 mg/mL) para pBI-121 y LB ampicilina (100 mg/mL) para pUC57MultiPRRS con el objetivo de recuperar las células transformadas (anexo 13). Las colonias aisladas desarrolladas a las 24 h fueron seleccionadas y cultivadas en medio líquido LB kanamicina (100 mg/mL) o LB ampicilina (100 mg/mL).

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para purificar el ADN plasmídico proveniente de ambos vectores (pBI-121 y pUC57MultiPRRS) se utilizó el kit QIAprep® Miniprep de QIAGEN. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y fue de la siguiente manera:

1. Se centrifugaron 3-4 mL del cultivo líquido de noche a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el sobrenadante.
3. Se resuspendió el pellet celular en 250 µL de Buffer P1.
4. Se añadieron 250 µL de Buffer P2 (lisis celular) y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente de 4 a 6 veces hasta que la solución se hiciera clara y sin permitir que pasaran más de 5 minutos.
5. Se añadieron 350 µL de Buffer N3 (neutralización) y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces.
6. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm.
7. Se tomaron 800 µL de sobrenadante y se colocaron en una columna del mismo kit, centrifugando a 13,000 rpm por 30 s dos veces.
8. Se lavó la columna agregando 700 µL de Buffer PE centrifugando a 13,000 rpm por 60 s dos veces.

9. Se coloca la columna en un tubo Eppendorff y se agregaron de 20 a 50 μL de agua estéril para eluir. Se dejó reposar un minuto y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min.

Para analizar el ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa al 1% (anexo 3), colocando 3 μL de muestra con 2 μL de buffer de carga (6X).

CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV PARA TRANSFORMACIÓN NUCLEAR

DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para comenzar con la construcción se realizaron digestiones por separado para el vector binario pBI-121 y para pUC57MultiPRRS, con las enzimas *Sac* I y *Sma* I con la finalidad de liberar el casete del gen GUS del vector pBI-121 y el gen de interés del vector de clonación pUC57MultiPRRS.

Reacción de digestión a 25 μL :

- | | |
|--|--|
| - H ₂ O | 1.5 μL |
| - Buffer CutSmart®
(New England Biolabs, EUA) | 2.5 μL |
| - <i>Sac</i> I | 0.5 μL (37°C/2 h de incubación) |
| - ADN | 20 μL |
| - <i>Sma</i> I | 0.5 μL (25°C/2 h de incubación) |

Las digestiones se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se separaron por electroforesis. Los fragmentos obtenidos se recuperaron y purificaron con el kit de extracción QIAEX II Gel Extraction Kit de QIAGEN (Cat No. 20021).

CLONACIÓN DEL INSERTO MULTIPRRS EN EL VECTOR BINARIO pBI-121

Para la ligación, se mezclaron 5 μL de pBI-121 y 5 μL del inserto PRRS en un tubo Eppendorff, se añadió 1 μL de la enzima ADN ligasa (New England Biolabs, EUA),

la reacción se incubó a 4°C toda la noche y se transformó *E. coli* TOP10 por choque térmico, se plaqueó sobre agar LB kanamicina (100 mg/mL) para recuperar las células transformadas y finalmente analizar las clonas por perfil de restricción.

PCR

Se analizó mediante PCR el ADN extraído de 5 colonias aisladas transformadas con la construcción LTB-PRRSV. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron para amplificar el gen de interés y fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. El amplicón esperado era de 245 pb.

OLIGONUCLEÓTIDOS PRRS:

F 5'-ACCGCAACACCCAGATCTAC-3'

R 5'-GGGGTCTTGTTGTTCCACAC-3'

A continuación, se muestra el programa utilizado para dicha reacción:

Desnaturalización inicial----5 min a 95°C

	Desnaturalización	40s a 95°C
35 ciclos	Alineamiento	30s a 55°C
	Extensión	30s a 72°C

Extensión final----5 min a 72°C

La mezcla maestra de reacción (25 µL) contenía ADN genómico (100 ng), buffer de Taq polimerasa (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.2 mM), oligonucleótidos (1 µM) y Taq polimerasa (1U/µl). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador MultiGene™ Mini Personal Thermal Cycler de la empresa Labnet EUA. Después de la amplificación, las muestras se separaron aplicando corriente eléctrica a 100 V

constantes en geles de agarosa al 1%, en buffer TAE 1X (anexo 2), los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador.

PERFIL DE RESTRICCIÓN

El ADN de las clonas obtenidas fue analizado mediante el perfil de restricción obtenido con las enzimas *Hind* III y *Sac* I.

TRANSFORMACIÓN DE *A. TUMEFACIENS* CON LA CONSTRUCCIÓN LTB- PRRSV

Se electroporaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV 1301 para transferir la construcción LTB-PRRSV mediante el siguiente procedimiento:

1. Previo a su uso, las células de *A. tumefaciens* fueron descongeladas en hielo y la celda de electroporación fue enfriada en hielo.
2. Se agregaron 4.0 µL de ADN a 50 µl de células competentes.
3. Posterior a la incubación en hielo por 2 minutos se transfirieron las células a una celda de electroporación Bio-Rad (0.1 mm) para aplicar el pulso bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25µF, 400Ω, 2.5 kV por 8-9 milisegundos) en un equipo MicroPulser™ Bio- Rad, EUA.
4. Se añadieron a la celda 500 µL de medio de cultivo LB y se transfirió la solución a un tubo Eppendorff de 1.5 mL.
5. Las células se recuperaron a 28°C por dos horas en ausencia de luz.
6. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos y la pastilla celular se resuspendió en 200 µl de medio de cultivo LB, se inoculó en medio de selección (LB con 100 mg/L de kanamicina) para su cultivo por 2 días a 28°C.

Nota: Las bacterias transformadas se desarrollan en el medio de selección debido a que el plásmido transferido confiere resistencia a kanamicina.

PCR

Para corroborar la transformación de *A. tumefaciens* con la construcción LTB-PRRSV fue empleada la técnica de PCR antes descrita. Se analizó el ADN extraído de 2 colonias aisladas utilizando los oligonucleótidos PRRS cuyo amplicón esperado era de 245 pb.

OBTENCIÓN DE EXPLANTES

Se obtuvieron varios tallos provenientes de un cultivo de tabaco wild type (WT), proporcionado por personal del laboratorio, los cuales fueron sembrados en medio de enraizamiento (MS) sin antibiótico para su regeneración hasta la obtención de hojas jóvenes (anexo 10 y 11).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DEL TABACO

Para la transformación se utilizaron 7 hojas jóvenes de cuatro semanas, las cuales fueron seccionadas con una navaja nueva de bisturí sobre papel absorbente humedecido con H₂O estéril para evitar la deshidratación del tejido. Posteriormente, fueron colocadas en una suspensión de *A. tumefaciens* (OD_{600nm}= 0.5-0.6) que portaba el plásmido LTB-PRRSV durante 10 min. Después, fueron transferidas a una caja con H₂O estéril y se retiró el exceso de humedad sobre papel absorbente seco y se seccionaron las hojas en fragmentos de 1 cm².

Los fragmentos de hoja fueron colocados en medio RMOP (medio de regeneración) sin antibiótico (anexo 10 y 11) durante dos días en ausencia de luz y transcurrido el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron a medio RMOP adicionado con 100 mg/L de kanamicina como agente de selección y 250 mg/L de cefotaxima para eliminar a la bacteria.

OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Como ya se mencionó en el punto anterior, los tejidos obtenidos resultantes de la transformación fueron subcultivados cada dos semanas en medio RMOP con antibiótico (100 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de cefotaxima), seleccionando solo los explantes resistentes a la selección con presencia de brotes y callos. Las plántulas provenientes de los callos fueron colocadas en medio para enraizar (MS) adicionado con 100 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de cefotaxima. Una vez formada la raíz, las plantas fueron transferidas a tierra hasta alcanzar una altura de 30 cm. Los medios de cultivo y plantas fueron mantenidos en una cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones ambientales: 16 h luz/ 8 horas de fotoperiodo a 25°C en condiciones normales de luz [100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$] y humedad (30- %).

ANÁLISIS DE TRANSFORMANTES

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico se aisló del tejido vegetal siguiendo el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) el cual se describe a continuación:

1. Se añadieron 600 μL de buffer de extracción de plantas al pellet de biomasa en tubo Eppendorf.
2. Los tubos fueron incubados a 65°C por 15 minutos con agitación suave periódicamente.
3. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 minutos.
4. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se añadió 1 volumen de fenol-cloroformo.
5. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 minutos.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 500 μL de isopropanol más 50 μL de acetato de sodio 3M.
7. Se incubó a -80°C por 15 minutos.
8. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.

