



**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**

**“Evaluación de la excreción del *Orthorubulavirus porcino* y la**  
**respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación**  
**durante la infección experimental en cerdos”**

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

**PRESENTA:**  
**KARLA LETICIA GONZÁLEZ SOLÓRZANO**

**TUTOR PRINCIPAL:**  
**JOSÉ FRANCISCO RIVERA BENITEZ**  
**INIFAP**

**COMITÉ TUTOR:**  
**NORA HILDA ROSAS MURRIETA**  
**BUAP**  
**JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT**  
**FMVZ-UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Mayo, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

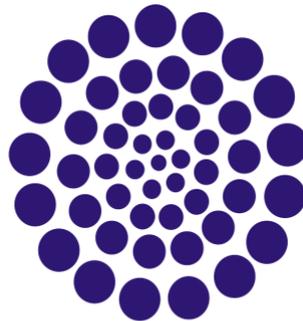
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias**



**CONACYT**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) perteneciente al instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), durante su realización, la alumna Karla Leticia González Solórzano recibió el apoyo por parte del programa de becas para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). El financiamiento para el desarrollo de este estudio fue otorgado por el proyecto SEP-CONACYT CB-2016-01- 284863: “Mecanismos de persistencia del *Rubulavirus porcino* en cerdos: influencia del hospedero y del agente etiológico” y FONSEC-SAGARPA-CONACYT-292826: “Desarrollo, producción y validación de biológicos y sistemas diagnósticos de nueva generación basados en la biotecnología para contribuir en la prevención y control de las enfermedades que afectan la producción pecuaria en México”.

## **DEDICATORIA**

A Zared, en quién ahora veo reflejado el anhelo de hacer cosas grandes y buenas en la vida. Gracias por estar orgulloso de mi, yo siempre lo estoy de ti.

Sé extraordinario amor.

A mi esposo Luis, quién ha sido mi apoyo todo este tiempo y mi mayor admirador. Gracias por procurar mi felicidad y preocuparte por que mis sueños se hagan realidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y mi hermano, quienes siempre me han apoyado en cada decisión que he tomado. Gracias papá por otorgarme tu tiempo estos últimos años, por apoyarme y siempre estar ahí cuando Zary y yo lo necesitamos, sin importar el día o la hora... sin tí nunca hubiera sido posible nada de esto.

Un agradecimiento especial a todo el personal del Laboratorio de Virología del CENID-SAI por enseñarme tanto sobre el compromiso, la humanidad, la solidaridad, el compañerismo y la amistad.

Al Dr. José Francisco Rivera Benítez por darme el honor de trabajar a su lado y permitirme aprender de él con toda su experiencia.

A la Dra. Jazmín de la Luz Armendariz por aceptarme sin dudarlo y confiar en mí siempre.

Al Dr. Luis Gómez Núñez, el Dr. Fernando Diosdado, la Dra. Catalina Trufiño, el Ing. Ricardo Barba y al Sr. Alberto por sus conocimientos y apoyo. Mi agradecimiento y mi aprecio es infinito.

A los integrantes de mi comité tutorial por su apoyo y seguimiento de mi trabajo durante todo este proceso, agradezco su tiempo dedicado a hacerlo posible.

Al honorable jurado por su tiempo y sus observaciones dedicadas a mejorar mi trabajo.

## RESUMEN

GONZALEZ SOLORZANO KARLA LETICIA. Evaluación de la excreción del *Orthorubulavirus porcino* y la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación durante la infección experimental en cerdos. (Bajo la tutoría del Dr. José Francisco Rivera Benítez).

La enfermedad del ojo azul es endémica de la zona central y del bajío de México y tiene una mayor prevalencia en algunos de los principales estados productores de cerdo; es ocasionada por el *Orthorubulavirus porcino* (ORP), el cual es un virus ARN que, desde su identificación en 1980, hasta la actualidad, sigue afectando a los cerdos en las unidades de producción y su diagnóstico serológico se lleva a cabo mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, principalmente. Se realizó un estudio longitudinal durante un año a 25 cerdos infectados experimentalmente con la cepa viral PAC-3 del *Orthorubulavirus porcino*. Se identificó que el virus persistió hasta los 380 días postinfección (dpi) en muestras de tonsila, encéfalo y pulmón, además se presentó una excreción vía nasal y oral entre los tres a 70 dpi, con una mayor carga viral promedio al quinto día, esto se prolongó hasta los 310 y 380 dpi en la vía nasal, presentando diferencias posterior a la inmunosupresión con tratamiento químico. La seroconversión se presentó con el pico más alto al octavo dpi y mantuvo un patrón de respuesta que se prolongó hasta el 380 dpi, sin evidencia de alteraciones en la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación atribuidos al tratamiento inmunosupresor. Se identificó una mayor afinidad de anticuerpos hacia los antígenos PPMV y PAC-2 en los días 30-70 posteriores a la infección experimental con la cepa prototipo PAC-3 y una menor afinidad de los mismos, contra las cepas PAC-1, PAC-4 y PAC-5. En el análisis de las secuencias de la proteína HN obtenidas de las muestras de hisopo nasal analizadas en este estudio se identificó una mutación (Q<sub>352</sub>K) en uno de los epítomos de mayor relevancia antigénica que demuestra la importancia de la investigación y monitoreo constante del virus.

## **ABSTRACT**

Blue eye disease is endemic in the central and lowlands of Mexico and has a higher prevalence in some of the main pork producing states; it is caused by the porcine Orthorubulavirus (ORP), which is an RNA virus that, since its identification in 1980, until nowadays, continues affecting pigs in production units and its diagnosis is carried out mainly by means of the hemagglutination inhibition test. A longitudinal study was carried out for one year on 25 pigs experimentally infected with the porcine Orthorubulavirus PAC-3 viral strain. It was identified that the virus persisted up to 380 days post-infection (dpi) in tonsil, brain and lung samples, in addition there was a nasal and oral excretion between 3 and 70 dpi, with a higher average viral load on the fifth day, this was prolonged up to 310 and 380 dpi in the nasal route, presenting differences after immunosuppression with chemical treatment. Seroconversion was presented with the highest peak at the eighth dpi and maintained a pattern of response that lasted until 380 dpi, without evidence of alterations in the response of hemagglutination inhibitor antibodies attributed to immunosuppressive treatment. A higher affinity of antibodies towards PPMV and PAC-2 antigens was identified on days 30-70 after experimental infection with the prototype PAC-3 strain and a lower affinity of antibodies against PAC-1, PAC-4 and PAC-5 strains. In the analysis of the HN protein sequences obtained from the nasal swab samples analyzed in this study, a mutation (Q352K) was identified in one of the epitopes of major antigenic relevance, which demonstrates the importance of constant research and monitoring of the virus.

## ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BO	Bulbo olfatorio
BZ	Bazo
C	Proteína C
Cer	Cerebelo
CF	Ciclofosfamida
Ct	Valor umbral del número de ciclos
DAB	Diaminobencidina
DICC50%	Dosis infectante en cultivo celular 50%
dpi	Días postinfección
EA	Encéfalo anterior
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Encéfalo medio
EOA	Enfermedad del ojo azul
EP	Encéfalo posterior
F	Proteína de fusión
G	Guanina
HA	Hemaglutinación
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa
HRP	Peroxidasa de rábano
I	Proteína I
IF	Inmunofluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
INF $\beta$	Interferón beta
IgG	Inmunoglobulina G
IHA	Inhibición de la hemaglutinación

Kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
L	Proteína de alto peso molecular
LA	Lóbulo apical
Lacc	Lóbulo accesorio
LC	Lóbulo cardiaco
LD	Lóbulo diafragmático
LMed	Linfonoforo mediastínico
log2	Logaritmo base 2
log10	Logaritmo base 10
LPMV	Virus de La Piedad Michoacán
LTB	Linfonodo traqueobronquial
M	Proteína de matriz
MEM	Medio mínimo esencial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MN	Mucosa nasal
MO	Médula oblonga
NeuAc $\alpha$ 2,3Gal	Ácido neuramínico $\alpha$ 2,3 galactosa
nm	Nanómetro
NP	Nucleoproteína
ORF	Marco de lectura abierto
ORP	Orthorubulavirus porcino
P	Fosfoproteína
PAC	Producción animal cerdos
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Plexo coroideo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POA	Paramixovirus del ojo azul
PV	Peso vivo

Riñ	Riñón
RLRs	Receptor de reconocimiento de patrones intracelular
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real
SCP	Plexo coroideo ovino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SN	Seroneutralización
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
TON	Tonsila
UHA	Unidades hemaglutinantes
V	Proteína V
WB	Western blot

## CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN .....	pág. 1
1.1	Generalidades.....	pág. 1
1.2	Impacto productivo y económico de las enfermedades virales.....	pág. 2
1.3	Antecedentes de la EOA .....	pág. 3
1.4	Distribución.....	pág. 4
1.5	Agente etiológico .....	pág. 4
1.5.1	Genes .....	pág. 5
1.5.2	Proteínas estructurales .....	pág. 8
1.5.3	Proteínas no estructurales .....	pág. 9
1.6	Replicación viral .....	pág. 9
1.7	Patogenia .....	pág. 11
1.8	Signos clínicos .....	pág. 12
1.9	Respuesta inmune.....	pág. 14
1.10	Antigenicidad cruzada entre cepas .....	pág. 15
1.11	Diagnóstico .....	pág. 15
1.12	Persistencia .....	pág. 15
II.	JUSTIFICACIÓN .....	pág. 17
III.	HIPÓTESIS.....	pág. 18
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	pág. 19
V.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	pág. 19
VI.	METODOLOGÍA .....	pág. 20
6.1	Replicación de cepas virales.....	pág. 20
6.2	Evaluación de la infección experimental .....	pág. 20
6.3	Extracción de ARN a partir de hisopos y órganos.....	pág. 21
6.4	Pruebas moleculares.....	pág. 22
6.4.1	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR) .....	pág. 22
6.4.2	Selección de muestras para PCR en punto final y secuenciación para su análisis .....	pág. 23

6.4.3	Análisis de secuencias .....	pág. 26
6.5	Pruebas serológicas .....	pág. 26
6.5.1	Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) .....	pág. 26
6.5.2	Evaluación de la antigenicidad .....	pág. 27
6.5.3	Western blot (WB) .....	pág. 27
VII.	RESULTADOS .....	pág. 29
7.1	Selección de línea celular para obtención de fluidos .....	pág. 29
7.2	Replicación de las cepas virales .....	pág. 31
7.3	Extracción de ARN .....	pág. 31
7.4	Pruebas moleculares .....	pág. 32
7.4.1	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR) .....	pág. 32
7.4.2	Selección de muestras para PCR en punto final y secuenciación .....	pág. 35
7.4.3	Análisis de secuencias .....	pág. 36
7.5	Pruebas serológicas .....	pág. 40
7.5.1	Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) .....	pág. 40
7.5.2	Evaluación de la antigenicidad .....	pág. 43
7.5.3	Western blot (WB) .....	pág. 44
VIII.	DISCUSIÓN .....	pág. 45
IX.	CONCLUSIONES .....	pág. 48
X.	REFERENCIAS .....	pág. 49
ANEXOS		
ANEXO A: Tamaño de muestras de hisopado por tipo y día postinfección en la que se tomó .....		
		pág. 57
ANEXO B: Tamaño de muestras de órgano y resultado de la carga viral promedio en donde T=grupo testigo y TC=grupo tratado con ciclofosfamida .....		
		pág. 58
ANEXO C: Identificación y número de acceso de las secuencias obtenidas de GeneBank de la proteína HN de ORP para su uso en el alineamiento múltiple .....		
		pág. 59

ANEXO D: Gráficos de las medias de la carga viral en las muestras de hisopado..... pág. 60

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características de las proteínas estructurales y no estructurales de ORP.....	pág. 6
<b>Cuadro 2.</b> Condiciones de la RT-PCR en tiempo real empleadas en el termociclado de la prueba.....	pág. 22
<b>Cuadro 3.</b> Muestras de hisopos nasales y orales seleccionadas con base en su Ct y valores expresados en Log base 10 de la cuantificación absoluta.....	pág. 23
<b>Cuadro 4.</b> Iniciadores empleados para la amplificación de los fragmentos específicos.....	pág. 25
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de la RT-PCR en punto final empleadas en el termociclado de la prueba.....	pág.25
<b>Cuadro 6.</b> Resultados obtenidos de la titulación mediante prueba de HA de los antígenos virales replicados en línea celular SCP.....	pág. 31
<b>Cuadro 7.</b> Índice de antigenicidad de la cepa prototipo PAC3 contra seis cepas de ORP en diferentes días posteriores a la infección.....	pág. 43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales estados productores de carne de cerdo en canal durante el año 2022.....	pág. 1
<b>Figura 2.</b> Edición del gen P que genera los ARNm alternativos para las proteínas P, V, C e I.....	pág. 7
<b>Figura 3.</b> Ciclo de replicación del <i>Orthorubulavirus porcino</i> .....	pág. 11
<b>Figura 4.</b> Aspectos evaluados por cepa para la selección de línea celular empleada para la obtención de fluidos virales.....	pág. 29
<b>Figura 5.</b> Efecto citopático de las diferentes cepas de ORP a diferentes dpi en las líneas celulares empleadas.....	pág. 30
<b>Figura 6.</b> Carga viral promedio de las muestras de hisopos analizadas mediante RT-qPCR.....	pág. 32
<b>Figura 7.</b> Carga viral promedio de las muestras de hisopos obtenidas de los subgrupos analizados con sus respectivos grupos testigo mediante RT-qPCR.....	pág. 33
<b>Figura 8.</b> Carga viral de las muestras de órganos obtenidas de los subgrupos analizados que recibieron tratamiento con ciclofosfamida.....	pág. 34
<b>Figura 9.</b> Gel de muestras seleccionadas de hisopo nasal (n=4) en las que los productos eran mayormente visibles en comparación con el resto de las muestras, mostrando con número 5 el control positivo y con número 6 el negativo.....	pág. 35
<b>Figura 10.</b> Resultados del análisis de las secuencias de aminoácidos del marco de lectura abierto para HN en donde se ubican los epítomos reportados por Siañez et al., 2020. Se identifican las mutaciones en la secuencia de las muestras trabajadas, junto con el control positivo que se empleó (C+ PAC3).....	pág. 37
<b>Figura 11.</b> Análisis filogenético obtenido mediante el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT) en el programa MEGAX (v 10.2.4) de las secuencias de la proteína HN del ORP y las muestras trabajadas en el laboratorio.....	pág. 39
<b>Figura 12.</b> Resultados del promedio de los títulos de anticuerpos contra diferentes antígenos virales de ORP obtenidos en la prueba de IHA a diferentes dpi.....	pág. 41

**Figura 13.** Resultados del promedio de los títulos de anticuerpos de los subgrupo 1 y 2 contra diferentes antígenos virales de ORP obtenidos en prueba de IHA a diferentes dpi.....pág. 42

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades

La porcicultura es la actividad productiva que incluye la crianza, alimentación y comercialización de los cerdos, es considerada una de las áreas ganaderas más dinámicas que existe en México junto a la producción de bovino y ave, generando más de un millón y medio de toneladas de carne de cerdo y registrando un consumo per cápita de aproximadamente 17.9 kg en el año 2021. Durante el mismo año, el promedio de la producción de carne de cerdo en canal se reportó en 1,686,802 toneladas y se mantuvo para el 2022 (SIAP, 2022), siendo la porcicultura de los estados de Jalisco, Sonora y Puebla las que presentan los mayores aumentos absolutos en la producción, representando hasta un 48% de la producción total (SIAP, 2022) (Figura 1).

