



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“PARTICIPACIÓN DE EPÍTOPOS DE RECONOCIMIENTO DE LINFOCITOS T
DE LA PROTEÍNA GP5 DEL VIRUS PRRSV EN LA RESPUESTA INMUNE
INNATA PORCINA”**

Tesis que presenta:

Médico Cirujano y Partero: Roberto Ortega Flores

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN EL ÁREA TEMÁTICA DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESORA-TUTORA:

D.C. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

CO-ASESORA

D. C. ILANE HERNÁNDEZ MORALES

MORELIA, MICH., Mayo de 2023

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la tutoría de la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita y la co-tutoría de la Dra. Ilane Hernández Morales.

Agradecemos el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT (A1-S-43236), al apoyo CONACYT al fortalecimiento de Infraestructura (INFR 2015-255010), referente a la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular y al apoyo CONACYT para fomento a la Infraestructura Científica 2021 (317189) y CONACYT INFR-2015-01-255010. DGAPA-PAPITT IA208322 (UNAM).

R.O.F. agradece la beca CONACYT No. 732520

“Cualquier destino, por largo y complicado que sea, consta en realidad de un solo momento: el momento en que el hombre sabe para siempre quién es.”

Jorge Luis Borges

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primero que nada, quisiera agradecer a mi familia. A mis padres Roberto y Luz del Carmen. Ya que ellos fueron los primeros en darme su apoyo para embarcarme en esta gran aventura. Su amor incondicional ha sido y siempre será el motor que me impulse para mejorar como profesionista y más aún como persona. Gracias a ellos siempre he encontrado el camino correcto. También mis hermanos Mauricio y Mariana que siempre han estado presente dándome esa motivación y ese cariño necesario para levantarme cada día y dar lo mejor de mí.

Quisiera agradecer a la doctora Rosa Elvira que me acogió en su grupo de trabajo y confió en mi para desarrollarme en esta área. Ella sabe mejor que nadie que para mí no fue nada fácil comenzar este proyecto, pero aún así ella siempre confió en mis capacidades e hizo florecerlas. No me queda más que estar siempre agradecido por esa confianza y hacerme ver que soy capaz de todo lo que me proponga.

También quisiera agradecerle a la doctora Ilane por toda la confianza y apoyo que ha tenido conmigo. Compartirme todo su conocimiento desde sus clases de inmunología y también su guía incondicional en la escritura de esta tesis. Ella sabe muy bien que para mí la escritura fue algo difícil más no imposible. Y quiero agradecerle por ayudarme a llevar a buen puerto este escrito.

También quisiera agradecer a los doctores miembros de mi comité tutorial. Al doctor Javier por hacerme ver que siempre debo intentar esforzarme y dar un poco más de ese 100%. Al doctor Juan José por compartir su conocimiento y sus preguntas que me ayudaron mucho en hallar dirección en este trabajo y al Doctor Cervantes que siempre tuvo tiempo y paciencia, para atender mis dudas y escucharme para poder ayudarme.

También quisiera agradecer a todos los amigos que hice en esta maravillosa etapa. A Miriam mi mentora que gracias a ella pude comenzar y me ayudo a tener confianza para trabajar en el laboratorio. Sin duda alguna sin ella y Juan Manuel no habría podido llevar a cabo esto. A Brandon que más que un amigo es un hermano para mí. Que siempre me estuvo ayudando en varios de los experimentos. A mi ahijada académica Tsitsiki que gracias a ella también pude ayudar a alguien a crecer como persona y me quedo con una invaluable amistad que perdurará. A Fran un gran amigo que siempre me escuchó pacientemente escucho mis dudas para poder avanzar. A Fer le estoy inmensamente agradecido ya que sin el una gran parte de este trabajo se llevó a cabo y consolidamos una gran amistad. A Andy y Adriana que también siempre me escucharon para explicarle lo que hacía. A Flor que también siempre no dudo en echarme una mano. A Gaby a la cual siempre acudí para tener una buena opinión cada vez que me sentía perdido. A mi gran amigo Güicho que sin esas tardes en el laboratorio no hubieran estado llenas de risa y buenas pláticas. A Nathan y Sergio que les pasó la batuta para continuar ampliando el conocimiento en esta noble área.

1.-INDICE

1.1 INDICE GENERAL

Agradecimientos	i
Agradecimientos personales	ii
1.-Indice	1
1.1 Índice general	1
1.2 Índice de figuras.....	3
1.3 Índice de tablas.....	4
1.4- Lista de abreviaturas	5
1.5 Resumen	7
ABSTRACT	8
2.- Marco teórico	9
2.1 Importancia y generalidades del PRRSV.....	9
2.2 Origen y evolución	10
2.3 Impacto del PRRSV en México y el mundo	11
2.4 Cuadro clínico.....	12
2.5 Vías de transmisión	12
2.6 Curso temporal de la enfermedad por PRRSV	13
2.7 Clasificación, genoma y estructura del PRRSV	14
2.8. Tropismo del PRRSV	16
2.9 Replicación de PRRSV	17
2.10 Proteína GP5	18
2.11 Respuesta inmune e infección por PRRSV	19
2.12 Polarización de macrófagos	20
2.13 Vía de señalización NF- κ B:	22
2.14 Interacción PRRSV/célula blanco y evasión de la respuesta inmune	24
3.- Antecedentes	27
4.- Justificación	33
5.- Hipótesis	34

6.- Objetivo general	34
7.- Objetivos específicos	34
8.- Metodología	35
8.1 Materiales y métodos	35
8.1.1. Péptidos y estímulos	35
8.1.2. Línea celular de macrófagos de cerdo 3D4/31 (ATCC® CRL-2844™).....	36
8.1.3. Sistema de vectores reporteros <i>CIS</i>	37
8.1.4 Transformación bacteriana por choque térmico.....	39
8.1.5 Extracción de plásmido a pequeña escala	39
8.1.6 Extracción de plásmido a gran escala (Método de lisis alcalina).....	40
8.1.7 Curva de resistencia a higromicina	41
8.1.8 Transfección Estable de macrófagos de cerdo (ATCC 3D4/31) con el plásmido pNF- κ B-hrGFP.	41
8.1.9 Ensayos de estimulación en macrófagos 3D4/31-pNF- κ B-hrGFP	42
8.1.10 Evaluación de la activación de NF- κ B en macrófagos de cerdo.....	43
8.1.11 Expresión de citocinas	43
8.1.12 Procedimiento para la extracción de proteínas totales	44
8.1.13 Procedimiento cuantificación de proteínas totales	45
8.1.14 Western Blot	46
9.- Resultados	47
9.1 Curva de resistencia a higromicina	47
9.2 Evaluación de la activación de NF- κ B.....	48
9.3 Analisis de la fosforilación de p65.....	49
9.4 Análisis de la expresión de citocinas en el sobrenadante del medio de cultivo	51
10.- Discusión	56
11.- Conclusiones	62
12.- Bibliografía	63

1.2 INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regionalización de las diferentes cepas del PRRSV en el mundo	11
Figura 2. Secuencia temporal de eventos posterior a infección con PRRSV	14
Figura 3. Sistema de Baltimore para clasificación de virus.....	15
Figura 4. Genoma y estructura de la partícula viral del PRRSV	16
Figura 5. Replicación del PRRSV en el macrófago.....	18
Figura 6. Representación esquemática de la proteína GP5 del PRRSV	19
Figura 7. Representación esquemática de la polarización de macrófagos	21
Figura 8. Formación de heterodímeros y homodímeros que componen la vía NF-κB en células eucariotas	23
Figura 9. Esquema simplificado de la vía de señalización del NF-κB	24
Figura 10. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune mediada por PRRSV	26
Figura 11. Fotomicrografía representativa de macrófagos de cerdo (Línea celular 3D4/31)...	37
Figura 12. Plásmidos reporteros <i>cis</i> hrGFP	38
Figura 13. Representación esquemática del vector NF-κB del sistema de Reporteros <i>cis</i>-hrGFP.....	39
Figura 14. Evaluación de la resistencia a higromicina en macrófagos de cerdo	47
Figura 15. Expresión de hrGFP en macrófagos de cerdo transfectados con sistema de reporteros pNF-κB-hrGFP. En a).....	48
Figura 16. Activación del elemento <i>cis</i> NF-κB en macrófagos de cerdo despues de la estimulación con diferentes inductores.	49
Figura 17. Inmunodetección de la proteína fosforilada p65 en proteínas totales obtenidas de macrófagos de cerdo despues del tratamiento con diferentes estímulos	50
Figura 19. Expresión de IL-10 por MΦ 3D4/31	53
Figura 20. Expresión de TNF-α por MΦ 3D4/31	54
Figura 21. Expresión de IFN-.....	55

1.3 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de activación de células en respuesta a péptidos virales.....	30
Tabla 2. Análisis de la	30
Tabla 3. Características de los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV	35
Tabla 4. Estímulos empleados para inducir la polarización de macrófagos alveolares de cerdo, de acuerdo con el fenotipo asociado.....	35
Tabla 5. Moléculas utilizadas como estímulos en cultivos de macrófagos porcinos.....	43
Tabla 6. Contenido del buffer RIPA.....	45

1.4- LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula presentadora de antígeno

CD- Clúster de diferenciación

GFP – proteína verde fluorescente

HDPs – péptidos de defensa del huésped

HS – Heparán Sulfato

IFN- Interferón

IκB- inhibidor de κB

IKK- quinasa de IκB

IL- interleucina

IRF – factor regulador de interferón

LPS- Lipopolisacárido

mRNA – RNA mensajero subgenómico

ORF - Marco de lectura abierta

PCR- reacción en cadena de la polimerasa

pDC- célula dendrítica plasmocitoide

PEI- polietilamina

PI – post infección

PRRS-Síndrome reproductivo y respiratorio porcino

PRRSV-Virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino

RE – retículo endoplásmico

RFU- unidades relativas de fluorescencia

RNA – ácido ribonucleico

RTC - Complejo de transcripción y replicación

SADER- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural

SFB- suero fetal bovino

sgRNA – RNA subgenómico

SIAP - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

Sn - Sialoadhesina

TNF-Factor de necrosis tumoral

1.5 RESUMEN

El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), afecta a cerdos provocando alta morbilidad. Las células blanco del virus son los macrófagos alveolares cuyas funciones disminuyen durante la infección. Previamente, hemos identificado epítomos (péptidos) de reconocimiento de linfocitos T en la proteína de envoltura GP5, los cuales indujeron la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en macrófagos de ratón y estimularon la polarización al fenotipo M1. Se desconocen los mecanismos que subyacen en la respuesta de macrófagos de cerdo ante los péptidos virales. **Objetivo:** Evaluar la participación de la vía NF- κ B en la activación de macrófagos de cerdo inducida por los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV, denominados GP5T1, GP5T2 y GPT3. **Metodología:** Se utilizó Western Blot, Sistema de reporteros y sistema X-MAP/Luminex. **Resultados:** Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de p-P65 de acuerdo con el siguiente orden $GP5T2 \geq GP5T1 \geq TNF\alpha \geq LPS \geq GPT3$ comparados con el control, lo cual sugiere que los péptidos GP5T1, GP5T2 y GPT3 activan la vía NF- κ B. Por otro lado, se observó que los tres péptidos virales fueron capaces de inducir la transactivación del elemento *cis* de NF- κ B en comparación con el control, medido por la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. También, se observó un aumento significativo en la secreción de IFN- γ , IL-1 β , IL-10 y TNF- β con el tratamiento con el péptido GP5T2 y un aumento en la secreción de IL-10 después del tratamiento con el péptido GP5T3. **Conclusión:** Los resultados sugieren que los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV GP5T1, GP5T2 y GP5T3 son capaces de inducir la activación de la vía NF- κ B en macrófagos de cerdo. En conjunto, estos datos mostraron que los péptidos GP5T1 GP5T2 y GP5T3 son suficientes para inducir el fenotipo M1/M2 en macrófagos de cerdo.

