

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo. A.C.

**Predicción *in silico* de epítopes de la proteína Nsp5 del virus  
del síndrome reproductivo y respiratorio porcino**

POR:

**JOSÉ LUIS DÁVILA RAMÍREZ**

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE DEL 2010

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de José Luis Dávila Ramírez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias.



---

Dr. Jesús Hernández López  
Director de tesis



---

Dra. Verónica Mata Haro

*Maricela Montalvo Corral*

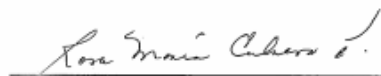
---

Dra. Maricela Montalvo Corral



---

M.C. Adriana Verónica Bolaños Villar



---

M.C. Rosa María Cabrera Pacheco

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves de material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial y total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A. C.).

La publicación en comunicación científica o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A. C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del Director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández.

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del programa SEP-CONACYT proyecto No. 82850

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, un especial agradecimiento al Dr. Jesús Hernández por la confianza, apoyo y estímulo brindado durante el desarrollo de esta investigación. Además de permitirme pertenecer a su grupo de trabajo durante este tiempo.

Al centro de investigación en alimentación y desarrollo, en especial al laboratorio de inmunología, por brindarme la oportunidad de realizar mi maestría, y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis integrado por el Dr. Jesús Hernández, Dra. Verónica Mata, Dra. Maricela Montalvo, M.C. Adriana Bolaños y M.C. Rosa María Cabrera por su guía, apoyo y dirección brindaba durante la realización de este trabajo.

Al personal técnico del laboratorio de inmunología, especialmente a la Q.B. Mónica Reséndiz y Q.B. Karina Espinoza, quienes colaboraron en las diferentes etapas de este estudio, gracias por dedicar un poco de su tiempo en la parte experimental de este trabajo.

Al personal de CIAD, Héctor Galindo, Laura García, Argelia Marín y Verónica Araiza de programas académicos, así como a don Héctor de servicios de apoyo. A Gerardo Reyna y Luis Conde de biblioteca, siempre con un trato amable en todo momento.

Al mis compañeros de laboratorio, Alexel, Chava, Lily, Erika, Lupita, Rosario, Elí, Anita, Erika, el mejor de los éxitos en su vida profesional.

## **DEDICATORIA**

Con profundo amor, admiración y respeto al amor más grande de mi vida; MIS PADRES, por su confianza y apoyo incansable para que mi superación fuera día con día. Mil gracias.

Gracias PADRE por el esfuerzo que has puesto en mí para ayudarme a forjar lo que ahora soy. Gracias MADRE por ver siempre primero por tus hijos y por sacarnos adelante a mis hermanas y a mí.

A mis Hermanas MARIA A. y KARLA L., por permitirme gozar de su compañía y sobre todo ser parte de mí familia. Las quiero y admiro mucho. El mejor de los éxitos.

A mis Sobrinos MARIAN ANDREA, MARCO ALEJANDRO Y MARIA JOSE, con la esperanza de que sus padres les enseñen a apreciar todo por lo que vale la pena luchar, como los míos me lo enseñaron. Para que en algún momento de sus vidas les sirva de impulso para una futura formación.

A ROSINA por darme la fuerza y el amor para lograr este importante objetivo profesional y de vida. Eres un ejemplo para mí, eres una gran mujer y espero que éste que es un logro para mí, sea motivo de felicidad para ti. Con todo mi amor.

Y en general deseo agradecer a mi familia, por su paciencia, comprensión, apoyo y estímulo durante la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Virus del PRRS	4
Variabilidad genética del virus del PRRS	6
Respuesta inmune al virus del PRRS	8
Complejo mayor de histocompatibilidad	13
Uso de vacunas contra el virus del PRRS	19
Predicción <i>in silico</i>	22
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Particulares	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Predicción <i>in silico</i> de péptidos	28
Unidades experimentales	29

<i>Cerdos de experimentación</i>	29
<i>Cerdos de granjas</i>	30
Diseño experimental	30
<i>Cerdos de experimentación</i>	30
<i>Cerdos de granja</i>	31
Extracción de células mononucleares (CMN)	31
Obtención de suero	32
Ensayo de proliferación	33
Determinación de la producción de IFN- $\gamma$	34
Determinación de la respuesta humoral	35
Análisis estadístico	35
<i>Respuesta celular</i>	35
Índice de proliferación	35
Índice de IFN- $\gamma$	36
<i>Respuesta Humoral</i>	37
Cerdos de experimentación	37
Cerdos de granja	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Selección de péptidos	39
Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta celular	43
<i>Péptido 1a</i>	43
<i>Péptido 2a</i>	47



Efecto de los péptidos sintéticos en la producción de IFN- $\gamma$	55
<i>Péptido 1a</i>	55
<i>Péptido 2a</i>	56
Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta humoral	59
<i>Péptido 1a</i>	59
<i>Péptido 2a</i>	61
Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta humoral en una infección natural	65
<i>Péptido 1<sup>a</sup></i>	65
<i>Péptido 2<sup>a</sup></i>	67
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
Figura 1 Secuencia de la proteína Nsp5 en las diferentes cepas del virus del PRRS reportadas.	41
Figura 2 Características hidrofóbicas de los péptidos 1a (Nsp5-MHC-I) y 2a (Nsp5-MHC-II).	42
Figura 3 Efecto en el índice de proliferación del péptido 1a (Nsp5-MHC-I) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el virus del PRRS.	45
Figura 4 Efecto en el índice de proliferación del péptido 2a (Nsp5-MHC-II) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el virus del PRRS.	49
Figura 5 Efecto en el índice de proliferación del péptido 1a (Nsp5-MHC-I) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV.	53

Figura 6	Efecto en el índice de proliferación del péptido 2a (Nsp5-MHC-II) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV.	54
Figura 7	Índice de IFN- $\gamma$ de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con 4 semanas con el PRRSV, estimuladas con el péptidos 1a (MHC-I) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	56
Figura 8	Índice de IFN- $\gamma$ de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con 4 semanas con el PRRSV, estimuladas con el péptidos 2a (MHC-II) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	58
Figura 9	Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 1a (Nsp5-MHC-I) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en sueros de animales sanos (semana 0) y en animales con diferentes semanas de infección con el virus del PRRS.	60

Figura 10 Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 2a (NsP5-MHC-II) a una concentración de 10 µg/mL en sueros de animales sanos (semana 0) y en animales con diferentes semanas de infección con el virus del PRRS.	62
Figura 11 Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 1a (NsP5-MHC-I) a una concentración de 10 µg/mL en sueros de animales de diferente edad y sexo infectados de manera natural con el virus del PRRS. Sementales (S), Cerdas (C), Lechones (L), Lechones de experimento con 5 semanas de infección (L5).	66
Figura 12 Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 2a (NsP5-MHC-II) a una concentración de 10 µg/mL en sueros de animales de diferente edad y sexo infectados de manera natural con el virus del PRRS. Sementales (S), Cerdas (C), Lechones (L), Lechones de experimento con 5 semanas de infección (L5).	69

## RESUMEN

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es la enfermedad más infecciosa que afecta actualmente a la especie porcina en todo el mundo. En E.U. las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad ascienden a más de 560 millones por año. Se han utilizado diferentes métodos para el control de la enfermedad como son el uso de vacunas, entre estas la de virus inactivado o virus vivo modificado. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la protección de inmunidad con el uso de vacunas aún no es claro. Recientemente se han utilizado herramientas bioinformáticas que utilizan matrices de afinidad para predecir epítopes con características inmunogénicas que pueden ser utilizados en el diseño de una vacuna. En este sentido y para los objetivos del presente trabajo, se seleccionaron *in silico* dos epítopes de la proteína Nsp5 del PRRSV con posible capacidad de estimular la proliferación en células mononucleares de cerdos infectados con el PRRSV y la producción de anticuerpos. Los estudios indicaron una respuesta celular muy heterogénea, probablemente provocado por la variación en haplotipos de los animales analizados. En cuanto a la respuesta humoral se observa que los dos péptidos fueron reconocidos por anticuerpos a partir de la semana 3 pos infección ( $P < 0.10$ ), mientras que en la respuesta humoral en animales de granja solo las cerdas presentaron anticuerpos ante los péptidos.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad del cerdo de etiología viral que ha causado gran impacto económico en la industria porcina mundial en los últimos años (Blaha, 2000; Fano et al., 2005). Se encuentra entre las enfermedades más importantes de los cerdos y se puede presentar en forma aguda, crónica y subclínica (Lager y Mengeling, 1995).

Existen dos genotipos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV): el europeo y el norteamericano (Nelson et al., 1993). El análisis de la secuencia de nucleótidos del ARN de ambos genotipos indica una diferencia de 40%. La gran variabilidad genética de este virus agrava el problema de la pobre o ineficaz respuesta inmunitaria. Ésta, depende de la cepa que esté infectando el sistema de producción de la granja, de las medidas de bioseguridad y de los patógenos secundarios existentes (Pijoan, 1996; Sierra et al., 1998).

El PRRSV infecta células del sistema inmune y modifica la función inmunológica normal del huésped. Por lo tanto, su respuesta a la infección es pobre y provoca que el virus persista en cerdos infectados por semanas o

meses (Yoo et al., 2004). El virus presenta una serie de características complejas, como la capacidad de mutar, recombinar, deprimir el sistema inmunológico y causar enfermedad persistente (Drew, 2000). Estas características están dadas por su alta variabilidad genética (Plagemann, 2003), lo cual provoca que module el sistema inmune del huésped, y hace muy difícil desarrollar una vacuna universal que pueda usarse para erradicar la enfermedad (Zuckermann et al., 2007).

La producción de anticuerpos neutralizantes contra el PRRSV es inducida principalmente por las glicoproteínas GP5 y GP4 (López y Osorio, 2004); sin embargo el conocimiento respecto a epítopes de células T del virus del PRRS es muy limitado. Vashisht et al. (2008), reportan que existen dos epítopes en la proteína GP5 de la cepa del tipo americano que tienen capacidad para inducir una respuesta en la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenida de cerdos infectados por el virus del PRRS.

La determinación de epítopes reconocidos por las células T es una tarea complicada. La síntesis y el análisis de una gran cantidad de péptidos es costoso y difícil. En contraste la predicción por medio de técnicas bioinformáticas es barata y puede ayudar a limitar el número de péptidos que serán analizados (Díaz et al., 2009). En un estudio reciente se utilizó la

predicción *in silico* para predecir los potenciales epítopes de las células T en las proteínas GP4, GP5 y N del PRRSV, por medio de la respuesta inmune celular cuantificando la producción de IFN- $\gamma$  (Díaz et al., 2009).

Con el progreso de las herramientas informáticas, se ha logrado crear medidas que apoyan el desarrollo *in silico* de vacunas en contra del PRRSV. El objetivo del presente trabajo fue predecir epítopes de la proteína no estructural 5 (Nsp5) del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, mediante la técnica *in silico*, analizando su actividad inmunogénica en células mononucleares y en suero de cerdos infectados con el PRRSV.



## **ANTECEDENTES**

### **Virus del PRRS**

El PRRSV está clasificado en el orden *Nidovirales*, y pertenece a la familia *Arteriviridae* y al género *Arterivirus*. Ocasiona fallas a nivel reproductivo caracterizadas por partos prematuros, momificación fetal, nacimiento de crías muertas o débiles, alta mortalidad pre-destete, además afecta animales de todas las edades (Nodelijk, 2002). Esto lleva al productor a pérdidas considerables representadas por una menor conversión alimenticia, mayores índices de mortalidad pre-destete, baja ganancia diaria de peso y enfermedad respiratoria de cerdos en crecimiento (Opriessnig et al., 2002).

Su genoma de aproximadamente 15 kb consta de RNA de cadena sencilla asociado a una cubierta proteica, además de contener 9 marcos de lectura abierta (ORF). El ORF1a y 1b del PRRSV ocupan la mayor parte del genoma (75%) (Benfield et al., 1999) y codifican la polimerasa viral, implicada en la transcripción y replicación del RNA. Los ORF 2a, 3, 4 y 5 codifican cuatro glicoproteínas que forman parte de la membrana del virus; ORF 2b y 6 codifican

proteínas de membranas no glicosiladas y ORF 7 contiene la proteína de la nucleocápside (N) (Zimmerman et al., 1998).

El ORF5 del PRRSV es un gen muy variable, que codifica a GP5 (Opriessnig et al., 2002). Ésta desempeña un papel importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el PRRSV (Gonin et al., 1999). Además, puede estar involucrada en la patogénesis de la enfermedad debido a que produce apoptosis en cultivos celulares (Suárez et al., 1996).

Las proteínas no estructurales del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino son codificadas por los ORFs 1a y 1b, las cuales tienen actividad de replicasas y helicasas (Wu et al., 2001). A pesar de ser esenciales en la replicación del virión, hasta la fecha es poco conocida la importancia que tienen en la respuesta inmune. Estas proteínas son vitales para el ciclo de vida viral y su presencia en células es conocida por ser tóxico, debido a su actividad de proteasas (Johnson et al., 2007). Las proteínas de la estructura viral son expresadas de seis mRNAs subgenómicos y se forman por un mecanismo de transcripción discontinua que aún se desconoce (Shishan y Zuzhang, 2008).

Se sabe que dichas proteína son expresadas en etapas tempranas de la replicación del virus y están disponibles al inicio de la infección en los proteosomas de degradación de los macrófagos. Así mismo, son presentadas al sistema inmune en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad

(MHC) clase I y II. Por otro lado, los datos reportados por Johnson et al. (2007), sugieren que tanto la proteína Nsp1 como la Nsp2 son altamente inmunogénicas y se expresan en niveles más altos, que la Nsp4 en células infectadas por el PRRSV. Además, existe reacción cruzada de los sueros de cerdos infectados con diferentes cepas en contra de la Nsp1 y Nsp2. El análisis de proteínas no estructurales de cerdos infectados con otras cepas del PRRSV, indican que múltiples epítopes son conservados.

Por otra parte, las otras proteínas presentes en el PRRSV, son las estructurales, en donde las principales son derivadas de los ORF5, 6 y 7, los cuales codifican la GP5, M y N, respectivamente (Wu et al., 2001). La proteína N forma el principal componente de la nucleocápside y se localiza en el nucléolo de la célula huésped durante la replicación (Rowland et al., 1999). Los productos de los ORF2, 3 y 4 (GP2, GP3 y GP4, respectivamente) pueden representar componentes adicionales del virión del PRRS (Meulenbergh et al., 1997).