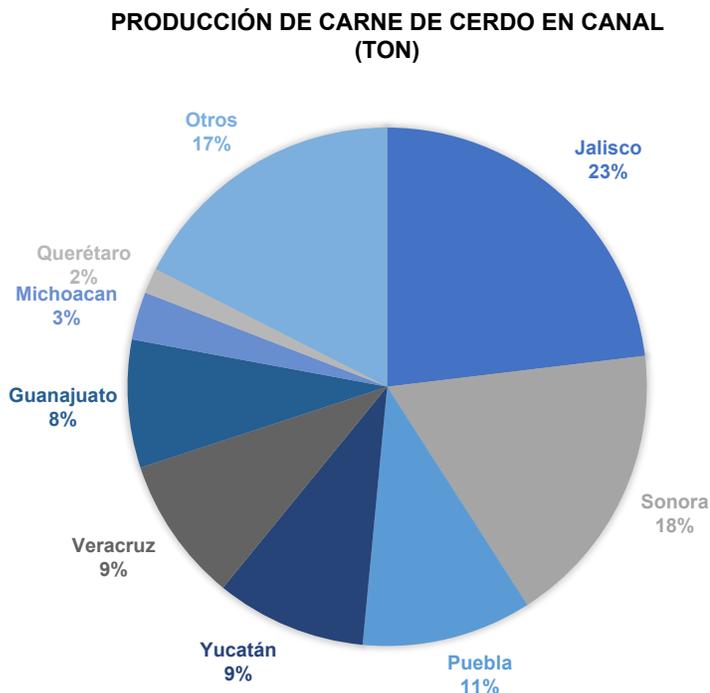


Figura 1. Principales estados productores de carne de cerdo en canal durante el año 2022. Datos del avance mensual de la producción pecuaria de la carne en canal de porcino (SIAP-2022).

## 1.2 Impacto productivo y económico de las enfermedades virales

El impacto que tiene una enfermedad en los animales destinados para el consumo humano es de gran importancia, debido a que al momento de aparecer y propagarse entre los animales, existen alteraciones en ellos que pueden ocasionar una disminución en su productividad e incrementar los costos de producción, generando pérdidas económicas y de inventario por la despoblación, además de incertidumbre por parte de los consumidores para adquirir los productos y sus derivados debido a la imagen negativa de una enfermedad al público (Morilla, 2003), lo cual también puede afectar en la relación con socios comerciales y la consecuente pérdida de mercados nacionales e internacionales.

Las enfermedades virales en los animales se caracterizan por ser de rápida propagación en la población, en ocasiones sin ser oportunamente detectadas, en donde las interacciones con poblaciones susceptibles y el contacto con otras especies domésticas y silvestres aumentan la posibilidad de la aparición de nuevos agentes patógenos que impacten negativamente a la industria.

Una de ellas es la enfermedad del ojo azul (EOA), que afecta productivamente a los cerdos de cualquier edad, puede existir la presentación neurológica, respiratoria o reproductiva (Santos-López *et al.*, 2017), reportándose que en los cerdos mayores de 30 días de edad los signos clínicos son menos frecuentes, con baja o nula mortalidad (Stephano, 2000), a diferencia de los presentados en lechones de 2 a 15 días de edad, en donde la presentación nerviosa de la enfermedad eleva mortalidades a un 80-90% (Sánchez, 2004). Su importancia económica reside en el impacto que tiene en las producciones, donde también puede ocurrir una afectación reproductiva con baja fertilidad, repeticiones en cerdas, aumento en abortos y mortinatos, en sementales con orquitis, epididimitis y disminución de la calidad espermática (Stephano, 1988). Lo cual conlleva a la disminución en la producción

de lechones y el número de destetados, retraso en el crecimiento, aumento de costos por tratamientos y eliminación de sementales.

### **1.3 Antecedentes de la EOA**

En 1980, un virus hemaglutinante con morfología similar a los paramixovirus se aisló de muestras de cerebro obtenidas de lechones que presentaban alteraciones neurológicas, el cual se denominó paramixovirus del ojo azul (POA), posterior a su aislamiento se reprodujo el cuadro característico de lesiones en cerdos menores a los 20 días de edad, infectados experimentalmente vía intranasal (Stephano *et al.*, 1988). En el mismo año, se identificó un virus similar en unidades de producción porcina en las afueras de La Piedad, Michoacán en donde los primeros brotes se caracterizaban por una presentación nerviosa y alta mortalidad en lechones de dos a 15 días de edad (Stephano *et al.*, 1988), en este caso, entre el 1 al 10% de los lechones cursaban con conjuntivitis y opacidad corneal unilateral o bilateral, en ausencia de otros signos. El virus también fue aislado de muestras de cerebros de lechones con presencia de un cuadro de meningoencefalitis y se denominó virus de La Piedad, Michoacán (LPMV), el cual, al infectar experimentalmente a lechones y ratones vía intracerebral, presentaba el cuadro de daño clínico a nivel neurológico (Moreno-López *et al.*, 1986). Al pasar los años, los signos cambiaron de ser principalmente neurológicos y afectar a lechones menores de 30 días de edad, a presentar signos también en cerdos de 15 a 45 Kg de peso con alteraciones respiratorias (Stephano, 1985). Cerdos de más de 30 días de edad presentaban signos moderados, como anorexia, fiebre y estornudos con mortalidad menor al 30%; posteriormente se asociaría a afectaciones reproductivas en hembras (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández-Jauregui *et al.*, 2004). Durante un periodo de tiempo se consideró que los sementales no eran afectados por el virus y posteriormente se demostró que también presentaban alteraciones reproductivas asociadas a la infección (Solís *et al.*, 2007; Campos y Carbajal 1989). Los resultados obtenidos de las infecciones experimentales realizadas en las últimas décadas han

demostrado que las nuevas cepas han mantenido las características de la enfermedad del ojo azul en los cerdos, posiblemente con una disminución en la gravedad de los signos debido a la inmunidad que puedan llegar a presentar los cerdos en una producción.

#### **1.4 Distribución**

Se ha reportado la circulación del virus en los estados de Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Nuevo León, Campeche, Querétaro, Tlaxcala, Tamaulipas, Puebla, Tabasco, Colima, Hidalgo y la Ciudad de México (Sánchez *et al.* 2008a; Fuentes *et al.*, 1992) y cerdos con presencia de anticuerpos en unidades de producción ubicadas en los estados de Aguascalientes, Chiapas, CDMX, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Quintana Roo, Sonora, Tabasco y Zacatecas (Lara Romero, 2013) considerándose una enfermedad endémica en la zona central y del bajío del país (Escobar-López *et al.*, 2012; Stephano, 1988). Hasta el 2012, se ha demostrado una seroprevalencia de ORP del 9% al 23.7% en los estados de Michoacán, Jalisco, Edo. de México y Guanajuato (Escobar-López *et al.*, 2012).

#### **1.5 Agente etiológico**

El agente etiológico de la EOA es el *Orthorubulavirus porcino* (ORP), un virus perteneciente al filo *Negarnviricota*, orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Rubulavirinae*, género *Orthorubulavirus* y especie *Orthorubulavirus porcino*. En la familia de los paramixovirus se encuentran otros virus causantes de importantes enfermedades en caninos, bovinos, aves y humanos como el virus de parainfluenza humana tipo 2 (HPIV-2), virus de parainfluenza humana tipo 4 (HPIV-4), virus Mapuera (MprPV), virus de parotiditis humana (MuV), virus de parainfluenza 5 (PIV5) y virus símico 41 (SV-41), en el estudio de las secuencias génicas y peptídicas del virus se ha comprobado que el ORP posee un

alto porcentaje de identidad con el virus de la parotiditis humana (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

El ORP es un virus envuelto, con genoma de tipo ARN monocatenario de polaridad negativa de 15 Kb (Wang *et al.*, 2007), el cual posee seis genes que pueden codificar hasta diez proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas, algunas de ellas altamente conservadas. Los viriones pueden medir de 180 a 300 nm de diámetro, son pleomórficos y generalmente esféricos, se conforman por una envoltura lipídica de origen celular que rodea a la nucleocápside helicoidal, la cual mide entre 1000-1630 nm y tiene un diámetro de 20 nm con prolongaciones de 8-12 nm correspondientes a las glicoproteínas F y HN (Kirkland *et al.*, 2006).

### **1.5.1 Genes**

La organización del genoma es la siguiente: 3' NP-P-M-F-HN- L 5', sus regiones intergénicas constan de 1 a 47 nucleótidos y las proteínas codificadas por estos genes se dividen en estructurales y no estructurales (Cuadro 1), siendo las estructurales las proteínas NP, P, M, F, HN, L y las no estructurales las proteínas V, C e I. El virus tiene una longitud de 15,193 nucleótidos (Berg *et al.*, 1992) y a lo largo de los años se han estudiado e identificado variaciones en las secuencias de los aislamientos obtenidos, identificando así regiones variables y conservadas en el genoma viral.

Cuadro 1. Características de las proteínas estructurales y no estructurales de ORP (Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2004; Santos-López *et al.*, 2004; Pisanelli, *et al.*, 2016).

Gen	Proteína	Aminoácidos	Peso molecular	Función
N	Nucleoproteína	545	68 KDa	Proteína de la nucleocápside que protege al genoma, una unidad se enlaza cada 6 nucleótidos sin separarse.
P	Fosfoproteína	403	52 KDa	3 unidades forman un complejo ARN polimerasa con la proteína L y junto con N, se enlazan al genoma.
P	C	126	15 KDa	Posee actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa, actúa como antagonista de la vía de señalización del INF I.
P	V	249	26 KDa	Se ha relacionado como promotor en infecciones persistentes, actúa como antagonista de la vía de señalización del INF I.
P	I	174	18 KDa	Proteína no estructural.
M	Proteína de matriz	369	42 KDa	Participa en el ensamblaje de viriones durante la gemación.
F	Proteína de fusión	541	71 KDa F1: 59 F2: 12	Induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, se divide en F1: glicoproteína transmembranal, participación en la fusión de membranas, hemólisis y formación de sincitios. F2: glicoproteína externa de membrana.
HN	Hemaglutinina-Neuraminidasa	576	66 KDa	Hemaglutinina: reconocimiento del receptor celular y adherencia, promoción de la fusión de membranas. Neuraminidasa: Hidrólisis del ácido siálico.
L	Proteína de alto peso molecular	2251	200 KDa	Componente catalítico del complejo ARN polimerasa formado con proteína P, aportando una unidad.

El gen P que se encuentra constituido por 1,373 nucleótidos (Berg *et al.*, 1992) y puede dar origen a 4 proteínas: P, V, C e I. La proteína V es codificada por una copia exacta del gen P, en donde la adición de dos guaninas no codificadas entre las posiciones 586 a 591 genera un alargamiento en el marco de lectura que expresa a la proteína P, por otro lado, cuando en lugar de añadirse dos guaninas es una, el marco de lectura que se genera es el que expresa a la proteína I, cuya función es desconocida aún (Berg *et al.*, 1992). La proteína C se codifica en un marco de lectura que se encuentra comprendido en cualquiera de los tres casos anteriores, ha sido asociada a la regulación de la transcripción/replicación viral y antagoniza la respuesta inmune contra el virus (Curran *et al.*, 1991; Cuevas-Romero *et al.*, 2016).

La mayoría de las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína P se han observado en las regiones N-terminales (Cuevas-Romero *et al.*, 2016) y se han asociado a cambios en las proteínas virales en células persistentemente infectadas que puede relacionarse con una reducción en la cantidad de ARNm de L y un cambio en la edición del gen P (Hjertner *et al.*, 1997).

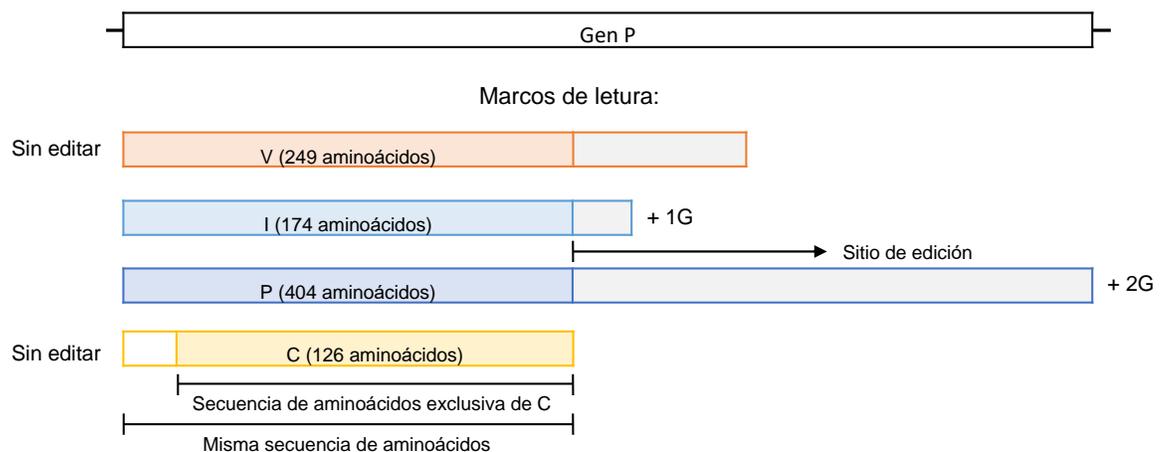


Figura 2. Edición del gen P que genera los ARNm alternativos para las proteínas P, V, C e I. (Modificado de Santos López *et al.*, 2004)

### 1.5.2 Proteínas estructurales

En la nucleocápside, cuya estructura es helicoidal, se constituye la unión de NP con el ARN genómico por medio de interacciones hidrofóbicas durante el proceso de replicación y transcripción, en donde cada molécula de NP se une cada 6 nucleótidos y no se desprende durante el proceso, a esta se asocian las proteínas P y L, las cuales forman un complejo con actividad polimerasa (Hjertner *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Santos-López *et al.*, 2004).

Esta nucleocápside se encuentra rodeada por una envoltura lipoproteica que presenta hacia su parte interna a la proteína M, la cual participa en el ensamblaje de viriones. Hacia el exterior presenta a las glicoproteínas transmembranales HN y F (Reyes-Leyva *et al.*, 2002), de las cuales la proteína HN es la más abundante en la envoltura viral. La HN se encuentra involucrada en la infección a la célula, reconociendo al receptor en la membrana de la célula huésped (ácido neuramínico) y también tiene actividad neuraminidasa, la cual consiste en la remoción de residuos de ácido neuramínico para la liberación de la progenie viral de la célula huésped (Ramírez, 1998; Yuan *et al.*, 2005; Santos-López *et al.*, 2017) y evitar su autoagregación. La proteína F es comúnmente asociada a la virulencia del ORP debido a su participación en la fusión de membranas celular y viral, se divide por acción de una proteasa celular en dos unidades (F1 y F2), F1 es una glicoproteína transmembranal, con participación en la fusión de membranas, actividad hemolítica y en la formación de sincitios y la proteína F2 actúa como glicoproteína externa de membrana (Santos-López, *et al.*, 2004; Cuevas-Romero *et al.*, 2016).

La proteína HN ha sido objeto de muchos estudios de la variabilidad genética del ORP, debido a los cambios (aproximadamente en el 2% de la proteína) que se han identificado en su secuencia y la organización de linajes que se asocian a cierta virulencia (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008b; Cuevas-Romero *et al.*, 2016).

### 1.5.3 Proteínas no estructurales

Las proteínas C y V, aunque no forman parte del virión, se localizan en las células infectadas con ORP, estas regulan la síntesis del ARN viral y tienen una actividad inhibitoria sobre el complejo de polimerasa viral, además de la inhibición de la actividad del interferón (IFN) (Pisanelli, *et al.*, 2016). La proteína C ha sido identificada como un factor de virulencia que interfiere en la respuesta inmune inactivando el receptor de reconocimiento de patrones intracelular (RLRs) MDA-5 (proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma), el cual está involucrado en la inhibición de la expresión de  $INF\beta$  (Linjie *et al.*, 2021). La proteína V se ha relacionado con el bloqueo de la vía de señalización del INF mediante su unión a STAT-2, uno de los componentes de su cascada de señalización (Pisanelli, *et al.*, 2016) y se ha identificado como promotor de infecciones persistentes en otros virus de la familia *Paramyxoviridae* (Kubota *et al.*, 2002; Kiyotani, *et al.*, 2007).