9. Se lavó con 500 μ L de etanol al 70%.
10. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 3 minutos.
11. Se dejó secar la pastilla.
12. El ADN se disolvió en 20 μ L de H₂O más 10 μ L de RNAsa.
13. Se incubó a 37°C por 1 H.
14. Finalmente, se almacenó a -20°C hasta su uso.

PROTOCOLO DE PCR

El ADN extraído de las hojas de 7 plantas adultas transformadas con la construcción LTB-PRRSV, fue analizado bajo la técnica de PCR previamente descrita utilizando los oligonucleótidos PRRS cuyo amplicón esperado era de 245 pb. Después de la amplificación, las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1%, sometido a corriente eléctrica a 100 V constantes para separar los productos en TAE 1X (anexo 2), los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV en un fotodocumentador.

RESULTADOS

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y ELECTROFORESIS

EN GEL DE AGAROSA

Mediante la utilización de este método de extracción y purificación se obtuvo un ADN plasmídico de gran pureza proveniente de ambos vectores (pBI-121 y pUC57MultiPRRS). Al visualizar el gel de agarosa al 1% se observó que dichas muestras fueron de buena calidad para continuar con los siguientes procesos (figura 8 y 9).

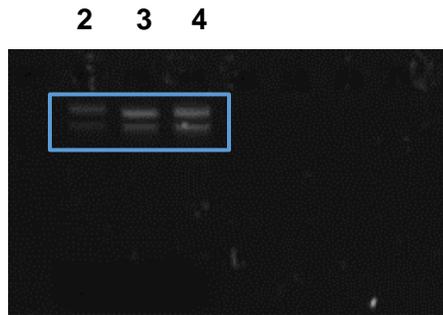


Figura 8. Calidad del ADN plasmídico del vector pBI-121. (2: colonia. 1, 3: colonia 2, 4: colonia 3)



Figura 9. Calidad del ADN plasmídico del vector pUC57MultiPRRS. (2: colonia. 1, 3: colonia 2, 4: colonia 3).

CONSTRUCCIÓN LTB-PRRSV PARA TRANSFORMACIÓN NUCLEAR

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El vector pBI-121 fue digerido con las enzimas de restricción *Sma* I y *Sac* I, con la finalidad de liberar el casete del gen GUS con un tamaño esperado de 1800 pb (figura 10). Así mismo, el vector pUC57MultiPRRS fue digerido con las mismas enzimas liberando el gen de interés cuyo tamaño era de 520 pb (figura 10). Se tomaron las bandas del vector pBI-121 y el gen de interés para ser purificados mediante el kit QIAEX II Gel Extraction de QIAGEN (figura 11) y de esta manera proceder a la ligación.

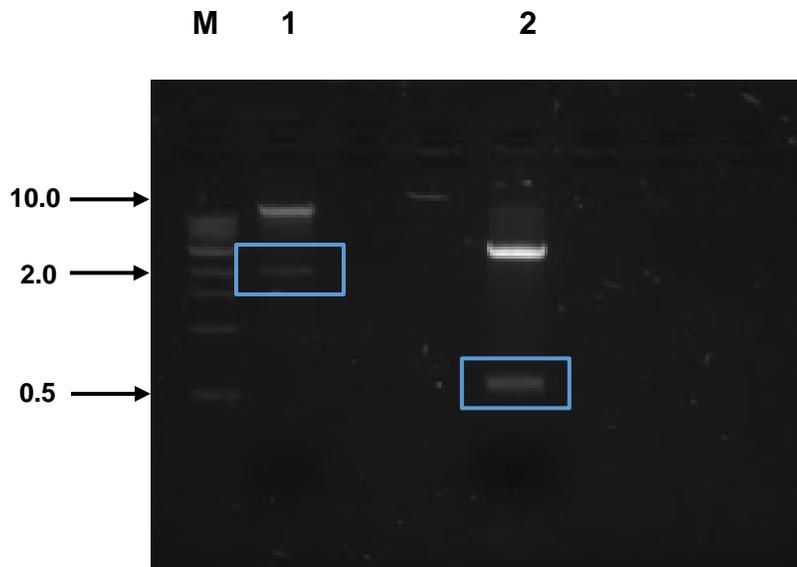


Figura 10. Digestión del vector pBI-121 y pUC57 con las enzimas *Sma* I y *Sac* I. M: Marcador de pares de bases 1Kb; 1: vector pBI-121 digerido, se muestra la liberación del fragmento de 1,800 pb correspondiente al gen GUS; 2: vector pUC57 digerido, se muestra la liberación del fragmento de 520 pb correspondiente al gen de interés.



Figura 11. Calidad de la purificación de banda. 1: pBI-121; 2: inserto MultiPRRS.

CLONACIÓN DEL INSERTO MULTIPRRS EN EL VECTOR BINARIO pBI-121

Se realizó una doble ligación del inserto MultiPRRS y el vector pBI-121, y con dicha ligación se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (TOP10), que fueron inoculadas en medio de selección (LB + 100 mg/mL kanamicina) obteniendo 5 clonas a las cuales se les realizó PCR con los oligonucleótidos PRRS previamente descritos, así como un perfil de restricción para comprobar si el inserto MultiPRRS había sido correctamente clonado.

PCR

Se evaluaron mediante esta técnica las 5 clonas de las cuales, solo tres mostraron el amplicón esperado correspondiente a 245 pb. Como control positivo se utilizó el plásmido Puc57MultiPRRS (figura 12).

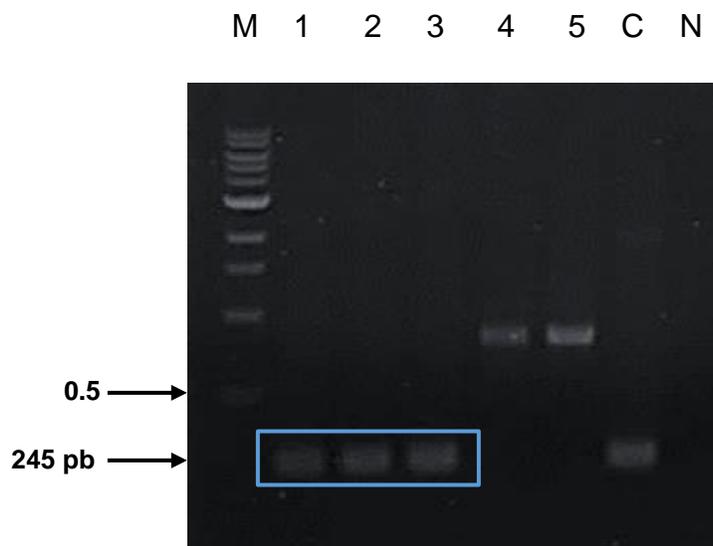


Figura 12. PCR para detección de clonas transformadas. M: Marcador de pares de bases 1Kb; 1 a 5: clonas evaluadas; C: control positivo plásmido pUC57MultiPRRS; N: negativo (H₂O).

PERFIL DE RESTRICCIÓN

El perfil de restricción se realizó solo con las 3 clonas positivas a PCR y se utilizaron las enzimas de restricción *Hind* III y *Sac* I. Estas clonas resultaron positivas al obtener una banda esperada de 1408 pb; como control también se realizó la digestión del vector pBI-121; en este caso la banda esperada era de 2765 pb (figura 13).

