



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

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

**PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
ESCALAMIENTO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES
DEL RUBULAVIRUS PORCINO EN BIORREACTOR Y
DESARROLLO DE COMPLEJOS
INMUNOESTIMULANTES DE NANOPARTÍCULAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

ROCÍO LARA ROMERO

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO
CENID-SAI, INIFAP**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. SUSANA MENDOZA ELIVIRA
FES-CUAUTITLÁN, UNAM
DR. HUGO RAMÍREZ MENDOZA
FES-CUAUTITLÁN, UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE: DR. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT

FMVZ, UNAM

SECRETARIA: JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO

CENID-SAI, INIFAP

VOCAL: SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

FES-CUAUTITLÁN, UNAM

VOCAL: JOSÉ LUIS CERRITEÑO SÁNCHEZ

CENIDS-SAI, INIFAP

VOCAL: GERARDO SANTOS LÓPEZ

CIBIOR, IMSS

AGRADECIMIENTOS

Número de becaria CONACyT: 300988

Programa de Apoyo Económico a los Estudiantes de Posgrado UNAM

Proyecto SEP- CONACyT [288942]

Contenido

CONTENIDO	IV
INDICE DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 ANTECEDENTES DE LA EOA	11
1.2 CUADRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD	13
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO	14
1.4 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL PRV	18
1.5 RESPUESTA INMUNE AL PRV	20
1.6 VACUNACIÓN CONTRA EL PRV	22
1.7 PROTEÍNAS RECOMBINANTES	23
1.8 CARACTERÍSTICAS PARA DESARROLLAR LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BIORREACTOR	23
1.9 CARACTERÍSTICAS GENERALES EN EL DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DEL RUBULAVIRUS PORCINO	29
5.2 DETERMINACIÓN CUERPOS DE INCLUSIÓN EN <i>E. COLI</i>	30
5.3 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	30
5.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	31
5.4.1 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE	31
5.4.2 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA PVDF	31
5.5 PRUEBA DE WESTERN BLOT	32
5.6 INMUNORREACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON SUEROS DE CERDOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON PRV	32
5.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL PRV EN MEDIO MÍNIMO MINERAL M9 Y LACTOSA COMO INDUCTOR	32
5.7 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL PRV EN BIORREACTORES DE CULTIVO BATCH	34
5.8 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE FILMES LIPÍDICOS	34
5.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	36
6. RESULTADOS	37
6.1 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	37
6.1.1 <i>Análisis de la proteína NP del PRV</i>	37
6.1.2 <i>Análisis de la proteína M del PRV</i>	42
6.1.3 <i>Análisis de la proteína HN del PRV</i>	48
6.2 PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	52
6.2.1 <i>Purificación y caracterización de la proteína NP</i>	52

6.2.2 Purificación y caracterización de la proteína M.....	54
6.2.3 Purificación de la proteína HN	55
6.3 OPTIMIZACIÓN DE MEDIO MÍNIMO MINERAL PARA CRECIMIENTO BACTERIANO.....	56
6.4 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL ESCALAMIENTO EN BIORREACTOR.....	57
6.5 ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	59
7. DISCUSIÓN.....	64
8. CONCLUSIONES	69
9. REFERENCIAS	70

INDICE DE ABREVIATURAS

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

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

RESUMEN

La biotecnología en la actualidad tiene diversas aplicaciones a través de la manipulación genética, las cuales, han permitido el desarrollo de diversos procesos para la producción de proteínas recombinantes que han sido de gran ayuda para establecer pruebas de diagnóstico confiables y vacunas efectivas. La enfermedad de ojo azul (EOA) es provocada por la infección viral del *Orthorubulavirus porcino* (PRV) en cerdos de todas las edades, afectando únicamente la región del bajío de la República Mexicana. La complejidad del genoma del PRV ha permitido que se generen infecciones persistentes, que da como consecuencia un diagnóstico poco acertado y procesos de vacunación deficientes, por lo que representa un grave riesgo para la porcicultura nacional debido a la posible propagación del PRV en regiones libres de la enfermedad. En consecuencia, para México cobra vital importancia el desarrollo de sistemas de diagnóstico y/o vacunas a partir de proteínas recombinantes del PRV es inminente para lograr tener las herramientas que otorguen el control de la EOA. En el presente trabajo se lograron producir de manera recombinante en el sistema de *Escherichia coli* las proteínas estructurales NP, M y HN del PRV, demostrando mediante Western Blot que los cerdos comienzan a producir anticuerpos contra la proteína NP y M desde el quinto día post infección (PI). La proteína HN fue utilizada para realizar ensayos en la optimización de medio de cultivo para la disminución de costos de producción, adaptando la utilización de medio mínimo mineral M9 y utilizando lactosa como inductor, comparando el crecimiento con medio Luria Bertnani (LB) e isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor, dando como resultado una fase exponencial y de crecimiento muy similar en ambos cultivos, por otro lado, en el proceso de inducción con lactosa se logró observar una sobreproducción a partir de la primera hora, en comparación con medio LB, sin embargo, es un proceso que requiere más tiempo de inducción para lograr resultados similares a IPTG, que se compensa por la considerable reducción de costos. Permitiendo de esta forma establecer el bioproceso de crecimiento en inducción a bajo costo en un biorreactor de cinco litros mostrando un crecimiento similar a los resultados obtenidos en matraz. En otra etapa del presente estudio con el objeto de potencializar la respuesta inmune cuando se utiliza proteínas recombinante como antígenos se logró el desarrollo de nanopartículas, formuladas con ácido glicirricínico (saponina), cuyas características morfológicas determinadas por microscopía electrónica de transmisión (MET), indicaron similitudes estructurales a los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs, adyuvantes comerciales), donde la base para formulación es la saponina *Quillaja saponaria*, las observaciones realizadas a las nanopartículas con base en ácido glicirricínico mostraron estructuras similares a liposomas. Las nanopartículas de ambas saponinas, presentaron un tamaño menor a 100 nm de diámetro que pueden garantizar una biodisponibilidad en el organismo más eficiente que partículas de mayor tamaño.

Palabras clave: *Orthorubulavirus porcino*, proteínas recombinantes, nanopartículas, biorreactor

ABSTRACT

Biotechnology currently has various applications through genetic manipulation, which have allowed the development of various processes for the production of recombinant proteins that have been of great help in establishing reliable diagnostic tests and effective vaccines. Blue eye disease (BED) is caused by porcine Orthorubulavirus (PRV) viral infection in pigs of all ages, arising only in the Bajío region of the Mexican Republic. The complexity of the PRV genome has allowed persistent infections to be generated, which results in poor diagnosis and poor vaccination processes, thus representing a serious risk for the national pig industry due to the possible spread of PRV in regions free of disease. In the present work, the structural proteins NP, M and HN of PRV were produced recombinantly in the *Escherichia coli* system, demonstrating by means of Western Blot that pigs begin to produce experiments against the NP and M protein from the fifth day post infection. (PI). The HN protein was used to carry out tests to reduce production costs, by using minimal mineral medium M9 and using lactose as inducer, comparing growth with Luria Bertnani (LB) medium and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as an inducer, resulting in an exponential phase with very similar growth in both cultures, on the other hand, in the induction process with lactose it was possible to observe an overproduction from the first hour, compared to LB medium, it is a process that requires more induction time to achieve results similar to IPTG, which is compensated by the considerable cost reduction. Therefore, this low-cost induction growth process is scaled up in a five-liter bioreactor, showing growth similar to the results obtained in a flask. In another stage of the present study, the development of nanoparticles was achieved, whose morphological characteristics determined by transmission electron microscopy (TEM), indicated structural similarities to immunostimulant complexes (ISCOM), where the base for formulation was the *Quillaja saponaria* saponin, while for glycyrrhizinic acid, structures similar to liposomes will be acquired, with both saponins, the particles were less than 100 nm in diameter, which can guarantee a more efficient bioavailability in the organism than larger particles.

Key words: *Porcine orthorubulavirus*, recombinant proteins, nanoparticles, bioreactor

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la biología molecular ha permitido el desarrollo de diversos campos de la ciencia, que ha dado oportunidad a un gran número de aplicaciones biotecnológicas en diversos sectores industriales con un crecimiento del 1.5% del 2015 al 2020 (Martin et al 2021). La biotecnología se puede definir como la aplicación técnica de diversos sistemas biológicos para la producción de sustancias que se encuentran en la naturaleza, esto implica el uso de organismos vivos que a través de la manipulación genética, llevan a cabo procesos definidos por el ser humano. Estos avances científicos han permitido producir proteínas humanas como la insulina y hormona del crecimiento, así como, proteínas para vacunas contra hepatitis B y antígenos suficientes para pruebas de diagnóstico de VIH (Soetan et al, 2008). En el caso de la medicina veterinaria, una parte fundamental de la producción radica en el control de enfermedades mediante el uso de pruebas de diagnóstico e inmunización con organismos atenuados y/o inactivados que se formulan generalmente con un adyuvante, que en muchos casos, presentan una variación de efectividad, por lo que el uso de la biotecnología se encamina para la producción de antígenos recombinantes, utilizados en sistemas diagnósticos y vacunas que junto con adyuvantes adecuados puedan ser específicas y seguras para su aplicación (Jorge y Dellagostin, 2017).

El cerdo (*Sus scrofa*) es una especie de gran importancia para la industria pecuaria, se caracteriza por su prolificidad, ya que una cerda es capaz de parir más de 20 lechones cada año, con una conversión alimenticia de 3.5 Kg de alimento por Kg de crecimiento, en donde finalmente cada uno de estos lechones puede ser sacrificado 6 meses después proporcionando 100 Kg de peso. Su carne es la más consumida a nivel mundial y su producción duplica la del ganado bovino. Según la FAO, se estima que hay cerca de 100 millones de cabezas de cerdo, siendo China, Estados Unidos y Brasil los países con mayor inventario y la carne de cerdo, la segunda en ser consumida a nivel mundial con 12.3 Kg. En México, actualmente los estados con mayor población porcina son Jalisco (20%), Sonora (11%), Puebla (10%) y Veracruz (10%), mientras que en el estado de Michoacán se concentra solo el 5% (Bobadilla *et al.*, 2010; Flores, 1993; Koeslag, 2006, Rivera-Benitez et al 2021, SIAP 2022).

La porcicultura nacional se ve afectada por diversas enfermedades que causan grandes

pérdidas económicas relacionadas con la mortalidad y el retraso en el crecimiento de los animales, entre las más importantes se encuentran el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, diarreas por coronavirus, complejo respiratorio porcino, síndrome multisistémico de adelgazamiento posdestete, influenza porcina y la enfermedad de ojo azul (EOA), la cual, sólo ha sido reportada en México y es causada por un paramixovirus, anteriormente denominado Rubulavirus porcino y a partir del 2019 Orthorubulavirus porcino (PRV) (Rima et al, 2019; Rivera-Benitez et al 2021r). Desde la aparición de la EOA (1981), la prevención y el control en las granjas infectadas se ha basado en estándares de sanidad e higiene, junto con la producción de vacunas experimentales y comerciales (Correa-Girón *et al.*, 2002). A partir de que se identificó el agente etiológico de la EOA, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de las características moleculares del virus y sus propiedades patológicas, biológicas e inmunológicas de la enfermedad. Los paramixovirus son causantes de diversas enfermedades zoonóticas y emergentes, siendo los murciélagos los hospederos naturales (Gibson et al, 2021). Se han identificado paramixovirus porcinos estrechamente relacionados en otros países como Australia, Canadá, Japón e Israel (CFSPH, 2006). (Hernández *et al.*, 2004).

1.1 Antecedentes de la EOA

En 1980 en una granja de 2500 vientres ubicada en La Piedad Michoacán se dieron a conocer los primeros brotes de una enfermedad con un cuadro clínico de incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad corneal en lechones de maternidad, de los cuales se aisló un virus hemoaglutinante. Sin embargo desde 1972 hay evidencias serológicas de que el agente etiológico ya se encontraba circulante en la República Mexicana. Seis años después del primer brote en México, esta enfermedad se diseminó a otros estados de la República Mexicana y para 1988 se demostró que la EOA era causada por un paramixovirus, el cual producía afecciones neurológicas en lechones menores de 21 días y en cerdas gestantes se presentaban trastornos reproductivos (Stephano *et al.*, 1981; 1988; Rosales *et al.*, 1988).

Estudios serológicos en 1991, 1992 y 1998 mostraron que los cerdos de los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo,

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

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

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

para controlar o erradicar esta enfermedad.

1.2 Cuadro clínico de la enfermedad

En 1981 Stephano y colaboradores reportaban en cerdos recién nacidos y lactantes la EOA que se caracterizaba por encefalitis, neumonía y opacidad corneal, la cual generalmente comienza con aparición repentina de fiebre, lomo arqueado, postración y depresión, estos signos son seguidos de enfermedad neurológica progresiva con debilidad, ataxia, temblores musculares, postura anormal y rigidez, especialmente de las patas traseras; algunos lechones se encuentran hipersensibles y realizan movimientos de pedaleo cuando son manipulados. Entre 1 y 10 % de los lechones desarrollan opacidad corneal unilateral o bilateral, incluso se puede observar conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, constipación y diarrea. Con frecuencia los lechones afectados mueren dentro de las primeras 48 horas de la aparición de los primeros signos clínicos; posteriormente se observan muertes después de 4 a 6 días de la enfermedad.

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

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

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

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

Para el 2004, Hernández-Jaúregui realizó estudios en cerdas de 6 a 10 semanas de gestación, en donde nueve cerdas fueron inoculadas con la cepa PAC 3 del PRV. Las lesiones encontradas correspondían a congestión y hemorragia en placenta y endometrio. El PRV fue aislado de pulmones, tonsilas, ovarios, placenta, útero y nodos linfoides de las cerdas, y de los fetos se logró aislar de cerebro, pulmones e hígado.

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

1.3 Agente etiológico

El agente causal de la EOA se denominó Rubulavirus porcino hasta el 2019, posteriormente de acuerdo al último reporte del ICTV se modificó la clasificación taxonómica del virus, registrado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Rubulavirinae*, género *Orthorubulavirus*, especie *Orthorubulavirus porcino* (Rima *et al.*, 1995; Rima *et al.*, 2019). Es un virus ARN, envuelto, en sentido negativo de una hebra no segmentada, formada por 15180 pares de bases, que actúan como molde para la síntesis del ARN mensajero (Wang *et al.*, 2007). Está dividido en 6 genes (3'-NP-P-M-F-HN-L-5') que codifican para seis proteínas estructurales y 3 no estructurales (Linné *et al.*, 1992) (figura 1), cuyas características moleculares se muestran en el cuadro 1.

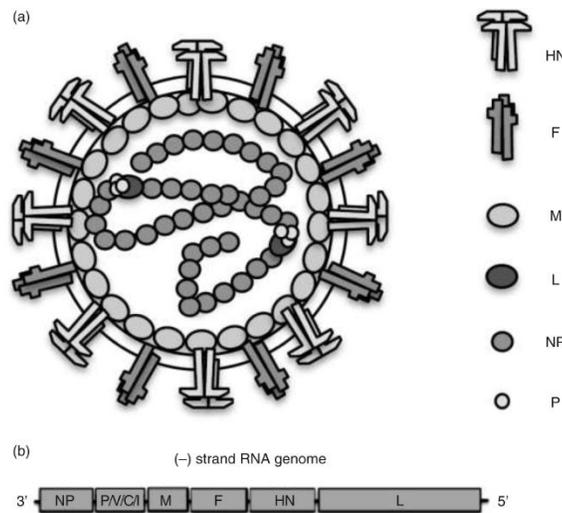


Figura 1. Esquema del Orthorubulavirus porcino (A) y organización genética (B). (Modificado de Cuevas et al, 2015).

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

Gen	Peso molecular (kDa)	Longitud (nt)	Tamaño (aa)
NP	68	1785	545
P	52	1372	404
M	40	1340	369
F	F ₁ 59 F ₂ 12	1838	541
HN	66	1862	576
L	200	6786	2251

De las proteínas estructurales, tres se encuentra asociadas a la nucleocapside: la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L) y tres asociadas a membrana del PRV: proteína de matriz (M), la hemoaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) (Moreno-Lopéz *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1990).

El gen P puede dar origen a una proteína estructural (P) y a tres no estructurales: V, I y C. Datos experimentales indican que los péptidos V y C se encuentran involucrados en la

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

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

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

La proteína F es una glicoproteína transmembranal altamente conservada entre la familia de los paramixovirus, la cual participa con la glicoproteína HN, en la fusión de la envoltura viral a la membrana celular, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y posteriormente se puedan formar células multinucleadas debido a la fusión de las membranas celulares. La glicoproteína F (precursor inactivo F₀) tiene un sitio de escisión

His-Arg-Lys-Lys-Arg, el cual es cortado por una proteasa, dando origen a los polipéptidos F₁ y F₂, el extremo N-terminal de la subunidad F₁ está relacionado directamente al ataque inicial de la membrana celular para dar lugar a la fusión (Berg *et al.*, 1997).

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

Un estudio *in silico* demostró que los epítomos ATRSETDYY y AAYTTTTCF de la proteína HN podrían ser importantes para neutralizar la infección viral, ya que son reconocidos como determinantes antigénicos para las células B (Siañez-Estrada *et al.*

2020). Además, ya se ha informado *in vitro* que estos epítomos son reconocidos por anticuerpos generados durante la infección por PRV (Zenteno et al. (2007).

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

1.4 Biología molecular del PRV

Desde que el PRV-LPMV fue aislado por primera vez en 1984, se ha encontrado una variabilidad del gen hemaglutinina-neuraminidasa respecto a diferentes aislamientos del PRV obtenidos desde 1990 y hasta el 2003 (cuadro 2). La realización de estudios de biología molecular y de secuenciación del gen HN de diferentes aislamientos del virus ha permitido identificar variantes genéticas. Actualmente se encuentran reportadas 91 secuencias diferentes del gen HN del PRV, respecto al primer virus aislado en La Piedad Michoacán (Moreno-López *et al.*, 1986; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008) (figura 2).