PALABRAS CLAVE: PRRSV, macrófago, GP5, citocina, cerdo

1.6 ABSTRACT

Swine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) virus affects pigs causing high morbidity. The target cells of the virus are alveolar macrophages whose functions decrease during infection. We have previously identified epitopes (peptides) of T-cell recognition in the GP5 sheath protein, which induced mRNA expression of proinflammatory cytokines in mouse macrophages and stimulated polarization to the M1 phenotype. The mechanisms underlying the response of pig macrophages to viral peptides are unknown. **Objective:** To evaluate the participation of the NF- κ B pathway in the activation of pig macrophages induced by the peptides derived from the GP5 protein of PRRSV, called GP5T1, GP5T2 and GP5T3. **Methodology:** Western Blot, Reporters system and X-MAP/Luminex system were used. **Results:** A statistically significant increase in p-P65 expression was observed according to the following order GP5T2 \geq GP5T1 \geq TNF α \geq LPS \geq GP5T3 compared to the control, which suggests that the peptides GP5T1, GP5T2 and GP5T3 activate the NF- κ B pathway. On the other hand, it was observed that the three viral peptides were able to induce the transactivation of the cis element of NF- κ B compared to the control, measured by the expression of the green fluorescent protein GFP. Also, a significant increase in IFN- γ , IL-1 β , IL-10 and TNF- β secretion was observed with GP5T2 peptide treatment and an increase in IL-10 secretion after GP5T3 peptide treatment. **Conclusion:** The results suggest that peptides derived from the GP5 protein of PRRSV GP5T1, GP5T2 and GP5T3 are capable of inducing the activation of the NF- κ B pathway in pig macrophages. Together, these data showed that the peptides GP5T1 GP5T2 and GP5T3 are sufficient to induce the phenotype M1/M2 in pig macrophages.

KEYWORDS: PRRSV, macrophage, GP5, cytokine, pork

2.- MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia y generalidades del PRRSV

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es causado por el virus del mismo nombre (PRRSV por sus siglas en inglés) actualmente es considerado como una de las enfermedades en cerdos más importantes a nivel mundial debido a su alta prevalencia y distribución en diferentes países. La enfermedad causa pérdidas millonarias en diferentes países porcicultores año tras año (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019). Para 2013, solamente en EE. UU, se estimaron pérdidas económicas de \$ 664 millones de dólares anuales (Holtkamp, 2013). Actualmente se calculan pérdidas anuales aproximadamente de 2.5 billones de dólares en los estados unidos y Europa. (Chase-Topping *et al.*, 2020). Datos obtenidos realizados a través de análisis de datos en Alemania, han calculado pérdidas aproximadas debido a PRRSV de 255 euros por cerdo, los cuales concuerdan con los de otros países europeos (Renken *et al.*, 2021).

Este virus se considera un patógeno de gran importancia dado que ha cobrado relevancia en las últimas décadas debido al impacto económico en cuanto a pérdidas anuales en granjas con diferentes grados de tecnificación, En nuestro país se desconocen las cifras reales de su impacto y prevalencia, pero se considera que es similar al de otros países con cifras reportadas. Por lo que SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) de acuerdo Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica ha denominado el PRRSV como conforme al artículo 344 del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal como enfermedad de notificación obligatoria (DOF - Diario Oficial de La Federación, n.d.).

El mercado de carne de cerdo es muy importante en México, ya que la misma es una importante fuente de proteínas. Tan solo en 2017 se produjeron aproximadamente 6.69 millones de toneladas de carne, de las cuales 21.5% fueron de origen porcino. También se vio un incremento en la producción de 3.7% en comparación con el 2016 (OCDE, 2019).

Este virus es causa importante de enfermedad respiratoria tanto en infección aislada como coinfección con otros agentes. El cual es uno de los mayores contribuidores al complejo

respiratorio porcino, el cual reúne patógenos de distinta naturaleza los cuales en conjunto ocasionan una gran morbilidad respiratoria en cerdos (Thaa *et al.*, 2008).

Actualmente prevalece la preocupación respecto a virus que infectan animales domesticados, dado que se considera importante la relación entre la salud animal y de humanos, ha cobrado mayor importancia en los últimos años con el surgimiento de pandemias originadas a partir de virus que previamente infectaban animales por ejemplo el virus de la influenza H1N1.

2.2 Origen y evolución

A finales de la década de los 80`s fueron descritos varios brotes en granjas porcícolas en diferentes estados de E.E.U.U de una enfermedad misteriosa en cerdos, caracterizada principalmente por fallo reproductivo en cerdas gestantes y afección respiratoria de diferentes grados de severidad. Posteriormente fueron descritos en Europa cuadros similares en diferentes países del continente con una rápida propagación entre granjas. En 1991 fue aislado por primera vez el virus causante del PRRS (PRRSV) en los laboratorios de Lelystad. El cual fue denominado virus Lelystad, a su vez considerado PRRSV-1. Posteriormente también fue aislado un año después en Estados unidos (E.E.U.U.) la cepa VR-2332 denominado PRRSV-2. Es importante mencionar que tanto el virus Lelystad y el Vr-2332 a pesar de contar con cuadros clínicos muy similares, características biológicas y epidemiológica semejantes, estos dos virus fueron clasificados desde su inicio como dos cepas de diferentes, denominándose genotipo 1 y genotipo 2 respectivamente (Carvajal, 2020).

Esta variabilidad genética del virus queda demostrada con la presencia de diferentes subtipos para cada uno de los dos genotipos, contando con una reducida homología entre ellos, esto debido a que al ser un virus RNA tiene una alta tasa de mutación. Y esto queda de manifiesto con la presencia brotes de diferentes cepas en todo el mundo (ver figura 1).

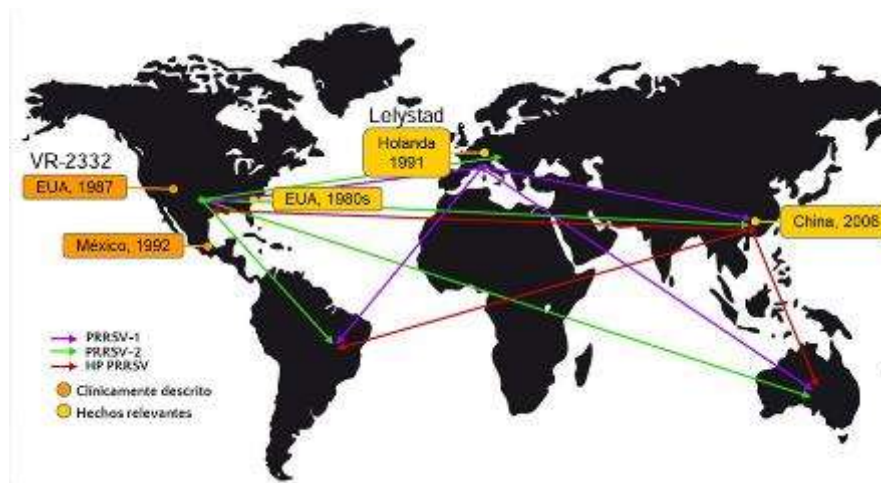


Figura 1. Regionalización de las diferentes cepas del PRRSV en el mundo (Modificado de Cano, 2012.)

2.3 Impacto del PRRSV en México y el mundo

Actualmente se desconocen las cifras del impacto económico del PRRSV en nuestro país, pero se estiman que son similares a países como E.E.U.U., tan solo en aquel país desde el inicio de la epidemia por PRRSV se reconoció un importante impacto económico debido a pérdidas en piaras infectadas con el virus, con una pérdida del rendimiento bruto calculado de 6 a 8% por cada mes del brote. Datos más recientes estiman pérdidas de productividad que ascienden a un estimado de \$664 millones de dólares americanos, notándose un incremento sustancial en comparación con un análisis realizado en 2005 (Holtkamp *et al.*, 2013). En granjas europeas se calcula una media en cuanto a pérdidas anuales de €75,724 si la granja era afectada en el área de crecimiento y engorda, mientras que las pérdidas calculadas se elevaban a € 650,090 si eran afectadas todas las áreas de la granja (Nathues *et al.*, 2017).

2.4 Cuadro clínico

El cuadro clínico por PRRSV clásicamente ha sido descrito como un cuadro caracterizado principalmente por afección pulmonar con cuadros de neumonía intersticial y otros signos respiratorios, y pérdidas gestacionales en cerdas gestantes, estos acompañados de signos generales como fiebre, anorexia, eritema, cianosis, alteraciones dermatológicas, entre otros, Aunque los signos clínicos de PRRS son muy variables, estos dependiendo de la cepa infectante, raza y edad del animal. Se ha observado signos clínicos más severos y prolongados en cerdos jóvenes. Es importante mencionar que carece de signos patognomónicos, por lo que es difícil e importante realizar diagnóstico diferencial en cuadros respiratorio con infecciones por otros patógenos como *H. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* y *H. parasuis*. Y en el caso de falla reproductiva se deberá descartar otras infecciones como Leptospirosis, Parvovirus, Brucelosis, enfermedad de Aujeszky.

La tasa de morbilidad se estima aproximadamente en un 50% en cerdos jóvenes y alcanza una mortalidad de 25% en cerdos en crecimiento. Las muertes por lo general son debidas a sobreinfecciones bacterianas secundarias como *S. choleraesuis*, *S. suis*, *A. pleuropneumoniae* y *H. parasuis*. Las mayores pérdidas económicas se dan en el fallo reproductivo en cerdas (Constable, 2017).

2.5 Vías de transmisión

El virus puede esparcirse rápidamente dentro de una piara, si los cerdos se encuentran dentro de un lugar cerrado y mal ventilado. Hasta un 90% de los cerdos llegarán a presentar seroconversión en los 3 meses posterior de la introducción del virus a la piara. La vía de transmisión más común se cree que es el contacto directo. Otras posibles rutas de contagio serían la introducción de animales vacunados, uso de semen en inseminación artificial de machos infectados y por aerosoles (Constable, 2017).

2.6 Curso temporal de la enfermedad por PRRSV

Las etapas tempranas de la infección por PRRSV, posterior a la entrada del virus a un cerdo previamente sano, se caracteriza por la presencia de diversos signos clínicos y una alta tasa de replicación en macrófagos alveolares y otros subtipos de macrófagos. Posteriormente se observa una alta carga viral en tejidos, acompañado de presencia de viremia (López & Osorio, 2004).

Más allá de la etapa aguda, sobreviene una etapa de infección persistente. En la cual el PRRSV persiste en cantidades disminuidas en tejido linfoide. En esta etapa el virus se encuentra en replicación continua, pero lo hace a niveles mucho menores que en las etapas anteriores de la infección. Por último, el virus es eliminado del organismo por lo general muchos meses después de la infección inicial. Los cerdos infectados desarrollan una respuesta mediada por células T que inicia aproximadamente a las 4 semanas Post infección (PI). La producción específica de IFN- γ muestra una demora en su respuesta al igual que anticuerpos neutralizantes (ver Figura 2).

Se estima un lapso de 150 días o más para la completa eliminación del virus en la totalidad de animales infectados. Actualmente no se conoce a través de qué mecanismos hay una persistencia del virus en el organismo, que pareciera ser debido a incapacidad del sistema inmune del hospedero para montar una respuesta efectiva contra el virus (López & Osorio, 2004).