### 1.6 Replicación viral

La replicación del virus inicia en la mucosa nasofaríngea y sistema linfático asociado, para su posterior diseminación por el organismo y consiste en las siguientes etapas (Figura 3) :

- Reconocimiento y adsorción de la superficie celular: en donde participa la proteína HN reconociendo al receptor (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal).
- Fusión de membranas: que ocurre en la superficie celular a pH neutro, en donde la proteína  $F_0$  es dividida por una proteasa celular en F1 y F2 (Berg *et al.*, 1992), acción que promueve la fusión de la membrana celular con la envoltura viral.

- Penetración celular y desnudamiento: que ocurre al integrarse la membrana celular y la envoltura viral y ocasiona la liberación de la nucleocápside en el citoplasma.
- Replicación del genoma: fase en la que debido a la acción ARN polimerasa que viene conformada en la nucleocápside se comienza a sintetizar una copia complementaria del genoma en sentido positivo, a partir de la cual se sintetizan nuevos genomas.
- Transcripción: fase en la cual la información de cada uno de los genes da lugar a la síntesis de los ARNm.
- Traducción: en donde los ARNm codifican a cada una de las proteínas virales.
- Ensamble: fase en donde las proteínas producidas durante la traducción se dirigen al sitio de ensamble y las proteínas N (1 unidad), P (3 unidades) y L (1 unidad) son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se dirige hacia la parte interna de la membrana celular, en donde se encontrará con las glicoproteínas HN y F recién sintetizadas en el retículo endoplásmico y modificadas en el aparato de Golgi para expresarse también en la membrana celular. La elevada afinidad de las proteínas de la nucleocápside con las glicoproteínas y la proteína M, favorece la formación del virión.
- Liberación de viriones: la cual se lleva a cabo mediante exocitosis y debido a la actividad neuraminidasa de la proteína HN, no se unen a los receptores de la célula ya infectada.

La formación y liberación de viriones a células vecinas no infectadas, es posible debido al proceso de fusión de membranas de una célula infectada con otra célula no infectada, gracias a la expresión de las glicoproteínas en la membrana de la célula infectada. Todo esto, aunado a que el ciclo de replicación viral ocurre en su totalidad en el citoplasma, permite la formación de aglomerados de nucleocápsides que se observan como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas, así como la formación de células gigantes multinucleadas o sincitios.

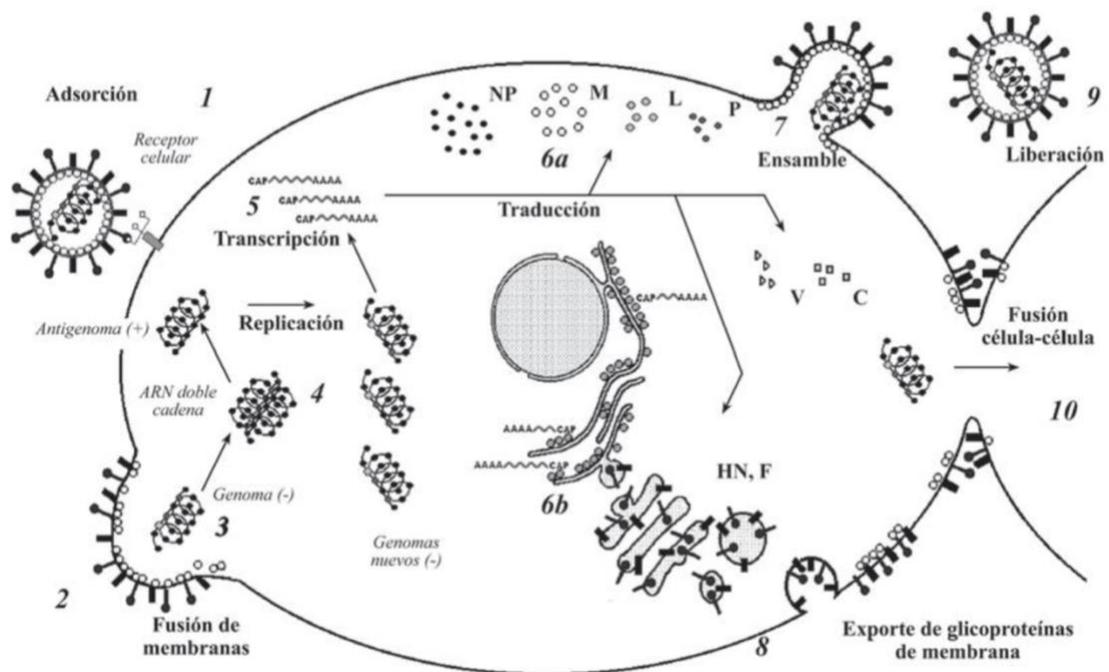


Figura 3. Ciclo de replicación del *Orthorubulavirus porcino*. Se ilustran las fases 1) Reconocimiento y adsorción de la superficie celular; 2) Fusión de membranas; 3) Penetración celular y desnudamiento; 4) Replicación del genoma; 5) Transcripción; 6a y 6b) Traducción; 7) Ensamble; 8) Expresión de glicoproteínas en la membrana; 9) Liberación del virión por exocitosis; 10) Proceso de fusión de membranas (Obtenido de Santos-López *et al.*, 2004).

## 1.7 Patogenia

La vía natural de ingreso del virus al organismo hospedero frecuentemente es por medio de la aspiración de aerosoles contaminados, siendo la ruta natural de infección la nasofaringe, en donde se lleva a cabo la replicación inicial del virus; posteriormente se disemina a pulmones y bronquios en donde nuevamente se replica y se distribuye vía sanguínea (Stephano *et al.*, 1988; Reyes-Leyva *et al.*, 2004). Experimentalmente se han utilizado las vías intratraqueal, intranasal, intracerebral, ocular e intramuscular, identificando infecciones exitosas (Hidalgo, 2017) y se ha observado que los sistemas nervioso, respiratorio y linfático son sitios de replicación de ORP con base en signología clínica y carga viral (Herrera *et al.*, 2017).

Durante la infección experimental por ORP vía intranasal en cerdos de tres meses de edad, se identificó una fase de viremia que permitió su diseminación del sitio de inoculación, hacia otros órganos a través del nervio olfatorio y trigémino, y en el caso de los pulmones por vía aérea (Ramírez *et al.*, 1997; Vallejo *et al.*, 2000; Reyes-Leyva *et al.*, 2004). En cerdos en crecimiento, la infección se establece principalmente en tracto respiratorio y sistema nervioso central (Ramírez *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2004), esto es debido a cambios en la expresión de los receptores celulares durante la maduración de los cerdos (Vallejo *et al.*, 2000) y en el caso de la enfermedad respiratoria en cerdos de 6 semanas de vida existe una excreción prolongada y elevada carga viral en los órganos linfoides, además de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación a los 6 dpi con un posterior incremento y mantenimiento de estos (Rivera-Benítez *et al.*, 2013c). En estudios donde se evaluó la carga viral y seroconversión después de la infección experimental con cepas recientemente aisladas se reportaron diferencias entre grupos (Rivera-Benítez *et al.*, 2013a; Herrera *et al.*, 2017) y se ha demostrado que la enfermedad persistente ocasionada por ORP en los cerdos puede facilitar el establecimiento de infecciones secundarias y aumento de signos clínicos en el caso de coinfecciones con otros agentes virales (Rivera-Benítez *et al.*, 2016).

### **1.8 Signos clínicos**

La susceptibilidad del huésped a la infección viral y la presentación de signos clínicos depende, tanto de la expresión del receptor celular (Ramírez, 1998), como de la presencia de partículas virales en el organismo, que pueden desencadenar una infección subclínica o clínica aguda debido a su nivel de replicación (Santos-López *et al.*, 2004). Se ha identificado que el ORP reconoce los oligosacáridos del ácido neuramínico  $\alpha 2,3$  galactosa (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal) y que la expresión de este es un requisito para el proceso de infección por ORP (Reyes-Leyva *et al.* 1993, 1997; Ramírez, 1998), la presencia de estas moléculas es abundante en el sistema

nervioso central y los órganos respiratorios de los cerdos neonatos (Reyes-Leyva *et al.*, 2004), en cambio, el virus no tiene afinidad al isómero del NeuAc $\alpha$ 2,3Gal: el NeuAc $\alpha$ 2,6Gal, el cual es abundante en la mucosa olfatoria y el bulbo de los cerdos adultos. Esto indica que la expresión de oligosacáridos específicos parece estar relacionada con la susceptibilidad de determinados órganos al ORP.

Los cerdos de dos a 15 días de edad son los más susceptibles, la mortalidad puede alcanzar un 90%, esto es debido a que la presentación de la enfermedad es principalmente nerviosa (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002). En estos casos se observa ataxia, debilidad, incoordinación motriz, rigidez de miembros posteriores, temores musculares, letargo, nistagmo y conjuntivitis, entre otros. La opacidad corneal, aunque es menos frecuente (1-10%), puede aparecer sin la manifestación de otros signos clínicos.

Los cerdos de más de 30 días de edad presentan índices de mortalidad casi nulo. En cerdas reproductoras, además de disminuir su índice de fertilidad, presentan aumento de días de retorno al estro y en los días destete-servicio, así como en los días abiertos, cursan con anorexia, aumento de mortinatos y se pueden llegar a presentar aborto. En machos se identificó la presencia de orquitis y epididimitis, con una consecuente atrofia testicular unilateral (más frecuente) o bilateral, en algunos casos irreversible (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Hernández-Jauregui *et al.*, 2004; Lara Romero, 2013), con una disminución de la concentración, motilidad y viabilidad espermática (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández-Jauregui *et al.*, 2004; Solís *et al.*, 2007). En la última década se han identificado signos neurológicos severos en cerdos adultos a consecuencia de mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína HN (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008b).

## 1.9 Respuesta inmune

La respuesta humoral contra ORP inicia con la producción de anticuerpos dirigidos contra las proteínas HN, NP y M (Hernández *et al.*, 2004), desde la primera semana postinfección, presentando un aumento con el paso del tiempo y asociándose con una disminución en la capacidad proliferativa de las células mononucleares. Así como, un aumento en el número de anticuerpos neutralizantes, que se extiende hasta la segunda semana (Hernández *et al.*, 1998). Los anticuerpos pueden ser inducidos en cerdas en gestación y transmitirse pasivamente a la camada (Sánchez, 2004), la desaparición de la viremia se asocia con títulos elevados de anticuerpos (Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

En muchas enfermedades virales, la infección se controla a nivel celular mediante el interferón de tipo I (IFN  $\alpha/\beta$ ) producido en respuesta a la presencia de ARN viral (Young *et al.*, 2000) en donde su reconocimiento por los receptores celulares específicos activa la cascada de señalización (Flores-Ocelotl, *et al.*, 2011; Didcock *et al.*, 1999) y se lleva a cabo un aumento en el número de linfocitos T totales (CD3+) y citotóxicos (CD8+) durante la primera semana (Sánchez *et al.*, 2004), lo que resulta en la liberación de antígenos endógenos los cuales pueden ser procesados y presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con su posterior liberación de citocinas y activación de cascadas de señalización. La producción de linfocitos TH2 es más predominante en infecciones crónicas, favoreciendo así la persistencia en infecciones (Biron, 1994) y donde resulta importante la capacidad proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica, en donde se ha demostrado presencia del virus.

Los resultados obtenidos en estudios de infección experimental han demostrado que algunos cerdos sin signos clínicos son negativos a la identificación del ORP; sin embargo, presentan niveles elevados de anticuerpos circulantes (Hernández, 2004; Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

### **1.10 Antigenicidad cruzada entre cepas**

Se han reportado 22 secuencias distintas del gen HN de ORP obtenidas de diferentes aislamientos a través de los años y se ha identificado que algunas cepas presentan antigenicidad cruzada en pruebas de IHA realizadas con sueros homólogos y heterólogos (Sánchez *et al.*, 2007). Los resultados de la evaluación de los anticuerpos específicos contra el ORP en ensayos realizados *in vitro* con animales infectados experimentalmente, al ser comparados con la infección en cerdos de campo, muestran diferencias debido a la variación antigénica entre cepas (Reyes-Leyva *et al.*, 2002), en muestras de suero de animales no vacunados se ha identificado que no existe una antigenicidad cruzada completa entre algunos aislados (Escobar-López *et al.*, 2012).

### **1.11 Diagnóstico**

El diagnóstico serológico se realiza principalmente por medio de la prueba de inhibición de hemaglutinación (IHA), la glicoproteína HN es capaz de hemaglutinar eritrocitos de una gran variedad de especies animales debido al reconocimiento de los residuos de ácido neuramínico en la superficie celular (Santos-López *et al.*, 2004). Otras pruebas empleadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), seroneutralización (SN) (Lara-Romero, 2013), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), aislamiento viral a partir de muestras y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Reyes-Leyva *et al.*, 2004; Cerriteño-Sánchez, 2016).

### **1.12 Persistencia**

Se ha comprobado que ORP posee la característica de establecer infecciones persistentes *in vitro* e *in vivo* (Hjertner *et al.*, 1997; Romero y Gómez, 2003) y en infecciones experimentales, se han reportado signos clínicos persistentes en cerdos

de 18 meses de edad, con un aumento de anticuerpos contra el virus a partir de la segunda semana postinfección (Vallejo *et al.*, 2000; Sánchez, 2004; Hernández *et al.*, 2004). Los resultados de un estudio realizado en el 2014, indican que el ARNm de ORP persiste e induce una respuesta inmune humoral duradera en cerdos que se han recuperado de una infección natural y que, tras una posible reactivación del virus, se transmite a otros cerdos en contacto con los cerdos convalecientes (Cuevas-Romero *et al.*, 2014).

Los estudios realizados por Cuevas *et al.* (2014), Hjetner *et al.* (1997) y Wiman *et al.* (1998), indican que el ORP puede mantener una infección persistente en el sistema nervioso, respiratorio, genitourinario y en órganos linfoides, lo cual se ha demostrado mediante RT-PCR anidada en encéfalo y pulmón a los 53 dpi (Wiman *et al.*, 1998), qRT-PCR a partir de leucocitos obtenidos en muestras de sangre periférica una positividad superior al 80% a ORP en hembras con diferentes concentraciones de ARN viral y de más del 60% en sementales (Lara-Romero, 2013) y en estudios en donde el virus ha sido aislado en muestras de semen y epidídimo a los 48 y 142 dpi (Rivera-Benitez *et al.*, 2013b).

## II. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad del ojo azul ha sido diagnosticada exclusivamente en México y es considerada endémica en las principales zonas productoras de cerdo del bajío, en donde aún no ha sido posible erradicarla. El estudio de los mecanismos de la infección persistente y los periodos de excreción viral en los cerdos es de gran importancia ya que ese estado viral en el organismo del animal representa un factor de riesgo en las producciones, para la incidencia de nuevos brotes o rebrotes de la enfermedad o para su diseminación a regiones libres, a nivel nacional o internacional. Por otro lado, la evaluación de la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra diferentes cepas virales durante la infección por una cepa de *Orthorubulavirus porcino* determinada, es un aspecto crucial en el correcto diagnóstico de la enfermedad. Estos son algunos de los aspectos fundamentales que pueden contribuir al control de la enfermedad y su mejor entendimiento.