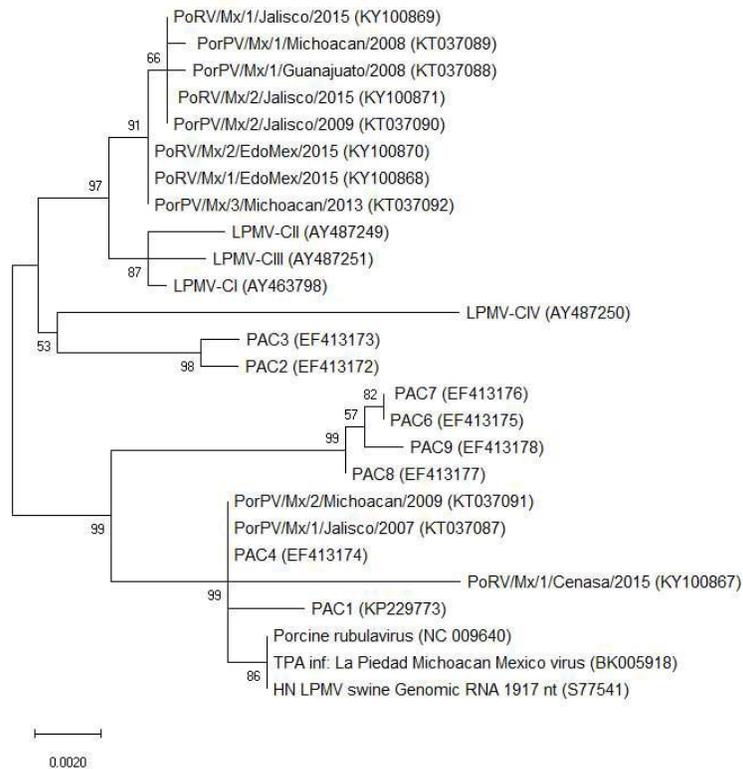


Figura 2. Árbol filogenético del PRV basado en el gen de la HN, realizado mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo del parámetro Kimura-2 con 1000 repeticiones.

De estas 91 secuencias, 45 corresponden al gen HN mediante el cual, con la realización de análisis filogenéticos y signos clínicos, se han dividido en tres genogrupos, los cuales se han asociado con las diferentes presentaciones clínicas; neurológicas, respiratorias y reproductivas; de la enfermedad de ojo azul. El primer genogrupo está asociado con trastornos neurológicos en lechones provocados por la cepa LPMV, PAC1 y PAC 4, caracterizada por presentar trastornos respiratorios en cerdos en crecimiento. El segundo genogrupo incluye a la PAC 2 y PAC 3, relacionadas con fallas reproductivas en cerdos adultos. Y en el tercer genogrupo se incluyen las variantes PAC6, PAC7, PAC8 y PAC9, las cuales están asociadas con la presentación de signos neurológicos en cerdos en crecimiento y cerdos adultos. Sin embargo, de las cepas CI, CII, CII y CIV no se han realizado estudios que permitan relacionarlas con alguna característica clínica de la EOA. Dos cepas más fueron caracterizadas y reportadas en 2017, la cepa G2-93 de una granja de ciclo cerrado, con problemas respiratorios y de retraso en el crecimiento en la etapa de crecimiento y engorda, mientras que la cepa G3-147 de cerdos en crecimiento con

problemas respiratorios (Figura 2) (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Rivera-Benítez *et al.*, 2013 (c); Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Variabilidad genómica del gen HN (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Paniagua-Buelnas, 2000; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008; Santos-López *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2017).

Cepa del PRV	Año de aislamiento	Número de acceso en el GenBank	Estado donde se aisló la cepa
LPMV	1984	S77541	Michoacán
C-I	1991	AY463798	Jalisco
C-II	1991	AY487249	Jalisco
C-III	1999	AY487251	Michoacán
C-IV	1999	AY487250	Michoacán
PAC1	1990	KP229773	Michoacán
PAC2	1990	EF413172	Michoacán
PAC3	1992	EF413173	Michoacán
PAC4	1993	EF413174	Michoacán
PAC6	2001	EF413175	Jalisco
PAC7	2002	EF413176	Jalisco
PAC8	2002	EF413177	Jalisco
PAC9	2003	EF413178	Jalisco
G2-93	2013	No reportada	Querétaro
G3-147	2013	No reportada	Michoacán

1.5 Respuesta inmune al PRV

La respuesta humoral contra el PRV se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana posinfección. Durante las primeras 4 semanas los títulos se incrementan entre 4 y 6 unidades logarítmicas en base 2 y a partir de la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 unidades logarítmicas. Los anticuerpos generados están dirigidos principalmente contra las proteínas HN, NP y M, aunque se ha reportado una especificidad e inmunodominancia de la respuesta humoral hacia la proteína HN del virus (Hernández *et*

al., 2004). Los anticuerpos contra HN son capaces de inhibir la hemoaglutinación y neutralizar la infección viral (Hernández *et al.*, 1998).

En la infección natural se han encontrado anticuerpos hasta 18 meses después de presentarse los signos clínicos de la enfermedad (Stephano *et al.*, 1988). Los anticuerpos contra el PRV pueden ser inducidos utilizando como antígeno virus inactivado con formalina y esta inmunidad puede transmitirse de la madre a los hijos al vacunar a cerdas en gestación. Los anticuerpos adquiridos pasivamente de la madre, a través de la placenta o al consumir el calostro y la leche, logran controlar la infección y reducir los índices de morbilidad y mortalidad en los lechones nacidos de cerdas vacunadas (Hernández-Jaúregui *et al.*, 1992). Ensayos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos contra el PRV o contra determinantes antigénicos de la proteína HN poseen actividad neutralizante (Zenteno *et al.*, 1998).

El primer cambio que se observa en la respuesta inmune celular después de la infección con PRV es un aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8+). Esto ocurre durante la primera semana, demostrando la importancia de estas células en el control de la infección. Además de la reducción en el número de linfocitos CD4+ que ocurre en la tercera semana post infección. Este fenómeno puede estar ligado a dos eventos: por un lado, las células específicas para antígenos virales son reclutadas a los tejidos infectados para participar en el control de la infección. Esto es sugerido por la abundancia de linfocitos y monocitos observados en los tejidos infectados en el tracto de los verracos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que los linfocitos CD4+ estimulados por el virus se transforman en linfocitos CD4+CD8+. Los estudios realizados demuestran que esta población de linfocitos T responden de manera específica al virus para convertirse en células de memoria productoras de citocinas de tipo 2 (principalmente interleucina 10), las cuales inducen una respuesta inmune mediada por anticuerpos (Hernández *et al.*, 2001; 2002). Éste tal vez sea un mecanismo inducido por los rubulavirus para modular la respuesta antiviral y sobrevivir en el hospedero evitando la actividad citolítica de los linfocitos T. La importancia de la respuesta inmune celular en el control de la infección viral fue evaluada midiendo la capacidad proliferativa de células inmunes en respuesta al antígeno viral y a los mitógenos concanavalina A y fitohemaglutinina. Una fase

de inmunosupresión pasajera fue identificada en los animales infectados, representada por índices de proliferación muy bajos con los dos mitógenos (Hernández *et al.*, 1998). Esta inmunosupresión puede ser la razón de que se haya descrito un incremento en la susceptibilidad a padecer infecciones secundarias en los animales infectados con PRV (Hernández-Jaúregui *et al.*, 2001). El análisis de los valores de los diferentes tipos de leucocitos en los animales infectados mostró que durante la tercera semana de la infección se presenta una disminución del 19% de linfocitos T, de 28% de linfocitos B y de 53% de monocitos en comparación con los valores promedios observados en los animales sanos utilizados como testigos (Hernández *et al.*, 1998). La identificación de antígeno viral en el interior de células mononucleares circulantes y en células inmunes de nódulos linfáticos, indica que el mismo sistema inmune es blanco de la infección viral, aunque no se presente una notable alteración en los mecanismos de respuesta como ocurre en virus verdaderamente inmunosupresores (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

1.6 Vacunación contra el PRV

Actualmente existen dos vacunas comerciales, sin embargo, se han desarrollado varias vacunas experimentales. Una de ellas corresponde a una vacuna inactivada y con un adyuvante oleoso desarrollada en 1990 en el CENID-Microbiología Animal del INIFAP, reportan que la vacuna protegió al 100% de los lechones desafiados provenientes de madres vacunadas, y que se lograron controlar dos brotes agudos de ojo azul, en donde los casos clínicos y muertes terminaron a los seis y ocho días de la vacunación respectivamente (Correa-Giron *et al.*, 2002).

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

1.7 Proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes en bacterias es una tecnología que surgió hace cerca de 40 años y respondió a una necesidad de proveer proteína de uso terapéutico con abasto asegurado y calidad constante, por lo que la primera proteína aprobada para uso en humanos fue la insulina producida en *Escherichia coli*. La información genética de la proteína a producir usualmente se inserta en un vector o plásmido de expresión, el cual, posteriormente se introduce a la bacteria para la producción de proteínas heterólogas (Lara, 2011). Los recientes avances en genómica, proteómica y bioinformática han facilitado el uso de la tecnología de ADN recombinante con el fin de evaluar cualquier proteína de interés (Young, et al, 2011). Durante los últimos años estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que la proteína recombinante HN del PRV se expresa correctamente en la bacteria *E. coli*, debido a ello es viable utilizar esta proteína recombinante, como inmunógeno para prevención y/o control de la Enfermedad del Ojo azul.

1.8 Características para desarrollar la producción de proteínas recombinantes en biorreactor

La producción de proteínas mediante procesos biotecnológicos involucra inicialmente la clonación de un gen específico en el laboratorio, o la construcción de un gen sintético, con la subsiguiente inserción en una célula llamada hospedero. La clonación del organismo o cultivo celular precede en general al desarrollo del proceso en escala piloto para optimizar rendimiento y calidad, para finalmente alcanzar el proceso a escala industrial (FEUM, 2014). Los productos obtenidos a partir de la recombinación del ADN se producen mediante sistemas de expresión con base en organismos procariontes (bacterias) o eucariontes (levaduras, líneas celulares de mamíferos, etc.), es por ello que el cultivo a gran escala de microorganismos o células recombinantes pueden llevarse a cabo en fermentadores o biorreactores comerciales, haciendo este tipo de sistemas de expresión económicamente viables (FEUM, 2014). Un biorreactor también es conocido como fermentador, el cuales es un recipiente donde se lleva a cabo el proceso de fermentación. Su función principal es mantener el medio y el microorganismo en las condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de los compuestos de interés. Dentro de las características

deben de incluir un bajo consumo de energía, capacidad para mantener homogenizado los microorganismos en el medio, con un mínimo de variaciones durante su operación, adaptación a los procesos, diseño mecánico simple, buena transferencia de energía, controles de pH, oxígeno disuelto, temperatura, facilidad para tomar muestras, diseño para mantener las condiciones de asepsia durante el proceso (Standbury, 2000). En los procesos de fermentación se puede producir biomasa de células animales, vegetales y microbianas, para estos procesos es necesario la operación de forma monoséptica y el proceso se realiza en cultivo sumergido, donde existe una agitación constante (Todaro, 2014).

Un punto fundamental durante el bioproceso de obtención de una proteína recombinante es el control de la calidad, debido a que gracias a ello se va a poder determinar la identidad, consistencia, pureza y perfil de impurezas. En el caso del control de calidad de los procesos biotecnológicos, es más común que se haga un análisis de los resultados analíticos del producto final, la validación del proceso y los resultados de los controles en proceso para asegurar la remoción de impurezas, reales o potenciales, hasta los niveles requeridos para garantizar su seguridad (FEUM, 2014). Para que las proteínas recombinantes expresadas en sistemas bacterianos como *E. coli* sean una alternativa en la vacunación o utilización como antígenos en pruebas diagnósticas, es necesario una producción a gran escala y a bajos costos, en donde, el uso de sistemas de biorreactor para alcanzar altas densidades celulares es necesaria (Lara, 2011).

Para que las proteínas recombinantes expresadas en sistemas bacterianos como *E. coli* sean una alternativa en la vacunación o utilización como antígenos en pruebas diagnósticas, es necesario una producción a gran escala y a bajos costos, en donde, el uso de sistemas de biorreactor para alcanzar altas densidades celulares es necesaria (Lara, 2011). La línea de biología sintética se enfoca en la generación de sistemas microbianos de producción, únicos para obtener productos de alto valor comercial (Cuevas-Romero et al., 2016).

1.9 Características generales en el desarrollo de nanopartículas

Bajo el concepto de la Nanotecnología han sido creados diversos acarreadores como las nanoemulsiones, liposomas, micelas, niosomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas y acarreadores lipídicos nanoestructurados (Torchilin, 2006;

Brewer, Zhang, Dong, Rutherford & Tian, 2007). La nanotecnología se define como la habilidad de trabajar a un nivel submicrónico, o molecular; con la finalidad de entender, crear y usar materiales estructurados, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones resultantes de su menor tamaño (Rocco, 2003).

Las nanopartículas constan de un tamaño menor a 1 micra. Para la fabricación de éstas, se han empleado polímeros naturales, sintéticos y materiales de naturaleza lipídica. Las nanopartículas (NPs) pueden viajar dentro del organismo a sitios específicos sin sedimentar u ocluir la microvasculatura, pueden penetrar tumores y otros tejidos con extravasación y pueden ingresar a nivel celular por endocitosis.

Las nanopartículas lipídicas son sistemas de administración versátiles y robustos para la inducción de anticuerpos y respuestas de linfocitos T a antígenos de subunidades asociadas. En los últimos 15 años, la tecnología de las vacunas de nueva generación ha madurado y ahora varias han sido aprobadas para uso humano o han llegado a etapas finales de evaluación clínica (Watson *et al.*, 2012)

Las proteínas recombinantes deben administrarse junto con adyuvantes o vehículos para que se inicien las respuestas inmunitarias dependientes de los linfocitos T contra los antígenos proteínicos. En la práctica clínica se emplean varios, tales como el gel de hidróxido de aluminio y preparados lipídicos que son ingeridos por los fagocitos. La saponina *Quillaja saponaria* ha sido utilizada para la formulación de adyuvantes llamados complejos inmunoestimulantes (ISCOM, por sus siglas en inglés), y se ha demostrado su eficacia en comparación con microesferas, liposomas e hidróxido de aluminio (Barr *et al.*, 1998; Abbas, 2008). El ácido glicirricínico es una saponina obtenida de la leguminosa *Glycyrrhiza galabra*, la cual, se ha utilizado como antiviral, expectorante, analgésico, antiséptico, antialérgico, antitumoral y adyuvante, por otro lado, tiene una estructura química similar a la *Quillaja saponaria* (Asl *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El PRV es endémico de la región central de México, no se han reportado brotes de la EOA en otros países, debido a esto, su estudio se limita a unos pocos grupos de investigación en México y anteriormente a un grupo de investigación sueco, por lo que existe un sesgo en las aportaciones científicas sobre el PRV en comparación con otros agentes etiológicos que causan importantes pérdidas económicas en la industria porcina. Dentro de estos sesgos se encuentra la investigación en vacunas de nueva generación a partir de proteínas recombinantes, las cuales, son una alternativa sin riesgo sanitario de diseminación del virus a zonas libres de la enfermedad. Durante los últimos años el INIFAP, dentro de sus líneas de investigación ha producido de manera recombinante la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del PRV, debido a que es el componente más abundante en el virus y altamente antigénico para la respuesta inmune en animales infectados y se han realizado ensayos piloto sobre el escalamiento de la producción en un sistema de biorreactor en colaboración con el Instituto Tecnológico de Celaya. Sin embargo, existen otras proteínas del PRV capaces de producir anticuerpos como lo es la proteína M y NP, las cuales hasta el momento no han sido producidas de manera recombinante y junto con la HN presentan un gran potencial como inmunógenos protectores contra la EOA. Sin embargo, la producción de proteínas recombinantes es costosa y se llegan a obtener pocas cantidades de proteína pura, por lo que el reto del presente trabajo es escalar mediante biorreactor la producción a un bajo costo, además de evaluar la actividad biológica de cada una de las proteínas recombinantes obtenidas. Por otra parte, se sabe que las proteínas recombinantes por si solas producen una pobre respuesta inmune y deben ser administradas junto con un adyuvante. Para esto se plantea el desarrollo de nanopartículas como lo son las estructuras lipídicas coloidales, equivalentes a los ISCOMs, elaboradas con base en ácido glicirricínico y lípidos, las cuales, generarían una adecuada respuesta inmune celular y humoral en el hospedero contra el PRV

3. HIPÓTESIS

Sí se diseña un sistema óptimo para la producción de proteínas recombinantes dentro de un proceso de escalamiento adecuado, entonces junto con el acoplamiento de las nanopartículas sintetizadas se podrá tener una opción vacunal para la enfermedad de ojo azul.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Producir y caracterizar las proteínas recombinantes del *Rubulavirus porcino* y establecer los principios para realizar el escalamiento de la producción en biorreactor, así como generar nanopartículas con base en el uso de ácido glicirricínico para su uso potencial como complejos inmuoestimulantes de nueva generación.

4.2 Objetivos particulares

- Producir, purificar y caracterizar las proteínas recombinantes HN, NP y M del *Rubulavirus porcino*.
- Evaluar la antigenicidad de las proteínas recombinantes mediante la técnica de Western Blot y sueros de cerdos infectados al PRV.
- Escalar la producción de proteínas mediante un proceso de biorreactor tipo batch.
- Sintetizar nanopartículas basadas en ácido glicirricínico y establecer sus características morfológicas mediante microscopía electrónica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Epizootiología del CENID Microbiología Animal, INIFAP, en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la BUAP, en CINVESTAV Irapuato y en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la FES-Cuautitlán.