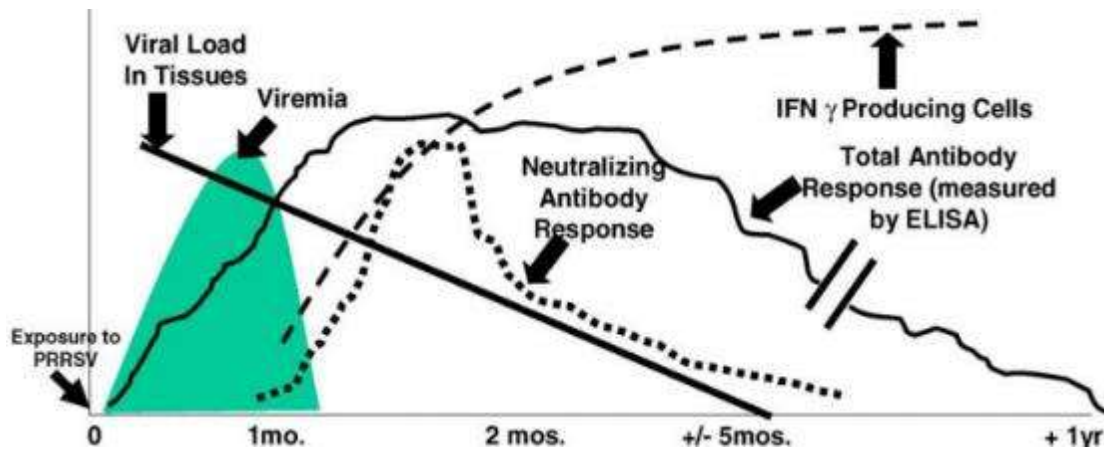


Figura 2. Secuencia temporal de eventos posterior a infección con PRRSV Se observa desde el primer día viremia detectable y mantenida durante semanas, correspondiendo con la secreción de anticuerpos no neutralizantes. Pasadas semanas inicia una respuesta celular y humoral detectadas por la presencia de anticuerpos neutralizantes (línea punteada gruesa) y aumento de interferón (Línea punteada fina) (Tomado de López *et al.*, 2009)

2.7 Clasificación, genoma y estructura del PRRSV

El PRRSV es un virus encapsulado RNA de sentido positivo, el cual se clasifica dentro del orden Nidovirales, y dentro de la familia de los *arterivirus* junto a otros como el virus de la arteritis equina y fiebre hemorrágica en simios. Una característica de esta familia es la presencia de un tropismo muy selectivo. La forma del virión es casi esférica con un tamaño aproximado de 50-60 nm de diámetro. De acuerdo con las características de su genoma, el PRRSV lo podemos clasificar en el grupo 4 del sistema de Baltimore para clasificación de los virus (ver figura 3), dado que su genoma es un RNA de sentido positivo de aproximadamente 15 kb (Lunney *et al.*, 2016)

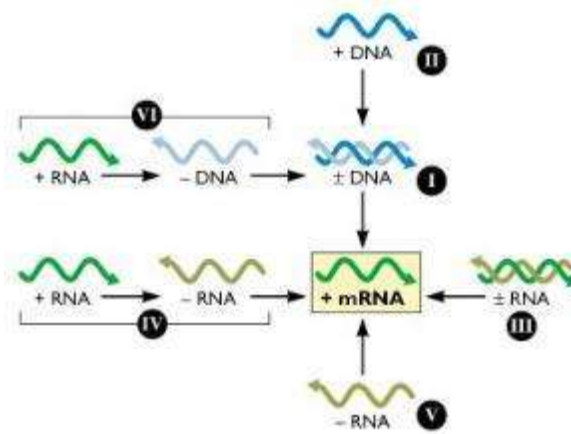


Figura 3. Sistema de Baltimore para clasificación de virus Este sistema clasifica a los virus dependiendo del ácido nucleico que contienen. El PRRSV se clasifica dentro del grupo 4 por tener RNA monocatenario de sentido positivo (Tomado de Racaniello *et al.*, 2009).

El tamaño promedio del genoma del PRRSV es de 15kb, el cual cuenta con 10 marcos de lectura abierta (ORF) con los genes involucrados en la replicación en el extremo 5', seguido de genes que codifican para las diferentes proteínas estructurales hacia el extremo 3' del genoma. Más de la mitad del genoma (aproximadamente 60 a 70%) codifica para las proteínas no estructurales, las cuales son importantes para el complejo de replicación, contenidas dentro de los ORF1a y ORF1b. Mientras que los ORF 2 a 7 codifican para las proteínas estructurales del PRRSV (ver figura 4). Cabe resaltar que el ORF 5 es de gran importancia debido a su alta variabilidad genética entre cepas. El PRRSV cuenta con 8 proteínas estructurales codificadas en su genoma, de las cuales las podemos dividir en glicosiladas: GP2a, GP2b, GP3, GP4, GP5a y GP5b; las cuales cobran gran importancia para interacción del virus con la célula diana, y a su vez son las proteínas que principalmente son reconocidas por el sistema inmune del hospedero. Por otro lado, tenemos proteínas no glicosiladas: M y N (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019)

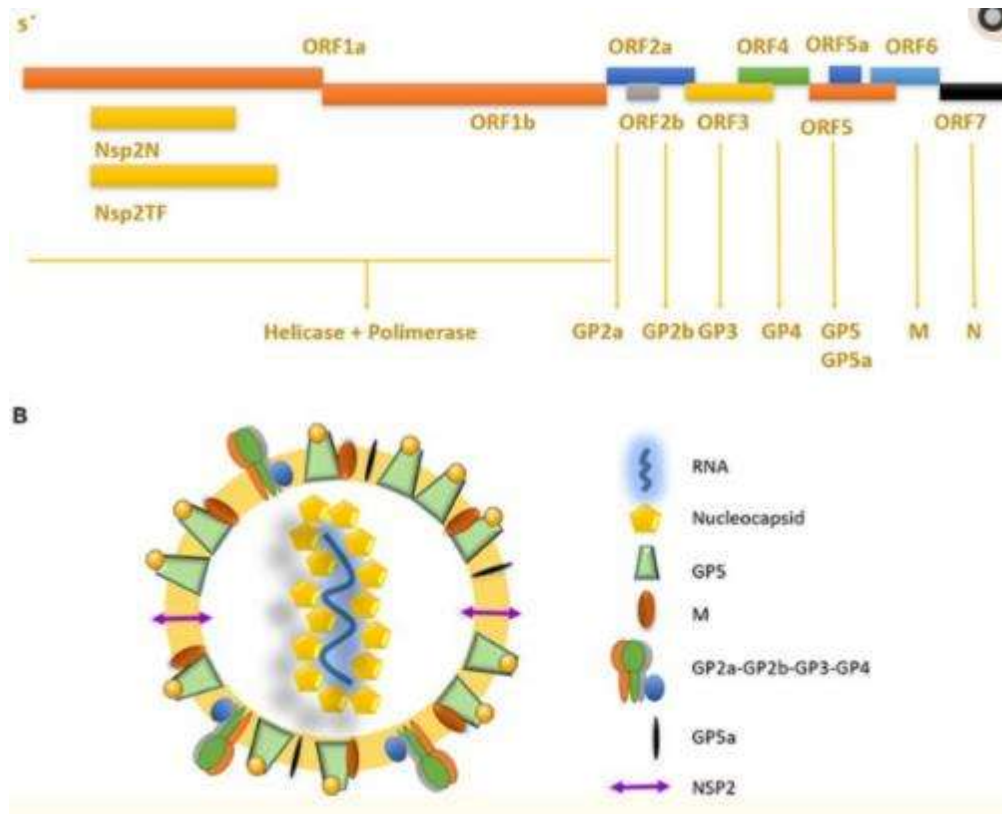


Figura 4. Genoma y estructura de la partícula viral del PRRSV. Representación esquemática del genoma completo del PRRSV. Los ORF 1a-1b abarcan más de la mitad de todo el genoma del virus. En la figura se esquematiza el virión del PRRSV, donde se observa la asociación en heterotrímero de las proteínas GP2a,3 y 4; y la formación del dinero constituido por GP5-M (Tomado de Montaner-Tarbes *et al.*, 2019).

2.8. Tropismo del PRRSV

El cerdo es el único hospedero natural conocido del PRRSV. Al igual que en otros arterivirus, en PRRSV se observa un tropismo selectivo del linaje monocítico, especialmente en macrófagos diferenciados, como macrófagos alveolares, y en menor medida células plasmáticas plasmocitoides (pDC por sus siglas en inglés). En condiciones *In vitro* el PRRSV puede ser propagado en células de riñón de mono verde africano MA-104, y sus derivados como células Marc-145, Vero y CL-2621. La infección de la célula blanco es un proceso mediado a través de receptores celulares tales como heparán sulfato (HS), sialoadhesina (sn), CD 163, CD151 y vimentina (Shi *et al.*, 2015).

Las células diferenciadas del sistema fagocítico mononuclear, tales como macrófagos y células dendríticas, provienen de células mieloides. Las cuales demuestran una heterogeneidad tanto fenotípica como funcional de acuerdo con su estado de activación o maduración, los cuales están determinados por patógenos y/o estados de enfermedad y señales del microambiente celular, da como resultado varios subtipos de estas células, las cuales determinan el resultado de la enfermedad (Singleton *et al.*, 2016a).

2.9 Replicación de PRRSV

El PRRSV entra a la célula blanco posterior a la interacción con proteínas de superficie a través de endocitosis mediada por clatrina. Actualmente se cree que CD163, el cual es un receptor tipo “scavenger”, es el principal receptor que medía la internalización del virión y su desensamble. El genoma del virus es liberado al citosol mediante la acidificación del endosoma temprano y fusión con la membrana de este. (Lunney *et al.*, 2016) Una vez que el RNA genómico (gRNA) es liberado, es usado como RNA mensajero (mRNA) para la traducción de las poliproteínas de replicasa, pp1a-nsp2TF, pp1a-nsp2N, pp1a y pp1ab (Kappes & Faaberg, 2015). A partir de proteinasas virales, también codificadas en el genoma del virus, las 4 poliproteínas son escindidas en 16 proteínas no estructurales, las cuales se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC por sus siglas en inglés). Una vez establecidos estos complejos son anclados a vesículas de doble membrana, las cuales se creen que provienen del retículo endoplasmático, y a partir de estas cadenas de RNA sentido positivo comienzan a traducir a cadenas de RNA de sentido negativo para poder producir RNA de sentido positivo para el ensamblaje de nuevos viriones. A su vez los RTC también traducen RNA subgenómico (sgRNA) los cuales son necesarios para la expresión de proteínas estructurales (Lunney *et al.*, 2016). Ya en etapas tardías de la replicación, una vez ensamblados los viriones ya maduros son acumulados en compartimientos de membrana intracelulares y son liberados en el espacio extracelular a través de exocitosis (Ver Figura 5).(Kappes & Faaberg, 2015)

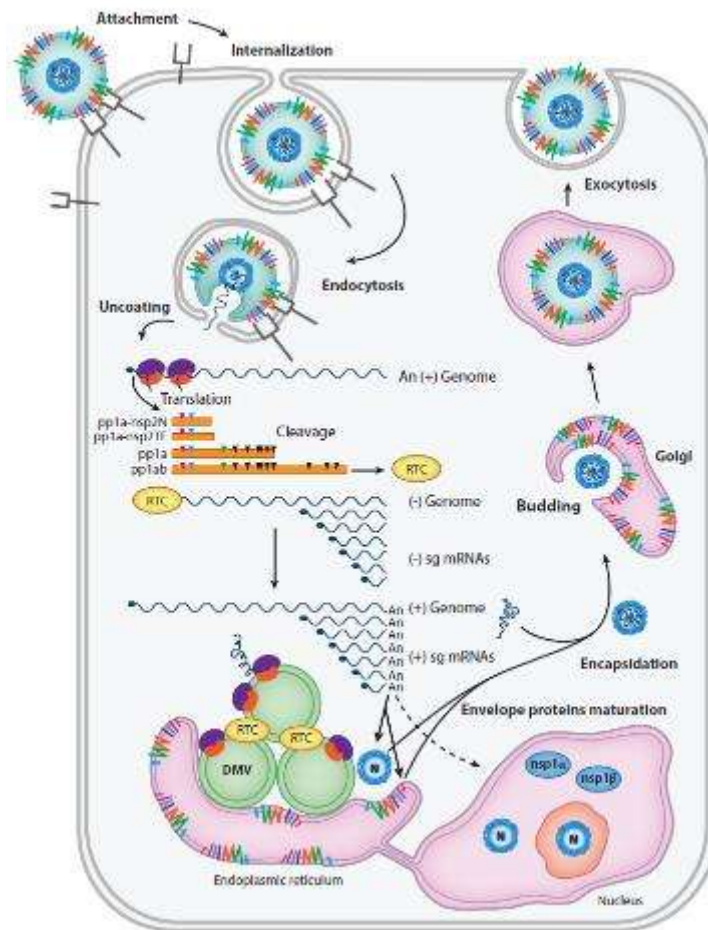


Figura 5. Replicación del PRRSV en el macrófago. Posterior a la interacción con proteínas de superficie de la célula blanco, el virus es internalizado a través de formación de endosomas por cambios en la clatrina de membrana. Una vez dentro el material genómico es liberado por acidificación de endosomas tempranos y por medio de su gRNA comienza a transcribir poliproteínas de replicasa, las cuales son escindidas en 14 proteínas no estructurales las cuales forman los RTC. Encargados de la transcripción de gRNA y sgRNA de sentido negativo que servirán como molde para gRNA y sgRNA sentido positivo para la traducción de gRNA y proteínas estructurales respectivamente. (Tomado de Lunney *et al.*, 2016).