### **III. HIPÓTESIS**

La infección con el ORP es de duración prolongada e intermitente, lo que se asocia con la carga viral y la respuesta humoral del hospedero.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la carga viral y título de anticuerpos en la respuesta inmune humoral a través del tiempo en la infección experimental con ORP en cerdos.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar la carga viral por medio de RT-PCR en tiempo real en muestras obtenidas posterior a la infección experimental.
- Evaluar la respuesta inmune humoral derivada de la infección empleando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA).
- Evaluar la antigenicidad con diversas cepas del ORP empleando la prueba de inhibición de hemaglutinación (IHA).
- Confirmar la presencia de inmunoglobulina G en muestras de suero empleando la prueba de western blot (WB).

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Replicación de las cepas virales.**

Se utilizaron las líneas celulares de riñón de mono verde africano (VERO), riñón de cerdo (PK15), riñón de mono verde africano (BGMK) y plexo coroideo ovino (SCP), las cuales se cultivaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y placas de 96 pozos, se mantuvieron con medio mínimo esencial (MEM) enriquecido con suero fetal bovino al 5% (SFB 5%), para posteriormente infectarse con seis cepas diferentes de *Orthorubulavirus porcino* (PPMV, PAC-1, PAC-2, PAC-3, PAC-4 y PAC-5), dilución 1:10 en MEM sin suero, se realizó la observación y registro del efecto citopático a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas postinfección.

Con base en los resultados, fue seleccionada la línea SCP para la obtención del lote viral, debido a su marcado efecto citopático y altos títulos, se procedió a cultivar la línea celular en botellas de 175 cm<sup>2</sup>, utilizando 3 unidades para su infección y 1 botella testigo de 25 cm<sup>2</sup>, las cuales se mantuvieron con MEM enriquecido con SFB 5%, hasta el momento de su infección con el antígeno viral en dilución 1:10 con MEM sin suero y observando cada 24h el efecto citopático para su posterior congelación y cosecha. Para cada infección realizada se utilizó una botella testigo de 25 cm<sup>2</sup>, la cual se congeló al mismo tiempo que la última botella cosechada. Se realizó la titulación de cada uno de los antígenos virales obtenidos a la cosecha por medio de la prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos de ave frescos al 0.5% y posteriormente se resguardaron a -70 °C hasta su uso.

### **6.2 Evaluación de la infección experimental.**

Se analizaron muestras de suero, hisopo nasal e hisopo oral de 25 cerdos de seis semanas de edad infectados experimentalmente, las cuales fueron colectadas durante el periodo de abril de 2020 a abril de 2021, dando seguimiento a la infección

experimental, la cual se realizó vía instilación nasal con una dosis de  $1 \times 10^6$  DICCC50%/ml en un volumen final de 4 ml del ORP cepa prototipo PAC3. Un subgrupo de 3 cerdos a los 240 (subgrupo 1) y 365 (subgrupo 2) días postinfección fueron tratados con ciclofosfamida a dosis 30mg/kg PV vía I.P. durante 15 días con el objetivo de identificar alteraciones en la respuesta humoral de los cerdos tratados, cada uno se comparó con su respectivo grupo control (n=6). De ambos subgrupos se tomaron muestras de órganos a la necropsia, las cuales se realizaron a los 255 (subgrupo 1) y 380 (subgrupo 2) dpi, se colectaron muestras de tonsila (TON), linfonodo traqueobronquial (LTB), linfonodo mediastínico (LMed), bazo (BZ), mucosa nasal (MN), lóbulo cardiaco (LC), lóbulo accesorio (Lacc), lóbulo diafragmático (LD), lóbulo apical (LA), encéfalo anterior (EA), encéfalo medio (EM), encéfalo posterior (EP), cerebelo (Cer), médula oblonga (MO), bulbo olfatorio (BO), plexo coroideo (PC), riñón (Riñ).

Durante el procedimiento experimental se realizaron 18 muestreos: a los -4, 0, 1, 3, 5, 8, 14, 21, 30, 70, 120, 150, 180, 240, 280, 310, 360 y 380 dpi. Se obtuvieron muestras de suero, hisopo nasal (HN) e hisopo oral (HO), todas las muestras fueron conservadas en congelación y ultracongelación hasta su procesamiento.

### **6.3 Extracción de ARN a partir de hisopos y órganos.**

Se empleó el paquete comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), se realizaron los diferentes pasos de lisis, lavados y elución de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total obtenido se cuantificó por espectrofotometría y se verificó la integridad del ARN obteniendo la relación 260/280 nm, se resguardaron a -70 °C.

## 6.4 Pruebas moleculares

### 6.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR)

Para las muestras de hisopado y órganos, se realizó el ensayo de RT-qPCR para la cuantificación de un fragmento de 95 pb del gen NP del ORP según lo reportado por Rivera-Benitez *et al.* (2013), para lo cual se utilizó el paquete TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix, en un termociclador BioRad FX-96, con el siguiente programa de termociclado, en donde las etapas de desnaturalización y alineamiento se repitieron durante 40 ciclos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones de la RT-PCR en tiempo real empleadas en el termociclado de la prueba.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	50 °C	5 minutos	1
Desnaturalización inicial	95 °C	20 minutos	1
Amplificación	95 °C	15 minutos	40
	60 °C	1 minuto	

Para la interpretación de los resultados se empleó una curva estándar previamente realizada para obtener la cuantificación absoluta y en todas las pruebas se empleó un control positivo y un control negativo. Estadísticamente se empleó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey para determinar si existen diferencias significativas en el promedio de la carga viral por muestra y dpi, el análisis se realizó con el programa JMP® para Macintosh empleando una  $p= 0.05$ .

#### 6.4.2 Selección de muestras para PCR en punto final y secuenciación para su análisis

Del total de muestras positivas, se seleccionaron 18 muestras de hisopo nasal y 20 de hisopo oral de diferentes dpi, se eligieron las que presentaron la carga viral más alta (valores Ct más bajos), obtenidos mediante RT-qPCR (Cuadro 3). Para realizar la prueba de RT-PCR en punto final para amplificar el gen HN, se utilizó el paquete QIAGEN OneStep RT-PCR Kit y se emplearon los primers reportados por Herrera *et al.*, 2017 (Cuadro 4). Se realizó otra selección de muestras al finalizar la RT-PCR en punto final con base en la intensidad de las bandas en la visualización del gel de agarosa, se seleccionaron las mayormente visibles de diferentes dpi (Cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras de hisopos nasales y orales seleccionadas con base en su Ct y valores expresados en Log base 10 de la cuantificación absoluta.

<b>Hisopo Nasal</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Ct</b>	<b>Carga viral</b>
1	3	26.62	4.93
2	3	27.31	4.71
3	4	27.09	4.78
4	4	27.39	4.68
5	4	23.76	5.84
6	5	27.85	4.53
7	5	25.14	5.40
8	5	27.07	4.78
9	5	25.39	5.32
<b>10</b>	<b>5</b>	<b>25.01</b>	<b>5.44</b>
11	5	26.64	4.92
12	5	25.86	5.17
13	5	26.88	4.84
<b>14</b>	<b>5</b>	<b>25.01</b>	<b>5.44</b>
15	5	25.72	5.21
16	5	25.63	5.24
17	6	26.76	4.88
18	6	26.76	4.88

Hisopo Oral			
Muestra	Muestreo	Ct	Carga viral
1	3	27.82	4.54
2	3	27.24	4.73
3	3	25.58	5.26
4	4	26.70	4.90
5	4	4.86	4.86
6	4	23.85	5.81
7	4	23.52	5.91
8	4	25.82	5.18
9	5	26.94	4.82
10	5	25.91	5.15
11	5	26.35	5.01
12	5	25.11	5.41
13	5	26.95	4.82
14	6	25.95	5.14
15	7	27.10	4.77
16	7	27.71	4.58
17	7	27.83	4.54
18	9	29.23	4.09
19	9	27.46	4.66
20	9	31.39	3.41

Se marcan en azul las muestras seleccionadas al finalizar la RT-PCR en punto final.

Cuadro 4. Iniciadores empleados para la amplificación de los fragmentos específicos.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Ubicación en HN (LPMV)</b>
Fw *	5´- GCAATGTCTCAATTAGGGACTGATC -3´	537	126-150
Rv	5´- AGCAAATGATGGTATCCGAGTACATCC -3´	537	636-662
Fw*	5´- CTAATCAATGATCCACGATATATGAGTGGT -3´	882	507-536
Rv*	5´-CCACCAAGAACTACTGCGTTGATAAT-3´	882	1363-1388
Fw	5´- TAACGCATGTTGCTGGACAGTGA -3´	613	1536-1514
Rv	5´- CCCCCACAACAACCTTTGACTCTT -3´	613	1514-1536
Fw	5´- CGAATAGAATGGTAATGATGGGAAGTG-3´	535	1300-1326
Rv*	5´-TCTCGTAAGAAGGGTACAATCTGAAATTCAC -3´	535	1804-1834

Se marcan con \* los reportados por Herrera *et al.*, 2017.

La prueba se realizó en un termociclador BioRad FX-96, con el siguiente programa de termociclado, en donde las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión se repitieron durante 40 ciclos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones de la RT-PCR en punto final empleadas en el termociclado de la prueba.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Retrotranscripción	50 °C	30 minutos	1
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	40
Alineamiento	62 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1

Los geles de agarosa se realizaron al 2% y se corrieron a 90 V, 190-200 mA durante 90 minutos.

A las muestras seleccionadas se les realizó una segunda RT-PCR en punto final a un volumen final de 25 µl y realizando el gel al 2% de agarosa, el cual se corrió a 90 V 200 mA durante 60 minutos, para su corte y purificación con el Kit QIAquick

Gel Extraction Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron pruebas a los controles para cada fragmento y se purificaron de la misma manera.

### **6.4.3 Análisis de Secuencias**

Los alineamientos de secuencias se realizaron mediante Clustal W por medio del programa MEGA X v 10.2.4. Para determinar la relación filogenética, se construyó un árbol filogenético empleando el programa MEGA v 10.2.4, mediante el modelo de Jones-Taylor-Thornton empleando 1000 réplicas de arranque.

## **6.5 Pruebas serológicas**

### **6.5.1 Inhibición de hemoaglutinación (IHA)**

Con el objetivo de evaluar la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, se realizó la prueba de IHA a un total de 348 sueros (324 sueros de cerdos sin tratamiento con ciclofosfamida y 24 sueros de cerdos tratados con ciclofosfamida). Los sueros se inactivaron a 56 °C durante 20 min, para ser adsorbidos con caolín y eritrocitos de pollo al 5%, para eliminar componentes no específicos que interfieren con la hemaglutinina. Se realizaron diluciones dobles seriadas de cada suero tratado en 50 µl de PBS, en placas de fondo redondo de 96 pozos (comenzando con una dilución 1:16 y finalizando con una dilución 1:2048). Posteriormente, cada suero se incubó durante 30 minutos con cada uno de los antígenos virales PPMV, PAC-1, PAC-2, PAC-3, PAC-4 y PAC-5 ajustadas a 8 unidades hemaglutinantes (UHA) contenidas en 50 µl y se añadieron 50 µl de eritrocitos de pollo al 0.5%, para poder realizar la lectura del título de anticuerpos después de 30 minutos de incubación. Cada prueba se realizó por triplicado, realizando tres lecturas y obteniendo un promedio para cada una. El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como la dilución máxima a la que el suero pudo inhibir la actividad hemaglutinante de cada uno de los

antígenos virales empleados y el valor se transformó a logaritmo base 2 ( $\log_2$ ). Se realizaron un total de 4176 pruebas y 6264 lecturas.

### **6.5.2 Evaluación de la antigenicidad**

La identificación de la variación antigénica en la respuesta de anticuerpos se realizó con el análisis del promedio de los resultados obtenidos, empleando la fórmula de Archetti y Horsfall (1950), se incluyeron únicamente las muestras de suero posteriores a los ocho días de la infección, punto en donde se observó el mayor título. La interpretación de resultados se realizó considerando valores de 1 que indican homología, valores de 1.1-1.5 y de 0.5-0.9 que indican relación antigénica y valores menores a 0.5 y mayores a 1.5 indican que no existe relación antigénica.

### **6.5.3 Western blot (Wb)**

Para confirmar los resultados de la inhibición de la hemaglutinación, se analizó la presencia de IgG contra las proteínas virales del ORP para lo cual se empleó el antígeno viral PAC-3. La prueba se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para la separación por peso molecular de las proteínas en cámara vertical, realizado por duplicado en geles al 12% y teñido con azul de Coomasie G-250, en donde fue detectable una proteína de aproximadamente 75 kDa, correspondiente a la proteína HN de ORP. Se realizó la transferencia del SDS-PAGE al 12% a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en PBS, para realizar el bloqueo de uniones inespecíficas de los anticuerpos en la muestra de suero en los puntos en donde no se transfirió la proteína. Se colocó el anticuerpo primario (suero hiperinmune de cerdo en dilución 1:20) en las membranas y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C para favorecer la unión antígeno-anticuerpo, para la posterior adición de la proteína A-HRP como conjugado secundario en dilución 1:100, incubándose durante 90 minutos a 37 °C y

manteniendo una agitación constante. La membrana fue revelada empleando diaminobencidina (DAB) y la interacción antígeno-anticuerpo se identificó por observación directa, considerando como resultados positivos los sueros en donde es posible visualizar una banda en la membrana al mismo peso molecular que el suero testigo positivo. Posteriormente, los sueros de los cerdos infectados experimentalmente fueron evaluados por esta técnica.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Selección de línea celular para obtención de fluidos

Los resultados obtenidos de la infección de las líneas celulares en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con las cepas de PPMV, PAC-1, PAC-2, PAC-3, PAC-4 y PAC-5 mostraron que la línea celular SCP fue la que registró mayor efecto citopático observado (sincitios y desprendimiento de estrato celular), además de títulos más altos en la prueba de hemaglutinación (HA) (Figuras 4 y 5).

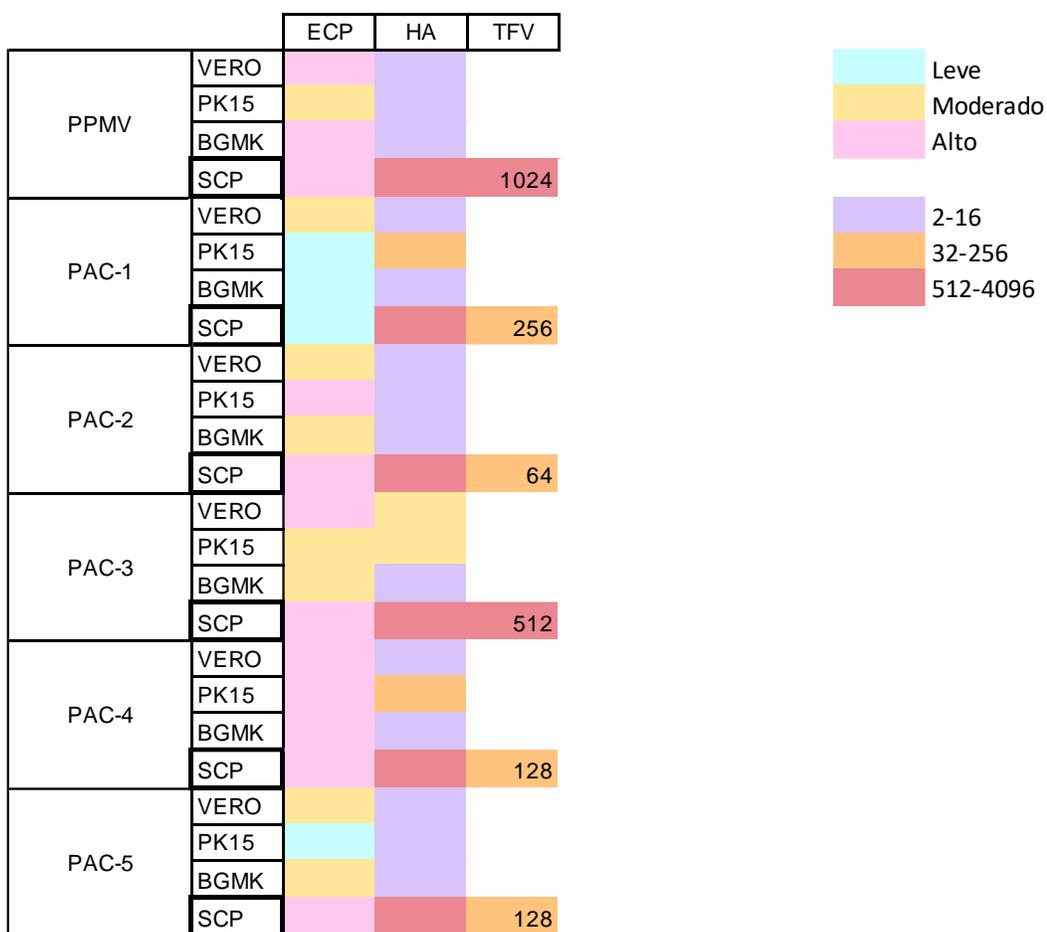


Figura 4. Aspectos evaluados por cepa para la selección de línea celular empleada para la obtención de fluidos virales. (EPC= efecto citopático, HA= títulos obtenidos en la prueba de hemaglutinación de sobrenadante de las botellas infectadas, TFV= título obtenido en prueba de hemaglutinación de fluido viral cosechado.)