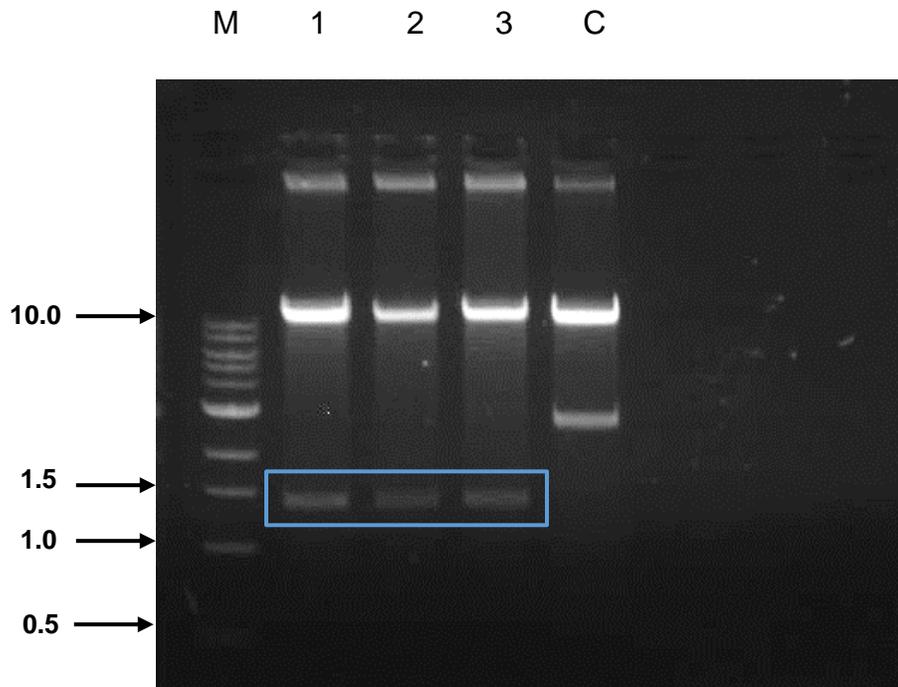


Figura 13. Perfil de restricción con *Hind* III y *Sac* I. 1 a 3: Clonas transformadas; C: Control (vector completo pBI-121).

TRANSFORMACIÓN DE *A. TUMEFACIENS* CON LA CONSTRUCCIÓN LTB- PRRSV

La construcción LTB-PRRSV fue transferida a *A. tumefaciens* mediante electroporación. Después de dos días de cultivo en medio de selección se presentó desarrollo bacteriano, lo cual indicó que la transformación fue exitosa.

La presencia del plásmido fue confirmada a través de la prueba PCR, en la que se visualizó el plásmido en las dos muestras seleccionadas con un tamaño esperado de 245 pb (figura 14).

PCR

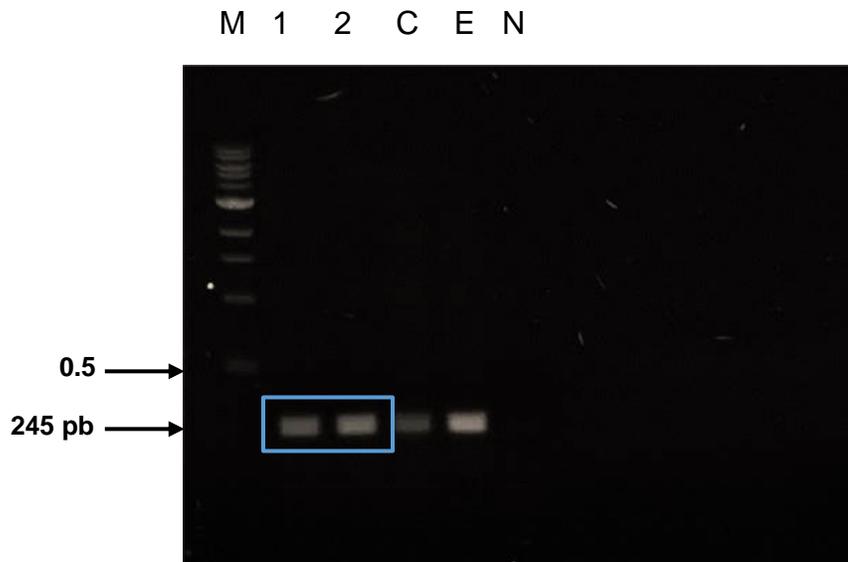


Figura 14. PCR para confirmar transformación de bacterias *A. tumefaciens*. M: marcador de pares de bases 1Kb; clonas 1 y 2; C: control positivo plásmido pUC57MultiPRRS; E: construcción LTB-PRRSV en *E.coli*; N: negativo.

OBTENCIÓN DE EXPLANTES

El crecimiento de los explantes se llevó a cabo de acuerdo a lo esperado, obteniendo plántulas con hojas jóvenes de 4 semanas que fueron empleadas para la transformación genética nuclear.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA NUCLEAR DEL TABACO

La infección de hojas de tabaco con el plásmido binario LTB-PRRSV se realizó como se describe en la sección de metodología. Las hojas de tabaco infectadas con dicho plásmido fueron colocadas en medio de selección (RMOP + 100mg/L kanamicina + 250 mg/L cefotaxima) hasta la formación de brotes y callos organogénicos (figura 15).

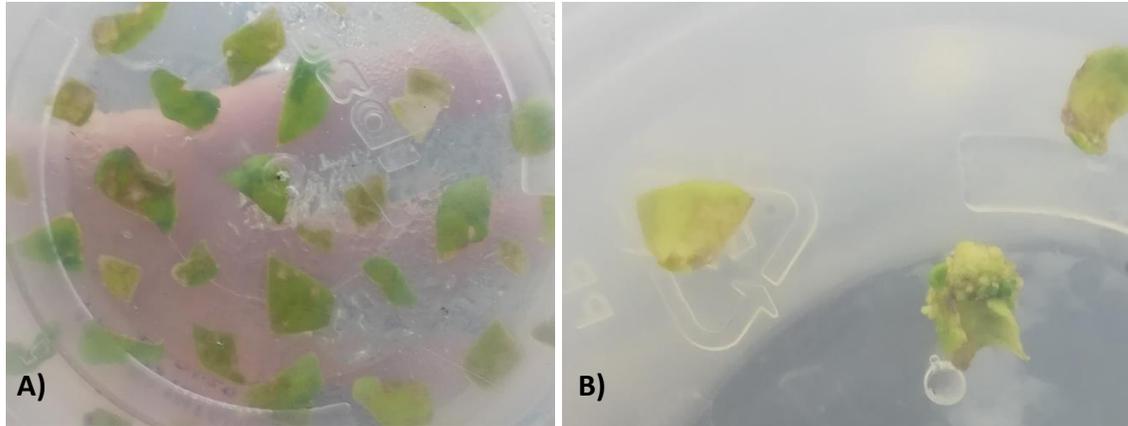


Figura 15. Formación de brotes y callos de tabaco a partir de hojas infectadas con el plásmido binario LTB-PRRSV. A) Callo después de 2 semanas posterior a la transformación. B) Callos a las 3 semanas posteriores a la transformación.

OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Las plántulas obtenidas de los callos fueron colocadas en medio MS de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de metodología. Una vez formada la raíz, fueron sembrados cuidadosamente en tierra. La regeneración de plantas de tabaco en medio de selección es un buen indicio de que la transformación fue exitosa para la construcción LTB-PRRSV (figura 16).



Figura 16. Representación esquemática de la transformación del tabaco vía *A. tumefaciens* y regeneración de la planta mostrando el tiempo acumulado para llegar a cada una de las etapas.

ANÁLISIS DE TRANSFORMANTES

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para comprobar la presencia del transgén, se realizó la prueba PCR del ADN extraído de las hojas de las 7 plantas de tabaco obtenidas mediante transformación nuclear, el resultado se muestra en la figura 17 en donde se observa la amplificación del fragmento esperado de 245 pb correspondiente a un segmento del gen LTB-PRRS.

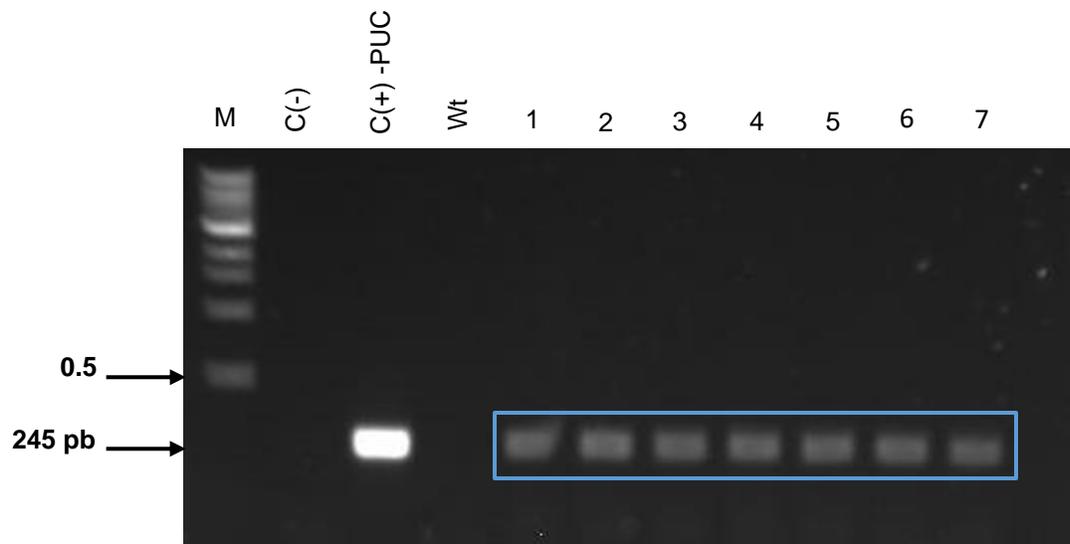


Figura 17. Detección por PCR de las plantas transgénicas portadoras del gen LTB-PRRSV. M: marcador de pares de bases 100 pb; C (-): control negativo (H₂O); C (+) plásmido Puc57MultiPRRS; Wt: muestra tabaco sin transformar; 1 a 7 ADN de plantas de tabaco transgénicas líneas L1-L7.