5.1 Producción y caracterización de proteínas del Rubulavirus porcino

Se seleccionarán los marcos de lectura de los genes que codifican para las proteínas HN, M y NP de la cepa LPMV del PRV con número de acceso en el GenBank NC_009640 utilizando el programa SeqBuilder de LasserGene para el análisis *in silico*. Posteriormente se realizó el diseño de iniciadores para los ORFs mediante el programa Primer Select. Las amplificaciones se realizaron mediante RT-PCR, utilizando para la RT el Kit de transcripción inversa RT RevertAid de (K1691) y para la PCR el Master Mix 2x (K0171) ambos de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo de manufactura. Posteriormente los productos de PCR fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y purificados por columnas comerciales de acuerdo al protocolo de manufactura Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (A9281). El material purificado fue clonado en el vector de resguardo pJET1.2/blunt, para posteriormente realizar la transformación de la cepa de *E. coli* Top 10, de acuerdo con el manual de CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific, K1231), todo esto siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó la selección de las bacterias transformadas y la producción de biomasa para la extracción del plásmido mediante las columnas comerciales Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega (A1470). Con este plásmido se realizará la subclonación en el vector de expresión Champion pET SUMO de Thermo Scientific (K30001), con el cual se transformó la cepa *E. coli* Top 10 y se realizaron pruebas de PCR para verificar que el ORF se encuentre en fase. Una vez seleccionadas las colonias con vector en fase, se procedió a la transformación de la cepa de expresión *E. coli* BL21. La cepa transformada para cada gen (HN, NP y M) se cultivó en medio LB e indujo mediante isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) siguiendo el protocolo indicado por el manual de Champion™ pET SUMO Expression System (Thermo Scientific). La expresión de las

proteínas recombinantes del PRV fue evidenciada mediante ensayos de SDS-PAGE y Western Blot (Laemmli 1970) utilizando como anticuerpo primario anti-hys.

5.2 Determinación cuerpos de inclusión en *E. coli*.

Después de la inducción de la expresión, las células se recuperan por centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos y el pellet celular se lavó con 5 ml de agua destilada estéril, se recuperó nuevamente por centrifugación a 6000 rpm 10 minutos y el pellet se resuspendió en 5 ml de sacarosa al 20%, se pasó a agitación continua (250 rpm por 10 minutos), para posteriormente centrifugar a 8000 rpm por 20 minutos, de este proceso se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de un buffer de tris-HCl 5 mM pH 7.5. Se agregaron perlas de vidrio en un volumen igual al de la suspensión anterior (aproximadamente 5 ml) y se rompieron las células en un homogeneizador por 1 hora, las perlas de vidrio fueron filtradas y el extracto se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos, para posteriormente separar el sobrenadante (extracto proteico soluble) y se guarda para su análisis. Al pellet (extracto proteico insoluble) se le añadieron 5 ml de tritón al 1% y se mantuvo en agitación constante (250 rpm 10 min), para después centrifugar a 8000 rpm 20 minutos. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 5 ml de agua destilada estéril en agitación constante (250 rpm 10 min), se centrifugó a 8000 rpm 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se disolvió el pellet en 5 ml de un buffer de solubilización pH 7.0 (ver anexo) y se mantuvo en agitación constante (250 rpm 24 horas). Al finalizar se centrifugó a 8000 rpm 20 minutos y se recuperó el sobrenadante (Dunn *et al.*, 2004).

5.3 Purificación de proteínas recombinantes

Se realizó la de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC por sus siglas en inglés), para lo cual, en una columna con resina Chelating Sepharose Fast Flow de GE Healthcare (GE17-0575-01) previamente sanitizada, con la resina activada y equilibrada, se adicionó la proteína recombinante solubilizada. Posterior a la adición se realizó el lavado de la columna y por último la elusión para la obtención del producto purificado (ver anexo) (Dunn *et al.*, 2004).

5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

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

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

5.4.1 Tinción con azul de Coomassie

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

5.4.2 Transferencia de proteínas a membrana PVDF

Posterior a la electroforesis se armó el cassette para realizar la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF. Se humedecieron dos esponjas y seis papel filtro en buffer de transferencia (ver anexo) para después armar el cassette de la siguiente manera: del lado de la tapa negra se colocó una esponja, tres filtros, el gel de acrilamida con las proteínas de interés, membrana PVDF (previamente activada con metanol por 30 segundos, lavada con agua destilada por 5 minutos y lavada con buffer de transferencia por 10 minutos), tres papel filtro y por último una esponja. Se colocó en la cámara con buffer de transferencia y se le aplicaron 200 mA por dos horas (Towbin *et. al.*, 1979).

5.5 Prueba de Western blot

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

5.6 Inmunorreactividad de las proteínas recombinantes con sueros de cerdos experimentalmente infectados con PRV

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

5.5 Optimización del proceso de producción de las proteínas recombinantes del PRV en medio mínimo mineral M9 y lactosa como inductor

Debido a los altos costos de producción de proteínas recombinantes con medio LB e IPTG como inductor, se realizarán ensayos de crecimiento e inducción con medio mínimo mineral M9. Inicialmente fueron seleccionadas mediante PCR las colonias bacterianas transformadas con el gen plasmídico se realizó un cultivo bacteriano de estas *E. coli* en medio LB con 200 µl de kanamicina (10mg/ml), el cual se dejó crecer durante 18 horas. De este cultivo se tomaron 250 µl para inocular en 75 ml de medio LB bajo en sales y se incubó en agitación continua (250 rpm) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se agregaron 250 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y 50 µl de L-Ramosa

al 20% para nuevamente mantenerlos en agitación continua (250 rpm) durante 18 horas a 37°C (Larentis *et al.*, 2011).

Las cepas de *E. coli* BL21 transformadas se inocularon en medio LB+kanamicina. Posteriormente se agitaron de manera continua a 250 rpm con una temperatura de 37°C durante 16 horas, como lo reportó Cuevas-Romero y colaboradores (2016). Por otra parte, se realizará el mismo proceso en medio mínimo mineral M9 (cuadro 3 y 4) utilizada glucosa como fuente de carbono (Zhou *et al.*, 2003). Este proceso se realizará por triplicado para producir lotes experimentales. La inducción en ambos experimentos se llevará a cabo cuando el cultivo llegue a una DO 600nm de entre 0.8 y 1.5. En medio LB la inducción será realizada con IPTG y en medio mineral M9 con lactosa. Se tomará una muestra de cultivo durante cada hora (hasta siete horas) para identificar la proteína expresada por medio de SDS-PAGE y se cuantificará utilizando el método de Sedmak y Grossberg (1977). Para la evaluación de estos datos se realizará estadística descriptiva.

Cuadro 3. Composición del medio modificado M9 para 1L de cultivo

Reactivo	Cantidad
Na₂HPO₄	6.8 g
KH₂PO₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH₄Cl	1 g

Cuadro 4. Composición de la solución mineral para 10 ml

Reactivo	Cantidad
FeSO₄.7H₂O	27.8 mg
MnCl₂.4H₂O	19.8 mg
CoCl₂.6H₂O	24 mg
CaCl₂.2H₂O	14.7 mg
CuCl₂.2H₂O	1.7 mg
ZnSO₄.7H₂O	2.9 mg

5.7 Caracterización del crecimiento bacteriano de las cepas productoras de las proteínas recombinantes del PRV en biorreactores de cultivo batch

Para la inducción de la expresión a gran escala se realizó un precultivo de las cepas bacterianas productoras utilizando medio mínimo mineral M9+kanamicina+glucosa 1.5%. El crecimiento celular fue medido a lo largo del tiempo a una densidad óptica de 600 nm para obtener las curvas de crecimiento. Este se utilizó en el Biorreactor (BioFlo®/CelliGen® 115, New Brunswick, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) comenzando a una DO de 0.1 a 600nm. Las condiciones de cultivo como la temperatura, flujo de aire, pH y revoluciones por minuto se controlaron. Se calculó el crecimiento celular, el tiempo de duplicación y parámetros cinéticos. La expresión se lleva a cabo en el punto de desaceleración del crecimiento celular adicionando lactosa como fuente de carbono y NH₄Cl como fuente de nitrógeno (Singh et al., 2014).

El cultivo obtenido fue centrifugado para posteriormente realizar la ruptura celular mediante el homogeneizador Gaulin (APV Homogenizer Group, Wilmington, MA, USA), con el fin de obtener los cuerpos de inclusión, los cuales contienen una gran cantidad de proteína recombinante y solubilizarla a través de agentes caotrópicos como sarcosil y urea.

Se tomaron muestras de las distintas fases del proceso, desde el medio de cultivo, ruptura celular y solubilización, para posteriormente desnaturalizarlas y analizarlas en un SDS-PAGE.

5.8 Preparación de nanopartículas mediante filmes lipídicos

El proceso para el desarrollo de nanopartículas se realizó en el laboratorio de bioquímica y biología molecular de la BUAP CU, mediante una estancia a cargo de la PhD Brenda Sánchez y la Dra. Irma Herrera.

Se comenzó con el diseño de la metodología, utilizando como reactivos:

- Saponinas
 - Quillaja (Saponin from Quillaja bark Sigma cat S4521)

- Ácido glicirricínico (Glycyrrhizic acid ammonium salt from glycyrrhiza root (licorice) Sigma cat 50531)
- Ácido glicirricinino (Chino)
- Colesterol (Sigma cat C8686)
- Fosfolípidos (L- α -Phosphatidylcholine (PC) Sigma cat P35556)

Los fosfolípidos y el colesterol fueron preparados en cloroformo y las saponinas en PBS pH 7.4 a una temperatura mayor a 37°C, esto debido a que gelifican a temperatura ambiente. Se determinó la relación óptima de concentraciones para la formación de nanopartículas de acuerdo al diagrama pseudoternario reportado por Demana et al. 2005 (figura 3)

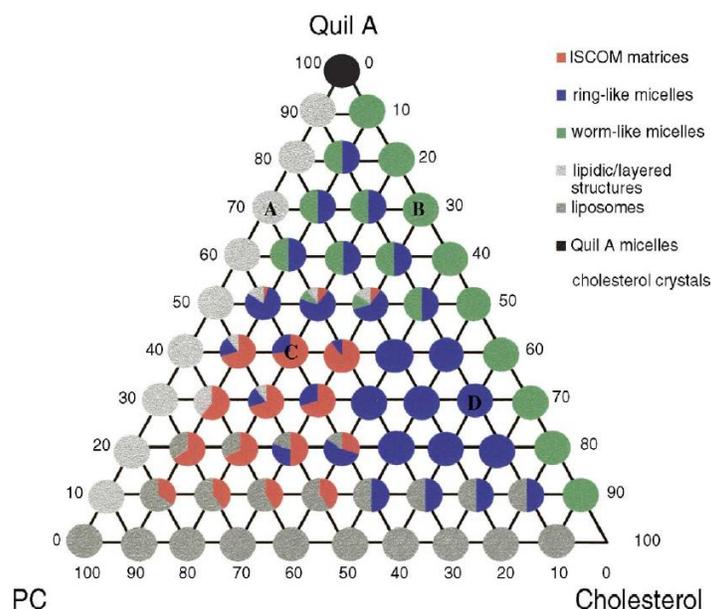


Figura 3. Diagrama pseudoternario de mezclas de colesterol, fosfatidilcolina (fosfolípidos) y QuilA (Quillaja) en buffer de tris (149mM, pH7.4) preparada por hidratación de filmes lipídicos. (Modificada de Demana et al. 2005).

Una vez determinada la relación adecuada para formación de nanopartículas, el colesterol y los fosfolípidos, fueron colocados en un recipiente (matraz o vaso de precipitado) con la finalidad de que el cloroformo se evapore y se forme una capa lipídica al fondo del recipiente. La capa de lípidos formada se hidrató con la solución de saponinas y de buffer tris 140mM a pH de 7.4 mediante agitación mecánica, corroborando que la agitación

desprenda la totalidad del filme lipídico formado. Una vez obtenida la mezcla, se procede a homogenizar con una mayor fuerza, para esto, se utilizó en el Ultra-turrax, a una velocidad aproximada de 15 000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se realiza una filtración en tandem con membrana de 1.0 μ m, 0.45 μ m y finalmente 0.22 μ m para homogenizar el tamaño de partícula.

En todos los lotes preparados se determinó el tamaño promedio de las nanopartículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) utilizando el instrumento Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600, a un ángulo de 90 °C, con una longitud de onda de 680 nm, las mediciones se realizaron durante 50 s a 20°C utilizando como dispersante agua con un índice de refracción de 1.33. Para que las muestras fueran medidas de manera correcta se realizaron diluciones en agua hasta que la señal se encontró en el intervalo correcto, cada muestra se leyó por triplicado (n= 3).

5.9 Microscopia electrónica de transmisión

Las partículas sintetizadas se analizaron mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) en el CINVESTAV-Irapuato, realizando dos tipos de tinción negativa en rejillas de cobre con filme de formvar de 200 mesh (Electron Microscopy Science), una de las tinciones fue mediante ácido fosfotúngstico al 2% (PTA por sus siglas en inglés), en donde, brevemente se colocaron 10 μ l de muestra del lado opaco de la rejilla, dejando adsorber por 10 minutos, posteriormente se retiró el excedente mediante el uso de papel filtro, se realizó un lavado con una gota de agua destilada estéril y posteriormente fue secada nuevamente mediante el uso de papel filtro, finalmente se colocaron 10 μ l de PTA durante cinco minutos y se retiró con papel filtro. El otro tipo de tinción negativa utilizada en el presente trabajo, fue con acetato de uranilo al 2.5% dejando adsorber 10 μ l de muestra en la rejilla por 15 minutos, se retiró el exceso de muestra, se dejó incubar por dos minutos y se colocaron 10 μ l de acetato de uranilo previamente centrifugado (8000rpm por 15 minutos) dejándolo incubar por 7 minutos y retirando el excedente, se realizó un último lavado con una gota de agua destilada estéril. En ambas tinciones las rejillas deben de estar completamente secas para poder realizar el análisis microscópico.

6. RESULTADOS

6.1 Producción de proteínas recombinantes

6.1.1 Análisis de la proteína NP del PRV

6.1.1.1 Diseño de iniciadores

El gen NP del PRV consta de 1638 nucleótidos que codifican para una proteína de 545 aminoácidos. Los iniciadores se diseñaron para realizar la ampliación del ORF hibridando, el iniciador delantero (5' CTCCAGGATAGAGGAGCCGA 3') hibrido partir del nucleótido 49 y el reverso (5' CTACTAAAGCTGCTGAAACATGGC 3') terminando en el nucleótido 1605, al cual, se le agregaron dos codones de paro en el extremo 5' para asegurar la terminación de la síntesis proteica. El fragmento que resulta de la amplificación presenta un tamaño de 1563pb.

6.1.1.2 Análisis *in silico*

Posteriormente se realizó el análisis *in silico* para determinar que el fragmento amplificado con los iniciadores diseñados quede en fase con el vector de expresión Champion pET Sumo (Figura 4). El vector pET Sumo-NP-RVP se muestra en la figura 5.



Figura 4. Imagen representativa de la fusión en fase de la región N-terminal de la proteína NP del PRV a la proteína SUMO y a la región de polihistidinas del vector Champion pET Sumo.

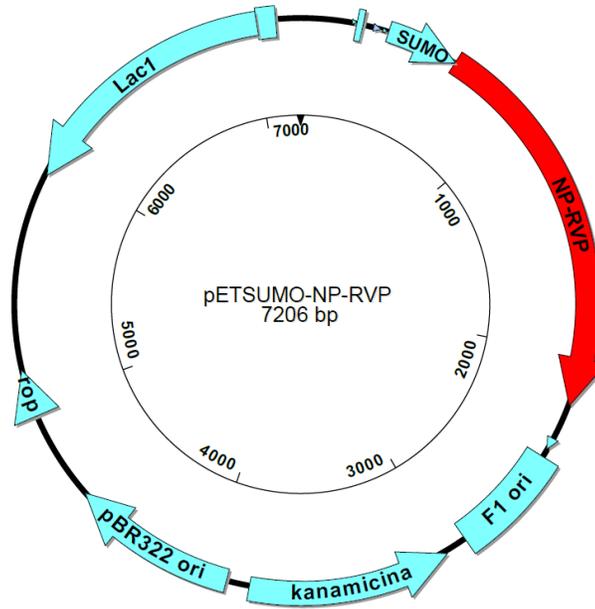


Figura 5. Vector de expresión Champion pET-SUMO-NP-RVP

Utilizando el programa Protean (DNASTar) se realizó el análisis *in silico* de la proteína recombinante NP-RVP para conocer sus características, el cual se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Características de la proteína NP-RVP

Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	70517.85 m.w.
Length	638
1 microgram =	14.181 pMoles
Molar Extinction coefficient	48840±5%
1 A(280) =	1.44 mg/ml
Isoelectric Point	6.20
Charge at pH 7	-5.97

6.1.1.3 Clonación del gen NP

Como plantilla para la amplificación del ORF de la proteína NP se utilizó la cepa LPMV. La temperatura de hibridación de los iniciadores para la amplificación mediante PCR se determinó mediante un gradiente de temperatura. En la figura 6 se muestra la imagen de la

electroforesis, en donde se observa que la banda con mayor intensidad se encuentra a una temperatura de 65°C.