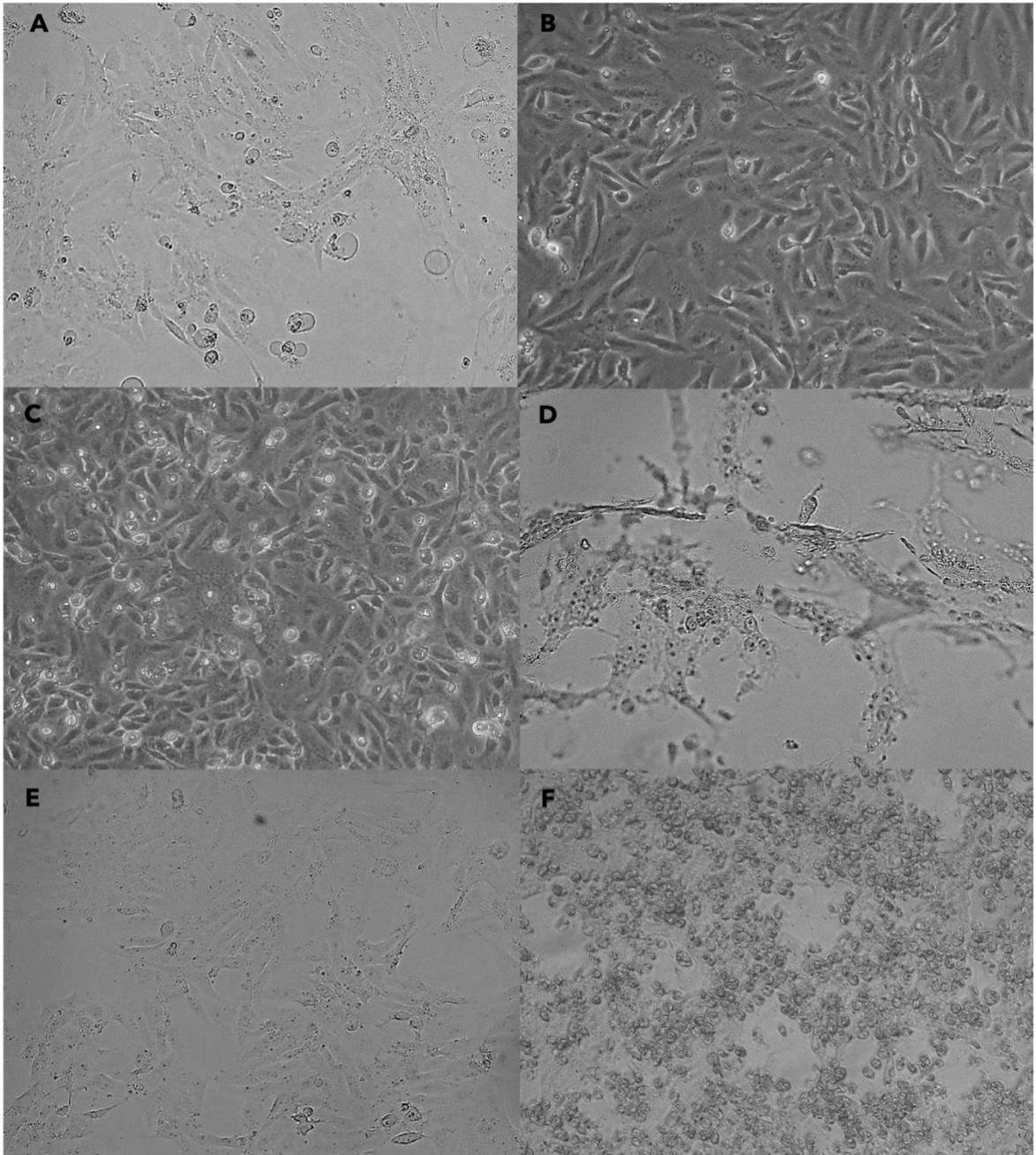


Figura 5. Efecto citopático observado al microscopio en objetivo 40X de las diferentes cepas de ORP a diferentes días postinfección (dpi) en las líneas celulares empleadas: A) Efecto citopático de PPMV en PK15 a las 72 hpi, B) Efecto citopático de PAC-1 en BGMK a las 48 hpi, C) Efecto citopático de PAC-2 en BGMK a las 72 hpi, D) Efecto citopático de PAC-3 en VERO a las 72 hpi, E) Efecto citopático de PAC-4 en PK15 a las 72 hpi, F) Efecto citopático de PAC-5 en SCP a las 72 hpi.

## 7.2 Replicación de las cepas virales.

Para obtener los lotes virales, se realizó la infección viral en cultivo celular con las cepas PPMV, PAC-1, PAC-2, PAC-3, PAC-4 y PAC-5 del ORP, empleando la línea celular SCP. Se trabajaron un total de 18 botellas de 175 cm<sup>2</sup> y 6 testigos de 25 cm<sup>2</sup>, cosechando en promedio 60 ml de lote viral por cepa. Los resultados de la titulación mediante la prueba de HA a la cosecha indicaron que las cepas con mayor título fueron PPMV, PAC-3 y PAC-1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados obtenidos de la titulación mediante prueba de HA de los antígenos virales replicados en línea celular SCP.

<b>Virus</b>	<b>hpi a cosecha</b>	<b>Título Viral HA</b>
PPMV	48 h	1,024
PAC-1	96 h	256
PAC-2	48 h	64
PAC-3	48 h	512
PAC-4	48 h	128
PAC-5	48 h	128

## 7.3 Extracción de ARN

Del total de las muestras colectadas en los 18 muestreos se procesaron 346 muestras de hisopo oral y 345 de hisopo nasal para realizar la extracción de ARN. A la necropsia, se tomaron 51 muestras de órganos del subgrupo 1 (255 dpi) y 51 del subgrupo 2 (380 dpi) y el mismo número de muestras para sus respectivos grupos testigo.

## 7.4 Pruebas moleculares

### 7.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR)

Del total de las muestras analizadas de hisopo oral (HO) e hisopo nasal (HN) se analizaron y procesaron los resultados, se consideraron como resultados positivos las muestras con valor Ct menor o igual a 35 y se calculó la cuantificación absoluta de la carga viral, expresándose en logaritmo base 10 (Log10). Se incluyeron los resultados de los muestreos de los cerdos testigos en el caso de los experimentos realizados con tratamiento de ciclofosfamida (3 individuos testigo y 3 con tratamiento).

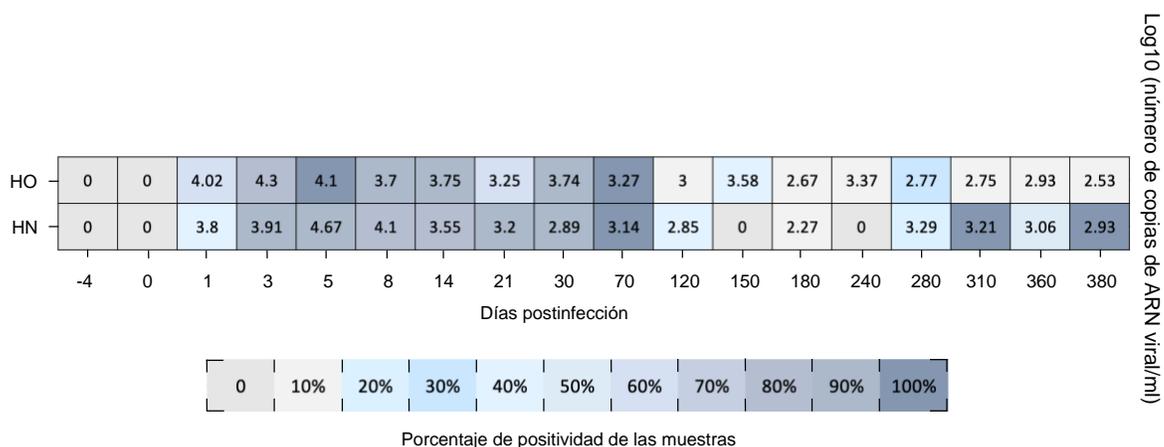


Figura 6. Carga viral promedio de las muestras de hisopos analizadas mediante qRT-PCR. Se muestran los resultados del número de copias de ARN vial/ml y se analiza el porcentaje de positividad en diferentes días postinfección (identificado en una escala de color gris-azul, de menor a mayor).

Se observó que la mayor parte de las muestras positivas se identificaron entre el tercer día a los 70 dpi, con una mayor carga viral promedio al día quinto, en ambas muestras, en el día 70 se obtienen el 100% positividad y se identifica excreción viral vía nasal en el 100% de los animales a los 310 y 380 dpi (Figura 6), lo cual es

evidencia de un patrón intermitente y prolongado en la excreción viral vía oral y nasal.

En la evaluación de los subgrupos se identificó una mayor carga viral en las muestras de hisopado nasal del subgrupo al que se le administró tratamiento con ciclofosfamida a los 240 dpi después de 14 días de tratamiento (Figura 7).

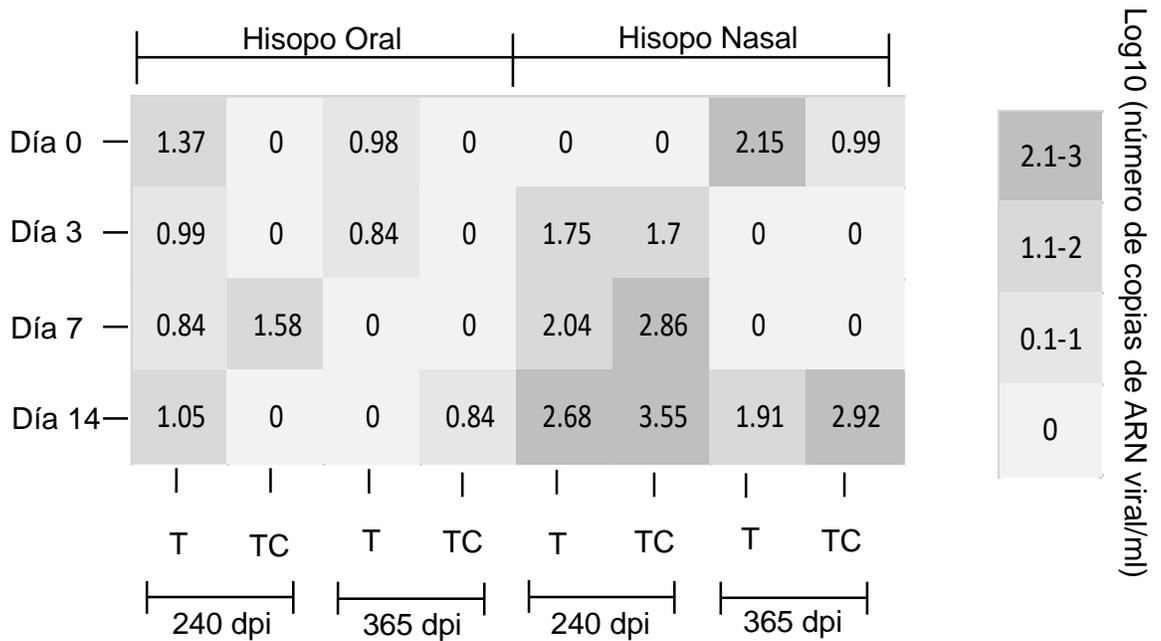


Figura 7. Carga viral promedio de las muestras de hisopos obtenidas de los subgrupos analizados con sus respectivos grupos controles mediante qRT-PCR en donde TC: grupo tratado con ciclofosfamida y T: grupo testigo.

La persistencia viral se determinó a partir de las muestras de órganos que se colectaron de los subgrupos a los 255 y 380 dpi (Figura 8), en los resultados se identificó la presencia de ARN viral a los 255 dpi en 1 de 3 muestras de linfonodo mediastínico y 1 de 12 muestras de pulmón en cerdos sin tratamiento inmunosupresor (Grupo testigo) con ciclofosfamida, en los cerdos con tratamiento el 100% de las muestras de tonsila resultaron positivas a la presencia de ARN viral

con altos valores de carga viral. A los 380 dpi se identificaron 2 de 12 muestras positivas de pulmón en cerdos no tratados y en cerdos con tratamiento, resultaron positivas 2 de 12 muestras de pulmón, 3 de 18 de sistema nervioso central y 1 de 3 de tonsila, identificando una mayor carga viral en esta muestra.

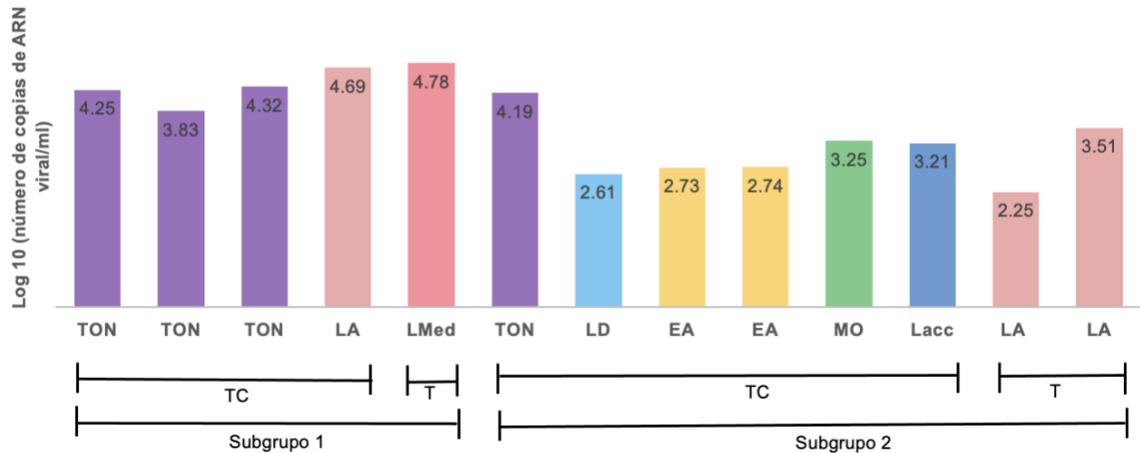


Figura 8. Carga viral de las muestras de órganos obtenidas de los subgrupos analizados que recibieron tratamiento con ciclofosfamida en donde TON: tonsila, LMed: lóbulo mediastínico, LA: lóbulo apical, LD: lóbulo diafragmático, EA: Encéfalo anterior. MO: Médula oblonga, Lacc: Lóbulo accesorio, TC: Grupo tratado con ciclofosfamida y T: grupo testigo.