### **Variabilidad genética del virus del PRRS**

El PRRSV posee dos genotipos: el europeo y el norteamericano. Estos dos son diferentes tanto genética como inmunológicamente, comparten solo el 60% en la identidad de nucleótidos (Nelsen et al., 1999). Mientras que reportes

en el mismo genotipo muestran una diversidad genética mayor del 20% (Mateu et al., 2003). Al hacer un estudio comparativo del grado de identidad de los diferentes aislados del PRRSV se observa que esta variación es muy notoria, considerando que la similitud de los aminoácidos entre los aislados americanos (VR-2332) y aislados europeos (virus Lelystad) es de 55% en la proteína GP5 (ORF5) y del 79% en la proteína matriz (ORF6) (Wu et al., 2001).

En el campo existen variaciones en la agresividad del virus, que puede asociarse a las diferentes cepas que existen. No se sabe cuántas existan, pero hay considerables variaciones antigénicas (Wensvoort et al., 1992). Por ello, la forma de presentación clínica de PRRSV es muy variable y depende de la cepa que esté infectando el sistema de producción de la granja, de las medidas de bioseguridad y de los patógenos secundarios existentes (Pijoan, 1996; Sierra et al., 1998).

Las secuencias, ya sean de nucleótidos o de aminoácidos, de los aislamientos del PRRSV de diferentes granjas raramente son idénticas. La variación ocurre ya sea porque las bases cambian durante la replicación viral, por un proceso de mutación, o porque el material genético de dos virus se recombina y produce nuevos virus. Los cambios en la secuencia de los nucleótidos pueden modificar la secuencia de aminoácidos y tal vez producirse un virus con propiedades diferentes. Estas variaciones son la causa biológica

que permite que el virus se adapte y persista ante los cambios del medio ambiente (Drew, 2000).

La gran variabilidad genética del PRRSV agrava el problema de la pobre o ineficaz respuesta inmune en los animales infectados. La inmunidad cruzada entre cepas es solo parcial, por lo que los animales infectados con una determinada cepa viral no están completamente protegidos frente a infecciones por otras cepas. Debido a esto es difícil establecer programas de control y erradicación del PRRSV (Zuckermann et al., 2007).

### **Respuesta inmune al virus del PRRS**

La respuesta inmune del cerdo sobre el desarrollo y la expresión de la infección con el PRRSV no se conoce bien. Sin embargo, los anticuerpos anti-PRRSV incrementan la fagocitosis del virus por los macrófagos. Existen varios problemas o limitantes cuando se trata de interpretar la serología de PRRS. La correlación entre la seropositividad, respuesta inmune y la presencia del virus aún no se ha dilucidado (Pijoan, 1996).

El PRRSV infecta células del sistema inmune y modifica la función inmune normal del huésped, por lo tanto, su respuesta a la infección es pobre y el virus persiste en cerdos infectados por semanas o meses (Yoo et al., 2004). En estos casos, el virus permanece en un estado viable que puede no estimular

la producción de anticuerpos. Además, puede ser recuperado en muestreos después de un tiempo postinfección, a partir de suero, cavidad orofaríngea y semen (Albina et al., 1994).

Los animales infectados desarrollan anticuerpos y una respuesta celular, pero la función específica de cada una de estas protecciones en la eliminación del virus se desconoce (Batista et al., 2004). El PRRSV es poco conocido en cuanto a su inmunología. No se sabe cuáles son los componentes de la respuesta inmune que pueden ser importantes para establecer una protección de inmunidad contra este patógeno. Una característica importante en la inmunidad expresada contra el PRRSV, es que existe una respuesta abundante a anticuerpos que exhiben mínima actividad de neutralización (Yoon et al., 1996).

Un tipo de respuesta que es importante ante una infección contra el PRRSV, es la humoral, la cual está dada por la cantidad de anticuerpos que se generan durante una infección por este virus. Los anticuerpos circulantes son detectados en algunos cerdos a los 5-7 días después de la infección, y en todos los animales se encuentran a los 14 días post-infección (Yoon et al., 1995). La inmunoglobulina (Ig) M específica al PRRSV alcanza su valor máximo al día 14 post-infección y empieza a declinar hasta niveles no detectables a los 42 días después de la infección. Por otra parte, la concentración de IgG alcanza un

máximo a los 19-49 días después de la infección (Loemba et al., 1996). No obstante, la respuesta IgM e IgG, no corresponden a anticuerpos neutralizantes (Yoon et al., 1995).

Los anticuerpos neutralizantes son detectados consistentemente alrededor del día 28 post-infección, tanto en las cepas de PRRSV europeas, como americanas (Meier et al., 2003). Estos anticuerpos son dirigidos principalmente contra la GP5, la cual contiene el mayor epítotope de neutralización (Nelson et al., 1994). En otros estudios se afirma que la GP4 y la M también contienen epítotope de neutralización al igual que la GP3, pero estas proteínas tienen menor significancia biológica al compararlas con la GP5 (Yang et al., 2000).

La producción de estos anticuerpos puede ser diferente al comparar una infección natural con una provocada por inyección de alguna cepa de PRRSV en una vacuna (Osorio et al., 2002). En este sentido Díaz et al. (2006), reportaron en infecciones experimentales de animales con el PRRSV, que la viremia puede ser resuelta dentro de niveles detectables de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, cuando ocurre una infección grave por el virus, la actividad de neutralización es típicamente baja (Yoon et al., 1995; Rowland et al., 1999).

Otro tipo de respuesta es la inmunidad celular, la cual es extremadamente importante cuando un animal está infectado con el PRRSV. Estudios previos muestran que los cerdos infectados experimentalmente con este virus presentan una alta proliferación de linfocitos, aunque ésta no se detecta hasta las cuatro semanas después de la infección (Bautista y Molitor, 1997). La principal citocina responsable de esta respuesta es el IFN- $\gamma$  y en menor cantidad la interleucina 2 (IL-2).

Las primeras células secretoras de IFN- $\gamma$ , aparecen en la tercera semana posterior a la vacunación, mientras que a las diez semanas las cantidades fluctúan entre 50 y 100 por cada millón de células mononucleares de sangre periférica. A las 48 semanas después de la infección, el número se incrementa a 400-500 por millón (Meier et al., 2003). Las células secretoras de IFN- $\gamma$  son principalmente CD4 y CD8. En un estudio realizado por Díaz et al. (2006) se obtuvieron resultados similares a estas cantidades en la producción de células productoras de IFN- $\gamma$ , en animales infectados con cepas europeas de PRRSV. En contraste, se encontraron de 200-300 células secretoras de IFN- $\gamma$ , a las tres semanas después de la vacunación contra la enfermedad del virus Aujeszky (Meier et al., 2003).

La producción de IFN- $\gamma$  es considerada como el principal mecanismo de protección contra la infección de varios virus (Zinkernagel et al., 1996). Es



probable que esta citocina juegue un papel importante en la protección contra el PRRSV en los cerdos. En este sentido el IFN- $\gamma$  tiene que ser detectado en nódulos linfáticos y pulmones, en células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con el PRRSV (Rowland et al., 2001).

Otro mecanismo postulado de inmunomodulación, durante los primeros estadios de la infección del PRRSV, es la IL-10, citocina catalogada como un potente inmunosupresor (Chung y Chae, 2003). La inhibición de las células inmunes por la IL-10 puede ser una de las explicaciones de la supresión de la defensa observada en una infección del PRRSV, como la inmunidad celular se cree que juega un papel importante en el mecanismo de defensa respiratorio (Dunkley et al., 1995).

Los estudios actuales están siendo dirigidos para determinar la respuesta inmune celular en las proteínas virales expresadas tempranamente en la infección con el PRRSV, y principalmente, en el desarrollo de herramientas para la elucidación de la respuesta inmune hacia el PRRSV para lograr con ello una vacuna que sea efectiva para contrarrestar la enfermedad provocada por este virus (Johnson et al., 2007). Para lograr producir dicha vacuna, un aspecto importante a considerar es que ciertas fracciones de estas proteínas, tanto estructurales como no estructurales, se pueden unir a moléculas relacionadas con la respuesta celular en una infección por algún virus. Estas moléculas las

componen las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los estudios tanto genéticos y evolutivos en torno a la respuesta inmune se han centrado en estas moléculas, ya que están implicadas en el reconocimiento inmunológico (Parham, 1999).

### **Complejo mayor de histocompatibilidad**

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) comprende una serie de genes que codifican un grupo de proteínas conocidas como moléculas de MHC. Estas proteínas juegan un papel muy importante y vital en la iniciación y regulación de la respuesta inmune (Villadangos et al., 1999; Bryant y Ploegh, 2004). Su función principal es vincular péptidos antigénicos y posteriormente presentarlos en la superficie celular para que sean reconocidos por las células T del sistema inmune. Existen dos clases de MHC, donde ambas moléculas tienen la función de presentación en la superficie celular, sin embargo, tienen diferentes características (Germain y Margulies, 1993).

Las moléculas de MHC de clase I (MHC-I) son proteínas que se encuentran en todas las células, se unen a péptidos generados en el citosol y son las encargadas de presentar los antígenos peptídicos a linfocitos T CD8+. En tanto que las moléculas de clase II (MHC-II) se encuentran en células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y

células epiteliales del timo). Éstas unen a péptidos derivados de proteínas endocitadas y activan linfocitos T CD4+ que estimularán la inmunidad celular y humoral contra el microorganismo apropiado (Castellino et al., 1997; Nielsen et al., 2004).

El tamaño de los péptidos que se unen a las moléculas de MHC es de aproximadamente nueve aminoácidos de longitud (Rammensee et al., 1999). La ranura de anclaje del péptido en el MHC-I tiende a ser cerrada en ambos extremos por lo que rara vez se unen péptidos de más de nueve aminoácidos. En cambio, los extremos de las moléculas MHC-II, presentan ranuras abiertas, lo que permite que se anclen péptidos de mayor tamaño (Sette et al., 1989; Castellino et al., 1997).

Los péptidos que se unen a las moléculas de MHC-I, son transportados al retículo endoplásmico (lugar donde se sintetizan las moléculas MHC-I) y finalmente se expresan en la membrana donde son reconocidos por los linfocitos CD8 (Strehl et al., 2005). La principal función de los linfocitos CD8 es el reconocimiento y destrucción del material infectado, lo cual es útil para defender al organismo frente al ataque de virus, bacterias intracelulares y de células tumorales. Las otras moléculas involucradas en la respuesta celular, por la unión a péptidos, son las moléculas de MHC-II, las cuales también se sintetizan en el retículo endoplásmico.

Existen algunas interacciones que permiten la estabilidad de los complejos MHC-péptido, las cuales están dadas por puentes de hidrógeno entre la cadena lineal del péptido y los residuos conservados del surco de unión (Stern et al., 1994). Algunas variaciones mínimas en éste pueden causar algunos cambios en el antígeno a ser presentado (péptido). En un trabajo reportado por Suri et al. (2003) se demostró que moléculas de MHC-II que se diferenciaban en un único aminoácido que se situaba en la cadena beta, presentaba repertorios peptídicos diferentes y específicos de cada alelo a pesar de que las proteínas disponibles para el procesamiento eran las mismas.

En algunos trabajos se ha descrito cómo a partir de un mismo péptido presentado por la molécula de MHC-II, se activan dos poblaciones de células T diferentes que distinguen entre el complejo generado por el procesado intracelular y el que se forma con el péptido añadido de forma exógena (Pu et al., 2004). Estas diferencias se pueden explicar por la existencia de diferentes estructuras que toman los complejos MHC-péptido, con distinta especificidad para los linfocitos T, protagonistas de la respuesta inmune celular, ya que poseen receptores que reconocen fragmentos peptídicos generados a partir de proteínas, que son presentados en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC), cuyos receptores están asociados en las moléculas MHC (Cresswell et al., 2005; Germain, 1994).

Para que un péptido sea capaz de activar a un linfocito T, además de las características descritas de poder encajar en el surco de unión de la molécula del MHC y de poseer secuencias de aminoácidos que interactúen con la molécula. También debe de contener secuencias que puedan ser reconocidas por el receptor de células T (TCR), que es el que proporciona la especificidad de unión y no el MHC, debido a que el TCR reconoce tanto al péptido como a la molécula del MHC (Janeway y Bottomly, 1994).

A pesar de todas las características de unión por parte de las moléculas de MHC, el sistema inmune tiene capacidad diferente para responder a un antígeno en particular entre los individuos, ya que se presentan diferentes patrones en los genes de MHC (Marsh, 2004). El polimorfismo alélico existente entre estas moléculas, ha provocado que se realice un gran número de estudios en relación a esta variabilidad genética, ya que se encuentra relacionada con la autoinmunidad, trasplantes y algunas enfermedades infecciosas (Hansen et al., 1999; Larsen y Alper., 2004; Segal y Hill., 2003).

El polimorfismo en las moléculas de MHC, tiene grandes implicaciones en el diseño de vacunas, ya que cada una de estas moléculas tiene un potencial diferente en su especificidad, y si una vacuna incluiría un único péptido para cada una de estas moléculas, se tendrían que incluir miles de péptidos en las mismas. Sin embargo, muchos alelos de MHC tienen

especificidades de unión muy similar, por lo tanto, por esta característica es posible encontrar péptidos promiscuos que se pueden unir a una serie de variantes de MHC. Esta característica permite, limitar el número de epítopes necesarios para ser incluidos en el diseño de vacunas y una alta precisión en la predicción de alelos MHC en situaciones en las que el motivo de unión no está aún caracterizado (Brusic et al., 2002).

Estas consideraciones podrían proporcionar un interés especial para entender mejor la diversidad genética de las moléculas de MHC, y desarrollar con esto herramientas que pudieran ser usadas de manera rutinaria para identificar variantes funcionales en las moléculas MHC de clase I y II (Smith et al., 2006). En este sentido el reconocimiento de epítopes de células T es fundamental para la respuesta inmune a enfermedades infecciosas, autoinmunes y alérgicas, por lo que el descubrimiento de epítopes de estas células es importante para el desarrollo de vacunas basados en péptidos (Zhong et al., 2003).

La determinación de epítopes hacia las células T es una tarea complicada. La síntesis y el análisis de grandes conjuntos de péptidos, cuando se carece de este conocimiento, es una forma cara y muy laboriosa, ya que consiste en diseñar péptidos solapados a lo largo de la cadena de la molécula proteica que se quiera analizar. Estos péptidos son sintetizados y

posteriormente analizados en ensayos de citotoxicidad y/o en ensayos de proliferación o producción de citocinas.

Existen un gran número de moléculas de MHC, los enfoques para la identificación de péptidos de células T consumen mucho tiempo y son muy caros, y por lo tanto no son aplicables para el análisis a gran escala en la actualidad. Por lo que los métodos bioinformáticos de modelado pueden ayudar a simular los procesos biológicos de presentación de antígenos, minimizando con esto el número de experimentos necesarios, poniendo en marcha una exploración sistemática de candidatos péptido-MHC y por lo tanto acelerar el desarrollo de una vacuna (Brusic et al., 1994).