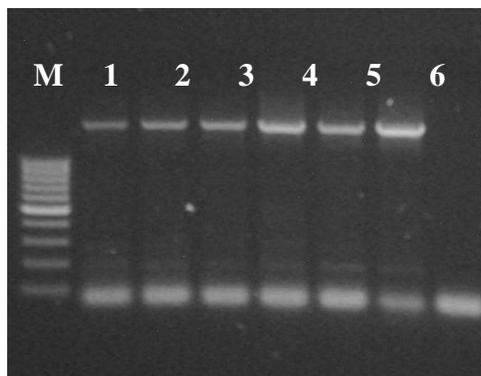


Figura 6. Resultados de la PCR para evaluar la temperatura de hibridación óptima. M) marcador de 100 pares de bases. 1) 45°C. 2) 46.4°C. 3) 54.4°C. 4) 55.8°C. 5) 61.0°C. 6) 65.0°C. B) control negativo de la reacción de PCR.

Una vez obtenida la PCR, se llevo a un mayor volumen para obtener suficiente producto para purificar de banda y ligarlo exitosamente en el vector de resguardo pJET1.2/blunt (Thermo Scientific), obteniendo un producto que fue clonado en células *E. coli* top 10, cuyo marcador de ampicilina permitió seleccionar cinco colonias a las que se les realizo la extracción de plásmido y una posterior PCR para amplificación del gen NP obteniendo resultados positivos, lo que significa que las cinco colonias contenían el gen clonado (figura 7).

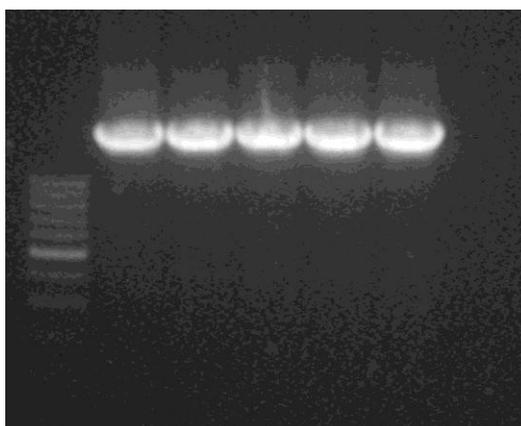


Figura 7. Resultado de la PCR para amplificar en ORF NP. Las cinco colonias seleccionadas para extracción de plásmido resultaron positivas.

Solo se seleccionó una colonia para realizar una nueva PCR a mayor volumen y obtener un purificado directamente de banda mediante columnas comerciales, sin embargo, gel de agarosa se incubo hasta su degradación a temperatura ambiente y no a 50°C como lo marca el protocolo de manufactura, esto para evitar que se degraden las adeninas adicionadas por una extensión final de 30 minutos en la PCR ya que mediante estas adeninas se logra la ligación al vector petSUMO.

Con el producto NP purificado se realizó la ligación al vector de expresión Champion-pETSUMO y una posterior transformación de la cepa de *E. coli* Top 10. Se transformaron un total de 16 colonias, las cuales fueron sembradas en medio LB con kanamicina, para posteriormente realizarse una extracción de plásmido mediante columnas comerciales. El plásmido obtenido fue analizado con una electroforesis (figura 8), donde se logro observar que los plásmidos obtenidos tenían un mayor tamaño en comparación con un plasmido Champion-pETSUMO vacio, lo que sugiere que se logró la ligación de NP.

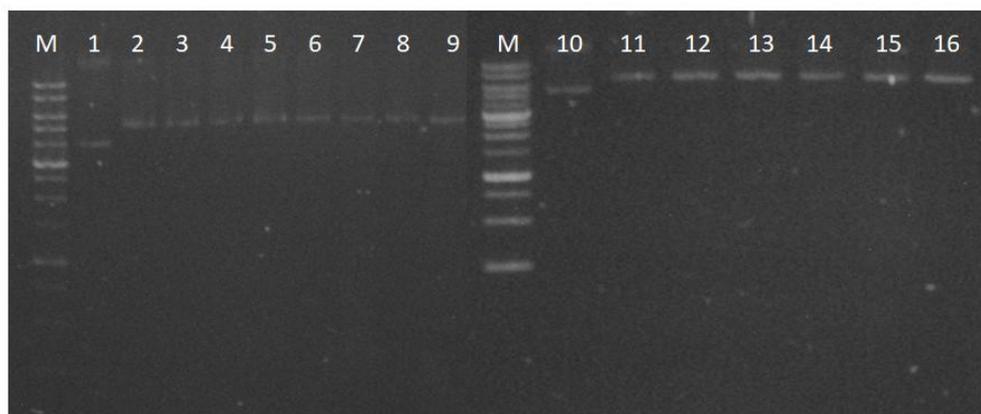


Figura 8. Electroforesis del DNA plasmídico de las colonias *E. coli* Top 10 seleccionadas de la transformación con el vector Champion-pETSUMO-NP. M) Marcador de pares de bases. 1 y 10) Vector Champion-pETSUMO vacio. 2-9) y 11-16) Plásmido de *E. coli* Top 10 transformadas.

Para corroborar la ligación y la correcta orientación se realizó una PCR utilizando un iniciador delantero que hibrida en la secuencia sumo del vector de expresión y como iniciador reverso se utilizo el diseñado para NP. Los resultados indicaron que de las 16 colonias solo cinco contaban con el inserto NP en fase (figura 9), en la electroforesis se observan amplicones inespecíficos, sin embargo solo se seleccionaron los que presentaban una banda intensa a 1600 pb aproximadamente.

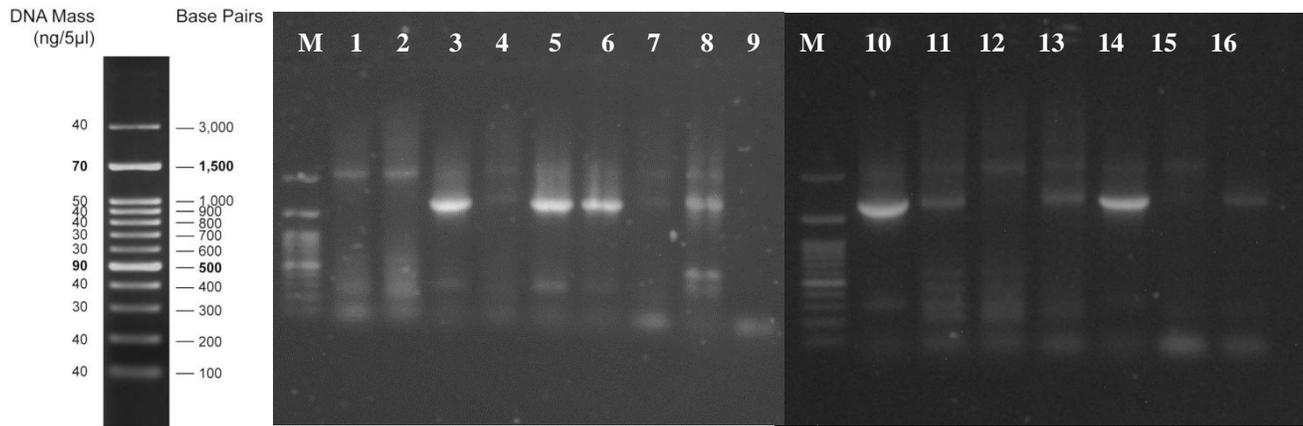


Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR para determinar la orientación del inserto NP en el vector Champion pETSUMO. M) Marcador de pares de bases. 3, 5, 6, 10 y 14) Muestras positivas.

Cinco plásmidos fueron positivos, de los cuales solo se seleccionaron dos para realizar la transformación de la cepa de expresión BL21 tres y diez de la figura 10.

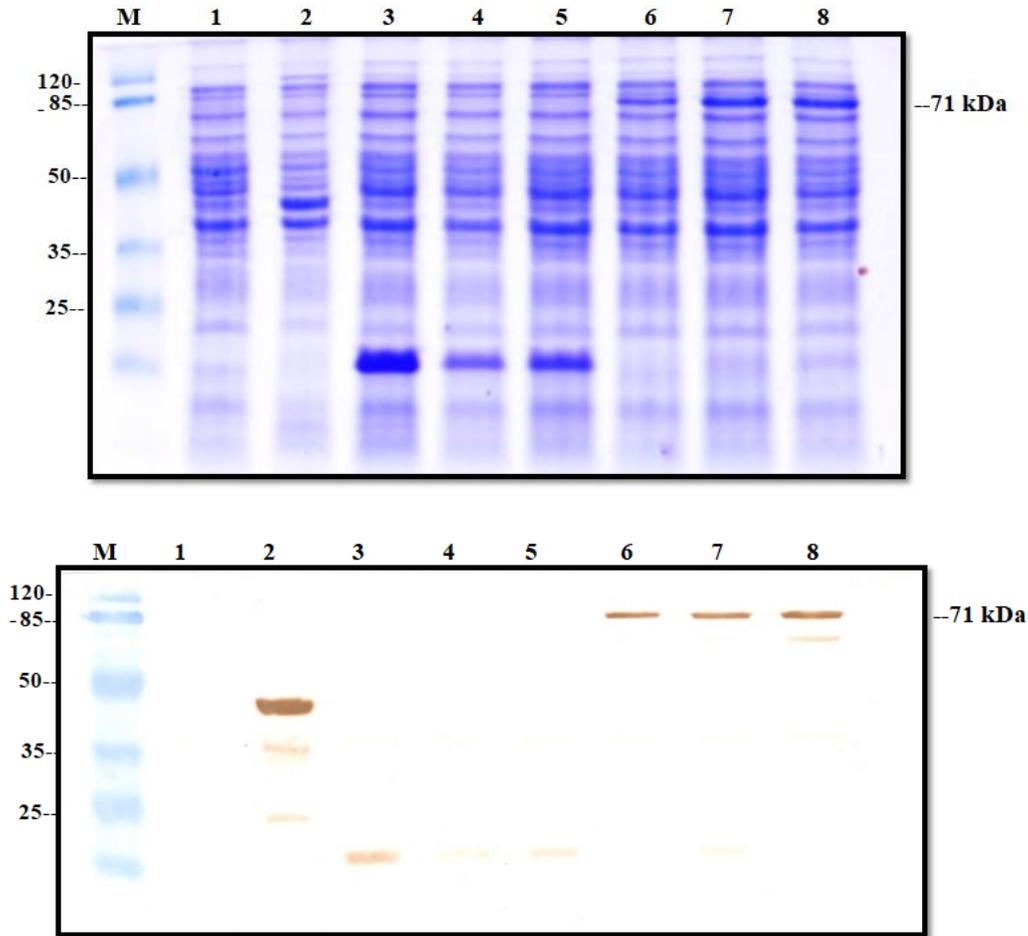


Figura 10. Producción de la proteína NP en la cepa E. coli BL21. Tinción de Coomassie y Western Blot con detección anti-hys. 1) control negativo 2) control positivo 3-8) diferentes clonas de L21-NP

6.1.2 Análisis de la proteína M del PRV

6.1.2.1 Diseño de iniciadores

El gen M del PRV consta de 1110 nucleótidos que codifican para 369 aminoácidos. El iniciador delantero se diseñó para la amplificación del ORF, hibridando a partir del nucleótido 49 (5' ACTGCACAACCTTCAACCATTTCC 3') y el iniciador reverso permite la amplificación hasta el nucleótido 1110 (5' GCTACTACTTACGGAAAGGATTCCAG 3'), al cual se le agregó en el extremo 5' un codón de paro adicional y una G para obtener el parámetro ideal de G-C. El fragmento por amplificar presenta un tamaño de 1066pb.

Los iniciadores fueron analizados para determinar que sus características eran adecuadas en cuanto a la formación de dímeros y horquillas.

6.1.2.3 Análisis *in silico*

Mediante el programa SeqBuilder (DNASTar) se realizó el análisis *in silico* del ORF del gen M para evidenciar que el fragmento amplificado se encontraba en fase con la proteína sumo y las polihistidinas (Figura 11), de modo que el vector circular pET SUMO-M-RVP se muestra en la figura 12.

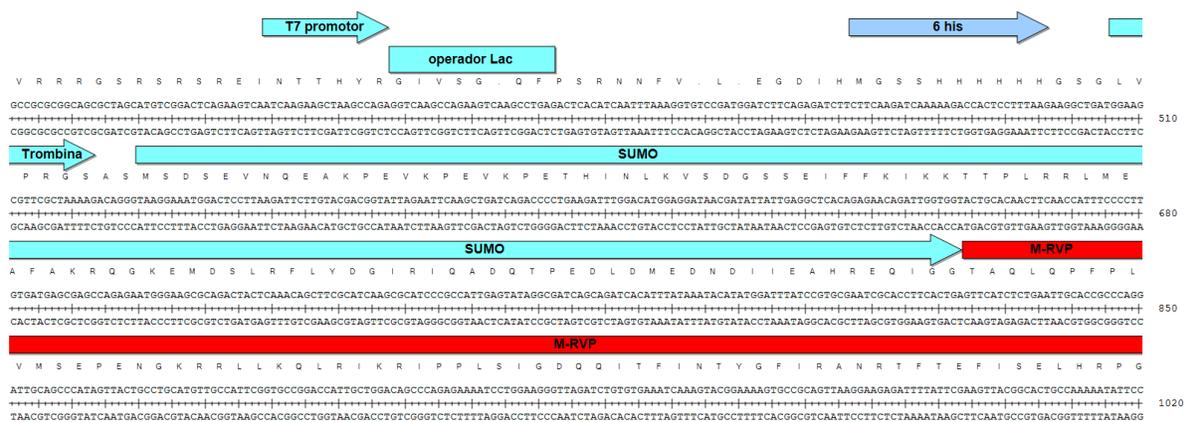


Figura 11. Imagen representativa de la fusión en fase de la región N-terminal de la proteína M del PRV a la proteína SUMO y a la región de polihistidinas.

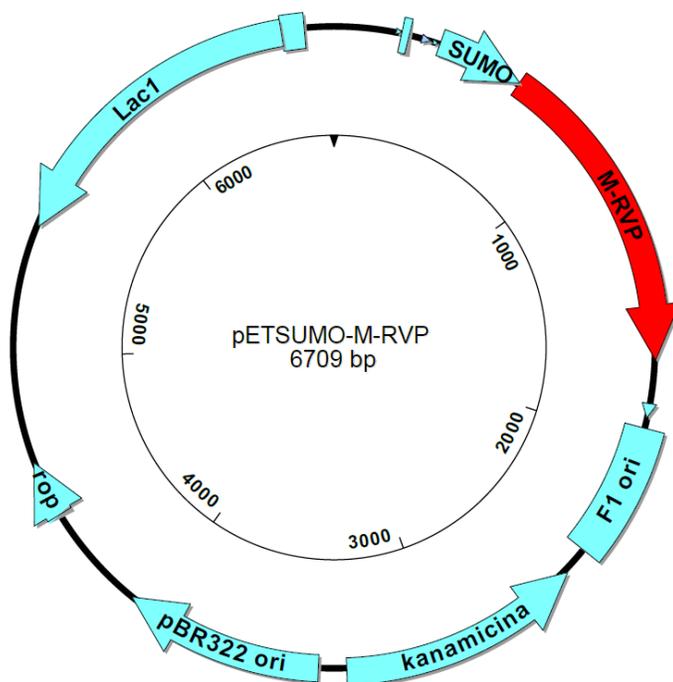


Figura 12. Vector de expresión Champion pET-SUMO-M-RVP

Utilizando el programa Protean (DNASTar) se realizó el análisis *in silico* de la proteína NP-RVP, el cual se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características de la proteína recombinante M-RVP

Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	53237.68 m.w.
Length	472
1 microgram =	18.784 pMoles
Molar Extinction coefficient	37680±5%
1 A(280) =	1.41 mg/ml
Isoelectric Point	8.96
Charge at pH 7	12.07

6.1.2.4 Clonación del gen M

Para realizar la amplificación del ORF M se utilizó la cepa LPMV utilizando un gradiente de temperatura para conocer los parámetros óptimos de hibridación de los iniciadores diseñados para la PCR. En la figura 8 se muestran los resultados, indicando que la mayor cantidad de copias del gen M se encontraban a los 61°C en la etapa de hibridación de iniciadores (figura 13).

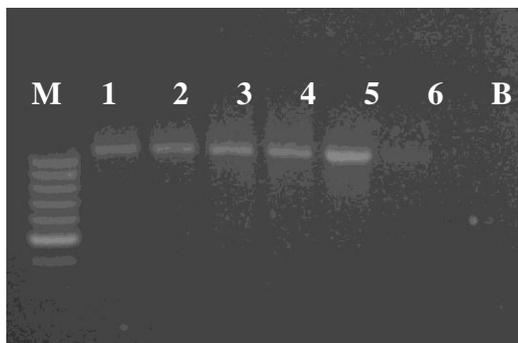


Figura 13. Resultados de la PCR para evaluar la temperatura de hibridación óptima. M) marcador de 100 pares de bases. 1) 45°C. 2) 46.4°C. 3) 54.4°C. 4) 55.8°C. 5) 61.0°C. 6) 65.0°C. B) control negativo de la reacción de PCR.

Una segunda PCR se llevó a cabo para posteriormente realizar una purificación a partir de banda. El resultado se visualizó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1.0% (Figura 14). El producto purificado del gen M fue utilizado para realizar la clonación en el vector de resguardo pJET.



Figura 14. Producto de PCR gen M purificado a partir de banda.

Del resultado de la clonación en el vector de resguardo y la transformación de la cepa *E. coli* top 10, se seleccionaron cinco colonias, de las cuales se les realizó extracción del DNA

plasmídico. En la figura 15 se muestra una electroforesis de los cinco plásmidos, en donde se observa que la colonia número tres con un menor tamaño, por lo que se dedujo que no presento el inserto M-RVP. Para corroborar lo anterior se realizó una PCR de los plásmidos obtenidos, el resultado permitió determinar que la cepa 2, 4 y 5 presentaban el inserto (figura 16). La cepa 2 fue seleccionada para la subclonación en el vector de expresión pET SUMO.