DISCUSIÓN

El PRRSV constituye uno de los problemas económicos más grandes de la industria porcina. Afecta a cerdos de todas las edades, causando problemas reproductivos y respiratorios que generan pérdidas económicas millonarias. Debido a las características genéticas y antigénicas del virus, constantemente han surgido nuevas variantes virales identificadas en nuevos brotes, esto hace que las estrategias actuales para su control sean ineficientes y que el virus logre diseminarse fácilmente.

Una de las principales herramientas para dicho control ha sido la vacunación, sin embargo, se han revelado numerosos problemas de seguridad y eficacia de las vacunas actualmente disponibles, tales como, la diseminación por MLV, así como, reversión a la virulencia, recombinación entre cepas de campo y vacunal (MLV) y la incapacidad de obtener inmunidad protectora contra virus heterólogos (Nan Y, *et al.*, 2017). Es por ello que, a lo largo de los años se han creado nuevos prototipos de vacunas que incluyen, vacunas de ADN, diferentes sistemas de expresión de antígenos del PRRSV, además de los avances en biología molecular que han permitido el desarrollo de vacunas que utilizan la manipulación genética, péptidos sintéticos y vacunas anti-idiotipo (anticuerpos que reproducen la morfología de un antígeno) (Zheng CF, *et al.*, 2006). Todas estas estrategias han contribuido al conocimiento de distintos inmunógenos que inducen un título alto de AcN, así como inducir una respuesta celular eficiente mediante la producción de IFN- γ . Sin embargo, a pesar de los adelantos logrados, aún no se cuenta con una vacuna recombinante capaz de generar una respuesta inmunológica óptima contra el virus.

Por lo anterior, en este estudio se buscó la expresión de una proteína quimérica basada en oligopéptidos de la proteína GP5 del PRRSV en planta de tabaco que será empleada posteriormente para su evaluación inmunogénica y protectora.

Como ya se ha mencionado, estudios recientes demostraron que el ectodominio de la GP5 está sujeto a recombinación genética y bajo presión inmunológica, favorece que el PRRSV evada la respuesta inmune del cerdo (Macías *et al.*, 2006). Esto es

de suma importancia ya que, cualquier cambio en las regiones inmunogénicas alterarían el reconocimiento de anticuerpos frente a virus heterólogos. Por esta razón, en este estudio se utilizaron 4 oligopéptidos los cuales conforman epítomos de la proteína GP5, los cuales fueron evaluados por García P. (2019) demostrando que éstos tienen un grado de conservación mayor al 96% y que son capaces de ser reconocidos por anticuerpos específicos presentes en sueros de cerdo obtenidos de granjas con circulación del virus de distintos estados de la República Mexicana. La expresión de estos epítomos que son altamente conservados de forma simultánea nos daría la ventaja de que en caso de ser inmunoprotectores estarían contenidos dentro de una misma molécula pudiendo obtener de esta manera una vacuna multitarget segura y eficaz para el control de la enfermedad.

En la actualidad, la mayoría de las vacunas se basan en virus completo, ya sea inactivado o atenuado, o mediante la inclusión en la vacuna de componentes antigénicos seleccionados del patógeno (vacunas de subunidades) (Sette A, 2003). Hasta la fecha, el enfoque de la utilización del virus completo ha sido claramente el más exitoso, sin embargo, no lo ha sido en las vacunas disponibles para el PRRSV, por ello las vacunas basadas en regiones relacionadas a epítomos inmunodominantes muestran ventajas significativas, tales como eliminación de respuestas inmunes indeseables asociadas al virus; generación de inmunidad prolongada con las respuestas requeridas para aumentar la potencia y la capacidad de enfocar las respuesta inmune en los epítomos conservados, así como la rentabilidad al reducir costos y tiempo de producción.

Se ha reportado que construcciones de un solo oligopéptido conllevan a una baja inmunogenicidad, esto ha originado la idea de diseñar construcciones con múltiples oligopéptidos, ya que podría mejorar tanto la antigenicidad como la inmunogenicidad de las vacunas (Parvizpour S, *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, se espera que la construcción quimérica LTB-PRRSV de este estudio tenga un buen resultado en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Adicionalmente, esta construcción contiene al acarreador inmunogénico LTB. Esta enterotoxina termolábil es una proteína bacteriana bien caracterizada que tiene un

gran potencial como adyuvante de mucosas (Clements *et al.*, 1988). La proteína LT está compuesta de dos subunidades codificadas por un operón; la subunidad A tóxica (LTA) de 28-kDa y una subunidad B pentamérica (LTB) de 60- kDa, las cuales tienen diferentes características moleculares y biológicas en asociación con la patogénesis e inmunidad del hospedero. La estructura del pentámero B contiene la función de unión al receptor celular (Yamamoto T, Tamura T, Yokota T, 1984). El principal receptor de LTB es el gangliósido GM1, un glucoesfingolípido que se encuentra de forma ubicua en la superficie de las células de mamíferos. Las interacciones de los enlaces de hidrógeno dentro de cada uno de los cinco bolsillos formados por el pentámero de la subunidad B permiten que LTB se una a GM1 con una afinidad extremadamente alta (Sixma TK, *et al.*, 1991). La actividad de unión al receptor de LTB es necesaria para la captación e internalización del complejo AB5 por las células blanco. La subunidad A es la porción tóxica de LT, se internaliza y posteriormente estimula el sistema adenilato ciclasa-AMP cíclico, lo que lleva a una elevación exponencial y no regulada del AMPc intracelular. En las células intestinales intoxicadas, la elevación de cAMP da como resultado una secreción masiva de electrolitos y agua en la luz intestinal, que se manifiesta clínicamente como diarrea. Por tanto, la subunidad A es responsable de la toxicidad de LT (Spangler BD, 1992 y De Haan L, *et al.*, 1998). Rosales- Mendoza y colaboradores (2009) han demostrado que LTB puede actuar como un acarreador y adyuvante eficaz de proteínas extrañas ligadas genéticamente para inducir una respuesta inmune eficiente en ratones y humanos cuando se expresa en plantas. La respuesta inmunomoduladora de LTB tiene que ver con su capacidad para mejorar la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II), activar la diferenciación selectiva de linfocitos; influir en la maduración y activación de las células dendríticas, así como aumentar la expresión de marcadores de activación en linfocitos B (MHC clase II, B7, CD40, CD25). Además, LTB puede aumentar la respuesta de citocinas de tipo 1 y 2 (Th1 y Th2) de acuerdo al antígeno acoplado a LTB.

En un estudio realizado por Chia M y colaboradores (2011) no encontraron diferencias significativas en la respuesta inmune de las dos construcciones

elaboradas, LTB-GP5-T y GP5-T. Los cerdos que recibieron LTB-GP5-T o GP5-T desarrollaron inmunidad mediada por células y anticuerpos específicos del PRRSV, mostraron una viremia y carga viral tisular significativamente más bajas y lesiones pulmonares menos marcadas que la planta de tabaco de tipo silvestre (W-T). El grupo tratado con LTB-GP5-T tuvo una respuesta inmune relativamente más alta que el grupo tratado con GP5-T, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Una de las teorías para este resultado es que la mayor parte de la GP5 derivada de plantas en LTB-GP5-T o GP5-T podría ser capturada eficazmente por el tejido linfoide asociado al intestino incluso sin la ayuda de la LTB pentamérica. En este proyecto se trabajó con una sola construcción que incluye LTB, sin embargo, en futuros estudios sería relevante obtener otra construcción sin LTB para evaluar la inmunogenicidad sin la presencia de este acarreador.