2.10 Proteína GP5

La estructura de la proteína estructural GP5 está comprendida por 200 aminoácidos, en el caso del genotipo americano) la cual contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, que dirige la síntesis proteica al retículo endoplásmico (RE), seguido de un

ectodominio de 30 aminoácidos, el cual contiene sitios de glicosilación, de los cuales N44 y N51 están altamente conservados en la proteína GP5 de diferentes cepas. Después es seguido por una porción altamente hidrofóbica que abarca los aminoácidos 63 a 135, la cual atraviesa la membrana tres veces. Por último, finaliza con una porción citosólica el extremo C terminal (ver figura 6) (Thaa *et al.*, 2008).

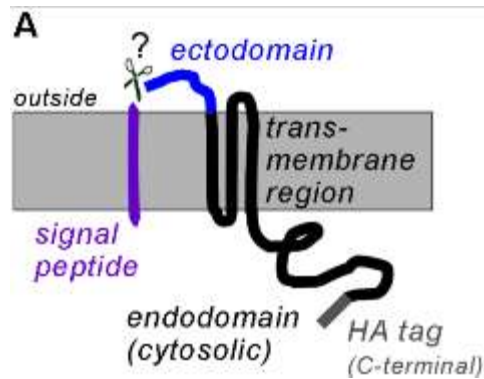


Figura 6. Representación esquemática de la proteína GP5 del PRRSV. En el extremo N terminal se encuentra un péptido señal, seguido de un ectodominio, el cual se sigue por una porción hidrofóbica que atraviesa la membrana 3 veces, y termina en un endodominio intracitosólico en su extremo C-terminal (Modificado de Thaa *et al.*, 2013).

También la proteína GP5 adquiere gran relevancia en su estudio, porque contiene una región inmunodominante con un epítipo neutralizante y a su vez un epítipo señuelo en su ectodominio que aporta a la evasión del sistema inmune del hospedero, a través de la formación de anticuerpos no neutralizantes, que por lo general aparecen 3 semanas PI. La proteína GP5 se asocia a la proteína M las cuales forman un heterodímero a través de puentes disulfuro (Roques *et al.*, 2013).

2.11 Respuesta inmune e infección por PRRSV

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa ante la llegada de un agente patógeno a un organismo, en el caso de infecciones virales es esencial para prevenir la replicación viral y la invasión a mucosas. La respuesta a través de la secreción de interferones del tipo I (IFN α/β) es una de las formas más potentes de la respuesta inmune innata ante la

presencia de virus, a través del cual se expresan varios genes que participan en la eliminación del virus. Virtualmente todas las células nucleadas son capaces de secretar interferones, pero entre los más potentes productores encontramos a los macrófagos y especialmente pDC. Pero se ha observado el PRRSV ha evolucionado mecanismos para la supresión de la secreción de IFN como mecanismo de modulación de la respuesta del hospedero, tanto *in vivo* como *in vitro*, teniendo como resultado una expresión baja de citocinas en cerdos infectados. De las proteínas identificadas como moduladoras de la expresión de citocinas en la célula infectada se encuentran nsp1a, nsp1b, nsp2, nsp4, nsp11, y N. (Montaner-Tarbes *et al.*, 2019)

2.12 Polarización de macrófagos

Los macrófagos son de las células más importantes y más diversas implicadas en la respuesta inmune innata, especialmente para patógenos intracelulares tales como virus, los cuales se encuentran casi en todos los tejidos del organismo. También sirven como puente entre la respuesta inmune innata y celular, al reclutar otras células del sistema inmune como el caso de los linfocitos. Los macrófagos de cerdo guardan ciertas similitudes con los de los humanos, pero a diferencia de estos últimos los de cerdo los podemos dividir en dos subpoblaciones de acuerdo con los CD que expresan en su membrana celular. En las que expresan CD163 y CD16, aunque a diferencia de otros mamíferos estas células no producen óxido nítrico (Kapetanovic, 2012)

Dependiendo de estímulos en el microambiente, estos son polarizados a uno de los dos principales fenotipos (ver figura 7).

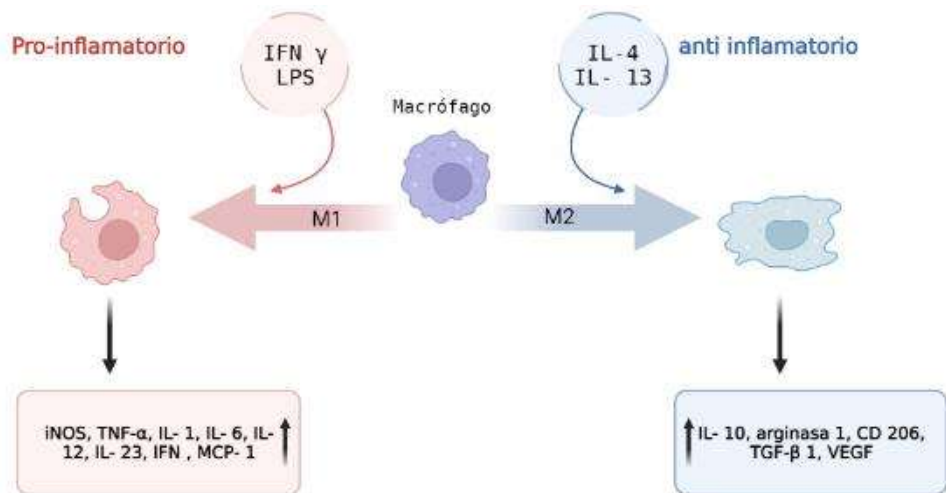


Figura 7. Representación esquemática de la polarización de macrófagos. Estímulos como lipopolisacárido (LPS) o interferones, inducen al macrófago a un fenotipo M1, el cual tiene funciones proinflamatorias. Mientras que estímulos como IL-4,13 y 1° , lo polarizan al fenotipo M2 el cual tiene funciones antiinflamatorias (Realizado Biorender modificado de Lee *et al.*, 2019).

La plasticidad de los macrófagos es una característica distintiva de este tipo celular, el cual representa un equilibrio dinámico entre la actividad proinflamatoria (M1 o clásica) la cual está caracterizada por la secreción de citocinas que inhiben el crecimiento celular de células adyacentes con consecuente daño tisular y la actividad antiinflamatoria (M2 o alternativa) marcada por la producción de citocinas que promueven la proliferación de células adyacentes con reparación tisular. Cada uno de estos fenotipos del macrófago están caracterizados por un perfil de citocinas bien caracterizado que le permite tener funciones específicas en diferentes tejidos dependiendo del contexto del microambiente celular, las cuales son opuestas entre estos fenotipos.(Wang *et al.*, 2014). Para la polarización clásica, principalmente es necesaria la estimulación por IFN- γ y ligación de TLR, lo cual es necesario para la eliminación y remoción de patógenos intracelulares. Por otro lado, la activación alternativa (M2) tiene poca capacidad de neutralización de patógenos, y tienen más funciones de reparación de tejidos (Singleton *et al.*, 2016)

2.13 Vía de señalización NF- κ B:

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) está comprendido por una familia de factores de transcripción los cuales actúan de manera precisa ante diversos estímulos para coordinar diversos procesos en casi todos los organismos multicelulares como la respuesta inflamatoria, diferenciación, proliferación celular y supervivencia de las células. Todos estos procesos tienen un alto grado de precisión y complejidad, por lo que su desregulación ocasiona diversos procesos patológicos. En mamíferos, NF- κ B está constituido por 5 monómeros miembros de la misma familia, p65/RelA, RelB, cREL, p50 (p105 es su precursor) y p52 (p100 es su precursor), los cuales forman homodímeros o heterodímeros. Estos dímeros van a ser distintos dependiendo del tipo celular. Específicamente para macrófagos vamos a encontrar el heterodímero formado por p65 y p50, del cual específicamente p65 va a funcionar como factor de transcripción para diversos genes involucrados en inflamación y proliferación celular (ver figura 8). Esta transactivación se logra mediante la translocación del dímero p65/p50 al núcleo y uniéndose a su elemento *cis* de respuesta. (Mitchell *et al.*, 2016) Haga clic o pulse aquí para escribir texto.

En un estado basal el dímero se encuentra secuestrado en el núcleo por la proteína inhibidora de Kb ($I\kappa B\alpha$). Una vez que los receptores involucrados en la vía son activados, se activa una cascada de señalización que culmina con la fosforilación y subsecuente activación de la quinasa de $I\kappa B$ (IKK). Una vez activada IKK esta fosforila a $I\kappa B\alpha$, la cual subsecuente es ubiquitinizada para su degradación. Una vez que se degrada $I\kappa B\alpha$ va a permitir que el dímero, formado por p65 y p50, se trasloque al núcleo para unirse a su elemento de respuesta para iniciar la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y de proliferación celular (ver figura 9)

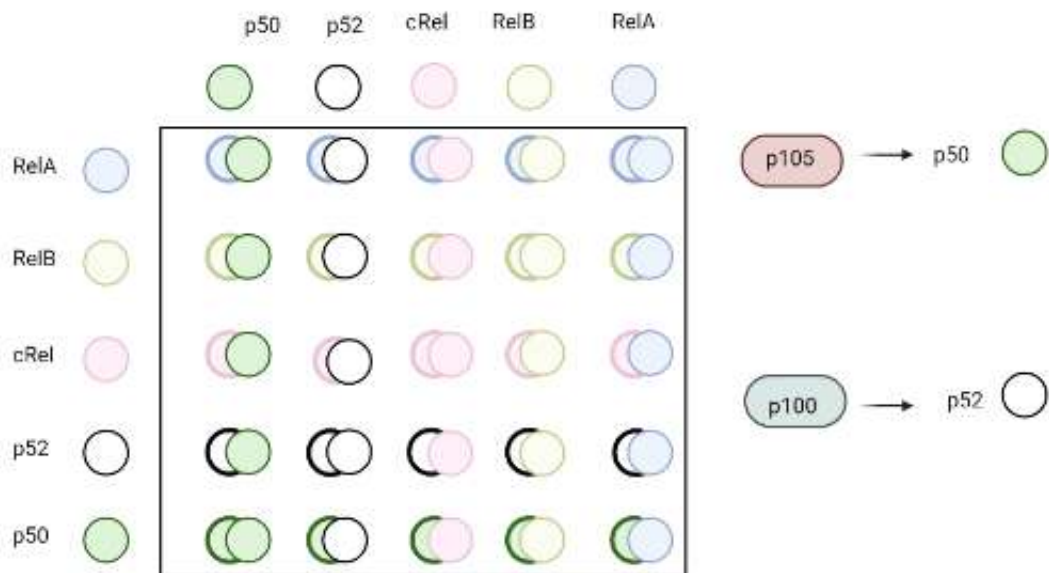


Figura 8. Formación de heterodímeros y homodímeros que componen la vía NF-κB en células eucariotas. Dependiendo del tipo celular, los dímeros que conforman NF-κB varían. En el caso de macrófagos el principal dímero está conformado por RelA (conocido también como p65) y p50. (realizado en Bio-render)

Entre las citocinas más estudiadas capaces de inducir la activación de la vía NF-κB se encuentra IL-1 y TNF, las cuales son rápidamente liberadas en tejido dañado o infección, los cuales son ligando de diferentes receptores celulares con estructuras diferentes, pero utilizan mecanismos de transducción de señales similares que incluye la activación de la cinasa de IκB (IKK) y NF-κB. Se conocen actualmente dos maneras diferentes en la que la vía puede ser activada. Una es la vía canónica la cual es activada a través de moléculas de origen bacteriano y citocinas proinflamatorias, como TNF e IL-1, a través de sus respectivos receptores, lo cual culmina usualmente con la activación y transcripción de diversos genes tanto inflamatorios como antiinflamatorios (Lawrence, 2009).