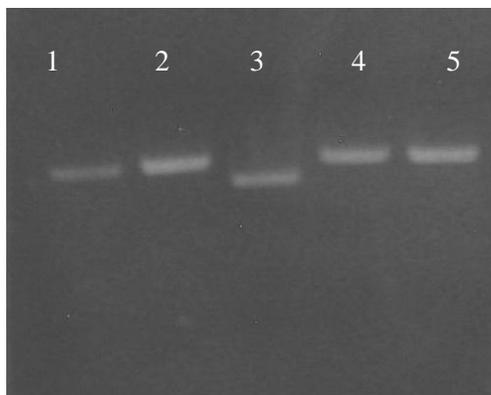


Figura 15. Electroforesis del DNA plasmídico de las colonias seleccionadas de la transformación del vector pJET-M-RVP en la cepa de resguardo *E. coli* top 10.

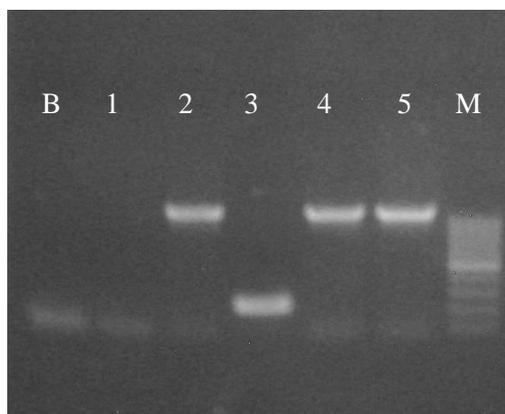


Figura 16. Resultado de la PCR para amplificar en ORF M. Las cinco colonias seleccionadas para extracción de plásmido resultaron positivas. B) Blanco de la PCR. 1-5) colonias de *E. coli*-M-RVP top 10 seleccionadas. M) Marcador de pares de bases.

Con el plásmido obtenido de la colonia 2 se realizó una PCR aumentando el tiempo de extensión final a 30 minutos, para agregar una cola de adeninas, las cuales se requieren para el proceso de clonación en el vector pET SUMO. Posteriormente el producto fue purificado directamente de reacción y visualizado mediante una electroforesis (figura 17).

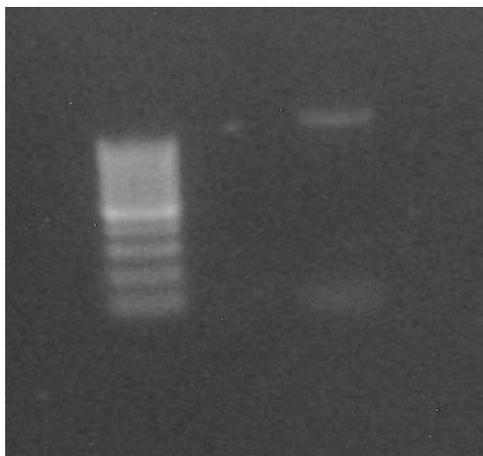


Figura 17. Resultado de la amplificación y purificación del ORF M del RVP del plásmido de la colonia 2.

Con el producto purificado se procedió a realizar la ligación al vector de expresión y posteriormente la transformación en la cepa *E. coli* top 10, de la cual fueron seleccionadas cuatro colonias. A las cuales se les realizó una primera PCR para determinar si tenían el inserto del gen M y la segunda PCR se realizó para determinar la orientación del producto. Los resultados mostraron que la colonia 1 y 2 presentaban inserto y orientación 5'-3', por lo que ambas fueron candidatas para la transformación en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (figura 18).

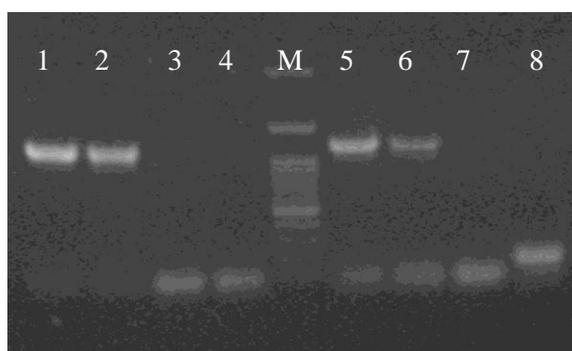


Figura 18. 1-4) PCR de ORF M de las cuatro colonias seleccionadas. M) Marcador de 100 pares de bases (plus). 5-8) PCR de orientación del vector pET SUMO-M-RVP

Con el plásmido de la construcción pETSUMO-M se realizó la transformación de la cepa de expresión *E. coli* BL21. De las colonias transformadas se seleccionaron seis para realizar la prueba de expresión de proteína. Los resultados fueron evaluados por SDS-

PAGE con tinción de azul de Coomasie y Western Blot utilizando anti-his (figura 19). En análisis *in silico* se estimo que el peso de la proteína SUMO-M fue de 53 Kda.

Mediante la tinción con azul de Coomasie se observa una ligera sobre expresión a un peso aproximado de 50 Kda en las seis clonas, esto comparado con el control negativo y positivo. El control positivo expresa la proteína CAT. La expresión de la proteína recombinante se corrobora mediante western blot, demostrando reconocimiento en el control positivo y en las seis clonas, donde incluso se observan algunas degradaciones propias de la proteína

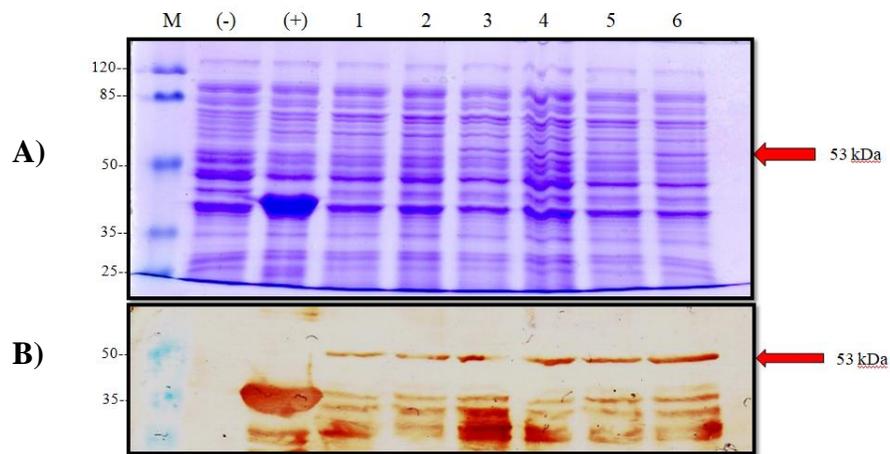


Figura 19. Pruebas de expresión de las clonas BL21-M. A) Tinción con azul de Coomasie. B) Western Blot. M) Marcador de peso molecular en Kda. (-) control negativo, cepa BL21 nativa. (+) BL21 CAT. 1-6) Clonas BL21-M.

6.1.3 Análisis de la proteína HN del PRV

Para la clonación se utilizaron los iniciadores reportados por Cuevas y colaboradores (2016) y como plantilla el gen HN del vector de expresión pDualGC del mismo trabajo. Se realizaron los ensayos *in silico* de los iniciadores para corroborar que el gen quedaba en fase con el vector, lo que nos asegura la correcta transcripción de la proteína recombinante HN (figura 20 y 21).

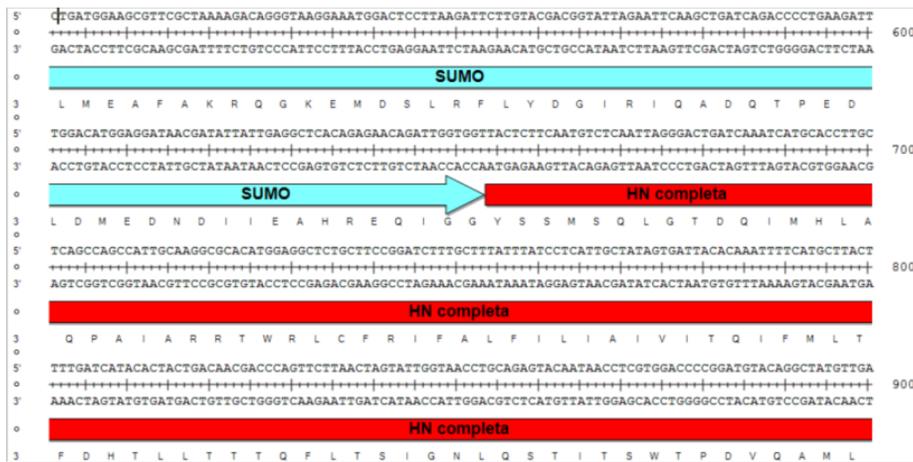


Figura 20. Vector de expresión ChampionpET-SUMO-HN completa

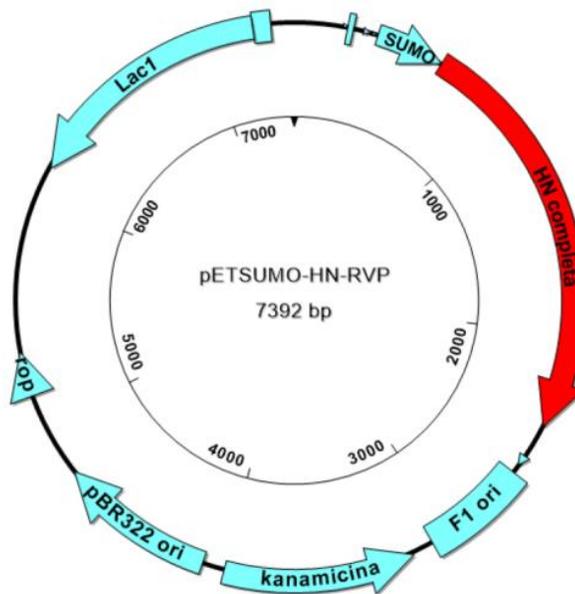


Figura 21. Imagen representativa de la fusión en fase de la región N-terminal de la proteína HN del PRV a la proteína SUMO.

Las características de la proteína SUMO-HN fueron analizadas mediante el programa Protean (Dnastar) (cuadro 7).

Cuadro 7. Características de la proteína recombinante SUMO-HN completa del PRV

Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	75715.12 m.w.
Length	683
1 microgram =	13.207 pMoles
Molar Extinction coefficient	87480±5%
1 A(280) =	0.87 mg/ml
Isoelectric Point	7.75
Charge at pH 7	4.36

Se amplificaron 1749 pb del gen HN mediante PCR, utilizando como plantilla el plásmido obtenido de la cepa *E. coli* BL21-pDUALGC-HN (figura 22), posteriormente el producto se purificó de banda mediante columnas comerciales. Se realizó la ligación en el vector de resguardo pJET con la cual se transformó la cepa *E. coli* Top 10, a partir de dicha cepa se realizó una subclonación en el vector de expresión Champion-pETSUMO y transformación de Top 10.

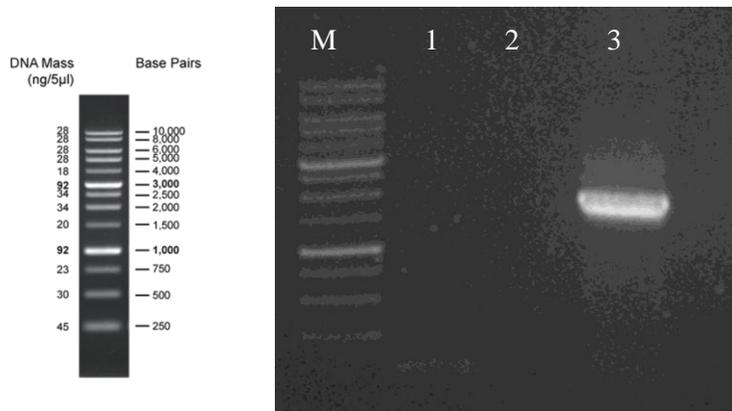


Figura 22 Amplificación mediante PCR del ORF HN. M) marcador de pares de bases 1Kb AccuRuler DNA RTU. 1) control negativo. 2) carril vacío. 3) Amplificación HN.

De las colonias transformadas de *E. coli* Top 10 con el vector pETSUMO-HN se seleccionaron seis, de las cuales se extrajo DNA plasmídico y se analizó mediante una electroforesis (figura 23). Los resultados muestran que cinco de las seis plásmidos tienen un mayor tamaño, lo que indica que se clonó el fragmento HN. Una vez verificada la correcta clonación se procedió al análisis de orientación para una correcta expresión de la proteína.

Los resultados se observan en la figura 24, donde tres clonas amplifican con una mayor intensidad, seleccionando dos (dos y seis) para realizar la transformación en la cepa de expresión *E. coli* BL21.

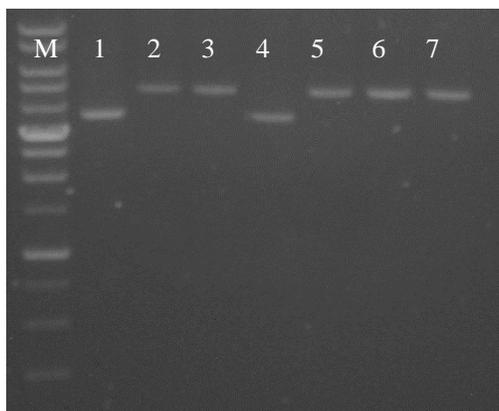


Figura 23. Electroforesis del DNA plasmídico de las colonias seleccionadas de la transformación del vector Champion pETSUMO-HN en la cepa de resguardo *E. coli* top 10



Figura 24. Electroforesis de los productos de PCR para determinar la orientación del inserto HN en el vector Champion pETSUMO. Se seleccionaron las clonas que corresponden al carril 2 y 6 debido a que no presentan amplificación inespecífica.

Con esta construcción y teniendo seleccionado el plásmido capaz de producir la proteína recombinante HN se realizara la transformación de la cepa *E. coli*. Y las pruebas de expresión, las cuales fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y Western Blot, dando como resultados, una evidente sobre expresión en las colonias transformadas e inducidas mediante la tinción de Coomassie, mientras que por Western Blot de detecto

inmunorreacción a los anticuerpos anti-his correspondientes a las cepas que presentaron sobre expresión (figura 25).

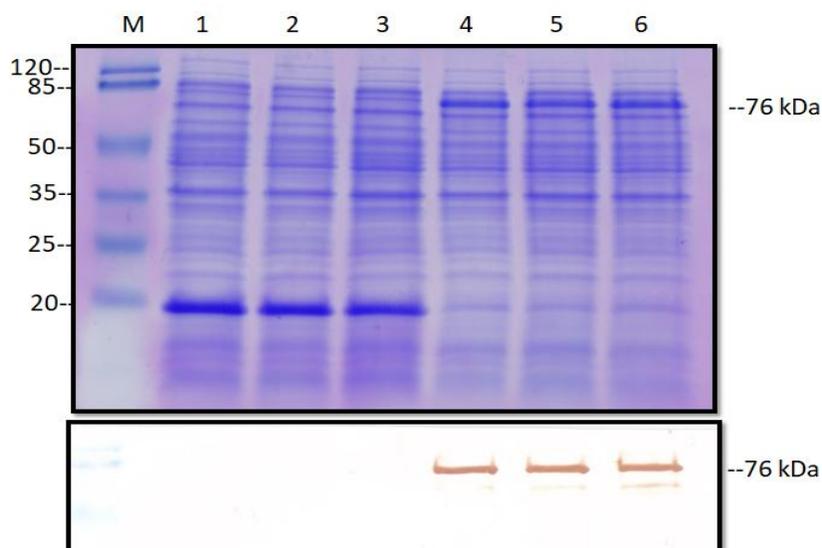


Figura 25. Prueba de expresión de la proteína recombinante NP. SDS-PAGE (A) y Western-Blot (B). M) Marcador de peso molecular. 1-6) BL21-HN. Los resultados permiten observar que existe una sobreexpresión en las colonias evaluadas en los carriles 4, 5 y 6.

6.2 Purificación e inmunodetección de proteínas recombinantes

6.2.1 Purificación y caracterización de la proteína NP

La proteína NP fue purificada de las fracciones insolubles debido a que la mayor producción se encontró en esta fase. Los cuerpos de inclusión fueron recuperados del pellet celular por ruptura mecánica y solubilizados mediante el uso de sarcosyl. La proteína ya soluble se cargó en las columnas para su purificación y fue eluida con imidazol, esta fracción fue analizada por SDS-PAGE y Western Blot (figura 26).

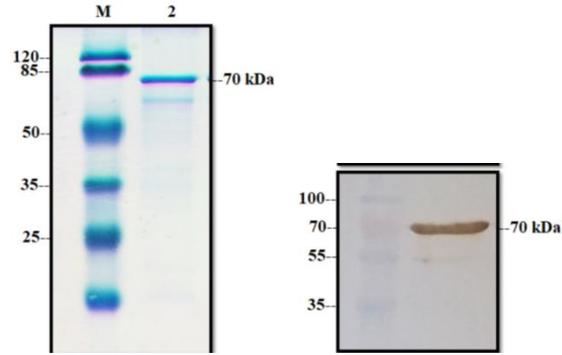


Figura 26. SDS-PAGE y Western Blot de la fracción purificada de la proteína NP del PRV

Para la determinación de la inmunodetección de la proteína NP, se utilizaron los sueros de muestras de animales experimentalmente infectados por Western Blot. El suero reconoció la proteína desde los cinco días post infección con un bajo grado de reconocimiento, el cual va en aumento a partir del día 10, con un máximo reconocimiento a los 30 días post infección, mientras que todos los sueros de los animales persistentes a la infección (con más de 30 dpi) se siguen reconociendo (figura 27).