Por otra parte, dado las ventajas que ofrecen las plantas como biofábricas de antígenos recombinantes, se adoptó esta plataforma para expresar el antígeno de interés empleando un gen optimizado para su expresión. Esta tecnología se ha investigado activamente en los últimos 20 años, dando como resultado un sistema novedoso y flexible (Loza-Rubio y Rojas- Anaya, 2018; Fischer R, *et al.*, 2004; Twyman RM, Schillberg S y Fischer R, 2013). Las regulaciones asociadas con las vacunas veterinarias son significativas, pero aún menos costosas que las asociadas con los productos farmacéuticos humanos, por lo tanto, las formulaciones crudas o parcialmente purificadas y la administración oral se consideran viables para estas aplicaciones. Por lo anterior, el desarrollo de vacunas de uso veterinario que se producen en plantas es un campo de investigación en expansión constante, por ejemplo, se han realizado estudios para la gastroenteritis transmisible porcina (Tuboly T, *et al.*, 2000), la enfermedad de Newcastle (Zhao Y, y Hammond RW, 2005), enfermedad hemorrágica de los conejos (Castanon S, *et al.*, 1999), fiebre aftosa (Wigdorovitz A, *et al.*, 1999), entre otras.

Dentro de este estudio se seleccionó al tabaco como sistema de expresión debido a su facilidad para la transformación genética y la rápida regeneración (Horsch *et al.*, 1985). La planta de tabaco es el biorreactor vegetal de elección para explorar de

forma inicial la expresión de proteínas recombinantes, aunque generalmente no se considera una planta adecuada para la producción de vacuna comestible por los compuestos tóxicos que contiene, tales como alcaloides (claridades agropecuarias, 2001). Esta información debe ser tomada en cuenta al momento de establecer la vía de administración para el prototipo de vacuna LTB-PRRSV en estudios subsecuentes, ya que de administrarse por vía oral sería necesario purificar la proteína, o bien, garantizar la dosis antigénica en dosis bajas de biomasa.

Cabe destacar que existen estudios sobre la evaluación de la inmunogenicidad del tabaco transgénico que contiene el antígeno GP5 del PRRSV, este fue administrado vía oral mezclado con el alimento a un grupo de cerdos, demostrando que se desarrollaron respuestas inmunes humorales y celulares específicas contra este virus. (Chia *et al.*, 2010). Por otra parte, diversos estudios han reportado la evaluación de antígenos del PRRSV expresados en diferentes cultivos como la papa (Chen y Liu, 2011) en donde los ratones inmunizados intragástricamente con el extracto de papa transgénico soluble que expresaba la proteína GP5, generaron anticuerpos específicos en mucosa intestinal y suero. En otro estudio se modificaron genéticamente callos de maíz para producir la proteína M del PRRSV. El extracto soluble fue administrado por vía oral mediante una sonda a un grupo de ratones BALB/c induciendo anticuerpos específicos de mucosa intestinal y suero. Dichos anticuerpos mostraron actividad neutralizante. Con estos resultados se demuestra que las plantas de maíz transgénicas son un sistema adecuado para la producción de vacunas administradas vía oral para la generación de respuestas inmunes específicas contra el PRRSV (Hu *et al.*, 2012).

La soya ha sido otro modelo de estudio, aquí se realizó una construcción que lleva como antígeno a la proteína N del virus de PRRS. Se observó una inducción significativa de una respuesta inmune específica, tanto humoral como de mucosa después de la inmunización intragástrica de ratones hembra BALB / c con el extracto soluble de semillas de soya transgénicas. Estos hallazgos proporcionan una evidencia y sirven como un paso crítico en el desarrollo de una vacuna subunitaria

contra PRRSV empleando a las plantas como sistema de expresión y producción eficiente (Vimolmangkang *et al.*, 2012).

En nuestro estudio se logró la transformación nuclear del tabaco con la construcción LTB-PRRSV, obteniéndose plantas adultas resistentes al agente de selección. El vector empleado pBI-121, permitió la expresión constitutiva del gen de interés en las plantas. La transformación nuclear se realizó exitosamente empleando *Agrobacterium*, el cual ya ha sido ampliamente estudiado y probado en diversas investigaciones (Kang TJ, *et al.*, 2006; Shen WJ y Forde BG, 1989; Wang Y, *et al.*, 2009) y que posee varias ventajas frente a otros sistemas de transformación. Entre estas destacan, la simplicidad técnica de los protocolos no requiere de equipos sofisticados, pueden ser empleados diferentes tipos de tejidos vegetales, la integración del T-ADN es un proceso relativamente preciso, la región de ADN a ser transferido es definida y hay baja probabilidad de rearrreglos.

Es importante mencionar que, en la transformación nuclear, el gen foráneo se incorpora de manera estable al genoma de la planta, se transcribe y se hereda a las siguientes generaciones; esta última sería la gran ventaja que dicho sistema ofrece (Kaprowski y Yusibov, 2001). Sin embargo, la cantidad de proteína que se obtiene es baja (0.01%-2% de la proteína total soluble, PTS) incluso después de haber optimizado el gen para su expresión en plantas.

Existen otros métodos de transformación para obtener mayores rendimientos de proteína, tales como la transformación de cloroplastos, cuyas ventajas sobre la transformación nuclear son: la ausencia de efectos epigenéticos como silenciamiento o cosupresión, no existen problemas de toxicidad o interferencia en el desarrollo de la planta ya que las proteínas recombinantes se acumulan en el interior del cloroplasto y lo más relevante, los elevados niveles de expresión debido a que cada cloroplasto presenta un gran número de copias de su cromosoma, y cada célula presenta un número elevado de cloroplastos (Rigano MM, *et al.*, 2005). El número de copias del ADN del cloroplasto por célula puede ser hasta 10,000 lo que puede dar como resultado una acumulación de hasta 47 % de las proteínas

totales solubles (Ruiz O, *et al.*, 2005). Sin embargo, esta tecnología demanda tiempos de hasta un año para generar las líneas transplastómicas.

Lo anterior abre la posibilidad de continuar trabajando con esta línea de investigación al tomar como base la quimera LTB-PRRSV tanto para infectar diferentes cultivos con métodos de transformación alternos, como para estudios subsecuentes donde se realicen pruebas de inmunogenicidad y antigenicidad, evaluando así la efectividad de las vacunas resultantes ante desafíos con cepas heterólogas.

El análisis por PCR logró demostrar la presencia del transgén en las siete muestras de ADN obtenidas de las hojas de las plantas adultas, lo cual es indicativo de una transformación exitosa; sin embargo, serán requeridos estudios adicionales para asegurar una transformación estable, es decir, que el transgén sea heredado a las siguientes generaciones de plantas, confirmando su expresión y los niveles de proteína obtenidos.

Con respecto a las ventajas de la producción de farmaquímicos de interés en plantas, si bien en este proyecto la transformación del tabaco resultó exitosa, es importante mencionar que un factor crítico a considerar de estos sistemas es el tiempo, ya que para la obtención de la primera cosecha de la planta que expresa la proteína recombinante, es necesario previamente preparar los vectores de expresión, transformar, regenerar y cultivar las plantas, así como evaluar varias generaciones con el fin de asegurar que la expresión de estas sustancias es estable y que la sustancia de interés es funcional. El tiempo estimado de todo el proceso puede ir desde 4 meses hasta 1 año dependiendo del sistema vegetal que esté siendo utilizado.

Además del tabaco, existen diversas especies de plantas potenciales utilizadas para la producción de proteínas farmacéuticas como: lechuga, zanahoria, tomate, maíz, papa, alfalfa, soya, plátano y arroz (Peterson y Arntzen, 2004). En caso de que en estudios subsecuentes el prototipo de vacuna LTB-PRRSV se desee administrar por vía oral, se podría proponer otro diseño experimental para utilizarlo en la transformación en cultivos comestibles tales como el plátano, papaya u otros, siendo

estos las mejores opciones, ya que son hospedadores ideales al ser cultivos comestibles que no contienen compuestos tóxicos para la producción de vacunas orales (Chan HT, *et al.*, 2013; Fragoso G, Hernández M, Cervantes-Torres J, *et al.*, 2017). No obstante, será necesario conocer con seguridad los niveles de expresión de la molécula en la planta con el fin de ajustar la dosis de manera adecuada.