En contraste la predicción por medio de técnicas bioinformáticas es muy barata y puede ayudar a limitar el número de péptidos que serán analizados (Díaz et al., 2009). Para los análisis donde se emplean técnicas bioinformáticas, se han utilizado varios modelos de predicción. Entre estos modelos se encuentran los que predicen la unión a proteínas TAP (van Endert et al., 1995), matrices cuantitativas (Daniel et al., 1998; Peters et al., 2003) y la red neural artificial (Brusic et al., 1999). La combinación de estos métodos computacionales, que integran pasos críticos, tanto lo que ocurre en el proteasoma, en el transporte de proteínas TAP y en la unión de los péptidos a moléculas de MHC de clase I, se ha propuesto como una metodología de apoyo

para la predicción de epítopes que pueden ser utilizados de forma terapéutica y en el uso de vacunas (Petrovsky y Brusic, 2004).

Los péptidos buscados con las técnicas bioinformáticas son los llamados péptidos promiscuos, ya que estos se unen a más de una variante de MHC, con lo cual son más importantes para el uso en el desarrollo de vacunas y en la inmunoterapia, pues pueden ser efectivos en una proporción mayor de la población estudiada (Brusic et al., 1999). El uso de estas herramientas podrían ser de gran ayuda para encontrar una posible solución al daño ocasionado por el PRRSV, ya que este se caracteriza por tener una alta variabilidad genética entre las cepas existentes en las granjas, lo cual provoca que las vacunas producidas hasta la fecha no presenten resultados homogéneos al aplicarlas a nivel de campo.

### **Uso de vacunas contra el virus del PRRS**

La vacunación es un procedimiento común usado para minimizar las pérdidas económicas asociadas con el PRRSV. Las vacunas tienen que ser efectivas en pruebas experimentales y estudios en campo (Opriessnig et al., 2005). Sin embargo, las vacunas dirigidas para contrarrestar el PRRSV fallan y no son usadas a nivel de campo, por lo que este virus continúa siendo el patógeno más común en las granjas productoras de cerdos (Harms et al.,



2002). Las fallas de las vacunas del PRRSV pueden deberse a la falta de protección cruzada entre la vacuna y las cepas en el campo, o a las fallas en la respuesta inmune de los cerdos (Opriessnig et al., 2005).

La infección con el PRRSV ha generado cambios en las estrategias actuales de vacunación. Un número limitado de vacunas del PRRSV, tanto de virus vivo modificado como de virus inactivados, está disponible en el mercado. Sin embargo, ambas tienen resultados muy heterogéneos (Meng, 2000). Las vacunas de virus inactivados no siempre proveen una protección de inmunidad a nivel de campo. En cambio las vacunas de virus vivo pueden proveer protección contra el PRRSV en cierto grado, los riesgos intrínsecos de reversión hacia otra virulencia bajo condiciones de granja permanecen constantes (Nilubol et al., 2004).

La divergencia genética presumiblemente conduce a la diversidad en la cantidad de antígenos del PRRSV (Halbur, 2003). Labarque et al. (2004), concluyeron que la diversidad genética del PRRSV de cepas europeas puede afectar la eficacia de las vacunas contra esta cepa.

La vacunación en masa a la entrada de la granja ayuda a reducir la persistencia y duración del PRRSV, pero no elimina el virus de campo. La

exposición previa del PRRSV provee un nivel significativo de protección contra los cambios heterólogos, pero no previene la re-infección (Cano et al., 2007).

Por un lado, las vacunas contra PRRSV, inducen un bajo nivel de inmunidad celular (Meier et al., 2003) y los anticuerpos neutralizantes no se desarrollan hasta la última fase de la infección (Meier et al., 2003). El balance de citocinas después de una vacunación o de una infección sugiere una posible baja en la regulación de muchas citocinas (Royae et al., 2004). Por otro lado, la diversidad genética del PRRSV, es otro aspecto que influye en la eficacia de las vacunas en condiciones de campo (Labarque et al., 2004), aunque se reporta un cierto grado de protección con su uso (Mengeling et al., 2003). En este contexto, es necesario el desarrollo y mejoramiento de las vacunas para entender la inmunidad contra el PRRSV.

La vacunación con virus vivo modificado provee una fuerte estimulación humoral dada por la producción de anticuerpos neutralizantes; sin embargo, el desarrollo temprano de anticuerpos no neutralizantes en el uso de vacunas puede tener un efecto significativo en el desarrollo del PRRSV ya que aumenta en la replicación viral en los macrófagos alveolares (Yoon et al., 1996).

En cuanto a la respuesta celular, el efecto de la vacunación con virus vivo modificado provee una fuerte estimulación de inmunidad celular dada por la

producción de células productoras de IFN- $\gamma$  (Zuckermann et al., 1999). El PRRSV induce una pobre respuesta de células secretoras de IFN- $\gamma$ , provocando con esto que la infección se incremente gradualmente por un periodo de meses (Meier et al., 2003). Esta respuesta tiene un papel crítico en la respuesta inmune innata y adquirida contra el PRRSV, y los cambios que inducen son importantes para las evaluaciones de la eficacia fenotípica y funcional de la respuesta inmune (Samson et al., 2000). Por ello, este tipo de respuesta ha tomado importancia en su análisis, con el uso de técnicas bioinformáticas conocidas actualmente. A este tipo de análisis se le conoce como predicción *in silico* y recientemente ha tomado gran importancia en la identificación de posibles candidatos para ser utilizados en vacunas.

### **Predicción *in silico***

El termino *in silico* es una expresión que significa hecho por computadora. Este término engloba aplicaciones de los programas de predicción de epítopes, los cuales están basados en matrices de afinidad, que generan péptidos afines a diferentes moléculas que intervienen en la respuesta inmune humoral y celular.

Una de las aplicaciones de la bioinformática es la búsqueda de secuencias con actividad inmunogénica, para el diseño de vacunas contra la malaria, donde la principal aplicación es el descubrimiento de los alelos supertipos de clase I y II (Ramírez- Rueda, 2007). La mayoría de los alelos pueden ser agrupados en unos pocos supertipos que tienen la propiedad de ser afines a una amplia gama de péptidos (Sidney et al., 1996; Southwood et al., 1998).

En la actualidad se cuenta con mucha información sobre el PRRSV, producto del gran número de investigaciones llevadas a cabo por un sin fin de instituciones de investigación científica (Barfoed et al., 2004). Aunado a que se cuenta con bases de datos genómicos disponibles y con poderosas herramientas computacionales para predecir los epítopes de proteínas no estructurales del PRRSV que después de ser probados y confirmados por laboratorios puedan ser postulados como posibles blancos de vacunas contra este virus a nivel granja.

El reto en el uso de esta herramienta está en seleccionar racionalmente aquellos candidatos (péptidos o epítopes) que tengan las mejores características para ser usados en una vacuna, tomando como referencia aquellos epítopes que tengan mayor capacidad inmunogénica de entre las diferentes proteínas o antígenos que posee un microorganismo. En este

sentido la herramienta *in silico* puede ser usada para limitar el número de candidatos a probar, ahorrando tiempo, trabajo y dinero.

## JUSTIFICACIÓN

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino es importante en la salud porcina en todo el mundo. Para contrarrestar la enfermedad se usan diversos métodos, pero los resultados que se han obtenido son poco homogéneos debido a su variabilidad genética. En la actualidad se está haciendo uso de técnicas de bioinformática, para la solución de problemas biológicos. La determinación *in silico* de epítopes con actividad inmunogénica de las proteínas no estructurales del virus del PRRS podría ser de gran ayuda para controlar la enfermedad a nivel granja. El mecanismo involucrado en la protección de inmunidad con el uso de epítopes con actividad inmunogénica aún no es claro. Existe una cierta protección contra el virus, pero el mecanismo específico de protección no se conoce. El análisis tradicional de determinantes antigénicos es costosa, por lo que la posibilidad de explorar nuevos antígenos y predecir por computadora (*in silico*) su inmunogenicidad, es una buena alternativa para la búsqueda de péptidos con actividad inmunogénica, los cuales podrían ser utilizados en una vacuna contra esta enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

Epítopes de la proteína Nsp5 determinados *in silico* son capaces de estimular la proliferación en células mononucleares y el reconocimiento de anticuerpos en sueros de cerdos infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad inmunogénica de epítopes de la proteína no estructural 5 predichos *in silico* en células mononucleares y sueros de cerdos infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

### **Objetivos particulares**

- 1) Predecir epítopes con actividad inmunogénica de la proteína no estructural 5 con el uso de técnicas de bioinformática.
- 2) Evaluar la capacidad de los péptidos obtenidos del análisis *in silico*, en inducir la proliferación en células mononucleares.
- 3) Evaluar la producción de IFN- $\gamma$  en células mononucleares, inducida por los péptidos.
- 4) Evaluar la respuesta humoral de los péptidos en suero de animales infectados de manera experimental con diferentes semanas post infección.
- 5) Evaluar la respuesta humoral de los péptidos en sueros de animales de diferente edad y sexo infectados de manera natural.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Predicción *in silico* de péptidos

Para identificar los epítopes propuestos en este trabajo y que serán parte de una aproximación teórica a una vacuna contra el PRRSV, se utilizaron herramientas bioinformáticas.

Para designar los péptidos que se unen de mejor manera al MHC de clase I y de clase II, se aplicó la metodología de Díaz et al. (2009), con la cual se analizó la secuencia de la Nsp5 del PRRSV. El análisis se basa en dos algoritmos para designar a los mejores candidatos para unirse al MHC de clase I. El primer algoritmo es la matriz de unión al MHC y el segundo es la red neural artificial (artificial neural networks=ann). El primer algoritmo se realiza con MAPP, utilizando la matriz SYFPEITHY, la cual está disponible en el sitio <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html>. Este algoritmo considera todos los nonámeros con potencial de unirse a cualquier alelo de humano, ya que los de cerdo aún no están disponibles. Para cada nonámero y alelo el programa da un puntaje de unión que representa al tiempo medio de disociación para cada péptido. Este puntaje es expresado como el porcentaje máximo posible para cada alelo dado. Los péptidos con los mejores puntajes por el primer algoritmo se analizaron con el segundo criterio de selección, el cual se basa en la red neural artificial, la cual se hace con el análisis de IC50nM

(concentración del péptido que inhibe la unión de un péptido estándar del 50%) el cual se encuentra disponible libremente en <http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhcbinding.html>. Éste se calcula para los péptidos unidos. Como punto de selección se toman aquellos péptidos que en el primer análisis dan un porcentaje superior al 80% de la puntuación máxima en un alelo en SYFPEITHY y con un IC50nM < 50, indicando con esto que los péptidos con estas características serían los mejores candidatos para ser unidos al MHC-I, y así estimular la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  que sería de gran ayuda al sistema inmune para contrarrestar el virus del PRRS. Con estos dos criterios, se seleccionó el péptido 1a el cual está dirigido al MHC-I.

En cuanto al criterio para seleccionar al mejor candidato para ser dirigido al MHC-II, éste fue por el número de alelos DRB1 y DRB5 en los que se repite la secuencia del péptido. Con este criterio se seleccionó el péptido de 9 aminoácidos con las mejores características para unirse al MHC-II.

### **Unidades experimentales**

#### **Cerdos de experimentación**

Se utilizaron un total de 5 cerdos de 5 semanas de edad con un peso promedio de 8 Kg procedentes de una granja libre del PRRSV y de las

principales enfermedades de los cerdos, como circovirus porcino, parvovirus, influenza porcina y fiebre porcina clásica. Los cerdos tuvieron libre acceso a agua y alimento. Los animales se alojaron en la unidad metabólica animal del CIAD. Ésta se mantuvo a una temperatura de 20°C con un flujo de aire constante, con la finalidad de que los cerdos tuvieran un estado de confort para reducir el estrés causado por el efecto climático. Estos animales se utilizaron para medir la respuesta celular y humoral de los péptidos seleccionados.

### **Cerdos de granja**

Se utilizaron sueros de sementales positivos (7) y negativos (6), así como cerdas positivas (7) y negativas (8), provenientes de diferentes granjas del Estado de Sonora, todos con más de dos años de edad. También se utilizaron sueros de lechones libres del PRRSV con 5 meses de edad (8). Se evaluó la respuesta humoral por medio del reconocimiento de los péptidos analizados.

## **Diseño experimental**

### **Cerdos de experimentación**

Se tomó una muestra de sangre antes de la infección de los animales de experimentación y después los 5 cerdos se infectaron vía intranasal con una cepa del PRRSV aislada en el Estado de Sonora. Los días 7, 14, 21, 28, y 35

post-infección, se tomaron muestras de sangre para obtener las células mononucleares y el suero para evaluar los parámetros inmunológicos.

### **Cerdos de granja**

Se adquirieron muestras de sangre de los diferentes animales provenientes de granjas del Estado de Sonora, la cual se utilizó para obtener los sueros para evaluar la respuesta humoral por el reconocimiento de anticuerpos.

### **Extracción de células mononucleares (CMN)**

Se obtuvo sangre periférica de la vena cava del cerdo, en tubos con heparina. Se separaron las CMN por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque. La sangre fue diluida 1:1 con buffer de fosfato (PBS, pH 7.4) estéril y se agregó Ficoll en un tubo estéril en una proporción 1:3. Los tubos se centrifugaron a 1,600 rpm por 30 minutos a 4°C y posteriormente se separó la capa de CMN con una pipeta Pasteur estéril. Una vez separadas las células, se lavaron con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de piruvato de sodio (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma),  $2 \times 10^{-5}$  mM 2-mercaptoetanol (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado por calor. Se centrifugaron a 1,400 rpm por 5 minutos, después se les agregó 5 mL de NH<sub>4</sub>Cl para eliminar eritrocitos y se

incubaron por 5 minutos para de nuevo lavarse tres veces con medio RPMI-1640 con SFB.