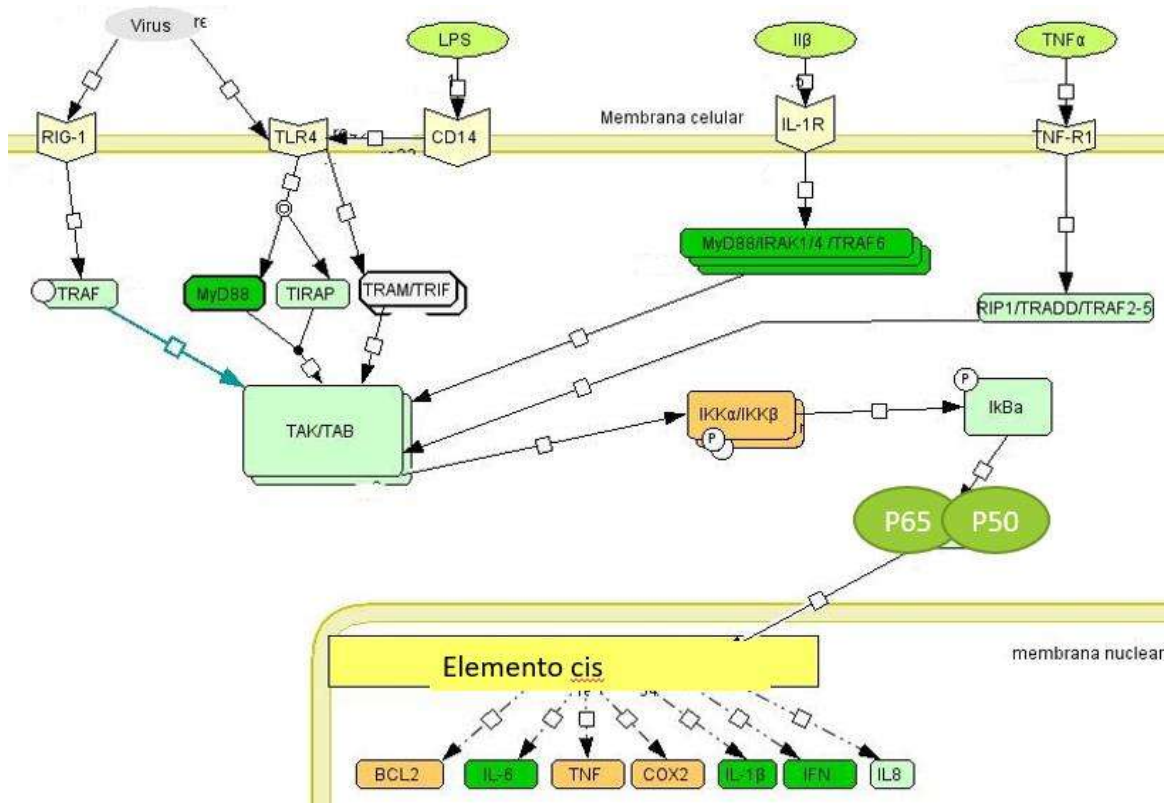


Figura 9. Esquema simplificado de la vía de señalización del NF-κB. La vía puede ser activada a través de la interacción de diferentes receptores como TLR4 y receptores de citocinas como TNF-α e IL-1 con sus respectivos ligando. A partir de esta activación y subsecuente cascada de señalización la proteína IKK es fosforilada y activada Lo cual permite la fosforilación de IκB y su degradación. Esto permite que el dímero p65/p50 se trasloque al núcleo y p65 ejerza su función como factor de transcripción para activar la expresión de diferentes genes relacionados con la inflamación y respuesta inmune.

2.14 Interacción PRRSV/célula blanco y evasión de la respuesta inmune

Los macrófagos alveolares se encuentran estratégicamente en la interfaz entre gases-superficie en la superficie de los alveolos y son los macrófagos predominantes que interactúan con patógenos que ingresan por la vía aérea. Diversos estudios han demostrado aumento la producción de citocinas proinflamatorias por parte de macrófagos alveolares en presencia de patógenos respiratorios, en comparación a animales sanos. Se ha demostrado de esta manera la capacidad del macrófago alveolar para cambiar su fenotipo al fenotipo proinflamatorio M1 (Li *et al.*, 2018).

Se sabe que la proteína CD163 es el principal receptor que medía la interacción entre el virus y el macrófago, a su vez que sialoadhesina (CD169) funciona como mediador para la internalización del virus al interactuar con los ectodominios de GP5/M (Lunney *et al.*, 2016). Una vez que el genoma del PRRSV es liberado al citoplasma de la célula blanco. Este al ser RNA sentido positivo es traducido por los ribosomas de la célula infectada a diversas proteínas no estructurales las cuales interactúan con diferentes proteínas bloqueando la vía de señalización. La vía NF- κ B generalmente se encuentra inactiva en células sin estímulos, dado que el dímero se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína I κ B. Una vez que llega un estímulo proinflamatorio se da la cascada de señalización la cual da lugar a la activación de NF- κ B, traslocándose al núcleo seguido de la expresión de genes específicos que dan lugar a la activación en este caso de macrófagos (Mastropiero., 2014). Se conoce que la expresión de CD163 y sialoadhesina es modulada por citocinas.

En cerdos infectados con PRRSV disminuye la secreción de TNF- α al igual que interferones, las cuales son citocinas antivirales por excelencia, mientras que hay una regulación al alza de IL-10. Lo que permite la replicación en macrófagos y propagación del virus por el organismo debido al bloqueo de la vía NF- κ B.(Sun *et al.*, 2012). La respuesta de interferones es una de las principales maneras en las cuales el organismo actúa ante la infección por virus, esta respuesta está altamente regulada y actúa al poco tiempo de la exposición a interferones.(Schneider, 2014). La supresión de la producción y señalización de interferones es una de las principales características del PRRSV. Se sabe que las proteínas no estructurales nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp4 y nsp11, y la proteína estructural N han sido identificadas como antagonistas de IFN, siendo nsp1 la más potente(Ke & Yoo, 2017) (ver figura 10).

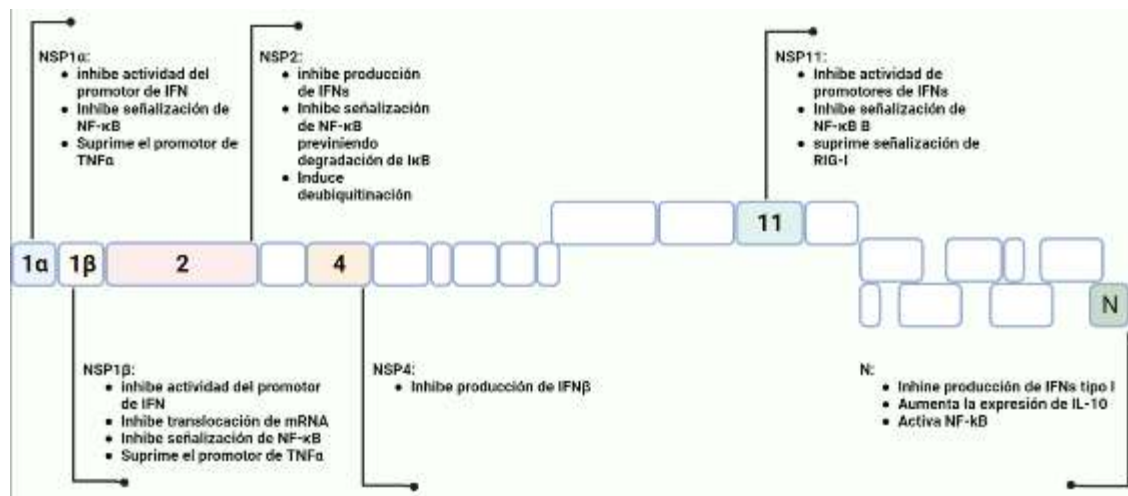


Figura 10. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune mediada por PRRSV. Las proteínas virales funcionan como antagonistas de interferones y de la vía NF-κB (Realizado en BIORENDER y modificado de Yoo *et al*, 2017)

De acuerdo con la figura 10, se puede observar que el PRRSV tiene codificado en su genoma diversos antagonistas de interferones, que permiten al virus evadir la respuesta inmune de la célula huésped, esto permite el aumento de la carga viral debido a la tasa elevada de replicación del virus en la célula hospedera. Tanto nsp1α como nsp1β tienen la capacidad de inhibir interferones tipo I e impiden la función del promotor de IFN, que puede ser a través del bloqueo de componentes cruciales para la expresión de IFN en el núcleo de la célula. A su vez nsp1α inhibe la activación del factor NF-κB. En cuanto a nsp2, esta proteína contribuye a la evasión de la respuesta inmune inhibiendo la fosforilación de IκB y su degradación, resultando en la inhibición de NF-κB dado que este paso es crucial para la activación de esta vía de señalización. Nsp4 se cree que pudiera inhibir también la transcripción de IFN-β. Nsp11 inhibe la traslocación nuclear de IRF3 (factor regulador de interferón 3) bloqueando la producción de interferón mediada por este factor. Por último, la proteína de nucleocápside (N) induce aumento de IL-10. Esta tiene al igual que las proteínas previamente mencionadas la función de inhibir la producción de interferones, y a la vez a través de activación de vías de señalización regula positivamente la expresión de IL-10.

3.- ANTECEDENTES

El genoma de PRRSV tiene un tamaño de aproximadamente 15 kb, el cual contiene once marcos de lectura abiertos (ORF). ORF1a y ORF1b en el extremo 5' del genoma codifica una poliproteína que se procesa en 13 proteínas no estructurales: Nsp1a, Nsp1b y Nsp2 a Nsp12. ORF2-ORF7 en el extremo 3' del genoma codifican cuatro glicoproteínas asociadas a la membrana (GP2, GP3, GP4 y GP5), dos proteínas de membrana no glicosiladas (E y M), y una proteína nucleocápside (N) (Kappes & Faaberg, 2015) .

Se sabe que el complejo formado por las proteínas GP2a, GP2b, GP3, GP4, M y GP5 se une al receptor CD163, y esta interacción es fundamental para el ingreso del virus a la célula (Lunney *et al.*, 2016).

Una de las proteínas más estudiadas es GP5, Se han detectado anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína GP5 (Wang *et al.*, 2016) por lo que esta proteína contiene epítomos neutralizantes. Por otro lado, durante una infección viral la respuesta inmune innata está mediada por la activación de los macrófagos. En el caso de la infección por el PRRSV, esta respuesta se ve afectada porque el virus se replica dentro de los macrófagos y modula su activación a fenotipo M (antiinflamatorio) (Pérez Duran, 2020., datos no publicados). Como antecedente, se conoce que la respuesta inmune innata es un factor imprescindible para eliminar la infección con PRRSV que frecuentemente no se evalúa.

El enfoque actual de las vacunas ha sido priorizado para favorecer la inmunidad adaptativa, sin embargo, la respuesta inmune innata celular tiene un papel preponderante en la neutralización del virus y en la inducción de la respuesta inmune adaptativas de larga duración para la consolidación de respuesta inmune de memoria.(Wahyuningtyas *et al.*, 2021)

De esta manera, los macrófagos activados son importantes en la inmunidad tanto innata como adaptativa porque estimulan la proliferación y activación de los linfocitos a través de la presentación de antígenos y expresión de citocinas. En consecuencia, los macrófagos funcionan como un puente eficaz entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. La respuesta adaptativa funciona través de los linfocitos B y T, porque se genera una respuesta duradera y específica, que a su vez genera memoria inmunológica.

La infección por PRRSV en los cerdos induce una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar, que se caracteriza por el aumento de citocinas proinflamatorias. Las citocinas involucradas en dicha respuesta incluyen a IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α y también, se asocia el reclutamiento de monocitos y neutrófilos al sitio de inflamación. Dado que las citocinas proinflamatorias aumentan y la señalización de NF- κ B está activada en células infectadas por PRRSV, se sugiere que PRRSV activa NF- κ B. La sobreexpresión de NF- κ B media la producción de citocinas proinflamatorias, que se correlaciona con la eliminación del virus del organismo. Datos aún no publicados de nuestro grupo de trabajo mostraron que péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV, que corresponden a epítomos de reconocimiento para linfocitos T, son capaces de inducir la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- α 1, IFN- α 4 IFN- β en macrófagos de ratón. Para conocer si este fenómeno ocurre de la misma manera en macrófagos de cerdo, es decir, el hospedero natural de PRRSV, en este trabajo se evaluó la expresión de dichas citocinas en macrófagos de cerdo.