CONCLUSIONES

El presente proyecto demostró que es posible realizar la transformación nuclear de la planta de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens* con el gen LTB-PRRSV, obteniendo callos y brotes resistentes al agente de selección.

El análisis por PCR demostró la correcta transferencia del transgén LTB-PRRSV en plantas adultas. Sin embargo, será necesario realizar análisis subsecuentes de caracterización de la proteína mediante Western blot y ELISA para tener una estimación cuantitativa del nivel de proteína LTB-PRRSV obtenida en el tejido foliar del tabaco transgénico, lo anterior será indispensable para completar la investigación y con ello poder decidir si es conveniente realizar pruebas *in vivo* en cerdos o ratones.

Los elementos que componen a la construcción LTB-PRRSV han sido ampliamente probados con resultados alentadores, por lo anterior, se piensa que esta podría ser un candidato ideal para vacuna, donde se esperaría que se genere una respuesta inmune efectiva y duradera ante el desafío con cepas heterólogas. No obstante, es preciso realizar otros estudios donde sean probados diferentes cultivos y métodos de transformación para tener comparaciones objetivas sobre los rendimientos de proteína, tiempo y facilidad de regeneración.

En este trabajo se pudo observar la importancia de las ciencias como la biotecnología y la ingeniería genética en el desarrollo de plataformas innovadoras para la producción de proteínas recombinantes de aplicación en medicina veterinaria. En el caso del virus de PRRS, cuya naturaleza entre sus cepas es heterogénea, contar con una vacuna recombinante a base de epítomos altamente conservados será de gran impacto y apoyo a la porcicultura mexicana, ya que la vacunación sigue siendo la forma más importante y rentable para el control de las enfermedades infecciosas. Ningún otro medio ha tenido tal impacto al disminuir la morbilidad y la mortalidad. Por ello es imperativo continuar con esta línea de investigación que posee muchas vertientes a desarrollar.

Como en muchos estudios ha sido señalado y este no fue la excepción, la planta de tabaco fue un excelente modelo de experimentación por su facilidad de transformación, sin embargo, es importante resaltar que, al ser una planta no comestible, el riesgo de contaminación a la cadena alimentaria es muy bajo pues será necesario purificar la proteína. Esto se tomaría en cuenta en caso de ser procesado a gran escala.

PROSPECTIVAS

- 1.- Detectar la proteína LTB-PRRSV en extractos de plantas de tabaco transformadas y determinar su reactividad con sueros provenientes de cerdos infectados.
- 2.- Una vez caracterizada la antigenicidad de la proteína, se podrían realizar estudios adicionales como, ELISA-GM1 para la detección de LTB de origen vegetal y su afinidad por el receptor de gangliósido GM1 mediante la formación de una estructura pentamérica.
- 3.- Realizar pruebas *in vivo* mediante un desafío para evaluar la inmunogenicidad de la proteína.
- 4.- Evaluar una versión de antígeno que carezca de LTB para evaluar y comparar la efectividad de este acarreador inmunogénico.
- 5.- Tomar como base la quimera LTB-PRRSV para realizar otros estudios donde sean probados diferentes cultivos y métodos de transformación alternos para tener comparaciones objetivas sobre los rendimientos de proteína, tiempo y facilidad de regeneración.

REFERENCIAS

- Albina E, Carrat C, Charley B. 1998. Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interf. Cytokine Res.* 18:485–90
- Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74:10834–37.
- Amador GC. (2016). Evaluación del impacto económico del virus de PRRS en granjas porcinas de México. Tesis de maestría. FMVZ-UNAM.
- Amarilla S, Avalos A, Suarez M, Marecos E., & González, E. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): epidemiology, symptoms and lesions. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 5(2), 38-46.
- Azze, CRFO. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Pan American Health Organization (PAHO).
- Balasuriya UB, & MacLachlan NJ (2004). The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102(3), 107-129.
- Barfoed, A. M., Blixenkroner-Møller, M., Jensen, M. H., Bøtner, A., & Kamstrup, S. (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1–7 of PRRS virus. *Vaccine*, 22(27-28), 3628-3641.
- Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG., Doster, A. R., Nelson, E., & Osorio, F. A. (2002). Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 21(1-2), 21-29.
- Batista L, Murtaugh M, Pijoan C. (2003). Variación Genética de PRRSV. *Rev Anaporc*;23 (236):52-60.
- Batista. Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. [Documento web]. [Citado en: marzo 03, 2018]. Disponible en: biblioteca.Colanta.com.co/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=759.
- Brown E, Lawson S, Welbon C, Gnanandarajah J, Li J, Murtaugh MP, et al. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV Types I and II. *Clin Vaccine Immunol*; 16:628-635.

- Burgara-Estrella A, Díaz I, Rodríguez-Gómez, I Essler, S., Hernández, J., & Mateu, E. (2013). Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN- γ and IL-10. *Viruses*, 5(2), 663-677.
- Cancel-Tirado SM, Evans RB, Yoon KJ. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102:249–62 48.
- Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Trincado CA, Pijoan CB. (2007). Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res*; 68:565-571.
- Castanon S, Marin MS, Martin-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, et al. (1999). Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 73(5), 4452-4455.
- Chan HT, Chia MY, Pang V F, Jeng CR, Do YY, & Huang PL. (2013). Oral immunogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen expressed in transgenic banana. *Plant biotechnology journal*, 11(3), 315-324.
- Charentantanakul W, Platt R, Johnson W, Roof M, Vaughn E., & Roth, J. A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109(1-2), 99-115.
- Chen X. and Liu J. (2011) Generation and immunogenicity of transgenic potato expressing the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods*, 173, 153–158.
- Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, et al. (2011). Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 140(3-4), 215-225.
- Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL., Chang HW, Tsai YC, Lin CM, Pang VF and Jeng CR. (2010) Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 234–242.
- Cho JG, & Dee SA. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66(3), 655-662.

- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Althouse GC, Lunney J. (2008). Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Anim. Health Res. Rev.* 9:59–69.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ et al. (1995). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest*; 7:456-464.
- Claridades Agropecuarias (2001). Tabaco y soya. ASERCA. Disponible en: <https://www.cmdrs.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=89>. [Consultado en: Diciembre 2020).
- Clemens JD, Sack DA, Harris JR., Chakraborty J, Neogy PK., Stanton B, Huda, et al. (1988). Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large-scale field trial. *J. Infect. Dis.* 158, 372–377.
- DANILOVA S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian J. Plant Physiol.* 54(5):569-581.
- De Haan L, Verweij WR, Feil IK., Holtrop M, Hol WGJ, Agsteribbe E, & Wilschut, J. (1998). Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology*, 94(3), 424-430.
- De la Fuente González A, Lozano, JR, & Capdevila EF. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel*, 22(5), 252-258.
- Diosdado VF, González-Vega D, Moles-Cervantes LP, Morilla GA. (2004). Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgénico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Vet Mex*; 35 (2): 147-152.
- Fahrion, A. S., Grosse Beilage, E., Nathues, H., Dürr, S., & Doherr, M. G. (2014). Evaluating perspectives for PRRS virus elimination from pig dense areas with a risk factor based herd index. *Preventive veterinary medicine*, 114 (3-4), 247-258.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, & Twyman RM. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology*, 7(2), 152-158.