Las CMN se incubaron en placas de cultivo de 96 pozos con 500,000 células por pozo. Las CMN restantes se mantuvieron congeladas y almacenadas a - 40°C en 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) y 40% de SFB hasta su uso posterior. Las células mononucleares se utilizaron en los diferentes tratamientos estudiados, los cuales fueron:

- A) Sin estímulo
- B) Células + Péptido P1 2046-2054 Nsp5 (1a)/ 5 µg/mL (MHC-I)
- C) Células + Péptido P1 2046-2054 Nsp5 (1a)/ 10 µg/mL (MHC-I)
- D) Células + Péptido P1 2046-2054 Nsp5 (1a)/ 20 µg/mL (MHC-I)
- E) Células + Péptido P1 2046-2054 Nsp5 (1a)/ 40 µg/mL (MHC-I)
- F) Células + Péptido P2 2019-2027 Nsp5 (2a)/ 5 µg/mL (MHC-II)
- G) Células + Péptido P2 2019-2027 Nsp5 (2a)/ 10 µg/mL (MHC-II)
- H) Células + Péptido P2 2019-2027 Nsp5 (2a)/ 20 µg/mL (MHC-II)
- I) Células + Péptido P2 2019-2027 Nsp5 (2a)/ 40 µg/mL (MHC-II)

#### **Obtención de suero**

Se obtuvo sangre periférica de la vena cava del cerdo, en tubos sin anticoagulante. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 2,500 rpm

a 4°C, se extrajo el suero en condiciones de esterilidad y se congeló a - 40°C hasta su uso posterior en la técnica de ELISA, donde se evaluó el reconocimiento de anticuerpos por parte de los cerdos analizados en las diferentes semanas de infección.

### **Ensayo de proliferación**

La proliferación de las CMN de los tratamientos estudiados (sin estímulo, péptido 1a y péptido 2a a las diferentes concentraciones analizadas) tanto de los animales sanos como de los infectados se evaluaron por citometría de flujo. Una vez separadas las CMN, se utilizaron células sin teñir como control y células teñidas con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE).

Las células se tiñeron de acuerdo al siguiente procedimiento: se agregaron 30 µL de una dilución 1:10 (5 µL de CFSE 0.5 mM y 45 µL de PBS). Posteriormente las CMN se incubaron por 10 min a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> agitando suavemente por periodos de 5 minutos. Después las CMN se lavaron agregando medio con SFB y centrifugando a 1400 rpm por 5 min. Las CMN sin teñir y teñidas fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 con 10% de SFB.

Se colocaron 500,000 células teñidas y 500,000 sin teñir por cada pozo en una placa estéril de 96. La placa se incubo por 7 días en un ambiente de 37

°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las CMN fueron cosechadas en tubos para citómetro y lavadas con 3 mL de PBS para su posterior adquisición en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickson) y los datos obtenidos se analizaron mediante el software FACS Diva.

El índice de proliferación se calculo utilizando el cociente del porcentaje de proliferación originada por el péptido y el porcentaje de proliferación del tratamiento control (células sin estímulo), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de proliferación} = \frac{\% \text{ de proliferación originada por el péptido}}{\% \text{ de proliferación del tratamiento control}}$$

#### **Determinación de la producción de IFN- $\gamma$**

Para la evaluación de la producción de IFN- $\gamma$ , se realizó mediante la técnica inmunoenzimática de ELISA, utilizando el kit de Swine IFN- $\gamma$  Cytoset, (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. La determinación de esta citocina se realizó a la cuarta semana de infección, ya que es en el tiempo donde se presenta mayor producción de ésta ante una infección por el PRRSV.

### **Determinación de la respuesta humoral**

La respuesta humoral a los péptidos se evaluó mediante ELISA indirecto de acuerdo a de Lima et al. (2006). Se utilizan 100  $\mu$ L del péptido (10  $\mu$ g/mL) en buffer de carbonatos con un pH de 9.6. Se empleó el suero de los animales analizados a una dilución de 1:20, se incubó con dilución del anticuerpo secundario de IgG anticuerpo peroxidado (1:2000). La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo a lo reportado en la técnica.

### **Análisis estadísticos**

Se realizaron diferentes diseños estadísticos para evaluar los distintos parámetros inmunológicos.

### **Respuesta celular**

#### Índice de proliferación

Para evaluar la respuesta celular (índice de proliferación), la cual se determinó a los animales de experimentación, se realizó un diseño factorial con bloques (1), tomando como variable de bloqueo el efecto de las semanas de infección. Se utilizó una significancia del 90% en la prueba de Tukey-Kramer



para detectar diferencias. Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 2007 (Hintze, 2006).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + A_{ij} + B_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Donde,

$Y_{ij}$  = Variables de respuesta (índice de proliferación).

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto de los tratamientos (péptidos analizados).

$\beta_j$  = Efecto de los bloques (semanas de infección).

$A_{ij}$  = Efecto de los cerdos

$B_{ij}$  = Efecto de la concentración

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

#### Índice de IFN- $\gamma$

Para evaluar el índice de IFN- $\gamma$  se utilizó un análisis de varianza, en donde la variable respuesta fue la absorbancia y la variable de agrupación los cerdos. Se utilizó una significancia del 90% en la prueba de Tukey-Kramer para detectar diferencias. Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 2007 (Hintze, 2006).

## Respuesta humoral

### Cerdos de experimentación

En cuanto a la respuesta humoral determinada a los cerdos experimentales, se utilizó un diseño completamente al azar con bloques (2), tomando como variable de bloqueo las semanas de infección, como variable de agrupación a los cerdos y de respuesta el valor de absorbancia. Se utilizó un nivel de significancia del 90% en la prueba de Tukey-Kramer para detectar diferencias, utilizando el paquete estadístico NCSS versión 2007 (Hintze, 2006).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

Donde,

$Y_{ij}$  = Variables de respuesta (reconocimiento de anticuerpos).

$\mu$  = Media general.

$\tau_i$  = Efecto de los tratamientos (cerdos).

$\beta_j$  = Efecto de los bloques (días).

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

### Cerdos de granja

Para la respuesta humoral determinada a los cerdos provenientes de granjas se utilizó un diseño completamente al azar (3), con un nivel de significancia del 90% en la prueba de Tukey-Kramer para detectar diferencias, utilizando el paquete estadístico NCSS versión 2007 (Hintze, 2006).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

Donde,

$Y_{ij}$  = Variables de respuesta (reconocimiento de anticuerpos).

$\mu$  = Media general.

$\tau_i$  = Efecto de los tratamientos (cerdos).

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Selección de Péptidos**

Las proteínas no estructurales son de gran importancia en la replicación viral, por lo que se ha evaluado la respuesta inmune humoral en contra de algunas de ellas, como la Nsp1 y Nsp2 (Johnson et al., 2007). Se ha demostrado que la proteína no estructural Nsp2 es la más inmunodominante, ya que posee epítopes lineales que pueden ser reconocidos por sueros de cerdos infectados hasta por 90 días (de Lima et al., 2006). Otra proteína no estructural es la Nsp5, los estudio enfocado en esta proteína son pocos. Específicamente la participación y capacidad de los anticuerpos contra la Nsp5 para proporcionar protección ante la infección por el virus del PRRS aún se desconoce y la respuesta celular en contra de esta proteína aún no ha sido investigada.

La proteína Nsp5, ubicada en la posición 2014-2183 en el genoma del virus, es codificada por el ORF1a, contiene dominios hidrofóbicos (Allende et al., 2000), los cuales son importantes ya que modifican las membranas de las células infectadas y sirven de anclaje para favorecer el ensamble del complejo multi-proteína de replicación viral en la región perinuclear de la célula infectada (Pedersen et al., 1999; Snijder et al., 2001).

Para realizar esta investigación se seleccionaron los péptidos de la proteína Nsp5 dirigidos al MHC-I (péptido 1a), en donde se consideró como criterio el nivel de conservación en sus aminoácidos y su potencial de ser epítotope de célula T por el máximo porcentaje en el puntaje (unión al MHC) y el mínimo IC50nM.

Los aminoácidos 2046 al 2054, con una secuencia de ILNEVLPAV, presentó un puntaje MAPP de 86.11% y un IC50nM de 6.4, lo que indica que esta porción de la proteína Nsp5 presenta las características más idóneas para unirse a MHC-I. Esta fracción de aminoácidos se localiza en una región hidrofóbica y conservada en las diferentes cepas del virus reportadas en el Genbank.

Para la selección del epítotope de células T dirigido a MHC-II (péptido 2a), se utilizó como criterio seleccionar la porción de aminoácidos que más se repitió en los alelos DRB1 y DRB5. La porción comprendida entre los aminoácidos 2019-2027 se repitió 20 veces, identificando a esta porción de la proteína Nsp5 como el mejor candidato dirigido al receptor MHC-II. La secuencia de aminoácidos del péptido 2a (VQLLCVFFL) posee características hidrofóbicas y se localiza en una región muy conservada de la proteína Nsp5 en las cepas del virus reportadas, tal y como se observa en la Figura 1.

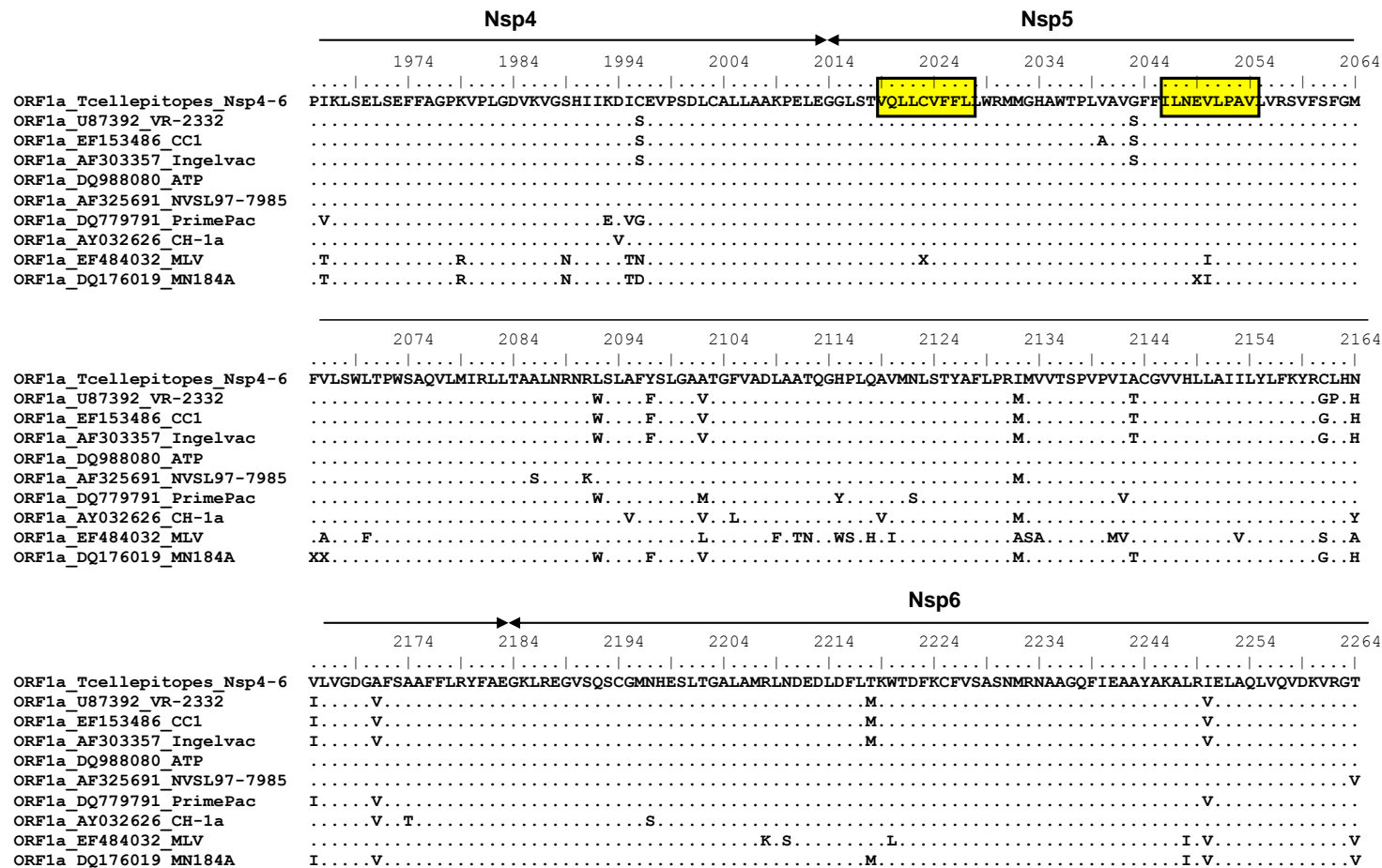
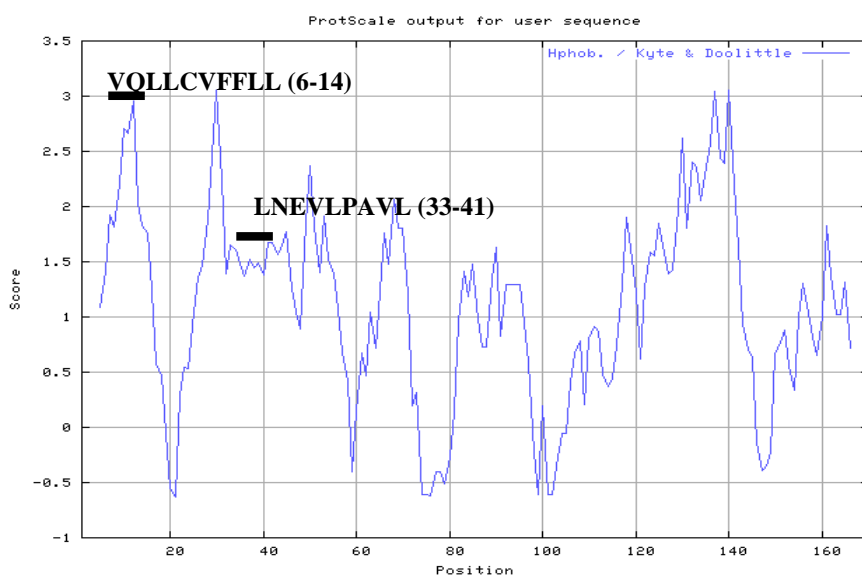


Figura 1. Secuencia de la proteína Nsp5 en las diferentes cepas del virus del PRRS reportadas.

En la Figura 2 se presentan las características de hidrofobicidad de los aminoácidos que conformaban los péptidos analizados en el estudio. Las características hidrofóbicas de los aminoácidos se analizaron utilizando el programa ProtScale, que permite analizar y representar los perfiles que se originan a partir de una escala de aminoácidos de una secuencia particular; dicha escala es definida por valores numéricos asignados a cada tipo de aminoácidos en función de las características físicas y químicas de los mismos.



**Figura 2.** Características hidrofóbicas de los péptidos 1a (Nsp5- MHC-I) y 2a (Nsp5- MHC-II) expresada por la grafica de Kyte and Doolittle.

Los resultados obtenidos con el programa ProtScale son presentados por la gráfica de hidrofobicidad de aminoácidos de Kyte y Doolittle, donde se observa que los valores superiores a 1, son clasificados como péptidos con características altas de hidrofobicidad. Dicha característica es importante, ya que permite tener indicios sobre su topología (ubicación) en la célula, lo cual es de utilidad en la predicción de dominios de segmentos transmembrana, sitios antigénicos potenciales y regiones que están probablemente expuestas en la superficie de la proteína.