Anteriormente Vaishisht., 2008, inmunizó cerdos con péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV, después de 6 semanas recolectó los PMBC de sangre periférica e identificó ciertos péptidos que fueron capaces de aumentar el número de células productoras de IFN- γ . En conclusión, se sugirió que la proteína GP5 posee epítomos de reconocimiento para linfocitos T.(Vaishisht *et al.*, 2008). Wahyuningtyas *et al.*, 2021, identificaron dos antígenos recombinantes que surgieron de la unión del ORF5, ORF6 y ORF7, los cuales codifican para las proteínas GP5, la M y N, los denominó A1 y A2 (a partir de PRRSV genotipo americano). El antígeno A1 se conjugó con epítomos de células T, el cual se construyó uniendo estos epítomos a la secuencia completa del ORF5 y la secuencia parcial del ORF6 y A2 con elementos lipídicos. Los dos antígenos se utilizaron para evaluar la regulación de la activación de macrófagos alveolares. Los resultados mostraron que la inmunización con el antígeno A1, favoreció la disminución de la expresión de CD163+, la cual fue acompañada por una marcada elevación de la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias. También, se demostró que los macrófagos tienen la capacidad de inducir la activación de linfocitos Th1 en co-cultivo mediante el aumento de citocinas involucradas en la activación de linfocitos Th1. Las citocinas se detectaron por medio de ELISA (Wahyuningtyas *et al.*, 2021) (ver tabla 1)

Otros autores valoraron la respuesta inmune adaptativa ante proteínas del PRRSV. Por ejemplo, Wang inóculo ratones y cerdos con un adenovirus recombinante que expresaba GM-CSF-GP3-GP5, posteriormente se hizo valoración de la respuesta en estos modelos, lo que encontró fue un aumento de anticuerpos circulantes contra PRRSV GP3/GP5 (Wang *et al.*, 2009) (ver tabla 2)

En nuestro grupo de trabajo, también, hemos explorado la participación de la vía de señalización NF- κ B como posible ruta de la regulación en respuesta a los péptidos.(Piña Díaz, 2021) Debido a que es una de las principales vías de regulación de la activación de macrófagos a fenotipo proinflamatorio ante diversos estímulos como agentes virales, bacterianos e inclusive de daño celular.

En este trabajo se exploró la participación de la vía de señalización NF- κ B en la activación de macrófagos de cerdo y su perfil de expresión de citocinas, inducida por péptidos de reconocimiento de linfocitos T derivados de la proteína GP5. La activación de la vía de NF- κ B se evaluó a través de la fosforilación del factor de transcripción de p65, y una vez que es activado se transloca al núcleo para unirse a su elemento de respuesta y regular la expresión de diversos genes involucrados en procesos inflamatorios, de crecimiento y señalización celular.

Los macrófagos alveolares de cerdo, al ser la célula blanco principal del PRRSV y el cerdo al ser el único hospedero del virus, son un excelente modelo para explorar la interacción de epítomos inmunodominantes de la proteína GP5 con la respuesta inmune innata del huésped, para determinar factores de protección contra el PRRSV.

Tabla 1. Análisis de activación de células en respuesta a péptidos virales.

Hallazgo	Referencia
Activación PBMC productoras de IFN- γ en respuesta a péptidos derivados de GP5	Vashisht.,2008
Adenovirus recombinante que expresaba GM-CSF-GP3-GP5 induce secreción de anticuerpos específicos contra GP3 y GP5	Xinglong Wang.,2009
Identificación de epítomos T inmunodominantes	Diaz.,2009
La proteína N activa la vía NF- κ B	Ke.,2019
Activación de macrófagos de ratón en presencia de péptidos derivados de la proteína GP5	Piña Diaz.,2021

Tabla 2. Análisis de la polarización de macrófagos en respuesta a diferentes estímulos.

Estímulo	Hallazgo	Referencia
HP-PRRSV	Aumento de mRNA de diferentes citocinas proinflamatorias en macrófagos m1	Longtao Wang.,2017
Antígenos recombinantes	Polarización de macrófagos a fenotipos proinflamatorios	Wahyuningtyas.,2021
Membrana de polilactida	Inducción de polarización de macrófagos a fenotipo M1 con aumento de mRNA para TNF- α e IL-6	Shuo Wang.,2021
Vesículas de membrana externa de A. pleuropneumoniae	Modulación de la polarización de macrófagos	Zhu.,2022
Proteína N de SARS-CoV-2	Modulación de la respuesta inmune con proteína N	Chen.,2022

La activación de la vía NF- κ B está relacionada con la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1. Por ejemplo, Wang demostró la polarización de monocitos de ratón al fenotípico M1 mediada por la activación de NF- κ B en presencia de una membrana de ácido poliláctico (un biomaterial también conocido como polilactida). Al contrario, el bloqueo de esta vía causa un cambio al fenotipo M2 lo cual disminuye la inflamación. De esta manera, Wang demostró que la activación de macrófagos está altamente regulada a través de la traslocación nuclear de la subunidad p65, por lo que el microambiente en el que se encuentra la célula es determinante para la polarización del macrófago, y esto se logra mediante la activación de la vía NF- κ B en este caso (S. Wang *et al.*, 2022).

Por otra parte, durante la infección por PRRSV, se encontró que en la infección se aumenta la expresión de TNF- α e IL-1 β y a su vez estas citocinas aumentan su expresión mediante retroalimentación positiva. lo que se traduce en un aumento de la inflamación y daño tisular. También se encontró que las proteínas no estructurales de PRRSV suprimen la activación de la vía NF- κ B dando como resultado una disminución de las citocinas como TNF- α e IL-1 β ; Mientras que las proteínas estructurales, como E y N, son capaces de inducir activación de NF- κ B (Ke *et al.*, 2019)

Durante la activación de la vía NF- κ B se induce la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias. Entre las que analizamos en el presente trabajo tenemos IFN- γ . Esta citocina es un interferón de tipo II la cual es importante para potenciar la respuesta inmune en enfermedades virales y cáncer. Esto lo logra aumentando la capacidad de presentación de antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno (APC). También esta citocina potencializa la capacidad de los macrófagos de neutralizar agentes patógenos dentro del organismo, e induce una sobre expresión de MHC-II la cual es esencial para la presentación de antígeno a linfocitos. (Kak *et al.*, 2018a). Por otro lado, tenemos al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que actúa como un mediador de la respuesta inmune ante agentes infecciosos. TNF- α es secretado principalmente por macrófagos y DC que al unirse a su respectivo receptor induce la activación de factores de transcripción como NF- κ B. A su vez, IL-1 ejerce funciones similares a las de TNF- α en la defensa del huésped

mediante la activación de factores de transcripción relacionados con inflamación y respuesta a estrés celular como AP-1 y NF- κ B (Abbas, 2018)

La activación de la vía NF- κ B se conoce que puede ser inducida a través de las citocinas previamente mencionadas. Pero a su vez también puede ser activada mediante la estimulación por antígenos virales de naturaleza peptídica como se mencionó previamente en esta sección. Por lo que nuestro grupo de trabajo realizó análisis de la literatura en cuanto a la proteína GP5 del PRRSV, de esto se pudieron identificar en su secuencia dos péptidos altamente inmunogénicos, denominados GP5T1 y GP5T2. De estos dos péptidos mediante el análisis *in silico* se encontraron posibles epítomos de reconocimiento para linfocitos T cuyas secuencias se encuentran altamente conservadas entre las cepas del PRRSV. Además, debido a la inmunogenicidad predicha para estos dos péptidos se diseñó un tercer péptido, denominado GP5T3, el cual resulta de la fusión de GP5T1 y GP5T2.

4.- JUSTIFICACIÓN

El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) afecta a cerdos de todas las edades produciendo alta morbilidad. PRRSV es considerado un virus importante a nivel mundial por las pérdidas económicas en la industria porcina. Las células blanco del virus son los macrófagos alveolares, los cuales interactúan con un complejo heterotrimérico de glicoproteínas virales (Loving *et al* 2015) y el receptor CD163 para facilitar la infección. En la interacción virus-célula blanco destaca la proteína GP5, la cual es la más abundante en la envoltura del virus. GP5 podría poseer epítomos capaces de evadir la respuesta inmune lo cual facilita la permanencia del virus en el hospedero. Por otro lado, la proteína GP5 pudiera tener secuencias peptídicas involucradas en la activación de macrófagos.

En este trabajo se estudió la activación de monocitos estimulados con péptidos de GP5, los cuales contienen epítomos de reconocimiento para células T. Esto, a través del análisis de la activación de la vía de señalización NF- κ B mediante la detección de la subunidad p65 fosforilada y la evaluación mediante un sistema de reportero. El objetivo fue determinar la capacidad de los péptidos para activar macrófagos y estimular una respuesta inflamatoria.

5.- HIPÓTESIS

Los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 serán capaces de regular la expresión de NF- κ B en macrófagos alveolares de cerdo.

6.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la activación de la vía NF- κ B en macrófagos alveolares de cerdo en respuesta a péptidos de la proteína GP5 de PRRSV.

7.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la fosforilación de la subunidad p65 (p-p65) de la vía NF- κ B en macrófagos alveolares de cerdo estimulados con los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV.

2. Evaluar la activación de la vía NF- κ B en macrófagos alveolares de cerdo después de la estimulación con los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV

3. Evaluar la expresión de citocinas asociadas a la activación de macrófagos de cerdo, después de la estimulación con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3.

8.- METODOLOGÍA

8.1 Materiales y métodos

8.1.1. PÉPTIDOS Y ESTÍMULOS

A partir de análisis bioinformático, se obtuvieron 3 péptidos por síntesis química. Los péptidos corresponden a secuencias altamente conservadas de la proteína GP5 del virus PRRSV y teóricamente son epítomos de reconocimiento para linfocitos T (Tabla 3). Las secuencias de estos péptidos conservan un alto grado de homología de aproximadamente un 80% entre los dos genotipos descritos (Piña Díaz, 2021).

El ensayo de estimulación se estableció de acuerdo con la literatura y con hallazgos previos de nuestro grupo de trabajo (ver tabla 4).

Tabla 3. Características de los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV. (modificado de Piña Diaz 2021)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Características		
		Longitud	P.I.	P.M.
GP5T1	KGRLYRWRSPVIVEK	15 aa	11.12	1,887.24 Da
GP5T2	LAALICFVIRLAKNC	14 aa	10.17	1,544.95 Da
GP5T3	KGRLYRWRSPVIVEKLAALICFVIRLAKN C	29 aa	10.7	3,414.18 Da

Tabla 4. Estímulos empleados para inducir la polarización de macrófagos alveolares de cerdo, de acuerdo con el fenotipo asociado.

Estímulo	Fenotipo asociado	Referencia
Dexametasona	M2	(Desgeorges <i>et al.</i> , 2019)
Il-10	M2	(Makita <i>et al.</i> , 2014)
TNF- α	M1	(Ait-Lounis & Laraba-Djebari, 2015)
Lipopolisacárido	M1	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
Péptido GP5T1	M1	(Piña Díaz, 2021)
Péptido GP5T2	M1	(Piña Díaz, 2021)
Péptido GP5T3	M1	(Piña Díaz, 2021)

8.1.2. LÍNEA CELULAR DE MACRÓFAGOS DE CERDO 3D4/31 (ATCC® CRL-2844™)

La línea celular se obtuvo a través del proveedor American Type Culture Collection (ATCC) (ver figura 11). Es una línea celular de macrófago alveolar de cerdo (*Sus scrofa*) inmortalizada con el antígeno T grande del virus simio 40 (*Simian virus 40 -SV40-* por sus siglas en inglés). Esta línea celular mielomonocítica tiene diversas aplicaciones en virología e inmunología porcina. Fue establecida en diciembre de 1998 al transfectar exitosamente macrófagos alveolares de cerdo con el plásmido pSV3neo, el cual contiene el gen para resistencia a neomicina y el antígeno T grande de SV40. (American Type Culture Collection 2020). Esta línea celular estable tiene la capacidad de ser inducida a los fenotipos M1 como M2 ante diversos estímulos, produce interferones y tiene relevancia al ser epitelio pulmonar en contexto del PRRS.