- Flores L, Hernández J (2010). Vacunas contra el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet Mex.*, 41 (2): 139-159.
- Fragoso G, Hernández M, Cervantes-Torres J, Ramírez-Aquino R, Chapula H, Villalobos, et al. (2017). Transgenic papaya: a useful platform for oral vaccines. *Planta*, 245(5), 1037-104.
- Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, Massie B, Dea S. (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol*; 148:951-972.
- Gagnon CA, Mardassi H, Gonin P, Massie B, & Dea, S. (1997). Adenovirus expression of ORFs 3, 5 and 7 products of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In *Proceedings of the 78th Conference for Research Workers in Animal Diseases* (pp. 10-11).
- García DJ. (2010). Plantas como fábricas de proteínas recombinantes humanas. *Cultura del cuidado*, 7(2), 39-50.
- García Plata, M. (2016). Desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/204397>
- García Plata, M. (2019). Identificación de epítopes conservados de la proteína GP5 del betaarterivirus suid 2 mediante herramientas bioinformáticas y su evaluación antigénica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3522578>
- GELVIN S (2003b). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends Biotechn.* 21(3):9598.
- GELVIN S (2010). Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation. *An. Rev. Phytopathol.* (Estados Unidos). 48:45-68.
- Gerner W Käser T & Saalmüller A (2009). Porcine T lymphocytes and NK cells—an update. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(3), 310-320.
- Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, & Gao H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *JIMB*, 38(12), 1879-1890.
- Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, Massie, B, & Dea, S. (1998). A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of virology*, 143(10), 1927-1940.
- Goyal SM. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*; 5:656–64.
- Greiser-Wilke I, Fiebig K, Drexler C, Beilage Grosse E. (2010). Genetic Diversity of Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet Micro*; 143:213-223.
- Haan, C., & Behrmann, I. (2007). A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods*, 318(1-2), 11-19.
- Han J, Wang Y, Faaberg KS. (2006). Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*. 122:175–82.
- Hellens, R.; Mullineaux, P. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci. Rev.* 5(10):446-451.
- Horsch RB, Fry JF, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT, (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229–1231.
- Hu J, Ni Y, Drymanb BA, Meng XJ and Zhang C. (2012) Immunogenicity study of plant-made oral subunit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vaccine*, 30, 2068–2074.
- ICTV (2020). Positive sense RNA viruses. *Virus Taxonomy: 2020 Release*. Tomado de: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/220/arteriviridae. [Consultado en Octubre 2020].
- Jacobs, M. (2003). Developing the *Agrobacterium* Ti plasmid as a vector for plant genetic engineering: the 2002 Benjamin Franklin Medal in life sciences presented to Mary-Dell Chilton. *J. Franklin Institute*. 340:213-219.
- Jiang W, Jiang P, Li Y, Tang J, Wang X, Ma S. (2006). Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol*; 113:169-180.
- Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu C, & Chen H. (2006). DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine*, 24(15), 2869-2879.

- Kang TJ, Han SC, Yang MS, & Jang YS. (2006). Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco plants. *Protein expression and purification*, 46(1), 16-22.
- Kappes MA, Faaberg KS. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*. 479–80:475–86.
- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Wilson P. (2007). Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol*. 145:11831191.
- Klinge KL, Vaughn EM, Roof MB, Bautista EM, Murtaugh MP. (2009). Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virol. J.* 6:177.
- Komori T, Imayama T, Kato N, Ishida Y, Ueki J, Komari T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiol*.145:1155-1160.
- Koprowski H, & Yusibov V. (2001). The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 19(17-19), 2735-2741.
- Koyama S, Ishii KJ, Coban C, & Akira S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336-341.
- Kwang J, Zuckermann F, Ross G, Yang S, Osorio F, Liu W et al. (1999). Antibody and cellular immune responses of swine following immunization with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci*;67:199-201.
- Lager WL, Vorwald KM, AC. (1995). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*; 7:3-16.
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, & Sharma R. (2007). Edible vaccines: current status and future. *Indian J Microbiol Res*, 25(2), 93.
- Leaflet AS. (2005). The Impact of PRRS on the Pig Cost of Production. Iowa State University Animal Industry Report.
- Li B, Fang L, Xu Z, Liu S, Gao J, Jiang Y, & Xiao S. (2009). Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerging infectious diseases*, 15(12), 2032.
- López M, Pardo R, Vega M. (2004). Vacunas de nueva generación. *Genoma Esp, Salud Hum*:7:12-15.
- López-Heydeck SM, Alonso-Morales RA, Mendieta-Zerón H, & Vázquez-Chagoyán, JC. (2015). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS): Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 6(1), 69-89.

- Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, & Zuckermann FA. (2015). Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 167(1-2), 1-14.
- Loza-Rubio & Gómez-Lim (2006). Producción de vacunas y otros compuestos biológicos en plantas transgénicas. *Vet Mex*, 37(4), 441-455.
- Loza-Rubio, & Rojas-Anaya. (2018). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). In *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine* (pp. 267-281). Springer, Cham.
- Lunney JK, Benfield DA, Rowland RRR. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res*;154 (1-2):1-6.
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, & Renukaradhya GJ. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual review of animal biosciences*, 4, 129-154.
- Ma JK-C, Drake PMW, Christou P (2003) Genetic modification: the production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794–805
- Macías MJ, Yépez-Plascencia G, Osorio F, Pinelli-Saavedra A, Reyes-Leyva, J, & Hernández, J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet Mex*, 37(2), 197-208.
- Mann JFS, Acevedo R, del Campo J, Pérez O, Ferro VA. (2009). Delivery systems: ¿A vaccine strategy for overcoming mucosal tolerance? *Expert Rev. Vaccines* 8:103–12.
- Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, Massie B, & Dea, S. (1998). A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol*, 72(8), 6298-6306.
- Mardassi H, Massie B, & Dea S (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 221(1), 98-112.
- Martínez-Bautista NR, Sciutto-Conde E, Cervantes-Torres J, Segura-Velázquez R, Mercado García MC, Ramírez-Mendoza H, & Sanchez-Betancourt JI. (2018). Phylogenetic analysis of ORF 5 and ORF 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México. *Transboundary and emerging diseases*, 65(4), 993-1008.

- Mcguirk p, Mccann c, Mills kh. (2002). Pathogenspecific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med*; 195:221-231.
- Meng XJ (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.*, 74(4), 309-329.
- Meulenber g JJ, Bende RJ, Pol JM, Wensvoort T G, Moormann RJ. (1995). Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*; 2:652-656.
- Meulenber g JJ, Petersen-Den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper, WM, & Wensvoort G (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 206(1), 155-163.
- Moormann RJ. (1993). Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol*. 74:1697-1701.
- Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, & Leung FCC. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*, 154(1-2), 18-30.
- Murtaugh MP, Xiao Z, & Zuckermann F. (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral immunology*, 15(4), 533-547.
- Murtaugh MP, Yuan S, Nelson EA, & Faaberg KS. (2002). Genetic interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in cell culture and in animals. *Journal of Swine Health and Production*, 10(1), 15-21.
- Nan Y, Wu C, Gu G, Sun W, Zhang YJ, & Zhou EM. (2017). Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective. *Frontiers in microbiology*, 8, 1635.
- Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol*. 80:297–305
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, et al. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*. 227(3):385–92.

- Nilubol D, Platt KB, Halbur PG, Torremorell M, Harris DL. (2004). The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol*; 102:11-18.
- Nodelijk G, De Jong MC, Van Leengoed LA, Wensvoort G, Pol JM, Steverink PJ et al. (2001). A quantitative assessment of the effectiveness of PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. *Vaccine*; 19:3636-3644.
- Ochoa RF. (2012) Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. PAHO. Disponible en: <https://www.paho.org/cub/dmdocuments/PubFINLAY-LIBROTeclnImmunoParaEClinVacunas2012.pdf>. [Consultado en: diciembre 2020).
- OIE (Oficina Internacional de Epizootias). (2008). Report of the OIE ad hoc Group on porcine reproductive and respiratory syndrome. Paris, 9-11 June. Fecha de consulta: mayo 2017. Disponible en: https://web.oie.int/download/SC/2014/A_SCAD_Feb2014.pdf. [Consultado en: diciembre 2020)
- Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., ... & Laegreid, W. W. (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology*, 302(1), 9-20.
- Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76:4241–50 47.
- Parvizpour S, Pourseif MM, Razmara J, Rafi MA, & Omid Y. (2020). Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. *Drug Discovery Today*, 25(6), 1034-1042.
- Peterson RK and Arntzen CJ. (2004) On risk and plant-based biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 22, 64–66.
- PITZSCHKE A, HIRT H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO J.* (Inglaterra). 29:1021-1032.
- Plagemann PG (2004). GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus research*, 102(2), 225-230.