Muestra	Resultado	Grado de reconocimiento
Positivo LPMV		++++
Negativo		-
5 PI		++
6 PI		++
10 PI		++++
14 PI		++++
30 PI		++++
75 PI		+++
Persistente		+++
Persistente		+++
Persistente		+++

Figura 27. Inmuno reactividad de la proteína NP a los sueros de cerdo infectados experimentalmente

6.2.2 Purificación y caracterización de la proteína M

Una vez que se obtuvo la proteína M, se procedió a producir un lote más grande para realizar los ensayos de purificación mediante cromatografía de afinidad. Los resultados se evaluaron mediante un SDS-PAGE y Western Blot (figura 28), observando que las degradaciones previas a la purificación disminuyeron de manera considerable.

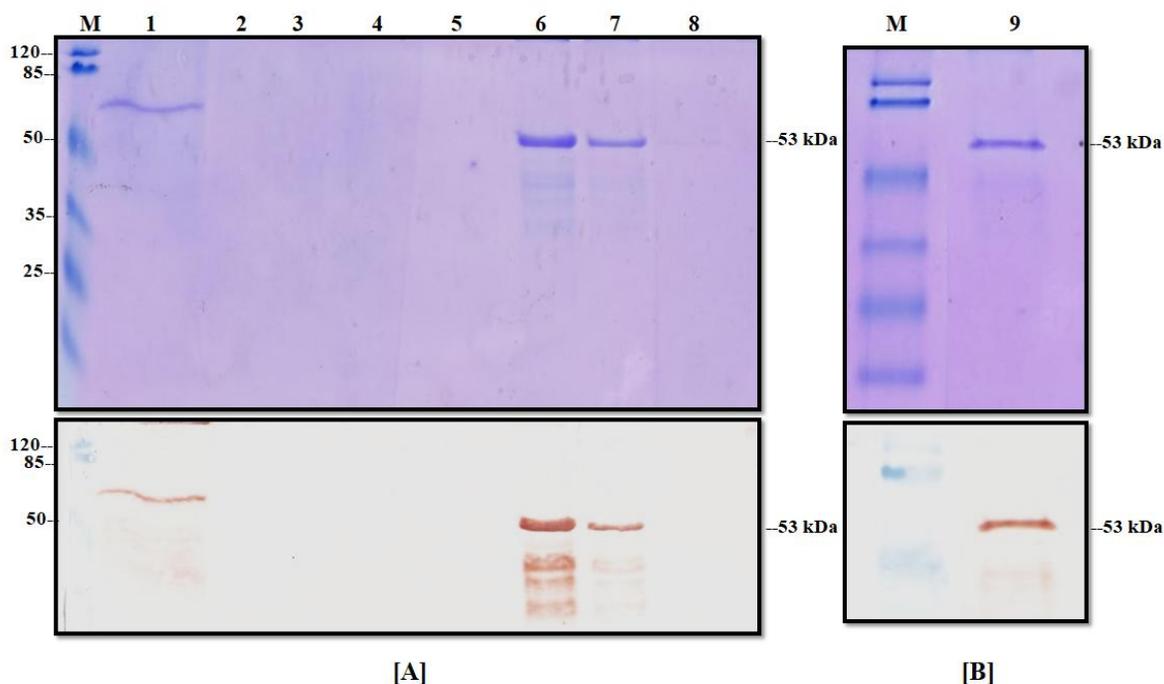


Figura 28. Purificación por cromatografía de afinidad. Tinción con azul de Coomassie y Western Blot. A) M) Marcador de peso molecular. 1) Cuerpo de inclusión solubilizado. 2 y 3) fracción del no pegado. 4 y 5) fracción de los lavados. 6-8) eluciones. B) Proteína M dializada y purificada. M) Marcador de peso. 9) Proteína dializada.

Posterior a esto se realizó un ensayo de antigenicidad para determinar la detección de la proteína mediante diversos sueros de cerdos infectados experimentalmente, los cuales correspondieron a animales desde los cinco días post infección, hasta animales persistentemente infectados, dando como resultado el reconocimiento mostrado en la figura 29 fueron capaces de reconocer la proteína recombinante M del *Rubulavirus porcino*.

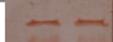
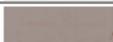
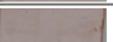
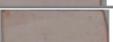
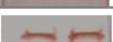
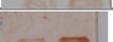
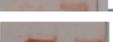
Muestra	Resultado	Grado de reconocimiento
Positivo LPMV		++++
Negativo		-
5 días P.I.		++
6 días P.I.		+++
14 días P.I.		++
30 días P.I.		+
30 días P.I.		+++
30 días P.I.		+
Persistente		-
Persistente		++
Persistente		+++
Persistente		+++

Figura 29. Prueba de antigenicidad usando sueros de cerdos infectados. P.I. (días post infección). Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:500 y el anticuerpo secundario 1:5000

6.2.3 Purificación de la proteína HN

Se produjo un lote de la proteína pDualGC-HN completa para poder utilizarla en ensayos de inclusión a las nanopartículas. La proteína fue solubilizada mediante el uso de 2-mercaptoetanol como agente desnaturalizante y posteriormente purificada con cromatografía de afinidad. Se tomaron diversas muestras de las fracciones de proteína no pegada a la columna, lavados de la columna y elusión de la proteína recombinante. Estas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie y Western Blot utilizando como anticuerpo primario anti-his (figura 30). De un cultivo de 500 ml se lograron obtener 15 ml de proteína purificada a una concentración de 70ug/mL

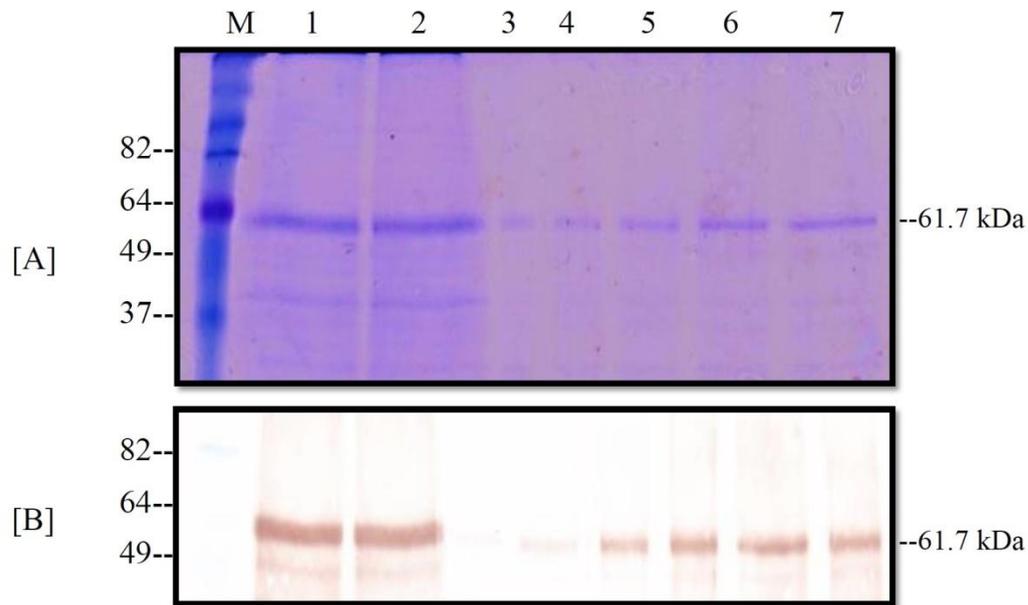


Figura 30. SDS-PAGE. Tinción con azul de Coomasie y Western Blot de las fracciones del proceso de purificación de la proteína recombinante HN del Rubulavirus porcino. M) Marcador de peso molecular. 1-2) Proteína no pegada a la columna. 3-4) Fracciones de lavado de la columna. 5-7) Elución de la proteína recombinante HN.

6.3 Optimización de medio mínimo mineral para crecimiento bacteriano

La curva celular se comparó con el crecimiento en medio LB (figura 31). La cepa BL21-HN mostró una diferencia importante entre el crecimiento en medio LB y M9, la fase de latencia fue más corta en LB y se extendió menos de 2 h en comparación con el medio M9 donde la fase de latencia se extendió más de 6 h. La fase exponencial fue similar en los dos cultivos, con una velocidad específica de crecimiento similar (μ_{max} : 1,16 h⁻¹ para LB y μ_{max} : 1,0 h⁻¹ para medio M9), sin embargo, esta fase se completó en 3 hrs en medio LB mientras que en el medio M9 la fase se completó en 7 hrs. El tiempo de duplicación (t) para BL21-HN en medio M9 fue de 0,69 h. En ambos medios, la cepa BL21-HN alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a 0,5 g/L y la fase de desaceleración aproximadamente a 0,4 g/L

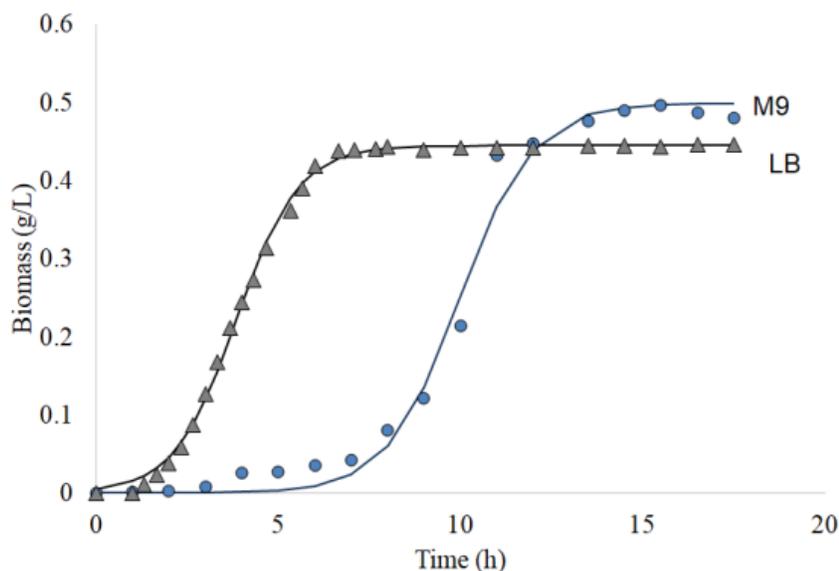


Figura 31. Crecimiento de BI-21 en medio LB y medio mínimo modificado M9 en matraz de 200 ml. Los datos experimentales de medio Lb y medio M9 fueron corregidos utilizando el modelo de crecimiento celular con integración con el modelo logístico.

6.4 Producción de proteínas mediante el escalamiento en biorreactor

Este objetivo se realizó solo con la proteína HN en el Instituto Tecnológico de Celaya con colaboración del Dr. Francisco Villaseñor, donde, se produjo la proteína del PRV en el vector de expresión pET SUMO y se llevaron a cabo ensayos de establecimiento de bioprocesos para el escalamiento de la producción a bajo costo, utilizando el medio mineral M9 y lactosa como inductor.

Utilizando la cepa *E. coli* BL21-HNsumo, se realizó en el TEC de Celaya un ensayo de escalamiento en el biorreactor BioFlo[®]/CelliGen[®] 115, New Brunswick (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) a un volumen de cinco litros, lo anterior, con medio mínimo modificado M9, glucosa al 1,5% como fuente de carbono y lactosa como inductor (figura 32).



Figura 32. Biorreactor BioFlo[®]/CelliGen[®] 115, New Brunswick.

En comparación con los ensayos en matraz, la cepa BL21-HN mostró un crecimiento similar en Biorreactor (figura 33A) con medio mínimo modificado M9, una fase de latencia extendida con más de 7 h. La fase exponencial se completó en aproximadamente 7 h y se observaron diferencias significativas en el tiempo de duplicación (t) de 1,36 h y con el μ_{max} de 0,5 h⁻¹. La tensión alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a 0,58 g/L y la fase de desaceleración aproximadamente a 0,44 g/L. El consumo de glucosa se midió a lo largo de todo el cultivo, con un resultado de $Y_{x/s} = 0.31$, las bacterias comenzaron a consumir la glucosa después de 6 h cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial. La inducción se llevó a cabo en la fase de desaceleración, cuando el consumo de glucosa se encontraba en valores insignificantes (0,86 g/L), adicionando lactosa al 1,5% como concentración como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno se añadió NH₄Cl. La producción de proteína recombinante se midió por Western blot (figura 33B). La producción de rHN-PRV se observó desde la primera hora de inducción, el aumento de la producción se prolongó hasta las 6 h. Después de eso, la producción disminuyó; indicando que el tiempo óptimo para la inducción y para recuperar la mayor producción es de 6 h. Aunque la expresión en el medio M9 modificado retrasa el lag y la fase exponencial en horas, en comparación con el medio LB, convirtiéndose en un largo proceso de inducción en el biorreactor, se compensa usando lactosa como inductor en lugar de IPTG lo que reduce considerablemente el costo, justificando la uso del M9 modificado.

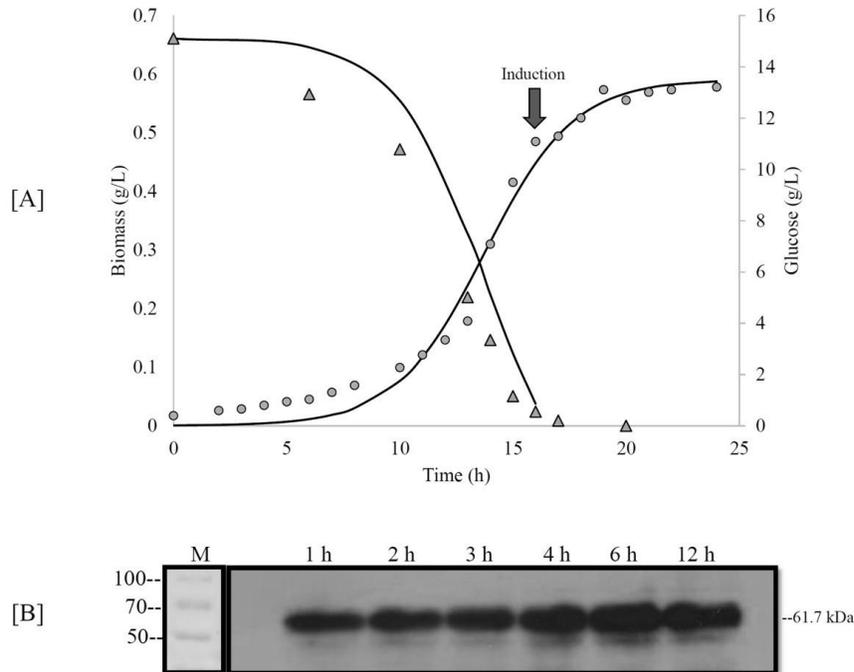


Figura 33. Crecimiento e inducción de BL-21 en sistema de biorreactor. A) Datos experimentales de la curva celular en medio mínimo modificado M9 (●) y consumo de glucosa (▲) corregido usando el modelo de crecimiento celular de Port con el momento de inducción marcado con una flecha. B) Análisis por Western Blot después de la inducción con lactosa en medio mínimo modificado M9, M- marcador de peso molecular e inducción a diferentes horas después de la inducción con lactosa (1-12 hrs).

6.5 Elaboración de nanopartículas

El método de diálisis no otorgó resultados satisfactorios, por lo que se trabajó con la hidratación de filmes lipídicos, permitiendo establecer dos concentraciones de trabajo en saponina : colesterol : fosfolípidos (2 : 1: 2 y 2:1.5:1.5) y una agitación mecánica con el homogeneizador Bead Beater (Biospec Products) a diferentes tiempos (cinco y diez minutos). Estos ensayos se realizaron con los tres tipos de saponina: Quillaja (Cuadro 8), Ac. Glicirricínico (sigma) (cuadro 9) y Ac. Glicirricínico (chino) (cuadro 10).

Cuadro 8. Determinación de tamaño de partícula utilizando Quillaja como saponina. Se resaltan los mejores valores

Muestra		Tamaño nm	Población %	Desv. Est.	PDI
2 : 1 : 2 Cinco minutos	Número	73.90	100	24.69	0.208
	Intensidad	159.7	100	70.06	
2 : 1 : 2 Diez minutos	Número	66.58	100	21.30	0.230
	Intensidad	142.8	97.00	64.00	
		4490	3.00	882.7	
2 : 1.5 : 1.5 Cinco minutos	Número	41.91	100	13.89	0.286
	Intensidad	204.0	100	129.2	
2 : 1.5 : 1.5 Diez minutos	Número	40.15	100	12.98	0.254
	Intensidad	150.7	100	95.79	

Cuadro 9. Determinación de tamaño de partícula utilizando ac. Glicirricínico (sigma) como saponina. Se resaltan los mejores valores.

Muestra		Tamaño nm	Población %	Desv. Est.	PDI
2 : 1 : 2 Cinco minutos	Número	94.87	100	30.77	0.187
	Intensidad	179.3	98.4	75.10	
2 : 1 : 2 Diez minutos		47200	1.6	767.00	0.243
	Número	58.95	100	21.96	
	Intensidad	183.5	98.3	92.23	
2 : 1.5 : 1.5 Cinco minutos		4913	1.7	660.9	0.134
	Número	129.8	100	45.35	
2 : 1.5 : 1.5 Diez minutos	Intensidad	216.7	100	80.41	0.150
	Intensidad	150.7	100	95.79	

Cuadro 10. Determinación de tamaño de partícula utilizando ac. Glicirricínico (chino) como saponina. Se resaltan los mejores valores.

Muestra		Tamaño nm	Población %	Desv. Est.	PDI	
2 : 1 : 2	Número	62.77	100	22.49	0.232	
	Cinco minutos	Intensidad	213.2	100		126.5
2 : 1 : 2	Número	50.34	100	19.14	0.286	
	Diez minutos	Intensidad	282.1	90.6		125.3
			61.24	7.1		12.10
2 : 1.5 : 1.5		5052	2.4	579		
2 : 1.5 : 1.5	Cinco minutos	Número	155.2	100	54.21	0.217
	Diez minutos	Intensidad	230.8	95.00	79.08	
2 : 1.5 : 1.5	Intensidad	150.7	100	95.79	0.240	

Se logró determinar que la mejor relación saponina : colesterol : fosfolípidos es de 2 : 1 : 2 y un tiempo de homogenización de diez minutos para obtener un tamaño de partícula de entre 40 y 60 nm de diámetro como lo indicó Morein en 1984.