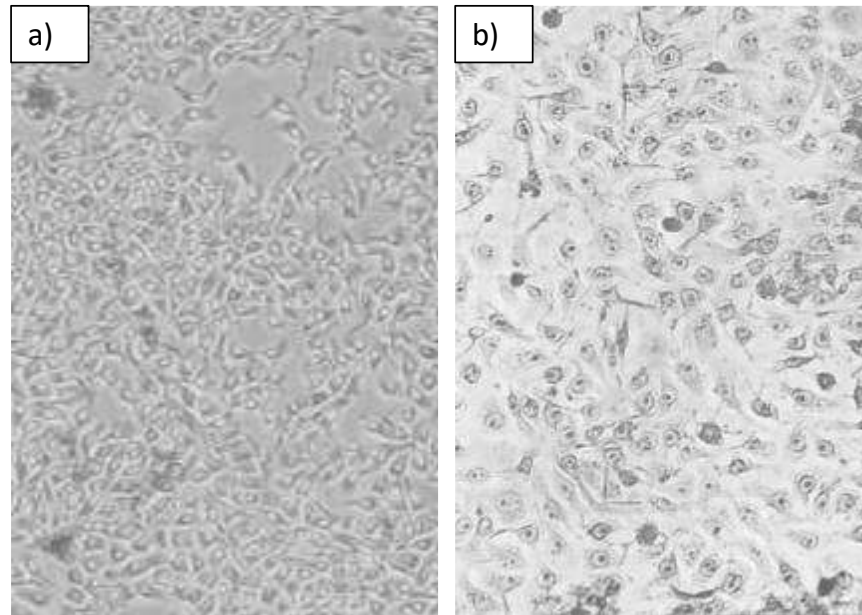


Figura 11. Fotomicrografía representativa de macrófagos de cerdo (Línea celular 3D4/31). Estas líneas mielomonocíticas tienen una amplia variedad de aplicaciones en virología e inmunología porcina. (3D4/31 CRL-2844™). Microscopio de contraste de fases, con magnificación: a) 4x y b) 40x

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (SIGMA) adicionado con suero fetal bovino (Gibco) al 10%, estreptomycin como antibiótico y anfotericina B (Gibco) como antifúngico. Las células se incubaron a 37.5° C y CO₂ al 5%.

Todas las fotomicrografías del presente trabajo se realizaron con cámara Nikon Coolpix P6000 acoplada a microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

8.1.3. SISTEMA DE VECTORES REPORTEROS *CIS*

Los sistemas de porteros *cis* son utilizados para valorar la activación o la inhibición de vías de señalización, y sus efectos en la expresión de genes involucrados en la vía evaluada. Esto se logran fusionando elementos de respuesta específicos con genes que codifican para una proteína reportera. Al valorar la presencia o ausencia del gen reportero se valora de manera indirecta la activación de la vía de interés.

El sistema de reporteros *cis* consiste en un plásmido con un promotor TATA y el gen reportero de la proteína verde fluorescente humanizada (hrGFP). En este trabajo se utilizó el sistema de vectores reporteros PathDetect (Agilent Technologies, específicamente, el sistema reportero pNF- κ B-hrGFP) (ver figura 12). En el caso de este plásmido el elemento de respuesta de NF- κ B se encuentra unido a la unidad reportera que consiste en un promotor sintético (TATA) y el gen de la proteína verde fluorescente humanizada (hrGFP) (ver figura 13).

Este plásmido contiene su origen de replicación bacteriano (pUC), un gen de resistencia a ampicilina para amplificación y selección en procariontes, y a su vez también contiene otro gen de resistencia a higromicina b para selección en células eucariotas.

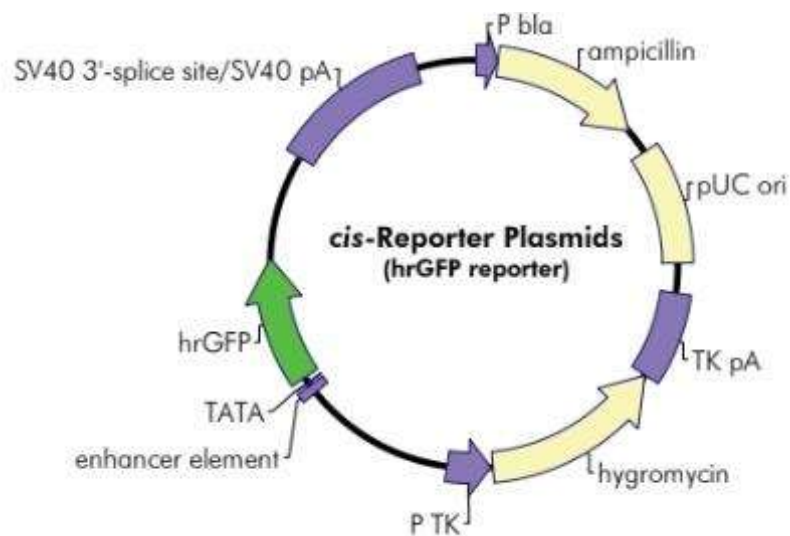


Figura 12. Plásmidos reporteros *cis* hrGFP . (Tomado de Agilent Technologies, 2019). El sistema de reportero se utiliza para monitorear la activación de la vía NF- κ B mediante la expresión de la hrGFP la cual se transcribe cuando p65 se une a su elemento de respuesta.



Figura 13. Representación esquemática del vector NF- κ B del sistema de Reporteros *cis*-hrGFP.

8.1.4 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Se realizó la transformación de bacterias competentes XL-1 con el plásmido pNF- κ B-hrGFP, utilizando la metodología de choque térmico. El procedimiento consistió en colocar 200 μ l de las bacterias más 1 μ g del plásmido en tubos de polipropileno y darles un ciclo de enfriamiento 30 min a 4° C. Después se aplicó el choque térmico poniendo el tubo en baño maría 45 segundos a 42°C, pasándose de nuevo durante 5 minutos a 4° C. (Froger & Hall, 2007)

8.1.5 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO A PEQUEÑA ESCALA

Después de la transformación bacteriana, se incubaron las bacterias durante 24 h a 37° C y agitación de 250 rpm. Por cada 2 ml de caldo Luria Bertani (LB) se adicionó ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml, el cual funcionó como antibiótico de selección.

Posteriormente, se realizó la extracción del plásmido utilizando el protocolo CTAB. Se prepararon alícuotas de bacterias en tubos polipropileno de 1ml. Seguido de centrifugación 12,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se obtuvo una pastilla que posteriormente se resuspendió en 300 μ l de solución STET más lisozima (20mg/ml). Después esta mezcla homogénea se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Después, los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 50 segundos, seguido de centrifugación durante 10 min a 12,000 rpm. El moco bacteriano, obtenido después de la centrifugación, se precipitó con solución TAB al 5% y se incubó durante 5 min a TA. De nuevo se centrifugó a 12,000 rpm. La pastilla obtenida fue resuspendida en NaCl al 1.2 M, completándose con un volumen de isopropanol frío para centrifugar el tubo

10 min a 12,00 rpm. Por último, se desechó el sobrenadante, los tubos se secaron a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 30 µl de H₂O Milli-Q.(Green & Sambrook, 2018)

El plásmido fue cuantificado con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

8.1.6 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA (MÉTODO DE LISIS ALCALINA)

Se utilizaron las enzimas de digestión EcoR1, Xba1 y BamH1, para determinar las clonas bacterianas que contenían el plásmido pNF-κB-hrGFP. La preparación del mix de digestión enzimática se realizó con una mezcla de volumen de Buffer apropiado para cada enzima, volumen de enzima, concentración del plásmido a analizar y H₂O desionizada (Milli-Q) para aforar a volumen final de 10 µl.

Una vez identificada una clona bacteriana pura que contenía el plásmido descrito anteriormente, se realizó el inóculo en 200 ml de medio LB adicionado de 100 µg/ml de ampicilina. Seguido de incubación a 37° C y en agitación a 250 rpm.

El medio de cultivo que contenía las bacterias se colocó en tubos cónicos de 50 ml para centrifugarse 15 min a 5,000 rpm. Una vez retirado el sobrenadante, se agregaron 15 ml de la solución I, se mezcló bien y se dejó reposar por 5 minutos a TA. Posteriormente se agregó 15 ml de la solución II y se dejó reposar por 5 minutos a TA. Después se agregó 15 ml de solución III para dejarse reposar 5 min a TA. Después se filtró con fibra de vidrio y la solución filtrada se recuperó en un tubo nuevo de 50 ml. El contenido se aforó a 45 ml con isopropanol y se dejó reposar por 24 h a 4° C para precipitar el DNA.

Después de 24 h, se centrifugaron los tubos durante 20 min a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 750 µl de etanol al 70% frío. Después se colocó el sedimento en un tubo de 1.5 ml. Se centrifugó 5 min a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se centrifugó 4 minutos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 5 µl de RNAsa y se homogenizó con vórtex. Se incubó 1h en baño maría a 37°C. Se adicionó un volumen de PEG 800 (Polietilenglicol al 13% + NaCl 6M) y se incubó durante 5 minutos a TA. Se centrifugó 15 min a 12,000 rpm. Se desechó

el sobrenadante. Posteriormente la pastilla obtenida se lavó con etanol frío al 70% y se secó el tubo y la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua Milli Q. (descrito en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001).

La concentración del plásmido fue cuantificada con el equipo NanoDrop 2000.

8.1.7 CURVA DE RESISTENCIA A HIGROMICINA

Con la finalidad de obtener una línea estable de macrófagos de cerdo (línea 3D4/31) que expresarán de manera constitutiva el plásmido reportero pNF-κB-hrGFP, se realizó una curva de resistencia a higromicina. Este plásmido contiene el gen de resistencia a higromicina que codifica para un polipéptido que degrada a la higromicina. Este antibiótico soluble pertenece a la familia de los aminoglucósidos y se obtiene partir de *Streptomyces kanamyceticus*. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas tanto en procariotas como eucariotas. Es un antibiótico de selección comúnmente utilizado en ensayos con células eucariotas y procariotas.

Para determinar la curva de sensibilidad se sembraron 3×10^5 células por pozo en cajas de 6 pozos (marca Corning) en concentraciones crecientes de higromicina.

A partir de un stock de higromicina B (50 mg/mL) se seleccionaron concentraciones finales de trabajo de 50, 100, 150, 200 y 400 µg /mL de medio en pozos por duplicado y un control sin antibiótico para cada dosis. Luego de 6 días de selección se determinó la viabilidad celular y concentración mínima citotóxica.

8.1.8 TRANSFECCIÓN ESTABLE DE MACRÓFAGOS DE CERDO (ATCC 3D4/31) CON EL PLÁSMIDO PNF-κB-hrGFP.

Para la transfección estable de macrófagos de cerdo con plásmido pNF-κB-hrGFP se utilizó polietilamina (PEI). PEI es un polímero catiónico que condensa el DNA en partículas con carga positiva las cuales se unen a las superficies aniónicas de la membrana celular, posteriormente el complejo DNA: PEI es internalizado en la célula mediante endocitosis y liberado en el citoplasma (Longo *et al.*, 2013).

Para la transfección se utilizaron células con más de 5 pasajes, libres de contaminación y completamente adaptadas al medio de cultivo como indica el protocolo. En una caja de 12 pozos se sembraron aproximadamente 1×10^5 células por pozo 24 h. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia aproximadamente de 80% se realizó la transfección con PEI. Los complejos PEI: ADN se prepararon en una relación 3:1 de la siguiente manera. Primero, en un microtubo de 1.5 ml se agregaron 124 μ l de medio OPTIMEM, posteriormente se agregaron 3 μ g de PEI, luego se agregó 1 μ l del plásmido pNF- κ B-hrGFP. Para la transfección, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se cambió por medio nuevo (RPMI 1640 SFB 10%). La mezcla bien homogeneizada de PEI: DNA se agregó por goteo y se incubó por 24 h a 37° C. Posteriormente, el medio se sustituyó por medio fresco con 200 μ g/ml de higromicina. El medio se cambió cada tercer día y la evaluación de las clonas resistentes se realizó al día 6 post selección. De esta manera se obtuvo una línea policlonal pNF- κ B-hrGFP 3D4/31.

8.1.9 ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN EN MACRÓFAGOS 3D4/31-pNF-KB-hrGFP

Las células pNF- κ B-hrGFP 3D4/31 fueron sembradas 24 h antes en placas de 96 pozos blanco y negro (Nunc) a una concentración de 1.5×10^4 por pozo en 100 μ l medio RPMI 1640 completo con higromicina a una concentración de 200 μ g/ml. Para el ensayo de estimulación se retiró el medio y se agregó medio RPMI 1640 fresco al 10% de SFB sin higromicina adicionado con los diferentes estímulos: el estímulo control, LPS, DEXA, TNF- α ; péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 a las concentraciones enlistadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Moléculas utilizadas como estímulos en cultivos de macrófagos porcinos. Las concentraciones utilizadas para estimulación fueron estandarizadas previamente en nuestro grupo de trabajo de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Estímulo	Concentración
Sin tratamiento (control)	---
Dexametasona (-)	1 µg/ml
TNF-α (+)	50 ng/ml
LPS (+)	1 µg/ml
GP5T1	5 µg/ml
GP5T2	5 µg/ml
GP5T3	5 µg/ml

8.1.10 EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN MACRÓFAGOS DE CERDO

Se evaluó la activación de la vía NF- κ B en macrófagos de cerdo estimulados con péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV mediante la cuantificación de fluorescencia a las 8 h de estímulo en las condiciones mencionadas en el punto 8.1.10.