- Plana-Duran J, Bastons M, Urniza A, Vayreda M, Vila X, & Mane H. (1997). Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, 55(1-4), 361-370.
- Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, Zhou YJ, Ni JQ, Luo YZ et al. (2005). Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol*; 106:309-319.
- Rao A, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Hahid A, Husnain T, Riazuddin S, (2009). The myth of plant transformation. *Biotechn. Adv.* 27:753-763.
- Renukaradhya GJ, Alekseev K, Jung K, Fang Y, Saif LJ. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral. Immunol.* 23:457–66.
- Rigano MM, & Walmsley AM. (2005). Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunology and cell biology*, 83(3), 271-277.
- Ristaino PA, Levine MM, & Young CR. (1983). Improved GM1-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin. Microbiol*, 18(4), 808-815.
- Rivera RA, Echeverría SP, & Herrera VA. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*. Octubre- diciembre.
- Rogan D, Babiuk LA, (2005). Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech*; 24:159-174.
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solis AG, Soria-Guerra RE, MorenoFierros L, Martinez-Gonzalez L, Herrera-Diaz A, Korban SS. (2009). Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J.* 57, 45–54.
- Rossow KD. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol.* 35: 1.
- Rowland RRR, Lawson S, Rossow K, Benfield DA. (2003). Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* 96:219–35.
- Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Zuckermann fa et al. (2004). Deciphering the involvement of innate immune

- factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*; 102:199-216.
- Ruiz O, García E, Gago L, & González V. (2005). *Plantas Biofactorías: Informe de Vigilancia Tecnológica*. Madrid: Fundación Española para el desarrollo de la investigación en Genómica y Proteómica/Parque Científico de Madrid, 130.
- Sang Y, Rowland RR, Blecha F. (2011). Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Anim. Health Res. Rev.* 12:149–67 49. Butler JE, Lager KM, GoldeW, Faaberg KS, Sinkora M, et al. 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol. Res.* 59:81–108
- Seong-Hee K, In-Soon R, Eun-Jin C, Changhee L, Chang-Hee L, Kyoung-Hyun L, et al. (2010). A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet Micro*; 143:394-400.
- Sette A, & Fikes J. (2003). Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current opinion in immunology*, 15(4), 461-470.
- Shen WJ, & Forde BG. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 17(20), 8385.
- Shi M, Lam TT-Y, Hon Ch-Ch, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK-H, et al. (2010). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of north American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*;84: 8700-8711.
- Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BA, Witholt B, & Hoi WG. (1991). Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, 351(6325), 371-377.
- Snijder EJ, Meulenbergg JJ. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol.* 79:961-979.
- Spangler BD. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), 622-647.
- Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, Podgorska K, (2006b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835–1841.
- Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, Timina AM, Krabbe JS, Chabros K, Potapchuk D. (2008). Definition of subtypes in the European genotype of

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153 (8), 1479– 1488.
- Suárez P, Díaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortín J (1996) Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70: 2 876–2 882.
- Sur JH, Doster AR, Christian JCS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osario FA (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71: 9 170–9 179.
- Sur JH, Doster AR, Osario FA (1998) Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 35: 506–514.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Thanawongnuwech R, Thacker EL, Halbur PG. (1997). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMS): In vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMS). *Vet Immunol Immunopathol.* 59:323–35.
- Tian ZJ, Qiu HJ, Ni JQ, Zhou YJ, Cai XH, Zhou GH, ... & Tong GZ. (2005). Construction and characterization of a recombinant pseudorabies virus expressing porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5. *Yi Chuan Xue Bao*, 32, 1248-1255.
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, & Nagy, E. (2000). Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 18(19), 2023-2028.
- Twyman RM., Schillberg, S., & Fischer, R. (2013). Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Current Pharmaceutical Design*, 19(31), 5486-5494.
- Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genetics.* 20 (8) :375-383.
- Valentine L. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiol.* 33: 948-955.
- Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X., & Nauwynck HJ. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome

- virus entry into the porcine macrophage. *Journal of General Virology*, 91(7), 1659-1667.
- Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. (2010). The M/GP (5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLOS Pathog.* 6: e1000730.
- Veluthambi K, Gupta AK, & Sharma A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3), 368-380.
- Vezina, S. A., Loemba, H., Fournier, M., Dea, S., & Archambault, D. (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet.*, 60(2), 94.
- Vimolmangkang S, Gasic K, Soria-Guerra R, Rosales-Mendoza S, Moreno Fierros, L. and Korban, S.S. (2012) Expression of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in soybean seed yields an immunogenic antigenic protein. *Planta*, 235, 513–522.
- Vu HL, Kwon B, Yoon KJ, Laegreid WW, Pattnaik AK, Osorio FA. (2011). Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J. Virol.* 85:5555–64.
- Wang Y, Deng H, Zhang X, Xiao H, Jiang Y, Song Y, ... & Chen, H. (2009). Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(2), 292-297.
- Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK, & Weiland F. (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet. Microbiol.*, 66(3), 171-186.
- Welch SK, Calvert JG. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* 154:98–103.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* Jul;13 (3):121-30.
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Santos MJD, Trono K, Peralta A, Gómez MC, ... & Borca, M. V. (1999). Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 255(2), 347-353.

- Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 41:58–62.
- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, et al. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55:231–40.
- Wills, R. W., Doster, A. R., Galeota, J. A., Sur, J. H., & Osorio, F. A. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.*, 41(1), 58-62.
- Wu WH, Fang Y, Rowland RR, Lawson SR, Christopher-Hennings J, Yoon KJ., & Nelson EA. (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus research*, 114(1-2), 177-181.
- Yamamoto T, Tamura T, & Yokota T. (1984). Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. *J. Biol. Chem.*, 259(8), 5037-5044.
- Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, Hill HT & Platt KB. (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol.*, 9(1), 51-63.
- Yun SI, Lee YM. (2013). Overview: replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Microbiol.* 51:711–23.
- Zhao Y, & Hammond RW. (2005). Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotechnology letters*, 27(6), 375-382.
- Zheng CF, Brownlie R, Huang D, & Babiuk LA (2006). Intercellular trafficking of the major tegument protein VP22 of bovine herpesvirus-1 and its application to improve a DNA vaccine. *Archives of virology*, 151(5), 985-993.
- Zimmerman J. Historical Overview of PRRS Virus (2003). *The PRRS Compendium* (second ed.); 1-6.
- Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster a, Brito m et al. (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol*; 123:69-85.

ANEXOS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO 1

TAE 50X

Para preparar un litro mezclaron 98.8 g de Tris base, 22.84 mL de ácido acético, 40 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M pH 8, se aforó con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

ANEXO 2

TAE 1X

Para preparar un litro se tomaron 100 mL de TAE 50 x y se aforó con agua destilada.

ANEXO 3

AGAROSA 1%

Para preparar 100 mL se añadió un gramo de agarosa a 100 mL de TAE 1X, se calentó hasta disolver y se almacenó a temperatura ambiente.

ANEXO 4

MEZCLA BASAL DE SALES MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100X (g/L)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78

	EDTA dihidratado	37.3	3.73
--	------------------	------	------

Los compuestos fueron disueltos en agua destilada estéril y fueron almacenados en alícuotas de 250 mL a 4°C.

ANEXO 5

VITAMINAS MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disolvieron en agua destilada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20° C.

ANEXO 6

VITAMINAS B5

Compuesto	Concentración (mg/L)	Concentración del stock 1000 x (mg/mL)
Myoinositol	100	100
Tiamina	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0

Los compuestos se disolvieron en agua estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -70°C.

ANEXO 7

ÁCIDO NAFTALENACÉTICO (ANA)

Para preparar un stock de 1.5 mg/mL, se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

ANEXO 9

BENCILADENINA (BA)

Para preparar un stock de 0.6 mg/mL, se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

ANEXO 10

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MS Y RMOP

Para preparar un litro de medio de cultivo, se añadieron 10 mL de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 mL de agua desionizada. Se adicionaron 30 gramos de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.8 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforó con agua destilada estéril. Por último, se añadieron 12 g de Phytigel (agar). Los medios se esterizaron a 15 lb/pulgada² por 15 minutos. Cuando fue necesario, la kanamicina y cefotaxima, fueron añadidas al medio después de la esterilización una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.

ANEXO 11

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MS Y RMOP PARA 1 L

Medio	Vitaminas	Vitaminas 1000 x	Sales MS (I-V)	ANA	BA	Sacarosa	Ph
MS	MS	1 mL	10 mL	-	-	30 g	5.8
RMOP	B5	1 mL	10 mL	100 µL	1 mL	30 g	5.8

ANEXO 12

MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO LB

Para preparar un litro de medio LB líquido se pesaron 10 g de Bactotripton (peptona bacteriológica), 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio (NaCl), se disolvió y se aforó con agua destilada para proceder a la esterilización.

ANEXO 13

MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO LB

Para preparar un litro de medio sólido LB se pesaron 25 g de base para medio de cultivo LB, se agregaron 14 g de agar grado bacteriológico, se disolvió y se aforó con agua destilada para proceder a la esterilización. Cuando fue necesario, la kanamicina y/o ampicilina, fueron añadidas al medio después de la esterilización una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.