#### 7.4.2 Selección de muestras para RT-PCR en punto final y secuenciación

Del resultado obtenido de la RT-PCR punto final para las muestras de hisopo oral y nasal seleccionadas se amplificaron los 4 fragmentos para el gen HN, de estas muestras se seleccionaron los productos que eran más visibles (Figura 9), seleccionando siete muestras de hisopo oral (muestreos 3, 4, 5 y 7) y cuatro de hisopo nasal (muestreo 5), para la amplificación a un volumen final de 25  $\mu$ l y corrimiento electroforético, corte y purificación.

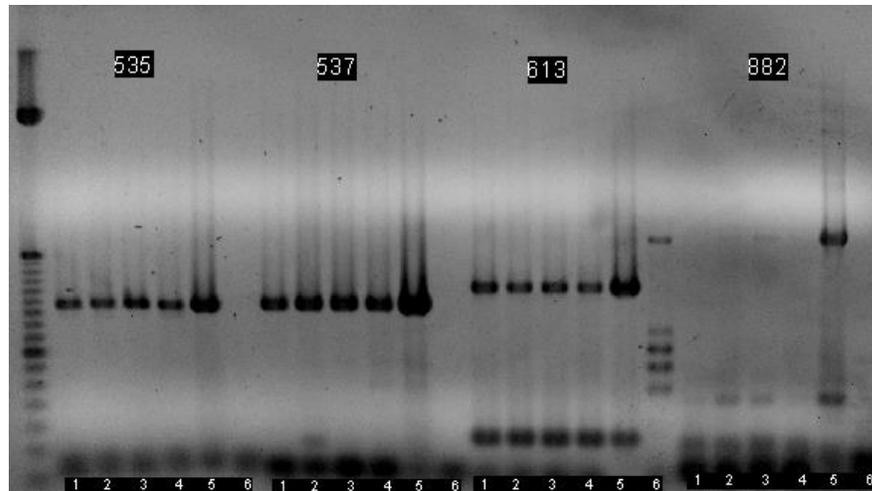


Figura 9. Gel de muestras seleccionadas de hisopo nasal (n=4) en las que los productos eran mayormente visibles en comparación con el resto de las muestras, mostrando con número 5 el control positivo y con número 6 el negativo.

Los productos de la purificación se corroboraron mediante la realización de otro gel y se seleccionaron dos muestras de hisopo oral (muestreo 3) y dos muestras de hisopo nasal (muestreo 5), para su posterior secuenciación en el Laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud, perteneciente al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 7.4.3 Análisis de secuencias

Se realizó la edición y evaluación de las secuencias recibidas mediante técnicas bioinformáticas. Al analizarse las secuencias de las muestras 3-20 y 5-6 se identificó un acortamiento de la secuencia de nucleótidos del marco de lectura para la proteína HN comenzando en la parte final del dominio transmembranal, por lo que no se detectaron en las predicciones *in silico* regiones hidrofóbicas ni hélices transmembranales.

De acuerdo con lo descrito por Siañez-Estrada *et al.* en 2020, para la proteína HN pueden predecirse 17 epítomos no conformacionales para células B, 7 epítomos conformacionales para células B y 34 epítomos para MHC-I. Se refiere en las posiciones 251-267 del marco de lectura abierto para la proteína HN la secuencia YVATRSETDYYAGNSPPQ como un epítomo potencial y con las mejores evaluaciones antigénicas, fisicoquímicas y estructurales (Zenteno-Cuevas *et al.*, 2007), a las secuencias ATRSETDYY y AAYTTTTTCF como epítomos que pueden ser importantes en la neutralización de la infección viral y el PQFSQRAAASY como el epítomo considerado como el mayormente antigénico. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con 22 secuencias obtenidas de GeneBank y las secuencias obtenidas de cada una de las muestras, en el que se identificaron mutaciones en las muestras de hisopado nasal a los 5 dpi en estos epítomos entre las posiciones 301-442, en la posición 352 hay una sustitución de Glutamina por Lisina (Q<sub>352</sub>K) al cambiar una C por A en la secuencia de nucleótidos correspondiente al codón que codifica al aminoácido en esta posición dentro de la secuencia del epítomo considerado el mayormente antigénico (Figura 10). Las regiones involucradas en la unión al ácido neuramínico (FPAYGGM y GSEGRI) y el sitio con actividad neuraminidasa (NRKSCS) reportadas por Herrera *et. al*, 2017 no presentaron cambios en las secuencias.



Se construyó un árbol filogenético para determinar la relación filogenética de las muestras con las 22 secuencias reportadas actualmente (Figura 11) identificando las muestras en un subgrupo en donde se encuentran relacionados evolutivamente las cepas PAC1, LPMV, PAC 4, la secuencia de una HN recombinante desarrollada en el 2010 y uno de los aislados secuenciados en el 2015.

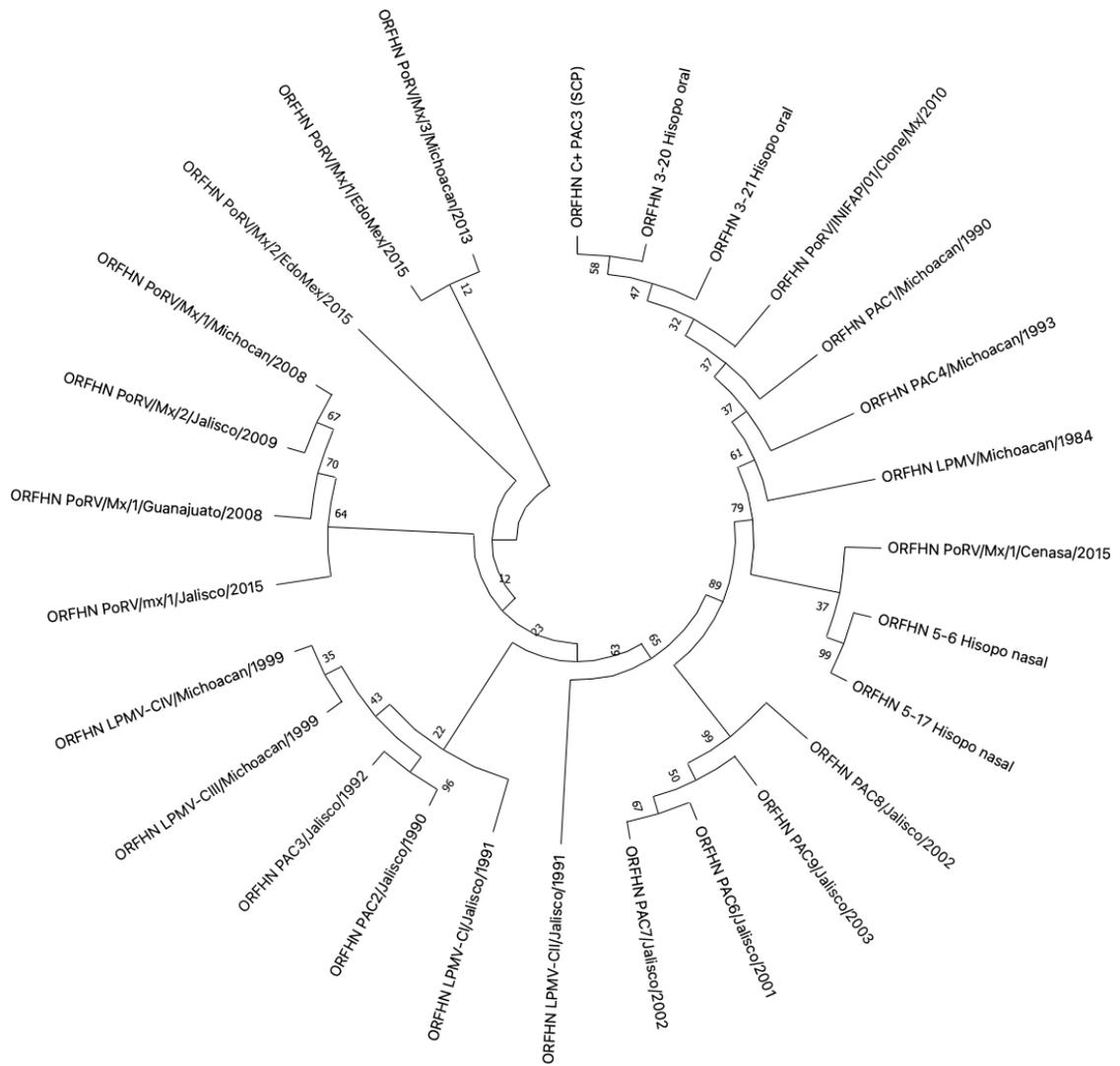


Figura 11. Análisis filogenético obtenido mediante el modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT) en el programa MEGAX (v 10.2.4) de las secuencias de la proteína HN de ORP y las muestras trabajadas en el laboratorio. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas. Este análisis incluyó 27 secuencias de aminoácidos. En el conjunto de datos final había un total de 576 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron con el mismo programa.

## **7.5 Pruebas serológicas**

### **7.5.1 Inhibición de hemoaglutinación (IHA)**

Se realizó la prueba a un total de 348 sueros (324 sueros de animales sin tratamiento con ciclofosfamida y 24 sueros de animales tratados con ciclofosfamida) según la metodología descrita. En todos los cerdos se observó seroconversión a partir del día 8 postinfección, manteniendo una respuesta hasta el día 380 postinfección (Figura 12). En los subgrupos a los 250 y 360 días postinfección la respuesta de anticuerpos mantuvo el comportamiento, al igual que los testigos, por lo que no se obtuvo evidencia de alteraciones en la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación atribuidos al tratamiento inmunosupresor (Figura 13).

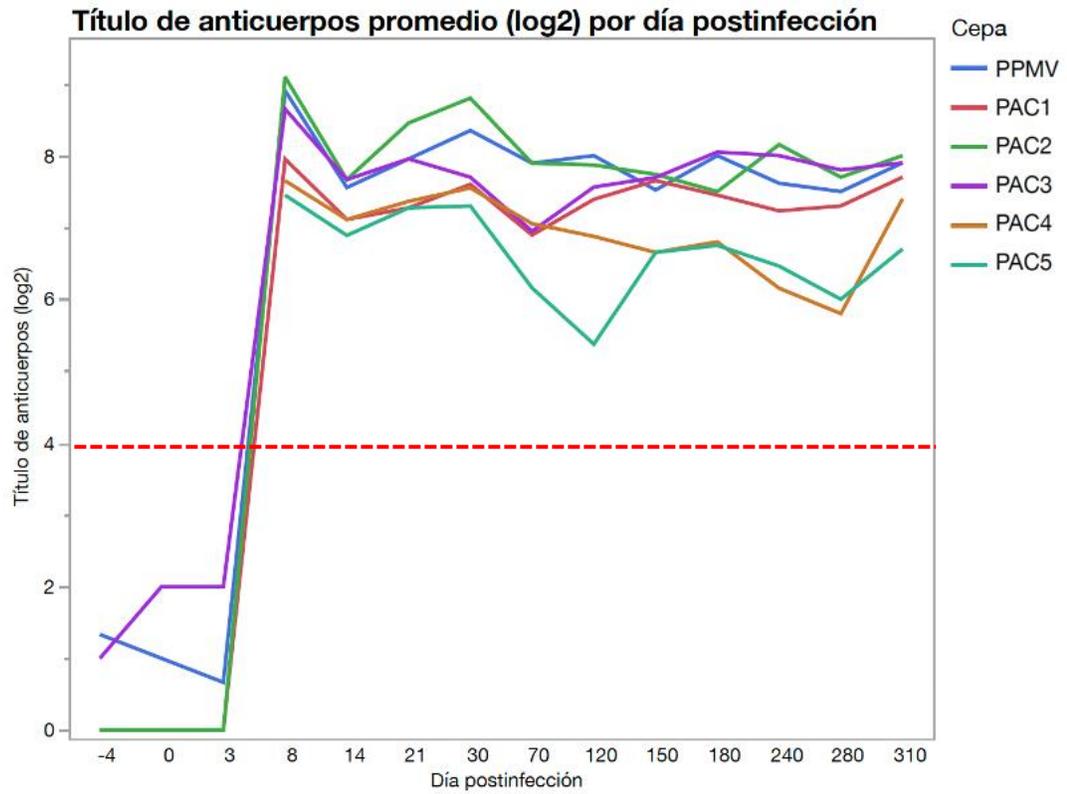


Figura 12. Resultados del promedio de los títulos de anticuerpos contra diferentes antígenos virales de ORP obtenidos en la prueba de IHA a diferentes dpi, el punto de corte se marca con una línea punteada color rojo.

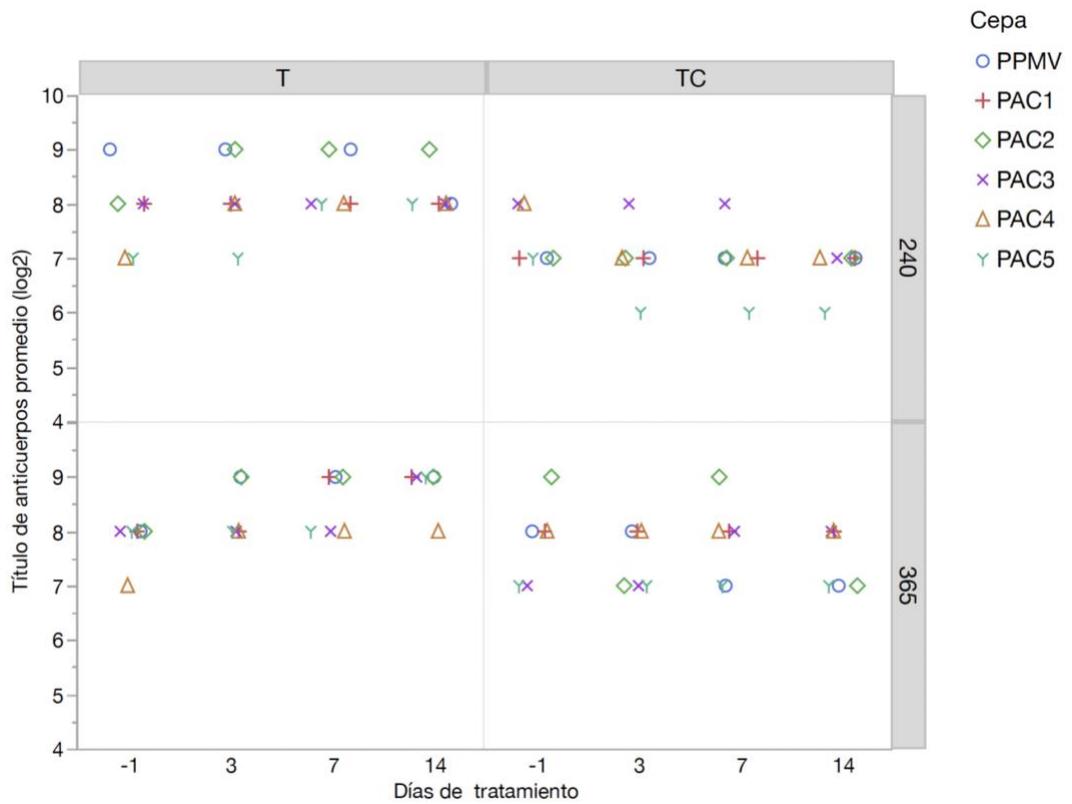


Figura 13. Resultados del promedio de los títulos de anticuerpos de los subgrupo 1 y 2 contra diferentes antígenos virales de ORP obtenidos en prueba de IHA a diferentes dpi, en donde: 240=subgrupo 1, 365=subgrupo 2, T=Grupo testigo y TC= Grupo tratado con ciclofosfamida.