El análisis morfológico de las nanopartículas se realizó en el Cinvestav unidad Irapuato mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). Las partículas observadas tenían un tiempo de almacenamiento de dos meses a 4°C, fueron fijadas en rejillas de cobre y teñidas con acetato de uranilo al 2.5%

El análisis de las partículas sintetizadas con Quillaja como saponina permitió la observación de partículas parecidas a los ISCOMS con un tamaño aproximado de 60nm (figura 34).

Los ensayos realizados con ácido glicirricínico con el almacenamiento de dos meses permitieron observar estructuras de diversos tamaños, los cuales iban desde 40 nm aproximadamente hasta los 2600nm. Estos tamaños tan grandes pudieran ser explicados debido a un efecto de almacenamiento las partículas presentando una coalescencia (figura 35).

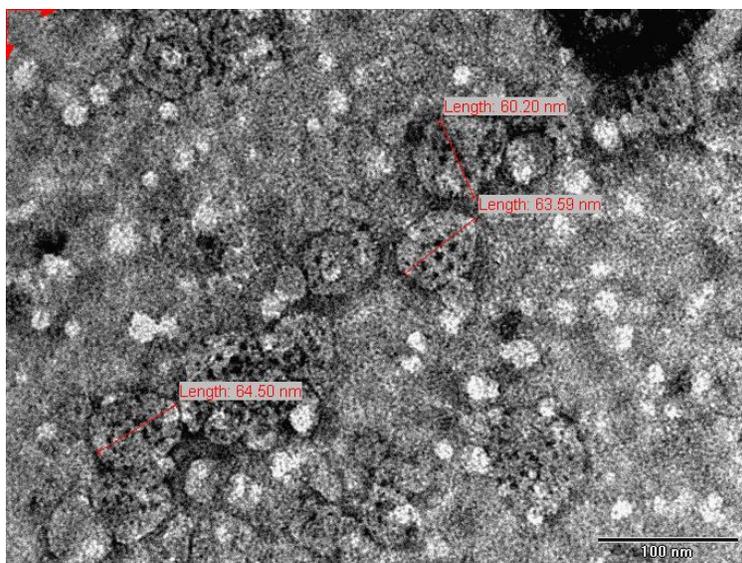


Figura 34. Imagen obtenida de MET de las partículas sintetizadas con Quillaja como saponina.

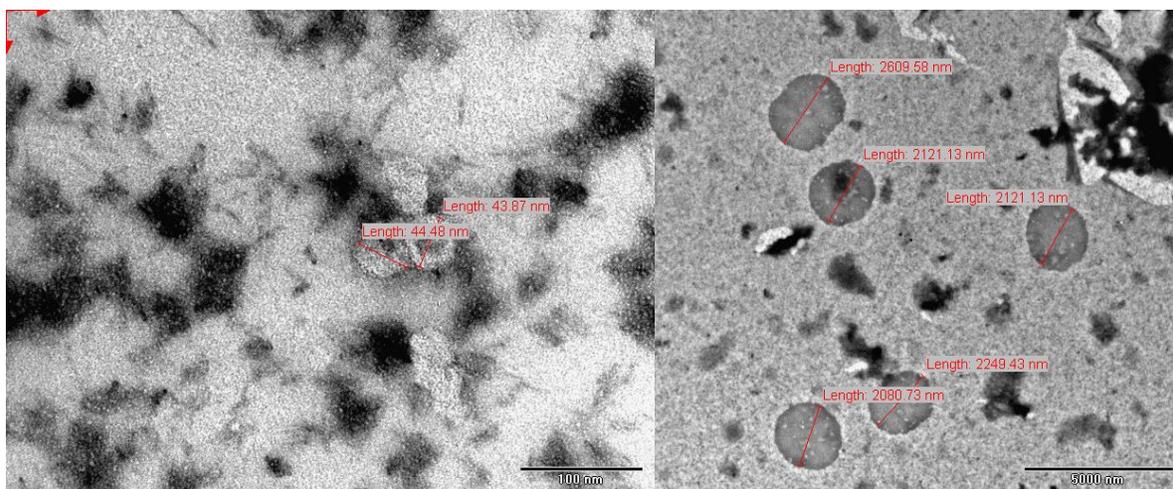


Figura 35. Imagen obtenida de MET de las partículas sintetizadas con ácido glicirricínico como saponina.

Otras estructuras encontradas en la síntesis realizada con ácido glicirricínico, las cuales presentan un tamaño aproximado de entre 10 y 20nm, al parecer se encuentran rodeadas de lípidos. Estas estructuras pequeñas podrían ser micelas de saponinas, de acuerdo a lo reportado por Demana en el 2004. Esta observación nos permitiría determinar que las estructuras formadas con ácido glicirricínico no son estables en almacenamiento a dos meses después de su síntesis.

Una muestra de la síntesis de nanopartículas con ácido glicirricínico con una semana de almacenamiento fue observada mediante MET, utilizando una tinción con ácido fosfotúngstico al 2%. Se identificaron estructuras de entre 80nm y 115nm, en donde se puede ver la fusión entre partículas (figura 36).

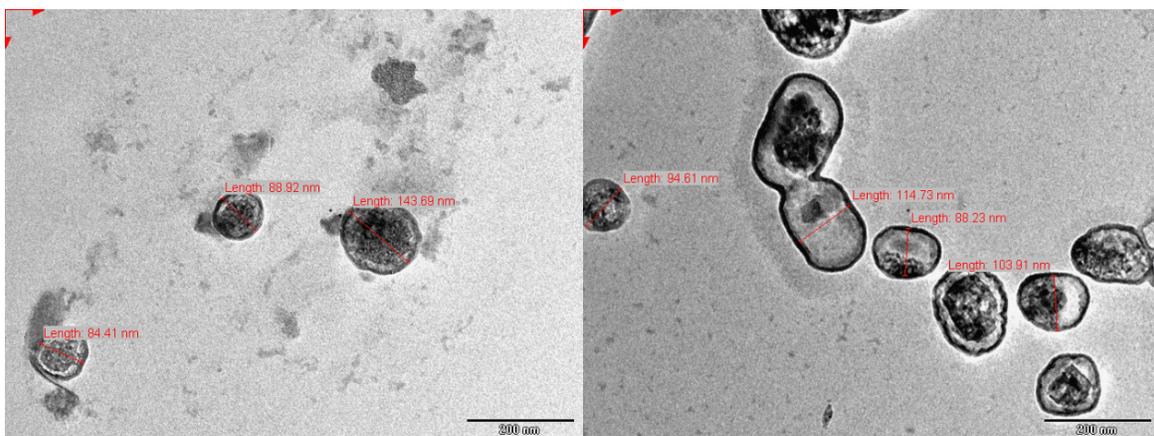


Figura 36. Imagen obtenida de MET. Nanopartículas de ac glicirricínico con una semana de almacenamiento teñidas con ácido fosfotúngstico al 2%.

7. DISCUSIÓN

Desde que la enfermedad de ojo azul aparición en México, diversos estudios se han enfocado en desarrollar estrategias para el diagnóstico, prevención y control de la EOA. Sin embargo, la enfermedad se mantiene endémica en la región del bajo mexicano, con brotes esporádicos y nuevas cepas neurovirulentas (2008-2015) con diferencias genéticas reportadas. Estos hallazgos sugieren que diferentes cepas del PRV genéticamente y antigénicamente diferentes se encuentran circulando en la población porcina, dificultando el diagnóstico y los esfuerzos en la vacunación (Sanchez-Betacourt et al 2008; Cuevas-Romero et al 2016; Ali et al 2017)

El PRV se encuentra en adaptación continua en el territorio mexicano prevaleciendo en la población porcina. Las técnicas clásicas de diagnóstico en los laboratorios, como la inhibición de la hemoaglutinación, inmunoperoxidasa y seroneutralización, son consideradas como obsoletas, debido a que exhiben diversas desventajas, que hacen difícil su estandarización a nivel nacional, que tienen que ver con la colección de glóbulos rojos adecuados, tiempos y temperaturas de incubación, así como la determinación del título viral (Hidalgo-Lara et al 2021).

En este contexto, se han realizado esfuerzos en la producción de estrategias de nueva generación para el desarrollo de métodos de diagnóstico o tratamientos, habiendo producido antígenos en sistemas eucariontes como las levaduras y procariontes como las bacterias. Hasta el momento solo se habían logrado desarrollar sistemas para la producción de la proteína recombinante HN del PRV con resultados favorables (Cerriteño-Sanchez et al 2016; Cuevas-Romero et al 2016). En el caso de la proteína F, se reportaron diversos estudios *in silico* y predicciones con respecto a la antigenicidad, incluyendo siete epítopes lineales y seis conformacionales de células B además de 22 epítopes de del MHC clase 1 de células T (Siañez-Estrada et al 2020).

Sin embargo, otras proteínas estructurales, como lo es la NP y M, no se habían tomado en cuenta como candidatos para estudios como lo han hecho con la HN y F. En el caso de la proteína NP del PRV, solo se ha descrito la técnica molecular de RT-PCR cuantitativa,

desarrollada para la detección de las diferentes cepas virales circulantes (Rivera-Benitez et al 2013).

Adicionalmente, Hernández y colaboradores en 1998, determinaron que los anticuerpos producidos en animales infectados con PRV producían anticuerpos contra las proteínas M y NP hasta las 3 y 4 semanas post infección, manteniéndose durante las siete semanas que duro el estudio (Hernández et al 1998).

Como consecuencia, el interés y la relevancia de la producción de nuevos antígenos del PRV, es de suma importancia. En el presente trabajo, las proteínas M y NP se produjeron por primera vez de manera recombinante utilizando un sistema bacteriano heterólogo, utilizando como vector de expresión el pET-SUMO. Existen evidencias en otros estudios de la expresión de versiones truncadas de estas mismas proteínas de otros paramixovirus en sistemas de *E. coli*, siguiendo una estrategia similar con resultados alentadores en el desarrollo de técnicas de diagnóstico y protección contra infecciones virales experimentales (Sui et al 2010; Nida et al 2014).

Por otra parte, la producción de proteínas recombinantes con el sistema pET-SUMO ha generado grandes cantidades de antígenos virales funcionales con propiedades antigénicas e inmunogénicas a pesar de las modificaciones por la adición de 6-histidinas como etiqueta para purificación y la proteína sumo (Nida et al 2014; Bugli et al 2014). En este trabajo se produjeron cantidades suficientes de proteína recombinante NP y M para realizar los análisis de SDS-PAGE y Western-Blot e incluso las cantidades que pueden ser suficientes para realizar ensayos de inmunización en ratones, debido a que se reporta que se requieren 400ug de proteína recombinante como dosis por ratón (Xiao et al 2021). En los ensayos de antigenicidad, los resultados obtenidos de la detección mediante Western-Blot, indicaron que animales infectados al PRV producían anticuerpos anti-NP y anti-M a partir de los cinco días post infección a diferencia de lo reportado anteriormente, donde las evidencias apuntaron a una producción de anticuerpos hasta la tercera semana PI (Hernández et al 2014). La detección de proteínas recombinantes en etapas tempranas de la infección del PRV fue posible debido a las capacidades de detección de la técnica de Western Blot, asimismo, esta técnica ha permitido la detección con alta especificidad y desde los primeros días de infección de diversas proteínas virales producidas en *E. coli* (Alcaraz et al 1995).

Tres proteínas estructurales del PVR se expresaron de manera recombinante en el presente trabajo, obteniendo concentraciones suficientes para su análisis, sin embargo, para lograr establecer la producción dirigida a los métodos de diagnóstico o vacunación, es necesario aumentar la cantidad de proteína recombinante obtenida y disminuir los costos de producción, es por esto, que se estableció el crecimiento de *E. coli* en medio mínimo mineral y posterior inducción con lactosa, existen diversos ejemplos del escalamiento de la producción de proteínas en biorreactor utilizando el medio mineral M9, como sucede con la producción del interferon γ humano de BL21 (Khalilzadeh et al 2004) y la coenzima recombinante Q10, la cual es un importante antioxidante utilizado en medicina humana (Martinez et al 2015). En el presente estudio, se determinó el tiempo en donde el cultivo de la cepa *E. coli*-HN, llega a la fase de desaceleración y cuando el consumo de glucosa esta en valores insignificantes, se realizó la inducción, en donde, la máxima producción de proteína recombinante se detectó mediante Western Blot a las 6 horas pos inducción. A pesar de que la expresión en medio M9 retrasa la fase exponencial, la fase lag y la inducción con lactosa, en comparación con medio LB e IPTG como inductor, se compensa considerablemente comparando los costos de producción. Por otro lado, el resultado de la obtención de la mayor cantidad de proteína se encontró en cuerpos de inclusión (Piao et al 2016), lo cual, dificulta la recuperación de la proteína, por lo que el uso del protocolo de solubilización utilizado con la glutatión S-transferasa (GST) recombinante a partir de Sarkosyl, resulto útil para rescatar nuestras proteínas recombinantes sobreexpresadas en medio M9 mínimo (Massiah et al 2016). De la misma manera, se realizaron ensayos de solubilización con altas concentraciones de urea, como lo reporta Singh et al., 2015, resultando en la posibilidad de recuperar la rHN-PRV en fase soluble a partir de cuerpos de inclusión. La cantidad de rHN-PRV obtenida de un biorreactor de cinco litros con medio mínimo mineral M9 y lactosa como inductor fue de 70 mg al final del proceso de purificación lo cual fue suficiente para 233 dosis.

El desarrollo a gran escala en la producción de proteínas recombinantes, representa un reto dentro de la industria farmacéutica veterinaria, con este trabajo se establecieron las condiciones de producción de la proteína recombinante HN en biorreactor utilizando un medio mínimo mineral que, permitió establecer las bases de un bioproceso para la obtención de un antígeno viral a bajo costo, factible de ser utilizado con proteínas

expresadas de *E. coli* y su futura aplicación en el desarrollo de pruebas de diagnóstico o vacunas.

Los sistemas de nanopartículas basadas en lípidos se han utilizado para mejorar la biodisponibilidad, además, se pueden incorporar moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (Danaei et al, 2018). Para la obtención de las nanopartículas en el presente trabajo, se comenzó a seguir la metodología descrita por Morein y colaboradores en 1984, con una relación de reactivos de 2:1:1 Saponina : Colesterol : Fosfolípidos, los tamaños de partícula obtenidos no fueron los esperados (40 y 60 nm), obteniendo tamaños de partículas menores a 10nm y mayores a 100nm, con un índice de polidispersión (PDI) muy elevado (mayor a 0.7). Por lo que se realizó la búsqueda metodologías más recientes (Copland et al., 2000; Demana et al. 2004; Demana et al. 2005), permitiendo implementar el método denominado hidratación de filmes lipídicos, trabajando con dos relaciones de saponina : colesterol : fosfolípidos, dando como resultados nanopartículas de aproximadamente 50nm e índice de polidispersión de 0.2, indicando una calidad adecuada y distribución de tamaño homogénea (Danaei et al, 2018). Los ISCOMS o complejos inmunoestimulantes se han utilizado como adyuvantes induciendo inmunidad celular y humoral, son sintetizados con la saponina Quillaja saponaria, sin embargo, se ha reportado el uso de otra saponina, la Quillaja brasiliensis como alternativa a la formulación original, con resultados similares en la estimulación de la respuesta inmune (Cibulski et al, 2016).

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica que usa un haz de electrones que pasan a través de una muestra produciendo una dispersión que permite determinar las características ultraestructurales de una muestra (Kumar, 2013). El empleo de la MET permitió realizar la observación de las estructuras obtenidas mediante la síntesis del presente estudio, usando la Quillaja saponaria se obtuvo una estructura idéntica a los ISCOMs y en el caso del uso de ácido glicirricínico como saponina, se identificaron estructuras con características similares a liposomas, que funcionan como alternativa para la inducción de respuesta celular, en específico, linfocitos t citotóxicos CD8+ (Barr et al, 1998).

El ácido glicirricínico ha demostrado en diversos estudios gran actividad antiviral e incluso actividad inmunoestimulante (Hoever et al, 2005; Huan et al, 2017; Zao et al, 2011). En

estudios pasados se han desarrollado nanopartículas de AG con tamaños de entre 200 y 300nm, sin embargo, fue necesaria su evaluación en sistemas in vitro, debido a la observación de efectos citopáticos, logrando determinar la concentración óptima de la formulación, sin dañar las células (Jardon et al, 2018).

8. CONCLUSIONES

Se logró la producción de la proteína recombinante M, NP y HN en el sistema bacteriano *E. coli* mediante el vector pET-SUMO.

La caracterización de las proteínas M y NP permitieron identificar una inmunodetección de anticuerpos a partir de los cinco días post infección al PRV.

Mediante el sistema de biorreactor se obtuvieron hallazgos alentadores para la producción a gran escala y bajo costo de las proteínas recombinantes.

Los ensayos en la síntesis de nanopartículas permitieron obtener estructuras similares a los ISCOMS en el caso del uso de la Quillaja saponaria, mientras tanto, con el uso del AG se lograron obtener estructuras similares a los liposomas con un tamaño adecuado que aumenta la biodisponibilidad.

Se requieren de estudios posteriores para lograr el acomplamiento de las proteínas recombinantes del PRV a los sistemas de nanopartículas y así lograr su uso en ensayos para demostrar la generación de inmunidad al PRV.

9. REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman A H, Peber J. (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. 6° Edición. Editorial Elsevier.
- Aguilar Martínez Elisa María del Carmen. (2001). *Expresión del gen HN del virus del síndrome del ojo azul en sistemas heterólogos*. CINVESTAV IPN. Tesis de maestría.
- Alcaraz, C.; Rodriguez, F.; Oviedo, J.M.; Eiras, A.; De Diego, M.; Alonso, C.; Escribano, J.M. Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54. *J Virol Methods*. 1995, 52(1-2), 111-119. doi: 10.1016/0166-0934(94)00150-f.
- Ali, A.; Garcia-Barrera.; Alberto, Del Valle.; Juan, A, Montaña-Hirose.; Blanca, Lilia, Barrón.; Juana, Salinas-Trujano.; Jesus, Torres-Flores. Full-genome sequencing and phylogenetic analysis of four neurovirulent Mexican isolates of porcine rubulavirus. *Arch Virol*. 2017, 162(6), 1765-1768. doi: 10.1007/s00705-017-3267-7.
- APHIS. (2007) *Reglamento de Importación de Animales y Productos de Origen Animal de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA*.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, 48(1), 1-13.
- Asl, M. N., & Hosseinzadeh, H. (2008). Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(6), 709-724.
- Barr I, Sjolander A, Cox J. (1998). ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 247–271.
- Berg M, Bergvall C, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. (1997). Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus F proteins. *Virus Genes* 14: 55-61.
- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J., & Linné, T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *The Journal of general virology*, 73, 1195-1200.
- Bernardez E & Clark, E. D. B. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), 157-163.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., & Gotschlich, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical biochemistry*, 136(1), 175-179.

Bobadilla Soto, E. E., Espinoza Ortega, A., & Martínez Castañeda, F. E. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(3), 251-268.

Brissos, V., Pereira, L., Munteanu, F. D., Paulo, A. C., & Martins, L. O. (2009). Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. *Biotechnology journal*, 4(4), 558-563.

Bugli, F.; Caprettini, V.; Cacaci, M.; Martini, C.; Sterbini, F.P.; Torelli, R.; Longa, S.D.; Papi, M.; Palmieri, V.; Giardina, B.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Arcovito, A. Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *Int J Nanomedicine*. 2014, 30, 9, 2727-2739. doi: 10.2147/IJN.S60014.

Carreón, N. R., & Fuentes, M. R. (1991). Frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del Ojo Azul en cerdos del altiplano y norte de México. *Veterinaria (Mexico)*, 22, 177-178.

Cerriteño-Sánchez, J.L.; Santos-López, G.; Rosas-Murrieta, N.H.; Reyes-Leyva, J.; Cuevas-Romero, S.; Herrera-Camacho, I. Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of Porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*. 2016, 10, 223, 52-61. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.035.

CFSPH, (2006) Enfermedad de Ojo Azul.

Cibulski, S. P., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira, T. F., Quirici, L., Roehe, P. M., Ferreira, F., & Silveira, F. (2016). Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*, 34(9), 1162-1171.

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

Correa-Girón, P., Martínez, A., Pérez, J., Coba, M. A., Solís, M., Morilla, A., & Zimmerman, J. J. (2002). Vaccination against blue eye disease. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 65-69.

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

Cuevas, J. S., Rodríguez-Ropón, A., Kennedy, S., Moreno-López, J., Berg, M., & Hernández-Jáuregui, P. (2009). Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 127(1), 148-152.

Cuevas-Romero, J. S., Blomström, A. L., & Berg, M. (2015). Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection—an overview. *Infection ecology & epidemiology*, 5(1), 29602.

Cuevas-Romero, J.S.; Rivera-Benítez, J.F.; Hernández-Baumgarten, E.; Hernández-Jaúregui, P.; Blomström, A-L.; Berg, M.; Baule, C. Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of Porcine rubulavirus. *Protein Expr Purif.* 2016, 128, 1-7. doi: 10.1016/j.pep.2016.08.002.

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

Cuevas-Romero, S.; Rivera-Benítez, J.F.; Blomström, A-L.; Ramliden, M.; Hernández-Baumgarten, E.; Hernández-Jauregui, P.; Ramírez-Mendoza, H.; Berg, M. Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico. *Virus Genes.* 2016, 52(1), 81–90. doi.org/10.1007/s11262-015-1281-y.

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.

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

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

Escobar-López, A. C., Rivera-Benitez, J. F., Castillo-Juárez, H., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo-Ortega, M. E., & Sánchez-Betancourt, J. I. (2012). Identification of antigenic variants of the porcine rubulavirus in sera of field swine and their seroprevalence. *Transboundary and emerging diseases*, 59(5), 416-420.

Evans, T. C., & Xu, M. Q. (Eds.). (2011). *Heterologous gene expression in E. coli: methods and protocols.* Humana Press.

Fauquet C, Bishop D, Ghabrial S, Jarvis A, Matelli G, Mayo M, Summers M. (1995). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag.

Fuentes Rangel, M., Carreón Nápoles, R., Ramírez Mendoza, H., Trujillo, M. E., & B de Fraire, I. (1992). Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Méx*, 23(1), 37-9.

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

- Gibson, L., Ribas, M. P., Kemp, J., Restif, O., Suu-Ire, R. D., Wood, J. L., & Cunningham, A. A. (2021). Persistence of multiple paramyxoviruses in a closed captive colony of fruit bats (*Eidolon helvum*). *Viruses*, *13*(8), 1659.
- Graham, F. L., & Van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *virology*, *52*(2), 456-467.
- Hansen, L. H., Knudsen, S., & Sørensen, S. J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current microbiology*, *36*(6), 341-347.
- Hernández Jáuregui, P., Sundquist, A., Fuentes, M., Díaz Orea, A., Reyes Leyva, J., Hernández Baumgarten, E., & Moreno López, J. (1992). Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet. Mex*, *23*(3), 217-22.
- Hernández, J., Garfias, Y., Nieto, A., Mercado, C., Montaña, L. F., & Zenteno, E. (2001). Comparative evaluation of the CD4+ CD8+ and CD4+ CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Veterinary immunology and immunopathology*, *79*(3), 249-259.
- Hernández, J., Garfias, Y., Reyes-Leyva, J., Chávez, R., Lascrain, R., Vargas, J., & Zenteno, E. (2002). Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*, *84*(1), 71-82.
- Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Ramírez, H., Valenzuela, O., & Zenteno, E. (2004). Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino. *Rev. Vet. Méx.*
- Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández-Jauregui, P., & Zenteno, E. (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary immunology and immunopathology*, *64*(4), 367-381.
- Hernández-Jáuregui, P., Yacoub, A., Kennedy, S., Curran, B., Téllez, C., Svenda, M., & Moreno-López, J. (2001). Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. *Archives of medical research*, *32*(5), 400-409.
- Herrera, J., Gómez-Núñez, L., Lara-Romero, R., Diosdado, F., Martínez-Lara, A., Jasso, M., ... & Rivera-Benítez, J. F. (2017). Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus research*, *230*, 50-58.
- Hidalgo-Lara, D.R.; Luz-Armendáriz, J.D.; Rivera-Benítez, J.F.; Gomez-Nuñez, L.; Salazar-Jiménez, E.N.; Madrigal-Valencia, T.L.; Ramírez-Mendoza, H. Comparison of hemagglutination inhibition tests, immunoperoxidase monolayer assays, and serum neutralizing tests in detecting antibodies against blue eye disease in pigs. *J Immunol Methods*. 2021, 496, 113088. doi: 10.1016/j.jim.2021.113088.

Hjertner, B., Wiman, A. C., Svenda, M., Berg, M., Moreno-Lopez, J., & Linné, T. (1998). Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Archives of virology*, 143(3), 425-439.

Hoever, G., Baltina, L., Michaelis, M., Kondratenko, R., Baltina, L., Tolstikov, G. A., ... & Cinatl, J. (2005). Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus. *Journal of medicinal chemistry*, 48(4), 1256-1259.

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

Huan, C. C., Wang, H. X., Sheng, X. X., Wang, R., Wang, X., & Mao, X. (2017). Glycyrrhizin inhibits porcine epidemic diarrhea virus infection and attenuates the proinflammatory responses by inhibition of high mobility group box-1 protein. *Archives of virology*, 162(6), 1467-1476.

Jardon, S., García, C. G., Quintanar, D., Nieto, J. L., Juárez, M. D. L., & Mendoza, S. E. (2018). Effect of two glycyrrhizinic acid nanoparticle carriers on MARC-145 cells actin filaments. *Applied Nanoscience*, 8(5), 1111-1121.

Jorge, S., & Dellagostin, O. A. (2017). The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 6-13.

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

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

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), 494-500.

Khalilzadeh R., Shoja Alsadati S.A., Bahrami A., Maghsoudi N. Fed-batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Producing Human Interferon- γ Under Controlled Specific Growth Rate. *Iranian journal of Biotechnology*. 2004. 2:13-122.

Kirkland, P. D., & Stephano, A. (2006). Paramyxoviruses Rubulavirus, Menangle, and Nipah Virus Infections. *Diseases of Swine*. 9th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 27.

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

Kumar, C. S. (Ed.). (2013). *Transmission electron microscopy characterization of nanomaterials*. Springer Science & Business Media.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lara, A. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223.

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

Leyva, J. R., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., del Tránsito Borraz, M., Ramírez, H. & Zenteno, E. (2002). MECANISMOS MOLECULARES DE LA PATOGENIA VIRAL: ESTUDIOS CON EL RUBULAVIRUS PORCINO. *Mensaje bioquímico*, 26.

Linné, T., Berg, M., Bergvall, A. C., Hjertner, B., & Moreno-López, J. (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary microbiology*, 33(1), 263-273.

Makadiya, N.; Brownlie, R.; Van den Hurk, J.; Berube, N.; Allan, B.; Gerdt, V.; Zakhartchouk, A. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virol J.* 2016, 1, 13:57. doi: 10.1186/s12985-016-0512-8.

Martin, D. K., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R., ... & Dunder, M. (2021). A brief overview of global biotechnology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(sup1), S5-S14.

Martínez I, Méndez C, Berríos J, Altamirano C, Díaz-Barrera A. Batch production of coenzyme Q10 by recombinant *Escherichia coli* containing the decaprenyl diphosphate synthase gene from *Sphingomonas baekryungensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015. 42(9):1283-9.

Massiah MA, Wright KM, Du H. Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media. *Curr Protoc Protein Sci.* 2016. 1;84:6.13.1-6.13.24.

Morilla, A., González-Vega, D., Estrada, E., Diosdado, F., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2002). Seroepidemiology of blue eye disease. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 59-64.

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

Nida, Iram.; Muhammad, Salahuddin, Shah.; Fouzia, Ismat.; Mudasser, Habib.; Mazhar, Iqbal.; S Samar, Hasnain.; Moazur, Rahman. Heterologous expression, characterization and evaluation of the matrix protein from Newcastle disease virus as a target for antiviral therapies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014, 98(4), 1691-701. doi: 10.1007/s00253-013-5043-2.

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

Piao DC, Shin DW, Kim IS, Li HS, Oh SH, Singh B, Maharjan S, Lee YS, Bok JD, Cho CS, Hong ZS, Kang SK, Choi YJ. Trigger factor assisted soluble expression of recombinant spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 2016. 4; 16(1):39.

Radhakrishnan, P., Basma, H., Klinkebiel, D., Christman, J., & Cheng, P. W. (2008). Cell type-specific activation of the cytomegalovirus promoter by dimethylsulfoxide and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(9), 1944-1955.

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

Ramirez-Mendoza, H., Hernandez-Jauregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-Lopez, J., & Kennedy, S. (1997). Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *Journal of comparative pathology*, 117(3), 237-252.

Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernandez, J., Zenteno, R., Vallejo, V., Hernández-Jáuregui, P., & Zenteno, E. (1997). NeuA α 2, 3Gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the Porcine rubulavirus LPMV. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(2), 327-332.

Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Santos, G., Zenteno, R., Hernández, J., Vallejo, V., & Zenteno, E. (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconjugate journal*, 16(9), 517-522.

Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Vallejo, V., Ramírez-Mendoza, H., & Hernández, J. (2004). Detección de viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Archivos de medicina veterinaria*, 36(1), 39-47.

Rima, B., Alexander, D. J., Billeter, M. A., Collins, P. L., KINGSBURY, D., Lipkind, M. A., & Nagai, Y. C, ÖRVELL, CR PRINGLE, V. TER MULLEN. (1995). Family Paramyxoviridae. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Viena-Nueva York: Springer-Verlag, 265-274.

Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W. G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., ... & Consortium, I. R. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Paramyxoviridae. *The Journal of general virology*, 100(12), 1593.

Rivera-Benitez, J. F., Cuevas-Romero, S., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013a). Respiratory disease in growing pigs after Porcine rubulavirus experimental infection. *Virus research*, 176(1), 137-143.

Rivera-Benitez, J. F., del Carmen García-Contreras, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Sánchez-Betancourt, J. I., & Ramírez-Mendoza, H. (2013c). Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Archives of virology*, 158(9), 1849-1856.

Rivera-Benítez, J. F., Luz-Armendáriz, J. D. L., Gómez-Núñez, L., Diosdado Vargas, F., Escatell Soggi, G., Ramírez-Medina, E., ... & Zapata Moreno, M. (2021). Salud porcina: historia, retos y perspectivas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12, 149-185.

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

Rivera-Benitez, J.F.; García-Contreras, A.C.; Reyes-Leyva, J.; Hernández, J.; Sánchez-Betancourt, J.I.; Ramírez-Mendoza, H. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Arch Virol*. 2013, 158(9), 1849-56. doi: 10.1007/s00705-013-1672-0.

Rosales, E. F., Martínez, L. A., & Correa, G. P. (1988). Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el “Síndrome de Ojo Azul”. *Tec. Pec*, 26, 304-311.

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

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

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

Sánchez-Betancourt, J. I., Santos-Lopez, G., Alonso, R., Doporto, J. M., Ramirez-Mendoza, H., Mendoza, S., & Trujillo, M. E. (2008). Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Research in veterinary science*, 85(2), 359-367.

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

Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M. T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo, V., & Reyes-Leyva, J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Archivos de medicina veterinaria*, 36(2), 119-136.

Sedmak, J. J., & Grossberg, S. E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, 79(1), 544-552.

Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A. S., & Fass, R. (1996). Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and bioengineering*, 49(4), 421-428.

Siañez-Estrada, L. I., Rivera-Benitez, J. F., Rosas-Murrieta, N. H., Reyes-Leyva, J., Santos-Lopez, G., & Herrera-Camacho, I. (2020). Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of Porcine rubulavirus. *PloS one*, 15(9), e0239785.

SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado julio de 2022.

Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*. 2015. 25;14:41.

Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005. 99(4):303-10.

Singh, J., Kaushik, N., & Biswas, S. (2014). Bioreactors—technology & design analysis. *The Scitech Journal*, 1, 28-36.

Soetan, K. O., & Abatan, M. O. (2008). Biotechnology a key tool to breakthrough in medical and veterinary research. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(4), 88-94.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). *Principles of fermentation technology*. Elsevier.

Stephan, H. A., Gay, G. M., & Ramirez, T. C. (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *The Veterinary record*, 122(1), 6-10.

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

Stephano, A., Morilla, A., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2002). Blue eye disease: clinical signs and lesions. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 47-50.

Stephano, H. A., Gay, G. M., Ramirez, C., & Maqueda, J. (1982). An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. In Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Mexico (Vol. 153).

Sui, Z.; Chen, Q.; Fang, F.; Zheng, M.; Chen, Z. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M1-based vaccine with chitosan as an adjuvant. *Vaccine*. 2010, 28(48), 7690-7698. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.09.019.

Sundqvist, A., Berg, M., Hernandez-Jauregui, P., Linné, T., & Moreno-López, J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal of General Virology*, 71(3), 609-613.

Svenda, M., Berg, M., Moreno-Lopez, J., & Linne, T. (1997). Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus research*, 48(1), 57-70.

Todaro, C. C., & Vogel, H. C. (Eds.). (2014). *Fermentation and biochemical engineering handbook*. William Andrew.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.

Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Ramírez, H., Delannoy, P., & Zenteno, E. (2000). Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126(3), 415-424.

Villaverde, A., & Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*, 25(17), 1385-1395.

Vinogradov, A. A., Kudryashova, E. V., Levashov, A. V., & van Dongen, W. M. (2003). Solubilization and refolding of inclusion body proteins in reverse micelles. *Analytical biochemistry*, 320(2), 234-238.

Wang, L. F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Cramer, G., & Eaton, B. T. (2007). Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Archives of virology*, 152(7), 1259-1271.

Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International journal of pharmaceuticals*, 203(1), 1-60.

Watson, D. S., Endsley, A. N., & Huang, L. (2012). Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, 30(13), 2256-2272.

Wiman, A. C., Hjertner, B., Linné, T., Herron, B., Allan, G., McNeilly, F., & Berg, M. (1998). Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *Journal of neurovirology*, 4(5), 545-552.

Xiao, Y.; Zhang, S.; Yan, H.; Geng, X.; Wang, Y.; Xu, X.; Wang, M.; Zhang, H.; Huang, B.; Pang, W.; Yang, M.; Tian, K. The High Immunity Induced by the Virus-Like Particles of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O. *Front Vet Sci*. 2021, 25, 8, 633-706. doi: 10.3389/fvets.2021.633706.

Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology journal*, 7(5), 620-634.

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

Zhao, X., Fan, Y., Wang, D., Hu, Y., Guo, L., Ruan, S., ... & Yuan, J. (2011). Immunological adjuvant efficacy of glycyrrhetic acid liposome against Newcastle disease vaccine. *Vaccine*, 29(52), 9611-9617.

Zenteno-Cuevas, R., Hernández, J., Espinosa, B., Reyes, J., & Zenteno, E. (1998). Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Archives of virology*, 143(2), 333-352.