### **Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta celular**

#### **Péptido 1a**

Para evaluar el efecto del péptido diseñado para unirse al MHC-I, se utilizó el índice de proliferación, el cual se obtuvo del cociente del porcentaje de proliferación originada por el péptido y el porcentaje de proliferación del tratamiento control (células sin estímulo). Para este análisis se realizó un diseño factorial en bloques, tomando como variable de bloqueo el efecto de las semanas de infección.

En la Figura 3 se muestra el índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con el PRRSV a diferentes concentraciones del péptido 1a (5, 10, 20 y 40 10 µg/mL). No se

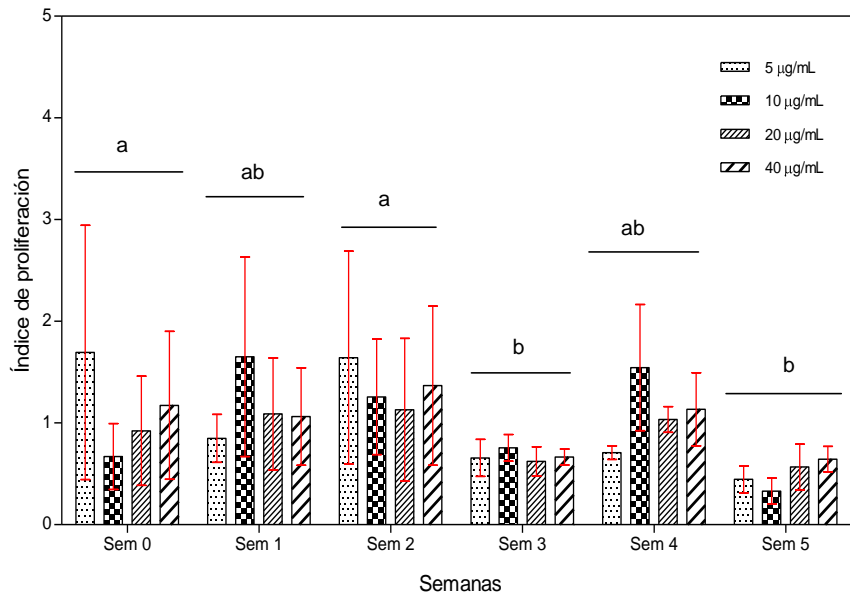


presentaron diferencias ( $P>0.10$ ) por efecto de la concentración de péptido utilizado en la proliferación celular. Sin embargo, se aprecia un ligero incremento en la concentración de 10 y 40  $\mu\text{g/mL}$  (1.184 y 1.187) respectivamente. Las concentraciones de 5 y 20  $\mu\text{g/mL}$  fueron las que mostraron la menor respuesta (0.976 y 1.060).

Este resultado coincide por los reportados por (Díaz et al., 2009), en donde se observó que con una concentración de 10  $\mu\text{g}$  de péptidos predichos *in silico* con características inmunogénicas de las proteínas estructurales GP4, GP5 y N del PRRSV, presentaron una mayor proliferación al compararlos con otras concentraciones del mismo péptido.

Se observó un efecto de las semanas de infección ( $P<0.10$ ) sobre la proliferación celular en los cerdos evaluados. Los datos de la semana 0 corresponden a células mononucleares obtenidas de cerdos sanos (control). De la semana 1 a la 5 indican las semanas pos-infección. No se observó un incremento en la respuesta celular conforme se incrementaba el tiempo de infección, es decir, el comportamiento típico ante una infección de un virus. Sólo se detectó un ligero estímulo en la semana 2 pos-infección (1.650) con respecto al control (1.571), pero no fueron diferentes estadísticamente ( $P>0.10$ ). En las semanas 3, 4 y 5 el índice de proliferación fue heterogéneo.

El comportamiento heterogéneo en la respuesta celular puede indicar una posible inhibición de la presentación del péptido 1a a los linfocitos T o una baja cantidad de moléculas MHC-I en la célula, por lo que la respuesta de unión de los péptidos a dichas proteínas es deficiente, generándose una baja proliferación.



**Figura 3.** Efecto en el índice de proliferación del péptido 1a (NsP5-MHC-I) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV. Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

En este sentido, se ha demostrado que los genes US2 y US11 del virus citomegalovirus (un virus del herpes) realizan la unión del MHC-I a una ubiquitina provocando su degradación en el proteosoma, interrumpiendo la presentación del MHC-I o reduciendo la cantidad de estas moléculas en la superficie celular, lo que causa un menor reconocimiento a los linfocitos T citotóxicos (Stagg et al., 2009). Posiblemente en una infección ante el PRRSV se está dando un mecanismo similar, ya que este tipo de resultados también han sido reportados por Wang et al. (2007), donde indican que el PRRSV suprime la expresión de MHC de clase I y II, provocando que se presente una proliferación menor.

La respuesta celular entre individuos fue diferente ( $P < 0.10$ ). Los cerdos que mejor respondieron fueron el 3 y 5 (1.299 y 1.615 respectivamente), y los cerdos 1 y 2 son los que menor respuesta mostraron (0.780 y 0.845 respectivamente). Este comportamiento heterogéneo presentado entre los cerdos analizados, tal vez se deba a los diferentes haplotipos que podrían tener estos animales. Esta diferencia en haplotipos puede ayudar a explicar la proliferación deficiente encontrada en este estudio.

Díaz et al. (2009) encontraron una alta variación en el comportamiento de péptidos de la proteína estructurales GP4, GP5 y N dirigidos al MHC-I y II entre los animales analizados, comportamiento atribuido a la presencia de

variaciones considerables en los haplotipos de los MHC de los diferentes animales, aunque sean de la misma especie, edad, raza. Estas diferencias provocan que la cantidad de péptido presentado a las moléculas de MHC (I y II) sea diferente, y con ello el estímulo no es el mismo generándose una menor o mayor proliferación.

### **Péptido 2a**

Para evaluar el efecto del péptido 2a (características de unión al MHC-II) sobre la respuesta celular, se utilizó el índice de proliferación, el cual se obtuvo del cociente del porcentaje de proliferación originada por el péptido y el porcentaje de proliferación del tratamiento control (células sin estímulo). Para este análisis, al igual que para el péptido 1a, se utilizó un diseño factorial en bloques, tomando como variable de bloqueo el efecto de las semanas de infección.

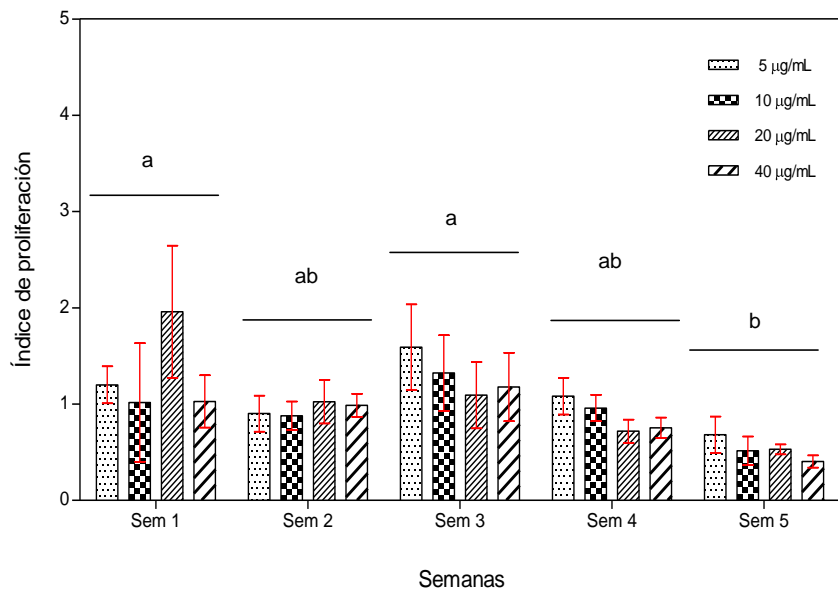
En la Figura 4 se muestra el índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica de cerdos infectados con el PRRSV a diferentes concentraciones del péptido 2a (5, 10, 20 y 40 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). No se presentaron diferencias ( $P>0.10$ ) por efecto de la concentración de péptido utilizado en la proliferación celular. Sin embargo se aprecia un ligero incremento en la de 5 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1.107 y 1.015) respectivamente. Mientras que las

concentraciones de 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fueron las que mostraron la menor respuesta (0.985 y 0.853).

En cuanto los resultados presentados por este péptido, no coinciden por los reportados por Díaz et al. (2009), en donde se observa que utilizando una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de péptidos con características inmunogénicas de las proteínas estructurales GP4, GP5 y de la proteína N del PRRSV presentaron una mayor proliferación al compararlos con otras concentraciones del mismo péptido.

Se observaron diferencias entre las semanas pos-infección evaluadas ( $P < 0.10$ ). Sin embargo, la respuesta celular no correspondió al comportamiento típico ante una infección de un virus, en donde la respuesta celular incrementa conforme avanza el periodo de infección. Sólo en la semana 3 pos-infección se detectó un ligero estímulo (1.281). No hubo diferencias en las semanas 1, 2, 4 y 5 (1.241, 0.932, 0.907 y 0.588 respectivamente) ( $P > 0.10$ ).

El comportamiento entre individuos fue diferente ( $P < 0.10$ ). De manera general, los cerdos que mejor respondieron son el número 4 y 5 (1.320 y 1.126 respectivamente) y los cerdos 1 y 2 son los que menor respuesta mostraron (0.613 y 0.801 respectivamente).



**Figura 4.** Efecto en el índice de proliferación del péptido 2a (Nsp5-MHC-II) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV. Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

En los péptidos evaluados (1a y 2a) se detectó una respuesta celular heterogénea, lo que sugiere que se está dando un mecanismo similar al descrito en la sección referente al péptido 1a (Stagg et al., 2009; Wang et al., 2007).

Al comparar los dos péptidos, se observa que mostraron diferente comportamiento, debido a que se observó que las concentraciones más altas y bajas presentaron un comportamiento inverso, ya que en el péptido 1a el más elevado estímulo se presentó la concentración de 40 µg/mL (1.187), mientras que la más baja es de 5 µg/mL (0.976). La estimulación en el 2a se presentó en la concentración de 5 µg/mL (1.107) y la menor en 40 µg/mL (0.853). En cuanto a la semana de estimulación mas elevada, en el 1a se presentó en la segunda (1.648) después de la infección, mientras que en el 2a en la tercera (1.281). En ambos péptidos se observó que el estímulo se ve disminuido en la semana 5 (1a y 2a) (0.620 y 0.588). Los cerdos respondieron de diferente manera, ya que el número 5 respondió mejor al 1a (1.615), mientras que el 4 al 2a (1.320), coincidiendo que los cerdos 1 y 2 son los que presentaron la menor respuesta (1a/ 0.780 y 0.845) (2a/ 0.613 y 0.801).

El comportamiento heterogéneo presentado en este estudio por parte de los animales analizados, se puede atribuir a la diferencia natural existente entre los mismos. Un aspecto importante a considerar, es que variaciones mínimas que pudieran existir en el surco de unión del péptido MHC puede causar algunos cambios en el antígeno a ser presentado (péptido) a esta molécula (MHC). Las moléculas de MHC (I y II) que se diferenciaban en un único aminoácido que se situaba en la cadena beta, presentaba repertorios peptídicos diferentes y específicos de cada alelo a pesar de que las proteínas disponibles

para el procesamiento eran las mismas (Suri et al., 2003). Yoon et al. (1995) y Batista et al. (2004), observaron también comportamientos muy diferentes en grupos de cerdos analizados, debido a diferencias biológicas individuales que existen entre ellos.

Pu et al. (2004), en su trabajo describe como a partir de un mismo péptido presentado por la molécula de MHC, se activan dos poblaciones de células T diferentes que distinguen entre el complejo generado por el procesado intracelular y el que se forma con el péptido añadido de forma exógena. Estas diferencias se pueden explicar por la existencia de conformeros de los complejos MHC-péptido que representarían distinta especificidad para los linfocitos T, que trae consigo diferencias en el porcentaje de proliferación, inclusive del mismo péptido analizado.

Otro de los aspectos importantes a considerar es el tamaño de los péptidos, ya que se ha reportado que péptidos menores de 15 aminoácidos en ocasiones ni con adyuvantes logran la activación de las células del sistema inmune (Arnon y Van Regenmortel, 1992).