## 7.5.2 Evaluación de la antigenicidad

El resultado de aplicar la fórmula de Archetti y Horsfall al promedio de los títulos obtenidos en la prueba de IHA por muestreo y cepa demostró que las cepas que presentaron mayor homología fueron la cepa parental PPMV y PAC-2, esta última relacionada estrechamente con la cepa PAC-3 en su secuencia de nucleótidos del gen HN. Las cepas que presentaron valores que indican nula relación antigénica con PAC-3 fueron PAC-4, en seis muestreos y PAC-5, en uno solo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Índice de antigenicidad de PAC3 contra seis cepas de ORP a diferentes días posteriores a la infección.

DPI	CEPAS EVALUADAS					
	PPMV	PAC-1	PAC-2	PAC-3	PAC-4	PAC-5
8	0.86	0.51	0.84	1.00	<b>0.44</b>	0.55
14	0.75	0.56	0.68	1.00	0.52	0.57
21	0.74	0.52	0.80	1.00	0.52	0.60
30	<b>0.93</b>	0.62	<b>0.98</b>	1.00	0.60	0.68
70	<b>1.06</b>	0.69	<b>0.99</b>	1.00	0.65	0.64
120	0.86	0.63	0.79	1.00	0.55	0.54
150	0.73	0.69	0.73	1.00	0.53	0.61
180	0.80	0.56	0.58	1.00	<b>0.46</b>	0.58
240	0.91	0.52	0.62	1.00	<b>0.39</b>	0.54
280	0.88	0.62	0.79	1.00	<b>0.47</b>	0.58
310	0.84	0.66	0.82	1.00	<b>0.46</b>	0.75
360	0.69	0.56	0.71	1.00	<b>0.47</b>	0.60
380	0.74	0.60	0.77	1.00	0.55	<b>0.46</b>
Promedio	0.83	0.59	0.78	1.00	0.51	0.59
<b>Desv. E</b>	<b>0.10</b>	<b>0.06</b>	<b>0.12</b>	<b>0</b>	<b>0.07</b>	<b>0.07</b>

En negrita se señalan los valores de reacciones homólogas. En rojo se muestran los valores más alejados, mismos que indican nula relación antigénica.

### **7.5.3 Western blot (WB)**

La inmunodetección confirmó la seroconversión en los cerdos infectados experimentalmente a partir del octavo día posinfección para la proteína hemaglutinina-neuraminidasa, involucrada en inducir la respuesta inmune. El primer pico máximo de detección se observó en el día 21 posinfección y la respuesta se mantuvo estable hasta los 360 dpi.

## VIII. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que la infección por *Orthorubulavirus porcino* es prolongada e intermítete con excreción viral vía nasal, con presencia de ARN viral en pulmón, tonsila y encéfalo hasta los 380 dpi, lo cual ya se ha demostrado en cerdos infectados experimentalmente. Se ha demostrado que la RT-PCR en tiempo real para la detección del gen NP es más sensible para la detección de positivos en muestras de hisopados nasales y orales (Rivera-Benítez *et al.*, 2013a) y en este estudio la detección de muestras positivas a más dpi fue mediante la amplificación del gen NP en muestras de hisopados nasal y oral, a comparación de la amplificación del gen HN en la RT-PCR en punto final en donde los productos que resultaron más visibles se encontraron dentro de los primeros 30 dpi.

En el estudio de Cuevas-Romero *et al.*, en el 2014 los resultados obtenidos indican que el ARNm de ORP persiste e induce una respuesta inmune humoral duradera en cerdos que se han recuperado de una infección natural, con base en los resultados obtenidos se reafirma la presencia y mantenimiento de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación hasta el 380 dpi que varía entre cepas con un pico máximo en común a los 8 dpi y una seroconversión detectable mediante las pruebas de IHA y confirmada mediante WB.

De acuerdo con lo descrito por Wiman *et al.*, en 1998, el ARN es identificado en muestras de encéfalo y pulmón en animales con y sin tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida, en este estudio, identificamos presencia de ARN en estas mismas muestras hasta el día 280 postinfección en animales con el tratamiento en muestras de lóbulo diafragmático, lóbulo accesorio, encéfalo anterior, médula oblonga y tonsila, identificando una mayor carga en esta última. Las muestras positivas de los animales sin el tratamiento inmunosupresor fueron de linfonodo mediastínico y lóbulo apical a los 255 dpi y solamente de lóbulo apical a los 380 dpi. Se demuestra que en estado de inmunosupresión el virus es detectable en una

mayor cantidad de muestras y no necesariamente con una mayor carga viral, esto junto con la excreción prolongada vía nasal con una mayor carga viral en los animales tratados con ciclofosfamida a los 7 y 14 días posteriores al tratamiento apoyan la hipótesis de que en un estado de inmunosupresión si existen cambios en el patrón de la enfermedad experimental, no así en la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación. Se ha demostrado que el aislamiento viral se puede realizar exitosamente en muestras de hisopado nasal aproximadamente en el 50% de ellas a los 1-17 dpi (Rivera-Benitez *et al.*, 2013a).

Respecto a las alteraciones encontradas en las secuencias de hisopado nasal, se ha demostrado que las mutaciones presentes en la secuencia de aminoácidos pueden afectar directamente la predicción de los epítomos de la proteína HN, en el análisis de las secuencias de la proteína obtenidas de las muestras trabajadas en este estudio se identificó una mutación (Q<sub>352</sub>K) en uno de los epítomos de mayor relevancia antigénica según lo descrito por Siañez-Estrada *et al.* en 2020 y Zenteno-Cuevas *et al.*, 2007, el cual tiene una fuerte afinidad a las moléculas de MHC-I y es importante para la generación de inmunidad humoral y su consecuente protección contra una reinfección, por lo cual se debe trabajar en la proyección y modelado por homología de las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína con las modificaciones en la secuencia de aminoácidos. En las regiones de unión al receptor y el sitio con actividad neuraminidasa no se identificaron cambios. En la secuencia YVATRSETDYAGNSPPQ reportada Zenteno-Cuevas *et al.*, 2007 y analizada para identificar mutaciones por Sánchez-Betancourt en el 2007 no se identificó modificación alguna en las muestras de hisopado oral y nasal, en cambio, en 5 de las 22 secuencias obtenidas de GeneBank se identificaron las mutaciones V<sub>252</sub>I y N<sub>264</sub>T y en 6 las mutaciones A<sub>511</sub>S y E<sub>514</sub>K, las cuales se asociaron al incremento de la carga positiva de la proteína HN.

En el diagnóstico serológico de la enfermedad, se ha demostrado que muestras obtenidas en diferentes puntos geográficos son positivos a algunas cepas en común

y a otras no (Escobar-López *et al.* 2012), los resultados de este estudio demuestran patrones de reconocimiento con diferencias al confrontarse los sueros obtenidos de la infección experimental con PAC-3 contra cepas heterólogas. Se identificó una mayor afinidad de las cepas PPMV y PAC-2 en los días 30-70 posteriores a la infección experimental con PAC-3 y una menor afinidad con las cepas PAC-1, PAC-4 y PAC-5, por lo que es una evidencia más de la posibilidad de que los anticuerpos generados en los cerdos por una cepa determinada a nivel de campo, no tengan afinidad por otras cepas distintas.

*In vitro*, existe evidencia que indica que las variantes antigénicas emergen bajo condiciones en las que el agente viral no es completamente neutralizado (Archetti y Horsfall, 1950), el caso de las infecciones persistentes por ORP se ha demostrado que es necesario continuar estudiando las modificaciones en las secuencias de los aislados que se vayan reportando, esto ayudará en el diseño de nuevos biológicos que sean eficientes contra la enfermedad.

## IX. CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró que ORP persiste en cerdos infectados experimentalmente hasta los 380 dpi en muestras de tonsila, encéfalo y pulmón y que existe una excreción viral vía nasal y oral entre los 3 a 70 dpi con una mayor carga viral promedio al día 5 y una prolongación vía nasal hasta los 310 y 380 dpi con diferencias en un estado de inmunosupresión de los cerdos, en donde se demostró que el virus es detectable en una mayor cantidad de muestras con un tratamiento inmunosupresor aunque no necesariamente con una mayor carga viral que los animales sin el tratamiento.
- La seroconversión, como se ha descrito en estudios anteriores, se detectó en los animales a partir del 8 dpi y presentó un patrón de respuesta hasta el 380 dpi, sin evidencia de alteraciones en la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación atribuidos al tratamiento inmunosupresor con la ciclofosfamida.
- Se identificó una mayor afinidad de anticuerpos hacia los antígenos PPMV y PAC-2 en los días 30-70 posteriores a la infección experimental con PAC-3 y una menor afinidad de los mismos con las cepas PAC-1, PAC-4 y PAC-5.
- Se confirmó la presencia de la IgG en muestras de suero con un pico máximo al 21 dpi y la respuesta se mantuvo estable hasta los 360 dpi.
- En el análisis de las secuencias de la proteína HN obtenidas de las muestras trabajadas en este estudio se identificó una mutación (Q<sub>352</sub>K) en uno de los epítomos de mayor relevancia antigénica, los cambios que pueden surgir en las secuencias de nucleótidos y que conllevan a mutaciones no conservativas pueden afectar las propiedades fisicoquímicas de las regiones altamente antigénicas por lo que la investigación de la enfermedad del ojo azul y su agente etiológico son una necesidad para combatirla.

## X. REFERENCIAS

- Albarrán-Rodríguez, R. R., Castillo-Juarez, H., Rivera-Benítez, F., Campos-Montes, G. R., Espinosa, B., Madrigal-Valencia, T. L., Jimenez, E. N. S., & Ramírez-Mendoza, H. (2022). Assessment of the hemagglutinating activity of the Porcine orthorubulavirus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101736>
- Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linne, T., Moreno-Lopez, J., Hernandez, P., Kennedy, S., Carroll, B. P., Herron, B., Foster, J. C., & Adair, B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(4). <https://doi.org/10.1177/104063879600800401>
- Archetti, I., & Horsfall, F. L. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *The Journal of Experimental Medicine*, 92(5). <https://doi.org/10.1084/jem.92.5.441>
- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-Lopez, J., & Linne, T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *Journal of General Virology*, 73(5). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1195>
- Biron C. A. (1994). Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Current opinion in immunology*, 6(4), 530–538. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90137-6)
- Campos H.R., Carbajal S.M. (1989). Transtornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)*, 62-64.
- Cerriteño Sánchez J.L. Producción de una forma enzimática activa e inmunogénica del ectodominio de la hemaglutinina Neuraminidasa (eHN) del rubulavirus porcino en la levadura *Pichia pastoris* (Tesis de Doctorado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2016.
- 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(1–2).  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.008>

Cuevas-Romero, S., Hernández-Baumgarten, E., Kennedy, S., Hernández-Jáuregui, P., Berg, M., & Moreno-López, J. (2014). Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: The detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Research*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.012>

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

Curran, J., Boeck, R., & Kolakofsky, D. (1991). The Sendai virus P gene expresses both an essential protein and an inhibitor of RNA synthesis by shuffling modules via mRNA editing. *EMBO Journal*, 10(10). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07860.x>

Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S., & Randall, R. E. (1999). Sendai Virus and Simian Virus 5 Block Activation of Interferon-Responsive Genes: Importance for Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.73.4.3125-3133.1999>

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). <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01286.x>

Flores-Ocelotl, M. del R., Rosas-Murrieta, N. H., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J., Herrera-Camacho, I., & Santos-López, G. (2011). Transcription of interferon stimulated genes in response to porcine rubulavirus infection in vitro. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300041>

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

Hernández-Jáuregui, P., Ramírez Mendoza, H., Mercado García, C., Moreno-López, J., & Kennedy, S. (2004). Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant cells. *Journal of Comparative Pathology*, 130(1). [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00058-6)

Hernandez, J., Ramírez-Mendoza, H., Reyes-Leyva, J., Valenzuela, O., Zenteno, E. (2004). Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el rubulavirus porcino. *Veterinaria México*. 1: 1-10.

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). [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00169-X)

Herrera, J., Gómez-Núñez, L., Lara-Romero, R., Diosdado, F., Martínez-Lara, A., Jasso, M., Ramírez-Mendoza, H., Pérez-Torres, A., & Rivera-Benítez, J. F. (2017). Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Research*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.010>

Hidalgo Lara, Diego Rafael. Evaluación de técnicas serológicas para el diagnóstico de rubulavirus porcino. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.

Hjertner, B., Linné, T., & Moreno-López, J. (1997). Establishment and Characterisation of a Porcine Rubulavirus (LPMV) Persistent Infection in Porcine Kidney Cells. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38(3). <https://doi.org/10.1186/BF03548484>

Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 8(3). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>

Kirkland P.D., Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle, and Nipah Virus Infections. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor D, editor. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006.

Kiyotani, K., Sakaguchi, T., Kato, A., Nagai, Y., & Yoshida, T. (2007). Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. *Virology*, 359(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.053>

Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., & Fujii, N. (2002). Association of Mumps Virus V Protein with RACK1 Results in Dissociation of STAT-1 from the Alpha Interferon Receptor Complex. *Journal of Virology*, 76(24). <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12676-12682.2002>

Lara Romero, R. Detección de cerdos persistentemente infectados por la enfermedad de ojo azul (Rubulavirus porcino) mediante la prueba de PCR tiempo real en leucocitos de sangre periférica. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli; 2013.

Linjie, L., Xiaoling, S., Xiaoxia, M., Xin, C., Ali, A., & Jialin, B. (2021). Peste des petits ruminants virus non-structural C protein inhibits the induction of interferon- $\beta$  by potentially interacting with MAVS and RIG-I. *Virus Genes*, 57(1). <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01811-y>

Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A., & Ericsson, A. (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of virology*, 91(3-4), 221–231. <https://doi.org/10.1007/BF01314282>

Morilla González, A. (2003). Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencia Veterinaria*. 197(227). Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-veterinaria/articulo/las-enfermedades-virales-emergentes-de-los-cerdos>

Pisanelli, G., Laurent-Rolle, M., Manicassamy, B., Belicha-Villanueva, A., Morrison, J., Lozano-Dubernard, B., Castro-Peralta, F., Iovane, G., & García-Sastre, A. (2016). La Piedad Michoacán Mexico Virus V protein antagonizes type I interferon response by binding STAT2 protein and preventing STATs nuclear translocation. *Virus Research*, 213. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.10.027>

Ramírez Mendoza, H. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México; 1998.

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). [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80018-7)

Reyes-Leyva J., Hernández-Jauregui P., Montaña L.F., & Zenteno E. (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (alpha 2,3) lactose-containing structures. *Archives of Virology*, 133(1-2). <https://doi.org/10.1007/BF01309755>

Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernandez, J., Zenteno, R., Vallejo, V., Hernández-Jáuregui, P., & Zenteno, E. (1997). NeuAc $\alpha$ 2,3Gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 118(2). [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00164-8)

Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Hernández, J., Espinosa, B., Borraz-Argüello, M., Ramirez-Mendoza, H., Vallejo-Ruiz, V., Zenteno, E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje Bioquímico*. 26: 99-125. disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/326723749\\_Mecanismos\\_moleculares\\_de\\_la\\_patogenia\\_viral\\_Estudios\\_con\\_el\\_Rubulavirus\\_porcino](https://www.researchgate.net/publication/326723749_Mecanismos_moleculares_de_la_patogenia_viral_Estudios_con_el_Rubulavirus_porcino)

Reyes-Leyva, J., García-Morales, O., 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). <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2004000100004>

Rivera-Benitez, J. F., de la Luz-Armendáriz, J., Saavedra-Montañez, M., Jasso-Escutia, M. Á., Sánchez-Betancourt, I., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Martínez-Lara, A., & Ramírez-Mendoza, H. (2016). Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus. *Veterinary Microbiology*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.005>

Rivera-Benitez, J. F., García-Contreras, A. del C., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Sánchez-Betancourt, J. I., & Ramírez-Mendoza, H. (2013a). Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Archives of Virology*, 158(9). <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1672-0>

Rivera-Benitez, J. F., Martínez-Bautista, R., Pérez-Torres, A., García-Contreras, A. del C., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013b). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary Microbiology*, 162(2–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.037>

Rivera-Benitez, J. F., Cuevas-Romero, S., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013c). Respiratory disease in growing pigs after Porcine rubulavirus experimental infection. *Virus research*, 176(1-2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.017>

Romero Valdovinos, M., & Gómez, B. (2003). Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: Association with defective interfering particles. *Intervirology*, 46(3). <https://doi.org/10.1159/000071461>

Sánchez B.J.I. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del rubulavirus porcino. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.