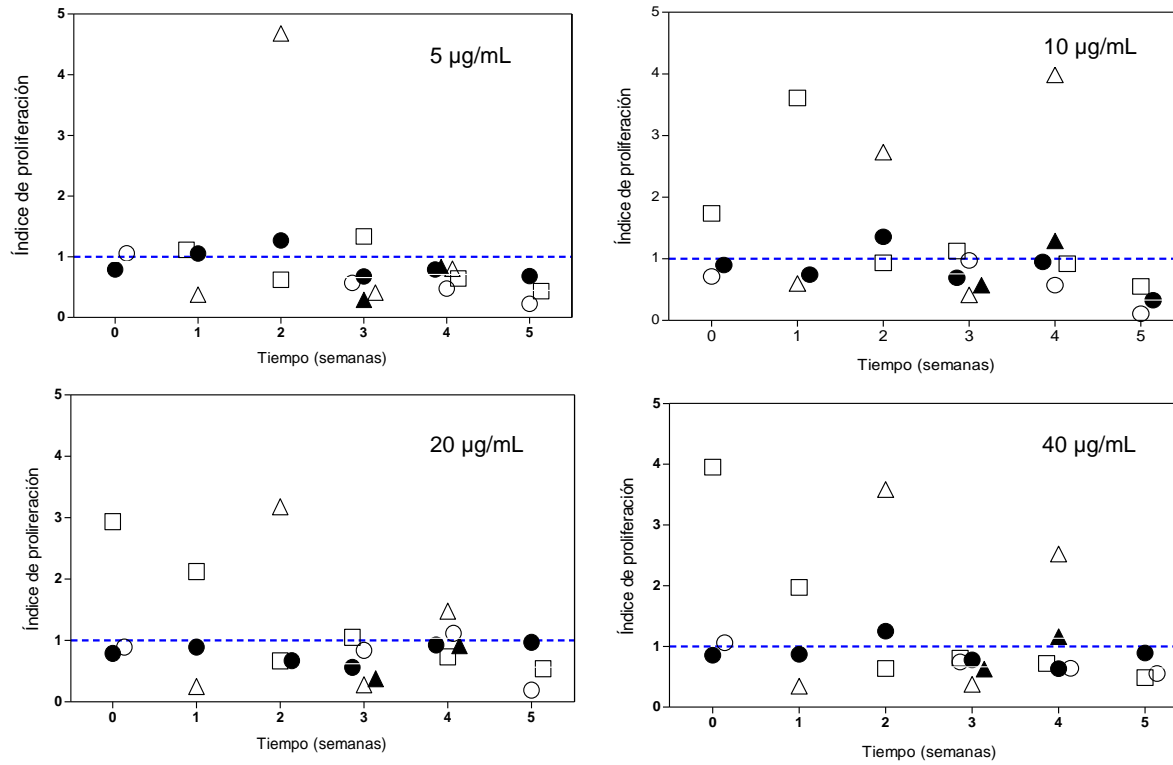
En general, en trabajos realizados donde se utilizan las herramientas bioinformáticas, se puede asumir que estos métodos computacionales para la predicción de epítopes consisten en asumir que algunas propiedades físico-



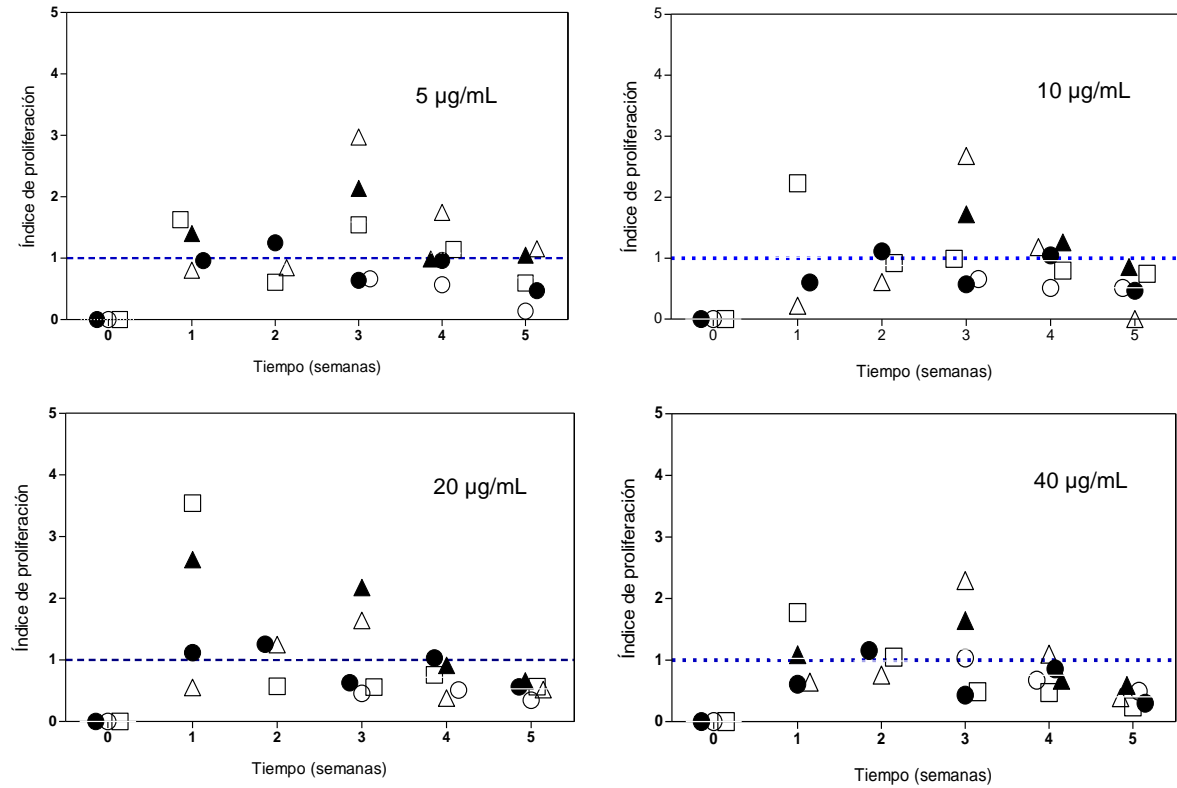
químicas de las cadenas proteicas se corresponden invariablemente con regiones inmunodominantes de las proteínas. Estos métodos pueden tener sus limitaciones, puesto que la inmunodominancia de los epítopes no es una propiedad estática, sino que existen también epítopes subdominantes, que en ocasiones, pueden ejercer una función dominante y protectora tras el escape inmunológico de un epítope inmunodominante (Sin et al., 2000). En la inmunodominancia intervienen varios factores, como la eficiencia del procesamiento de los péptidos, la unión de los péptidos a las moléculas del MHC de clase I y la afinidad de los receptores de células T por los complejos MHC-péptido (Day et al., 2001).

En las Figuras 5 y 6, se muestra el comportamiento individual de los animales analizados y se observa el efecto heterogéneo descrito anteriormente. Se puede notar que si existió reconocimiento de algunos cerdos tanto al péptido 1a, como al 2a, en las diferentes semanas de infección y en las distintas concentraciones.

Al observar un efecto heterogéneo por los diversos factores involucrados en los animales descritos anteriormente, se procedió a hacer un análisis de la producción de IFN- $\gamma$  en la semana 4 pos-infección, utilizando una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , ya que existen reportes que a partir de este periodo y concentración se incrementa la producción de esta citocina (Díaz et al., 2009).



**Figura 5.** Efecto en el índice de proliferación del péptido 1a (Nsp5-MHC-I) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV. Cerdo 1 (O), cerdo 2 (●), cerdo 3 (□), cerdo 4 (▲), cerdo 5 (△).



**Figura 6.** Efecto en el índice de proliferación del péptido 2a (Nsp5-MHC-II) a diferentes concentraciones en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con el PRRSV. Cerdo 1 (O), cerdo 2 (●), cerdo 3 (□), cerdo 4 (▲), cerdo 5 (Δ).

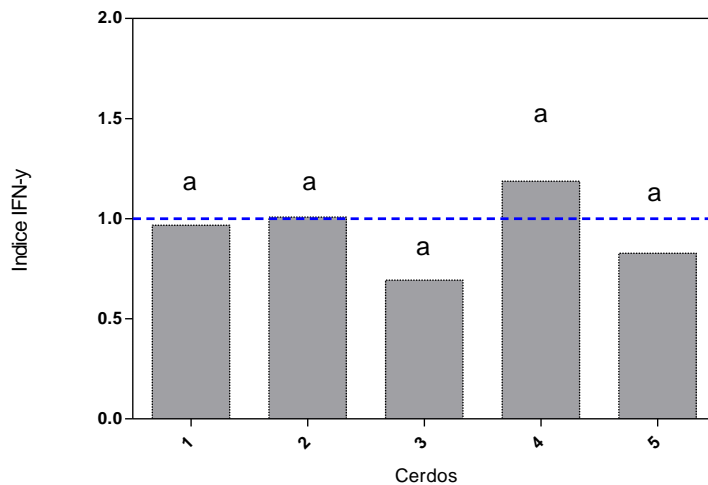
## **Efecto de los Péptidos Sintéticos en la Producción de IFN- $\gamma$**

### **Péptido 1a**

La Figura 7 muestra la producción de IFN- $\gamma$  por efecto del péptido 1a a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La producción de esta citocina se expresó por el índice de IFN- $\gamma$ , el cual se obtiene del cociente del porcentaje de producción de IFN- $\gamma$  originada por el péptido a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el porcentaje de la producción del tratamiento control (CMN sin estímulo).

Para analizar este parámetro se utilizó un análisis de varianza, tomando como variable de respuesta el valor de las absorbancias y como variable de agrupación los cerdos. Se observa que no existió diferencia ( $P > 0.10$ ) en los cerdos analizados, en cuanto al índice de IFN- $\gamma$ , a pesar que se observó un ligero incremento por parte de algunos de ellos (cerdo 2 y 4) (1.015 y 1.235) respectivamente, presentando valores superiores a 1, los cuales se reportan como positivos. En contraparte, los cerdos que presentaron los valores menores fueron el 3 y 5 (0.69 y 0.84) respectivamente. Un aspecto interesante es el resultado presentado por el cerdo 5, el cual presentó un índice de proliferación positivo (3.984) en la cuarta semana después de la infección a esta misma concentración (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pero una producción de IFN- $\gamma$  baja, lo que indica que dicha proliferación no estaba dada por esta citocina (IFN- $\gamma$ ), probablemente este

efecto resulte de la síntesis de otras citocinas como IL-2 e IL-12 (Meier et al., 2003).



**Figura 7.** Índice de IFN- $\gamma$  de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con 4 semanas con el PRRSV, estimuladas con el péptido 1a (MHC-I) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

### **Péptido 2a**

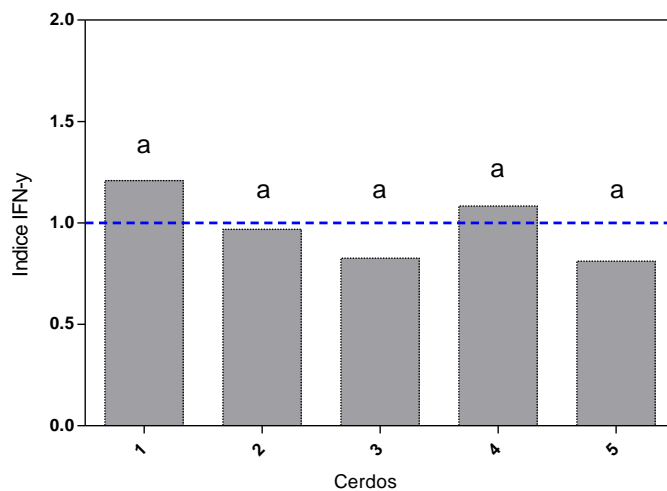
La Figura 8 muestra la producción de IFN- $\gamma$  por efecto del péptido 2a a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La producción de esta citocina se expresó por el índice de IFN- $\gamma$ , el cual se obtiene del cociente del porcentaje de producción

de IFN- $\gamma$  originada por el péptido a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el porcentaje de la producción del tratamiento control (CMN sin estímulo).

Al igual que para el péptido 1a, se utilizó un análisis de varianza, tomando como variable de respuesta el valor de las absorbancias y como variable de agrupación los cerdos. Se presentó un comportamiento similar al péptido 1a, no se detectaron diferencias ( $P > 0.10$ ) en los cerdos analizados. Sin embargo, se aprecia que algunos animales presentaron un efecto positivo (mayores a 1), cerdos 1 y 4 (1.23 y 1.1). Los cerdos que presentaron los valores más bajos fueron el 3 y 5 (0.845 y 0.810).

Al realizar una comparación con los resultados del índices de proliferación y de IFN- $\gamma$ , a la cuarta semana de infección y con una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido 2a, se observó que el cerdo 1 a pesar de presentar un índice de proliferación menor a 1 (0.513), el más bajo para los cerdos analizados en esta semana, fue el que presentó el máximo índice de IFN- $\gamma$ , indicando que la proliferación presentada en este animal se debía principalmente a la citocina IFN- $\gamma$ , la cual es importante para activar macrófagos y que estos cumplan sus funciones para ayudar a la resolución del virus (Drew, 2000). Resultado similar se presentó en el cerdo 4, ya que este presentó un índice de proliferación de 1.260 y uno de IFN- $\gamma$  de 1.083, clasificando a este resultado como positivo.

Estos resultados coinciden por los reportados por Batista et al. (2004) y Xiao et al. (2004), ya que reportan una respuesta de linfocitos atípica, con la aparición de las células productoras de IFN- $\gamma$  del día 14 hasta incluso la cuarta semana post-infección. Sin embargo, no coinciden por los reportados por Vashisht et al. (2008), quienes reportan péptidos presentes en la glicoproteína 5 (GP5), capaces de producir una respuesta celular, pues tienen la capacidad de estimular a células productoras de IFN- $\gamma$  en cerdos infectados.



**Figura 8.** Índice de IFN- $\gamma$  de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de cerdos infectados con 4 semanas con el PRRSV, estimuladas con el péptido 2a (MHC-II) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

## **Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta humoral**

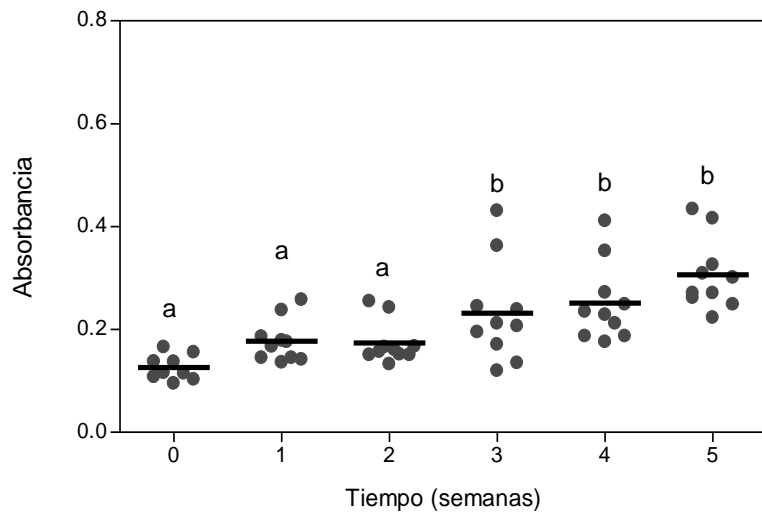
### **Péptido 1a**

La respuesta humoral se evaluó por la técnica de ELISA en donde el reconocimiento de anticuerpos se expresó por el valor de absorbancia. La Figura 9 muestra el reconocimiento del péptido 1a, a una concentración de 10 µg/mL por los anticuerpos en los diferentes cerdos analizados.

Para este análisis se utilizó un diseño completamente al azar con bloques, tomando como variable de bloqueo las semanas de infección, como variable de agrupación a los cerdos y de respuesta el valor de absorbancia. En el análisis por cerdo se observaron diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ) entre estos, ya que uno de ellos presentó el máximo reconocimiento a lo largo de todas las semanas de análisis (cerdo 2) 0.318, presentando los animales restantes un comportamiento similar ( $P > 0.10$ ) entre ellos, con un valor de absorbancia que oscilo entre 0.170 - 0.201.

Con respecto a las semanas de análisis, se observaron diferencia estadística ( $P < 0.10$ ). La absorbancia incrementó conforme avanzaba el periodo de infección. En la semana 0 (sin infección), la absorbancia fue de 0.138, mientras que para la última semana de análisis (5) fue de 0.306.





**Figura 9.** Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 1a (NsP5-MHC-I) a una concentración de 10 µg/mL en sueros de animales sanos (semana 0) y en animales con diferentes semanas de infección con el PRRSV. Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

En este sentido se observó que a partir de la semana 3 pos-infección existieron diferencias en el reconocimiento respecto al control ( $P < 0.10$ ), lo que indica que a partir de este periodo existen anticuerpos específicos para esta proteína.

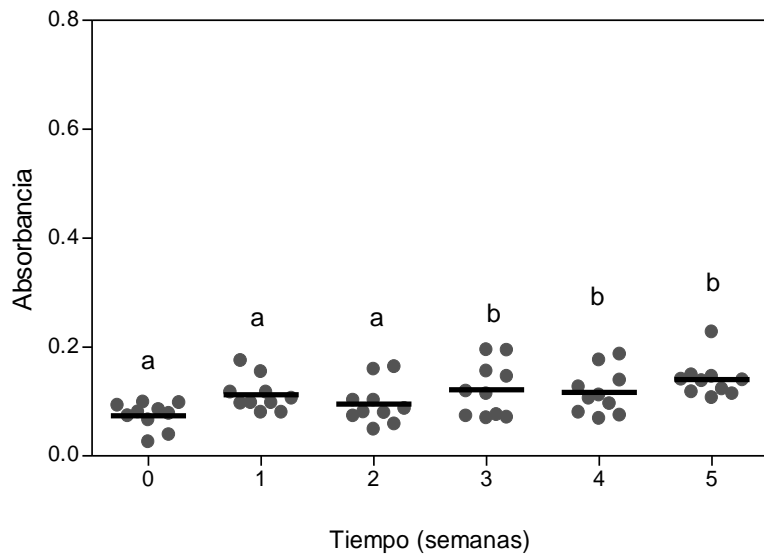
## **Péptido 2a**

La Figura 10 muestra el comportamiento del péptido 2a a una concentración de 10 µg/mL en el reconocimiento de anticuerpos en los diferentes cerdos analizados. Este se expresó con el valor de absorbancia. Los valores de la semana 0 corresponden a los sueros obtenidos de cerdos sanos. De la semana 1 en adelante indican las semanas después de la infección de los cerdos estudiados.

Para este análisis, al igual que para el péptido 1a, se utilizó un diseño completamente al azar con bloques, tomando como variable de bloqueo las semanas de infección, como variable de agrupación a los cerdos y de respuesta el valor de absorbancia. Los resultados indicaron que el péptido 2a presentó características de reconocimiento homólogo al péptido 1a, ya que se detectó diferencia ( $P < 0.10$ ) hasta la semana 3 después de la infección. A partir de la tercer semana, el reconocimiento no fue significativamente superior ( $P > 0.10$ ), sin embargo se observa una tendencia a aumentar este parámetro conforme avanza la viremia de los animales (0.121, 0.117, 0.140) (semana 3, 4 y 5) respectivamente.

En el análisis por cerdo se observaron diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ) entre estos. Se aprecia que el cerdo 2 presentó el máximo reconocimiento a lo

largo de todas las semanas de análisis, presentando un valor de absorbancia de 0.165, lo que indica que este animal presentó un alto reconocimiento al anticuerpo, a pesar de tener el mismo periodo de infección que los demás cerdos analizados. Los cerdos restantes presentando valores de absorbancia diferentes entre ellos e inferiores a los detectados por el cerdo 2 ( $P < 0.10$ ).



**Figura 10.** Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 2a (NsP5-MHC-II) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en sueros de animales sanos (semana 0) y en animales con diferentes semanas de infección con el PRRSV. Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

El comportamiento presentado en el reconocimiento por el péptido 2a es menor al que se presentó en el 1a ( $P < 0.10$ ), indicando este epítipo como menos inmunogénico, a pesar de que presentaron un efecto significativo ( $P < 0.10$ ) desde la tercer semana de infección. Se observó que las mismas unidades experimentales presentaron los valores más altos y bajos en el reconocimiento en ambos péptidos.

Los estudios en el reconocimiento de anticuerpos ante una infección del PRRSV, han estado enfocados principalmente en las proteínas estructurales del virus. En este sentido Kwang et al. (1999), señalaron un reconocimiento al PRRSV desde los 15 días pos infección, lo cual corresponde a un aumento de anticuerpos contra las proteínas M y N del virión. De manera similar Batista et al. (2002), Will et al. (2003) y Trincado et al. (2004), los cuales trabajaron con cerdos de diferentes edades, de 1 a 5 meses, infectados con PRRSV, indican un reconocimiento, por la técnica de ELISA, después de 14 días pos infección, sin embargo estos anticuerpos no ejercen protección y solo es de importancia diagnóstica.

Los anticuerpos pueden ser detectados a los 7 días después de la infección, los cuales mayormente están dirigidos contra la proteína de la nucleocápside (N), la cual está catalogada como la más inmunogénica del virión, pero no es neutralizable. En esta misma proteína se han reconocido

alrededor de 7 determinantes antigénicos con epítopes conservados entre aislados norteamericanos y europeos, los cuales fueron identificados por anticuerpos monoclonales (Cheon y Chae, 2000).

En cuanto a los anticuerpos contra la proteína matriz (M), la cual es también altamente inmunogénica, a pesar de proyectarse al exterior de la envoltura viral, es altamente conservada entre los aislados americanos y europeos, encontrándose epítopes únicos y comunes entre estos aislados, estos aparecen entre los 9 y 35 días (Meulenber, 2000). Entre los 30 y 60 días después de la exposición al PRRSV, se detectan anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura (E), los cuales tienen características inmunogénicas pobres pero serían las proteínas neutralizables y cuando aparecen empieza a desaparecer la viremia (Cheon y Chae, 2000). En cuanto a las proteínas no estructurales del virus del PRRS, solo se reportan reconocimientos por parte de las Nsp1 y 2 del PRRSV en sueros con animales con 4 y 5 semanas de infección (Johnson et al., 2007).

Al observar una respuesta en el reconocimiento de los animales infectados de forma experimental, se evaluó si este comportamiento también se presentaba en animales de diferente edad y sexo, los cuales estaban infectados con el virus del PRRS de manera natural en granjas del estado de Sonora.

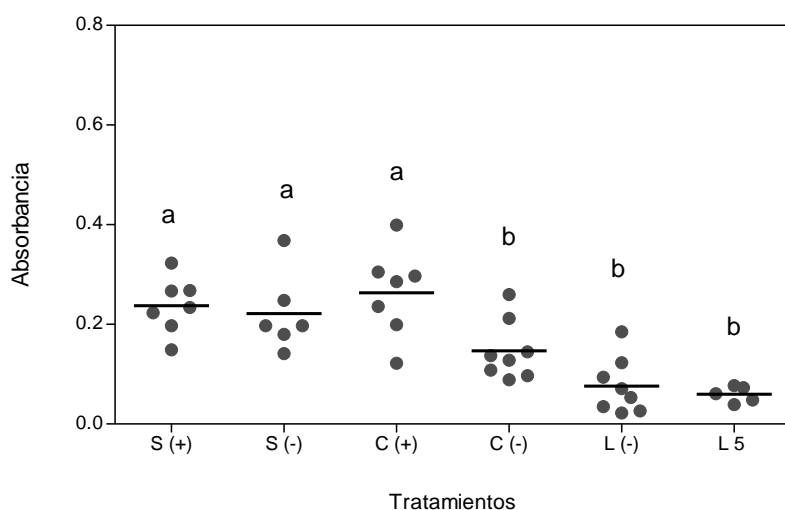
## **Efecto de los péptidos sintéticos en la respuesta humoral en infección natural**

### **Péptido 1a**

Para este análisis se realizó un diseño completamente al azar, empleando sueros de sementales y cerdas de más de dos años de edad, infectados y no infectados. Así mismo, se emplearon sueros de lechones no infectados con cinco meses de edad. Los resultados se compararon con los sueros de los lechones que fueron infectados de manera experimental.

Los resultados presentados en el reconocimiento del péptido 1a en sueros de los diferentes animales analizados se presentan en la Figura 11, en la cual se puede observar que existió diferencia ( $P < 0.10$ ) entre los diferentes grupos analizados. Al comparar los sueros de los dos grupos de sementales (positivos y negativos), se aprecia que son similares ( $P > 0.10$ ), a pesar de estar un grupo infectado (0.237) y el otro sin infección (0.222). En los sueros de las cerdas analizadas, estos si fueron diferentes ( $P < 0.10$ ), apreciándose que los positivos (0.263) son muy superiores a los libres del PRRSV (0.147). Los sueros provenientes de los dos grupos de sementales y de cerdas positivas son similares ( $P > 0.10$ ), en contra parte los de cerdas negativas son inferiores

( $P < 0.10$ ) a los demás sueros provenientes de animales de más de dos años de edad.



**Figura 11.** Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 1a (NsP5-MHC-I) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en sueros de animales de diferente edad y sexo infectados de manera natural con el virus del PRRS. Sementales (S), Cerdas (C), Lechones (L), Lechones de experimento con 5 semanas de infección (L5). Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ ).

Por lo que respecta a los sueros de lechones de 5 meses de edad, tanto negativos provenientes de granjas y los positivos con 5 semanas de infección, las absorbancias son similares ( $P > 0.10$ ) (0.076 y 0.060 respectivamente), a pesar de observarse un ligero incremento en los valores presentados por los lechones provenientes de la granja. Este resultado es interesante, ya que en la

infección experimental, si se observó un efecto ( $P < 0.10$ ) a las 3 semanas de infección, lo que nos hace suponer que el tiempo de infección es importante para la aparición de estos anticuerpos.

Los dos grupos de lechones (negativos granja y positivos experimental) son similares a los encontrados en los sueros de las cerdas negativas ( $P > 0.10$ ) (0.147), indicando en este comportamiento, que la edad de los animales no influyo en incrementar este reconocimiento. Sin embargo, son inferiores ( $P < 0.10$ ) a los encontrados en los sueros de los otros animales con edad superior a 2 años, lo que indica que este efecto estuvo representado por estar los animales infectados con el PRRSV.

En el péptido con mejores características de unirse al MHC-I (1a), el máximo reconocimiento se presentó en los sueros provenientes de las cerdas positivas (0.263), las cuales provenían de una granja del estado. Mientras que las absorbancias más bajas se presentaron en los sueros de los lechones con 5 semanas de infección de manera experimental (0.060).

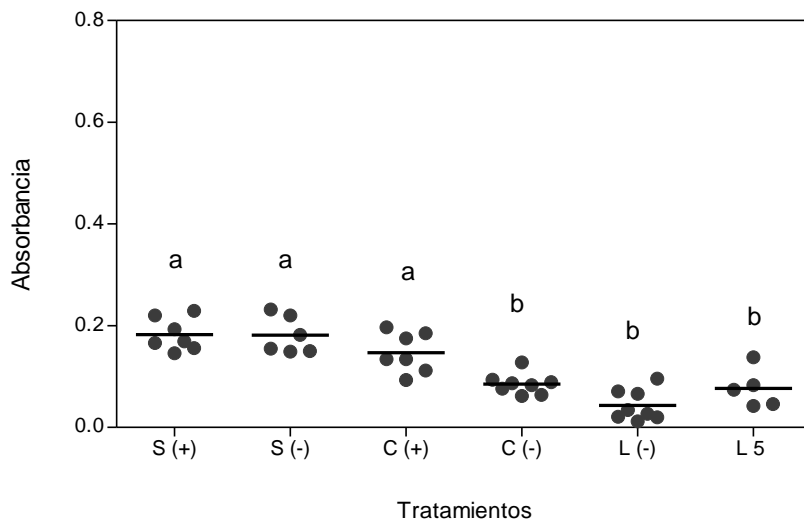
### **Péptido 2a**

Para este análisis, al igual que el péptido 1a, se realizó un diseño completamente al azar, empleando sueros de sementales y cerdas de más de



dos años de edad, infectados y no infectados. Así mismo, se emplearon sueros de lechones no infectados con cinco meses de edad. Los resultados se compararon con los sueros de los lechones que fueron infectados de manera experimental en este trabajo experimental. Los resultados en el reconocimiento del péptido 2a en sueros de los diferentes animales analizados se presentan en la Figura 12. Se puede observar que existió diferencia ( $P < 0.10$ ) entre los diferentes grupos analizados. Al hacer la comparación de los sueros proveniente de los dos grupos de sementales (positivos y negativos), se aprecia que son similares ( $P > 0.10$ ), a pesar de estar un grupo infectado con el PRRSV (0.183) y el otro libre de este virus (0.181).

En lo referente a las absorbancias presentadas por los dos grupos de cerdas analizados (positivas y negativas), se observa un comportamiento no similar al presentado por los sementales (positivos y negativos), ya que en estos animales si se presentó diferencia ( $P < 0.10$ ), presentando las cerdas positivas absorbancias superiores (0.147) al comparar con el grupo negativo (0.085). Al hacer la comparación de los sueros provenientes de los animales con una edad superior a dos años, se puede observar que se presentó un efecto similar al péptido 1a, ya que los sueros de los sementales (positivos y negativos) y el de cerdas positivas son similares entre ellos ( $P > 0.10$ ), mientras que las absorbancias de las cerdas negativas son menores ( $P < 0.10$ ).



**Figura 12.** Efecto en el reconocimiento de anticuerpos del péptido 2a (NsP5-MHC-II) a una concentración de 10 µg/mL en sueros de animales de diferente edad y sexo infectados de manera natural con el virus del PRRS. Sementales (S), Cerdas (C), Lechones (L), Lechones de experimento con 5 semanas de infección (L5). Diferentes literales indican diferencias estadísticas ( $P < 0.10$ )

En cuanto a los sueros de los lechones de 5 meses de edad, tanto negativos proveniente de granjas como positivos con 5 semanas de infección con el PRRSV, las absorbancias presentadas por estos dos grupos son similares ( $P > 0.10$ ) (0.043 y 0.077 respectivamente). Sin embargo, se observó un ligero aumento en el valor de los lechones con 5 semanas de infección, resultado que fue inverso al presentado por el péptido 1a donde se encontró

que el grupo compuesto por los lechones negativos provenientes de la granja eran ligeramente superiores ( $P > 0.10$ ).

De manera general se observó que los datos provenientes de los dos grupos de lechones, son similares a los encontrados en los sueros de las cerdas negativas (0.085) ( $P > 0.10$ ), a pesar de presentar un ligero incremento por parte de estos. Sin embargo, a pesar de ser ligeramente superiores a los encontrados en los lechones, los sueros de las cerdas negativas son menores ( $P < 0.10$ ) a los encontrados en los sueros de los otros animales con más de dos años de edad.