Sánchez B.J.I. Caracterización del gen HN de variantes del Rubulavirus porcino y determinación de la eficiencia protectora de una vacuna polivalente. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.

Sánchez B.J.I., Mendoza E.S., Doporto D.J.M., Trujillo O.M., Reyes L.J., Becerra F.A. (2008a). Situación actual de la enfermedad del ojo azul en México. *Memorias del XLIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)*, 62-76.

Sánchez-Betancourt, J. I., Santos-López, G., Alonso, R., Doporto, J. M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Hernández, J., Reyes-Leyva, J., & Trujillo, M. E. (2008b). 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). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.10.007>

Santos-López, G., Borraz-Argüello, M. T., Márquez-Domínguez, L., Flores-Alonso, J. C., Ramírez-Mendoza, H., Priem, B., Fort, S., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J., & Herrera-Camacho, I. (2017). Neuraminidase activity of blue eye disease porcine rubulavirus: Specificity, affinity and inhibition studies. *Research in Veterinary Science*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.008>

Santos-Lopez, G., Hernandez, J., Borraz-Argüello, Ramirez-Mendoza, H., Vallejo, V., & Reyes-Leyva, J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. In *Archivos de Medicina Veterinaria* (Vol. 36, Issue 2). <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2004000200003>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Resumen nacional de la producción pecuaria. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>

Siañez-Estrada, L. I., Rivera-Benítez, J. F., Rosas-Murrieta, N. H., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., & Herrera-Camacho, I. (2020). Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of Porcine rubulavirus. *PLoS ONE*, 15(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239785>

Solís, M., Ramírez-Mendoza, H., Mercado, C., Espinosa, S., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., & Hernández, J. (2007). Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Research in Veterinary Science*, 83(3). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.018>

Stephano H.A., Doperto J.M., Gay G.M. (1985). Estudio epidemiológico en dos granjas afectadas por el síndrome del ojo azul. *Memorias del XX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC)*, 79-82.

Stephano HA (2000). La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones. En: *Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo*.

Stephano, H. A., Gay, G. M., & Ramírez, 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. <https://doi.org/10.1136/vr.122.1.6>

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 - B Biochemistry and Molecular Biology*, 126(3). [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00213-3)

Yuan, P., Thompson, T. B., Wurzburg, B. A., Paterson, R. G., Lamb, R. A., & Jardetzky, T. S. (2005). Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.02.019>

Young, D. F., Didcock, L., Goodbourn, S., & Randall, R. E. (2000). Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response. *Virology*, 269(2). <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0240>

Wiman, A. C., Hjertner, B., Linné, T., Herron, B., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B., Moreno-López, J., & 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). <https://doi.org/10.3109/13550289809113499>

Wang, L. F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Crameri, G., Rima, B. K., Moreno-López, J., & 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). <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0959-4>

Zenteno-Cuevas, R., Huerta-Yepez, S., Reyes-Leyva, J., Hernández-Jáuregui, P., González-Bonilla, C., Ramírez-Mendoza, H., Agundis, C., & Zenteno, E. (2007). Identification of potential B cell epitope determinants by computer techniques, in hemagglutinin-neuraminidase from the porcine rubulavirus La Piedad michoacan. *Viral Immunology*, 20(2). <https://doi.org/10.1089/vim.2006.0066>

## ANEXO A

Tamaño de muestras de hisopado por tipo y día postinfección en la que se tomó.

<i>DPI</i>	<i>n HO</i>	<i>n HN</i>
-4	22	23
0	24	24
1	25	25
3	25	24
5	25	25
8	25	25
14	25	25
21	24	24
30	24	23
70	19	20
120	23	23
150	23	22
180	23	23
240	6	6
280	10	10
310	10	10
360	7	7
380	6	6
Total	346	345

## ANEXO B

Tamaño de muestras de órgano y resultado de la carga viral promedio en donde T= grupo testigo y TC= grupo tratado con ciclofosfamida.

	Subgrupo 1			Subgrupo 2			Subgrupo 1			Subgrupo 2		
	T	T	T	TC	TC	TC	T	T	T	TC	TC	TC
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tonsila	Neg	Neg	Neg	4.25	3.83	4.32	Neg	Neg	Neg	4.18	Neg	Neg
Lif. Traqueobronquial	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Linf. Mediastínico	Neg	Neg	4.78	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Bazo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Mucosa Nasal	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Lóbulo apical	Neg	Neg	Neg	4.69	Neg	Neg	2.25	Neg	3.51	Neg	Neg	Neg
Lóbulo cardiaco	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Lóbulo diafragmático	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	2.6	Neg	Neg
Lóbulo accesorio	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	3.2	Neg
Bulbo olfatorio	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Encéfalo anterior	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	2.73	2.74	Neg
Encéfalo medio	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Encéfalo posterior	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Cerebelo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Médula oblonga	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	3.24	Neg	Neg
Plexo coroideo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Riñón	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

## ANEXO C

Identificación y número de acceso de las secuencias obtenidas de GeneBank de la proteína HN de ORP para su uso en el alineamiento múltiple.

<b>Aislamiento reportado</b>	<b>Número de Acceso</b>
LPMV/1984	S77541.1
PAC1/1990	KP229773.1
PAC2/1990	EF413172.1
PAC3/1992	EF413173.1
PAC4/1993	EF413174.1
PAC6/2001	EF413175.1
PAC7/2002	EF413176.1
PAC8/2002	EF413177.1
PAC9/2003	EF413178.1
LPMV-CI/1991	AY463798.1
LMPV-CII/1999	AY487249.1
LPMV-CIII/1999	AY487251.1
LPMV-CIV/2002	AY487250.1
PorPV/Mx/1/Jalisco/2007	KT037087.1
PorPV/Mx/2/Jalisco/2009	KT037090.1
PorPV/Mx/1/Jalisco/2015	KY100869.1
PorPV/Mx/1/ Guanajuato/2008	KT037088.1
PorPV/Mx/1/Michoacan/2008	KT037089.1
PorPV/Mx/2/Michoacan/2009	KT037091.1
PorPV/Mx/3/Michoacan/2013	KT037092.1
PorPV/Mx/1/EdoMex/2015	KY100870.1
PorPV/Mx/2/EdoMex/2015	KY100868.1

**ANEXO D. Gráficos de las medias de la carga viral en las muestras de hisopado.**

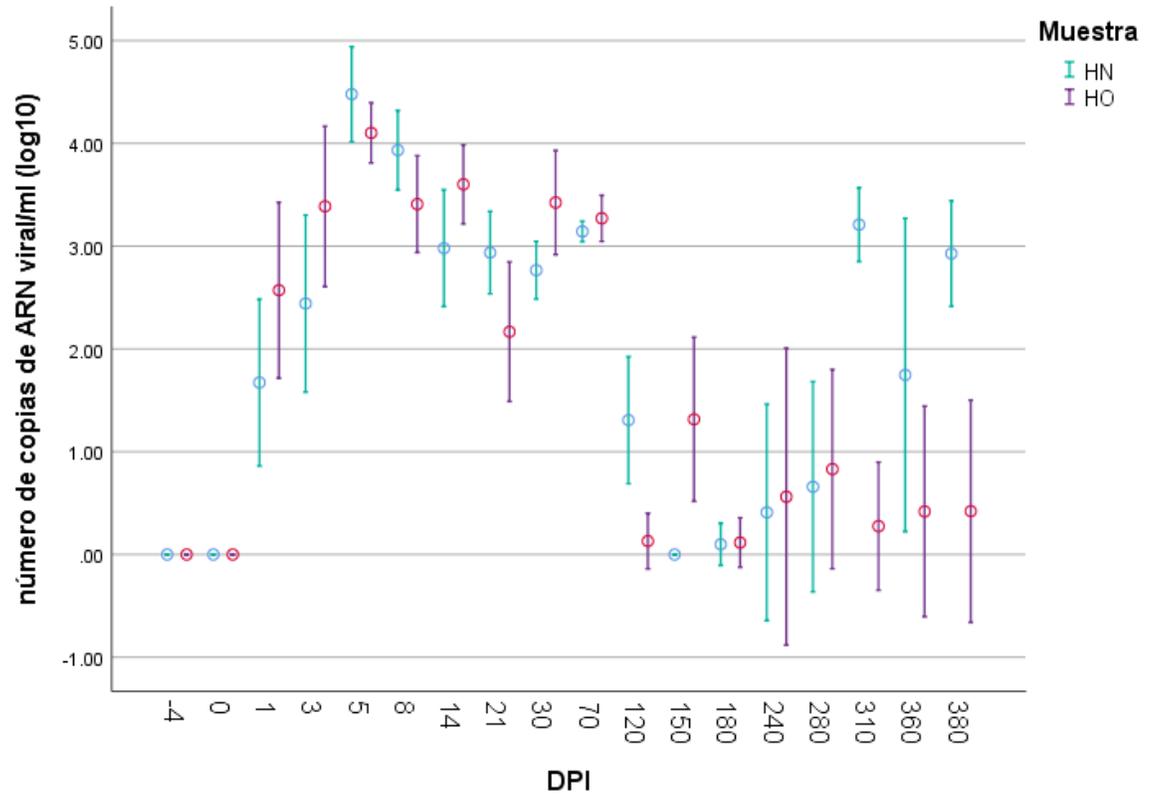


Gráfico de descriptivo de las medias de carga viral de las muestras de hisopados nasal (HN) y oral (HO) por día postinfección.

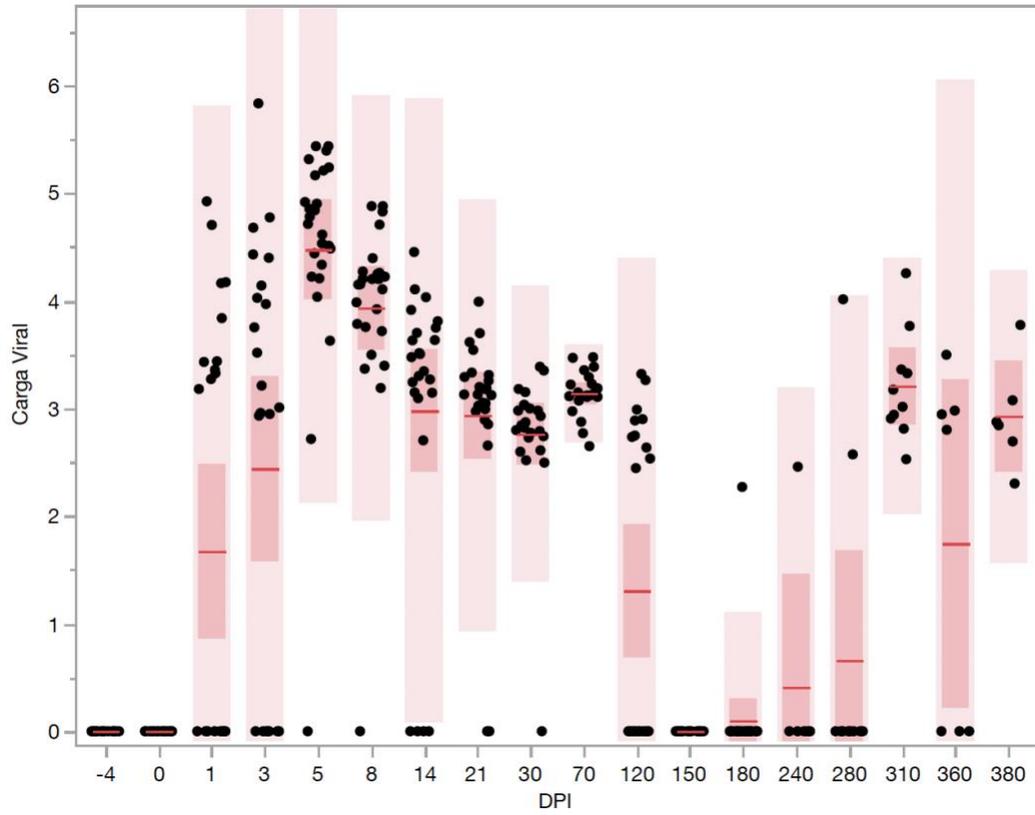


Gráfico de dispersión de las medias de carga viral de las muestras de hisopado oral por día postinfección.

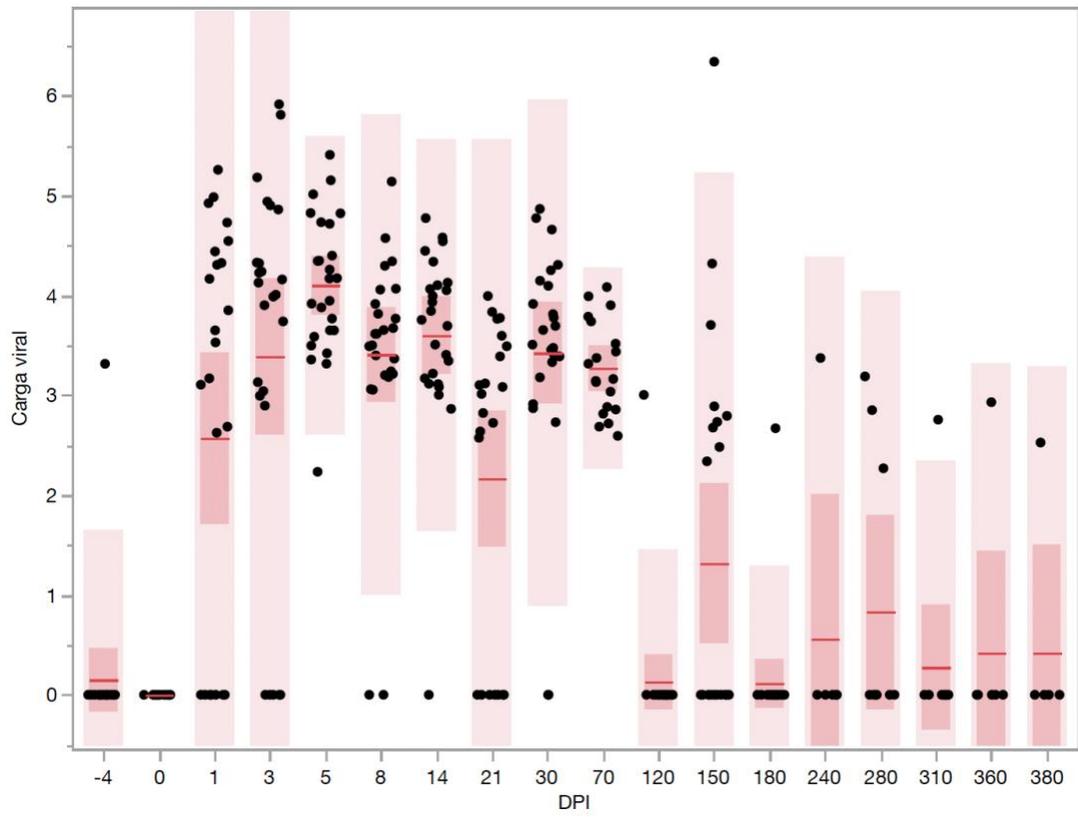


Gráfico de dispersión de las medias de carga viral de las muestras de hisopado nasal por día postinfección.