En el péptido 2a, el cual reúne las mejores características de unirse al MHC-II, el máximo reconocimiento se presentó en los sueros provenientes de los sementales positivos (0.183), a diferencia a los presentados en el péptido 1a, en el cual los de cerdas positivas (0.263), fueron los mayores. En este mismo péptido (2a) las absorbancias menores se presentaron en los sueros de los lechones negativos, los cuales provenían de una granja del estado (0.043), a diferencia de los sueros de lechones con 5 semana de infección, los cuales presentaron los valores de absorbancia menores en el péptido 1a (0.060). Al presentarse este comportamiento, dichos datos sugieren que solo las cerdas presentaron anticuerpos ante los péptidos.

## CONCLUSIONES

La respuesta celular por efecto de los péptidos (1a dirigido al MHC-I y 2a dirigido MHC-II), en las concentraciones utilizadas (5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$ ) fue heterogénea. Se observó un comportamiento atípico al normalmente presentado ante una infección por el virus del PRRS, ya que la proliferación no incrementó al aumentar el tiempo de infección.

En la respuesta humoral evaluada en los animales de experimentación, se observó que los dos péptidos (1a dirigido al MHC-I y 2a dirigido MHC-II), son reconocidos por anticuerpos a partir de la semana 3 pos infección ( $P < 0.10$ ), mientras que en la respuesta humoral en animales de granja solo las cerdas presentaron anticuerpos ante los péptidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Torrison, J. 1994. Immune response and persistence of the reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec.* 134(22):567-573.
- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Willis, R.W., Osorio, F.A. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol.* 74(22):10834-10837.
- Arnon, R., Van Regenmortel, M.H. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 6(14):3265-3274.
- Barfoed, A.M., Blixenkroner-Møller, M., Jensen, M.H., Botner, A., Kamstrup, S. 2004. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine.* 22(27-28):3628-3641.
- Batista, L., Dee, S., Rossow, K., J Deen, C Pijoan. 2002. Assessing the duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence and

shedding in a large population of breeding age female swine. *Can J Vet Res.* 66(3):196-200.

Batista, L., Pijoan, C., Lwamba, H., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P. 2004. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J. Swine Health Prod.* 12:170-175.

Bautista, EM., Molitor, T.W. 1997. T cell response to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 144(1):117-134.

Benfield, D.A., Collins, J.E., Dee, S.A. Halbur, P.G. Hoo, H.S. Lager, K.M. Mengeling, W.L. Murtaugh, M.P. Rossow, K.D. Stevenson, G.W. and Zimmerman, J.J. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Diseases of Swine* (8th ed.). Ames, Iowa: Iowa State University Press. 201-232.

Blaha, T. 2000. The "colorful" epidemiology of PRRS. *Vet Res.* 31(1):77-83.

Brusic, V., Rudy, G., Harrison, L.C. 1994. Prediction of MHC binding peptides using artificial neural networks. In: Stonier, R.J. and Yu, X.S. (eds),

*Complex Systems: Mechanism of Adaptation*. IOS Press, Amsterdam, Holland. 253–260.

Brusic, V., van Endert, P., Zeleznikow, J., Daniel. S., Hammer, J., Petrovsky, N. 1999. A Neural network model approach to the study of human TAP transporter. *In Silico Biol.* 1(2):109-121.

Brusic, V., Petrovsky, N., Zhang, G., Bajic, V.B. 2002. Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules. *Immunol Cell Biol.* 80(3):280–285.

Bryant, P., Ploegh, H. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol.*16(1):96-102.

Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Trincado, C.A., Pijoan, C. 2007. Effect of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on the dynamics of homologous viral infection in pig populations. *Am J Vet Res.* 68(5):565-571.

Castellino, F., Zhong, G., Germain, R.N. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the

molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol.* 54(2):159-169.

Cheon, D.S., Chae, C. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Korea. *Arch Virol.* 145:1481-1488.

Chung, H.K., Chae, C. 2003. Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Comp Pathol.* 129:205-212.

Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R., Wearsch, P.A. 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev.* 207:145-157.

Daniel, S., Brusica, V., Caillat-Zucman, S., Petrovsky, N., Harrison, L., Riganelli, D., Sinigaglia, F., Gallazzi, F., Hammer, J., van Endert, P.M. 1998. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J Immunol.* 161(2):617-624.



Day, C.L., Shea, A.K., Altfeld, M.A., Olson, D.P., Buchbinder, S.P., Hecht, F.M., Rosenberg, E.S., Walker, B.D., Kalams, S.A. 2001. Relative dominance of epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with shared HLA alleles. *J Virol.* 75(14):6279-6291.

de Lima, M., Pattnaik, A., Flores, E., Osorio, F. 2006. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* 353(2):410-421.

Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology.* 351(2):249-259.

Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E. 2009. *In silico* prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine.* 27(41):5603-5611.

- Drew, T. V. 2000. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Res.* 31(1):27-39.
- Dunkley, M., Pabst, R., Cripps, A. 1995. An important role for intestinally derived T cell in respiratory defense. *Immunol Today.* 16(5):231-236.
- Fano, E., Olea, L., Pijoan, C. 2005. Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naïve gilts. *Can J Vet Res.* 69(1):71-74.
- Germain, R.N., Margulies, D.H. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol.* 11:403-50.
- Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 76(2):287-299.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C.A., Dea, S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest.* 11:20-26.

Halbur, P. 2003. Factors that influence the severity of clinical disease. In: Zimmerman J, Yoon KJ, editors. PRRS compendium. 2<sup>nd</sup> ed. National Pork Board. 17-26.

Hansen, J.A., Yamamoto, K., Petersdorf, E., Sasazuki, T. 1999. The role of HLA matching in hematopoietic cell transplantation. Rev Immunogenet. 1(3):359-373.

Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. J Swine Health Prod. 10(1):27-30.

Hintze, J. 2001. NCSS, PASS, and GESS. Ness. Kaysville, Utah.  
[www.ncss.com](http://www.ncss.com).

Janeway, C.A., Bottomly, K. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. Cell. 76(2):275-285.

Johnson, C.R., Yu, W., Murtaugh, M.P. 2007. Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol. 88(4):1184-1195.

Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W., Low, S. 1999. Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci.* 67(2):199-201.

Labarque, G., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S., Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine.* 22(31-32):4183-4190.

Lager, K.M., Mengeling, W.L. 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 59(3):187-192.

Larsen, C.E., Alper, C.A. 2004. The genetics of HLA-associated disease, *Curr Opin Immunol.* 16(5):660-667.

Loemba, H.D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., Dea, S. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 141(3-4):751-761.

- López, O.J., Osorio, F.A. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* 102(3):155-163.
- Marsh, S.G. 2004. Nomenclature for factors of the HLA system, update May 2004. *Hum Immunol.* 65:1546-1547.
- Mateu, E., Martin, M., Vidal, D. 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J Gen Virol.* 84(3):529-534.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A. 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology.* 309(1):18-31.
- Meng, X.J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccines efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol.* 74(4):309- 329.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F. 2003. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines

for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol.* 93(1):25-38.

Meulenberg, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J. 1997. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol.* 55(1-4):197-202.

Meulenberg, J.J. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000. 31(1):11-21.

Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol.* 73(1):270-280.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., Benfield, D.A. 1993. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 31(12):3184-3189.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A. 1994. Serum immune response to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest.* 6(4):410-415.

Nielsen, M., Lundegaar, C., Worning, P., Sylvester, C., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S., Lund, O. 2004. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics*. 20(9):1388-1397.

Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M., Harris, D.L. 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol*. 102(1-2):11-18.

Nodelijk, G. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review. *Vet Q*. 24(2):95-100.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yoon, K.J., Pogranichniy, R.M., Harmon, K.M., Evans, R., Key, K.F., Pallares, F.J., Thomas, P and Meng, X.J. 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccines (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J Virol*. 76 (23):11837-11844.

Opriessnig T., Pallares F.J, Nilubol, D., Vincent, A.M., Thacker, E.L, Vaughn, E.M., Roof, M., Halbur, P.G. 2005. Genomic homology of ORF 5 gene sequence between modified live vaccines virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccines efficacy. *J Swine Health Prod.* 13(5):246-253.

Osorio FA, Galeota JA, Nelson E, Brodesen B, Doster A, Wills R, Zuckermann, F., Laegreids, W.W. 2002. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology.* 302(1):9-20.

Parham P. 1999. Virtual reality in the MHC. *Immunol Rev.*167:5-15.

Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ. 1999. Open reading frame 1a encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J Virol.* 73(3):2016-2026.

Peters, B., Tong, W., Sidney, J., Sette, A., Weng, Z. 2003. Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules. *Bioinformatics.* 19(14):1765-1772.



Petrovsky, N., Brusica, V. 2004. Virtual models of the HLA class I antigen processing pathway. *Methods*. 34(4):429-435.

Pijoan, C. 1996. An Overview of PRRS - Associated Respiratory Disease. *American Assoc. Swine Practitioners*. 559-561.

Plagemann, G.W. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Origin hypothesis. *Emerg Infect Dis*. 9(8):903-908.

Pu, Z., Lovitch. S.B., Bikoff. E.K., Unanue. E.R. 2004. T cells distinguish MHC-peptide complexes formed in separate vesicles and edited by H2-DM. *Immunity*. 20(4):467-476.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Ramírez-Rueda, R.Y. 2007. Búsqueda de secuencias con actividad inmunogénica, útiles para el diseño de un modelo de posible vacuna contra la malaria. *SaludUIS*. 39:8-15.

Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., Stevanovic, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50(3-4):213-219.

Rowland, R.R., Steffen, M., Ackerman, T., Benfield, D.A., 1999, The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and

emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*. 259(2):262-266.

Rowland, R.R, Robinson, B., Stefanick, J., Kim, T.S., Guanghua, L., Lawson, S.R., Benfield, D.A. 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Arch Virol*. 146(3):539-555.

Royae, A.R., Husmann, R.J., Dawson, H.D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., Lunney, J.K. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 102(3):199-216.

Samson, J.N., de Bruin, T.G.M., Voermans, J.J.M., Meulenberg, J.J.M., Pol, J.M.A., Bianchi, A.T.J. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveola lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cell. *J Gen Virol*. 81:497-505.

Segal, S., Hill, A.V. 2003. Genetic susceptibility to infectious disease, *Trends Microbiol*. 11(9):445-448.

Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J.A., Chesnut, R., Miles, C., Colon, S.M. and Grey, H.M. 1989. Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 86(9):3296-3300.

Shishan, Y., Zuzhang, W. 2008. Construction of infectious cDNA clones of PRRSV: Separation of coding regions for nonstructural and structural proteins. Sci China Ser C-Life Sci. 51(3):271-279.

Sidney, J., Grey, H.M., Kubo, R.T., Sette A. 1996. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. Immunol Today. 17(6):261- 266.

Sierra, R.N., Ramírez, N.R., Mota, R.D., Avila, D. 1998. First Report of the (PRRS) Virus Isolation in Mexico. *IPVS* 15:303.

Sin. JI., Kim. J., Chattergoon. M., Ayyavoo. V., McCallus. D., Ugen. KE., Boyer .JD., Weiner. DB.2000. Engineering of DNA vaccines using molecular adjuvant plasmids. Dev Biol (Basel).104:187-198.

- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado
- Código de campo cambiado

Smith, W.P., Vu, Q., Li, S.S., Hansen J.A., Zhao, L.P., Geraghty D.E. 2006. Toward understanding MHC disease associations: Partial resequencing of 46 distinct HLA haplotypes. *Genomics*. 87(3):561-571.

Snijder, E.J., Van Tol, H., Roos, N., Pedersen, K.W. 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J Gen Virol*. 82(5):985-994.

Southwood, S., Sidney, J., Kondo, A., del Guercio, M.F., Appella, E., Hoffman, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., Sette, A.1998. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol*. 160(7):3363-3373.

Stagg, H.R., Thomas, M., van den Boomen, D., Wiertz, E.J., Drabkin, H.A., Gemmill, R.M., Lehner, P.J. 2009. The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER. *J Cell Biol*.186(5):685-692.

Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado  
Código de campo cambiado

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC

protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. Nature. 368(6468):215-221.

Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M. 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. Immunol Rev. 207:19-30.

Suárez, P., Diaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, J., Nieto, A and Ortin, J. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. J Virol. 70(5):2876-2882.

Suri. A., Walters. J.J., Kanagawa. O., Gross .M.L., Unanue E.R. 2003. Specificity of peptide selection by antigen-presenting cells homozygous or heterozygous for expression of class II MHC molecules: The lack of competition Proc Natl Acad Sci USA. 100(9):5330-5335.

Trincado, C., Dee, S., Jacobson, L., Otake, S., Rossow, K., Pijoan, C. 2004. Attempts to transmit porcine reproductive and respiratory syndrome virus by aerosols under controlled field conditions. Vet Rec. 154(10):294-297.

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

van Endert, P.M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J.F. 1995. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med.* 182(6):1883-1895.

Vashisht, K., Goldberg, T.L, Husmann, R.J, Schnitzlein, W., Zuckermann, F.A. 2008. Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine.* 26(36):4747-4753.

Villadangos, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, C. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev.* 172:109-120.

Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol.* 152(2):289-303.

Wensvoort, G., Kluyver, E., Luitze, E., Besten, A. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest.* 4(2):134-138.

Wills RW, AR Doster, JA Galeota, JH Sur, FA Osorio. 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol.* 4(1):58-62

Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A. 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology.* 287(1):183-191.

Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P. 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol.* 78(11):5923-5933.

Yang L, Frey ML, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Platt KB. 2000. Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol.*145(8):1599-1619.

Yoo, D., Welch, S.K., Lee, C and Calvert, J.G. 2004. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccines vectors. *Vet Immunol Immunopathol.* 102(3):143-154.

- Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., Mcginley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T., Platt, K.B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest.* 7(3):305-312.
- Yoon, K.J, Wu, L.L, Zimmerman, J.J, Hill, H.T, Platt, K.B. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol.* 9(1):51-63.
- Zhong, W., Reche, P.A., Lai, C.C., Reinhold, B., Reinherz, E.L. 2003. Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire. *J Biol Chem.* 278(46):45135-45144.
- Zimmerman, J., Yoon, J.K., Stevenson, G., Dee, S.A. 1998. The 1998 PRRS Compendium. National Pork Producers Council. U.S.A.
- Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., Hengartner, H. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 14: 333-367.



Zuckermann, F.A., Martin, S., Husmann, R.J., Brandt, J. 1999. Use of interleukin 12 to enhance the cellular immune response of swine to an inactivated herpes virus vaccines. *Adv Vet Med.* 41:447-461.

Zuckermann, F.A., Alvarez, E., Días, I., Christopher, J., Dosrter, A., Brito, M., Osorio, F. 2007. Assessment of the efficacy of comercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cell and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol.* 123(1-3):69-85.