Las células con los estímulos fueron incubadas durante 8h. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector de microplacas (Thermo Scientific Varioskan LUX) a una longitud de onda de 480/520 nm. Los datos obtenidos en unidades relativas de fluorescencia (RFU) fueron analizados con el software estadístico Graphpad Prism 8.

8.1.11 EXPRESIÓN DE CITOCINAS

La concentración de citocinas, en el sobrenadante de los cultivos celulares, se cuantificó mediante ensayos luminex. Las citocinas evaluadas fueron: IFN α ; IFN- γ ; IL-1 β ; IL-10; IL-12/IL-23p40; IL-4; IL-6; IL-8 (CXCL8) y TNF α .

Los macrófagos fueron estimulados con las concentraciones referidas en la Tabla 5. Después de 8 horas de estimulación, se recuperó el sobrenadante para el análisis en la plataforma luminex.

La tecnología luminex utiliza microesferas de 6.5 micrones que contienen un núcleo magnético y una superficie de poliestireno. Las esferas están teñidas con proporciones precisas de fluoróforos rojos e infrarrojos, los cuales son detectados por el equipo luminex xMAP (marca Thermofisher). La unión de diferentes anticuerpos a diferentes esferas permite el análisis de diferentes analitos en un solo pozo.

Para este experimento se utilizaron 50 μ l de sobrenadante de medio de cultivo de macrófagos estimulados y el protocolo se realizó como indica el fabricante.

8.1.12 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Previo a la estimulación, se cultivaron células 3D4/31 en una caja de 100 mm para valorar su crecimiento y confluencia a 24 horas posteriores a ser tripsinadas y sembradas en cada uno de los pozos. La evaluación de las células por medio de microscopía de contraste de fase nos indicó que las células no se activaron indirectamente en respuesta al estrés por aumento de confluencia o disminución de nutrientes; por lo que se continuó con el experimento. Una vez obtenida una caja de 100mm a una confluencia de 80%, la caja fue lavada con PBS, las células fueron tratadas con tripsina y contadas en cámara de Neubauer para sembrarse en la caja de 6 pozos. Se estableció que la concentración de células necesarias para una confluencia de 70 a 80 % es aproximadamente de 350,00 células, en las siguientes condiciones: medio RPMI completo con SFB 10%, incubación a de 37° con CO₂ al 5%, durante 19 a 22 horas. Los macrófagos fueron estimulados durante 8 h con las concentraciones referidas en la Tabla 5.

Para la lisis de las células se utilizó el buffer RIPA el cual lisa componentes celulares debido a que contiene detergentes iónicos y no iónicos. A su vez solubiliza proteínas

minimizando la degradación de proteínas, manteniendo su inmunorreactividad y actividad biológica. También se le agregan inhibidores de proteasas (PMSF) (ver tabla 6).

Tabla 6. Contenido del buffer RIPA.

Buffer RIPA
Tris al 50mM con un PH 7.4
NP-40 al 0.5%
NaCl al 100mM
PMSF al 100mM
Inhibidor de proteasas “complete mini” ROCHE

8.1.13 PROCEDIMIENTO CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la cuantificación de las proteínas obtenidas de macrófagos de cerdo, se utilizó método de Bradford (Bradford, 1976a). Este método tiene como principio la reacción colorimétrica de las proteínas con el reactivo de Bradford (BIORAD) para el cual se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm por espectrofotometría. En este protocolo se hace uso de albumina sérica de bovino a concentraciones conocidas para generar la curva de referencia para la cuantificación (Bradford, 1976).

En una caja de 96 pozos se realizó una curva estándar poniendo en cada pozo, por duplicado, concentraciones crecientes de BSA (0,1,2,4,6 y 8 μg) en agua mili Q para un volumen final de 100 μl . A su vez se agregó 1 μl de las proteínas a cuantificar en 99 μl de agua. A los pozos con BSA y proteínas se agregaron 100 μl por pozo de reactivo de Bradford, lo que da como resultado un cambio diferencial del color dependiendo de la concentración de proteína en el pozo el cual se midió a través de su absorbancia en lector de microplacas. La cuantificación de absorbancia de las proteínas extraídas se comparó con la de la BSA.(Bradford, 1976b)

8.1.14 WESTERN BLOT

Se realizó un ensayo de Western Blot para detectar la fosforilación de la subunidad p-p65 NF- κ B como métrica indirecta para valorar su activación y traslocación al núcleo.

El Western blot consiste en una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% de proteínas desnaturalizadas que son evidenciadas a través de un anticuerpo de captura específico para la forma fosforilada de la proteína p65.

Primero, se obtuvieron los extractos de proteínas de células 3D4/31 estimuladas como se describió en el punto 8.1.10. Se realizó electroforesis de la proteína extraída (10 μ g por pozo en 3 μ l de buffer de carga) por triplicado en gel de acrilamida al 10% en cámara mini-PROTEAN tetra cell (BIO-RAD).

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en Trans-blot SD Semi-dry transfer cell (BIO-RAD). La membrana se bloqueó con leche en polvo al 2% en PBS-Tween al 0.05% durante toda la noche.

Posteriormente se incubó con un anticuerpo de captura contra p-p65 hecho en conejo (Phospho-NF-KB P65 (Ser536) (93H1) Rabbit MAb | Cell Signaling Technology, n.d.) a una concentración de 1:1000 en PBS-tween al 0.05% durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS-Tween al 0.05%. Después de incubó durante 2 h con un anticuerpo secundario contra IgG de conejo hecho en ratón asociado a fosfatasa alcalina a una concentración de 1:1000 en PBS-tween al 0.05%. (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Cell Signaling Technology). Después la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.05%.

La membrana se reveló durante 15 min en agitación con kit comercial de revelado AP conjugate substrate kit (marca BIO-RAD).

9.- RESULTADOS

9.1 CURVA DE RESISTENCIA A HIGROMICINA

La concentración mínima tóxica de higromicina en los cultivos de células 3D4/31 se determinó mediante una curva de resistencia. Una vez transcurridos seis días de iniciada la evaluación se encontró que la dosis mínima citotóxica fue de 200 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, los ensayos para la selección de clonas portadoras del plásmido pNF- κ B-hrGFP se realizaron utilizando esta concentración de antibiótico.

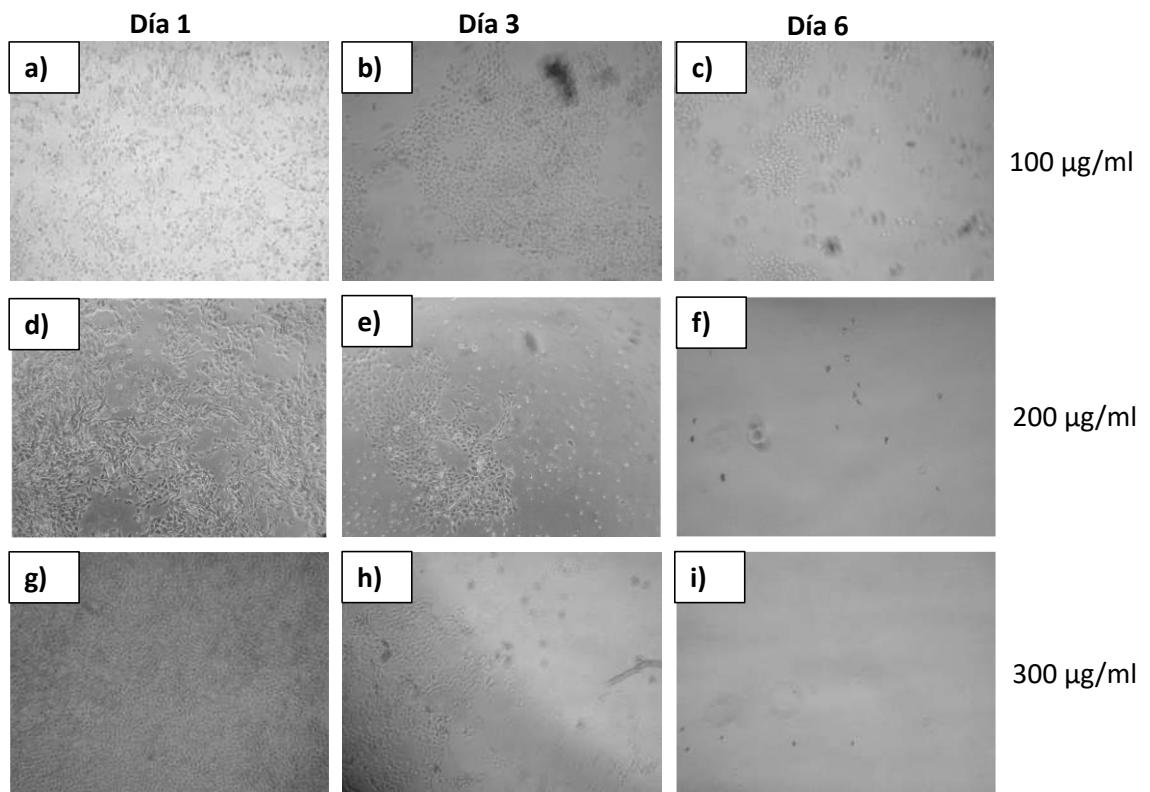


Figura 14. Evaluación de la resistencia a higromicina en macrófagos de cerdo Se cultivaron macrófagos de cerdo en condiciones estándar con higromicina en diferentes concentraciones. Al día seis no se observaron células viables con las concentraciones 200 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ se eligió para la selección de los macrófagos transfectados con el plásmido pNF- κ B-hrGFP.

9.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Para evaluar la activación de la vía NF- κ B en macrófagos de cerdo se obtuvo la línea pNF- κ B-hrGFP 3D4/31 transfectándose con el plásmido con gen reportero pNF- κ B-hrGFP utilizando PEI. Las células de la línea policlonal pNF- κ B-hrGFP 3D4/31 fueron estimuladas con LPS, DEXA, TNF- α como controles y péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 como estímulos experimentales. A las 8 h post-estimulación GP5T1, GP5T2 y GP5T3 indujeron un aumento en las unidades relativas de fluorescencia en comparación con el control. La fluorescencia del gen reportero GFP indica la activación de la vía NF- κ B.

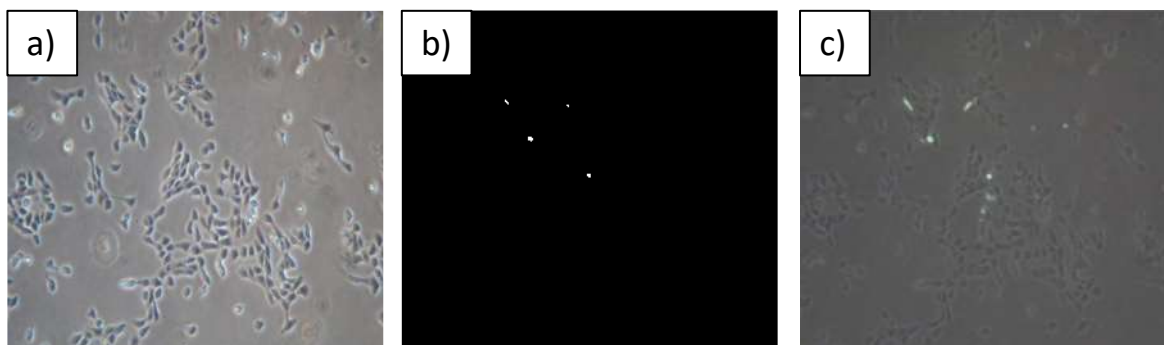


Figura 15. Expresión de hrGFP en macrófagos de cerdo transfectados con sistema de reporteros pNF- κ B-hrGFP. En a) se muestran los macrófagos de cerdo 3D4/31, magnificación 4x en microscopia de contraste de fases. En b) se muestra la fluorescencia obtenida con estímulo de LPS a las 8 h en microscopia de fluorescencia a 4 x. En c) se muestra la convergencia de las dos imágenes previas para mostrar la expresión de GFP por macrófagos de cerdo.

La evaluación de la fluorescencia, como se muestra en la figura 16 demuestra una diferencia estadísticamente significativa de las RFU en comparación con el control, igual que los controles positivos con el control ($P < 0.05$). Los tres péptidos fueron capaces de inducir fluorescencia obteniendo valores de fluorescencia más altos que en las células sin estímulo, sin diferencias estadísticas entre ellos.

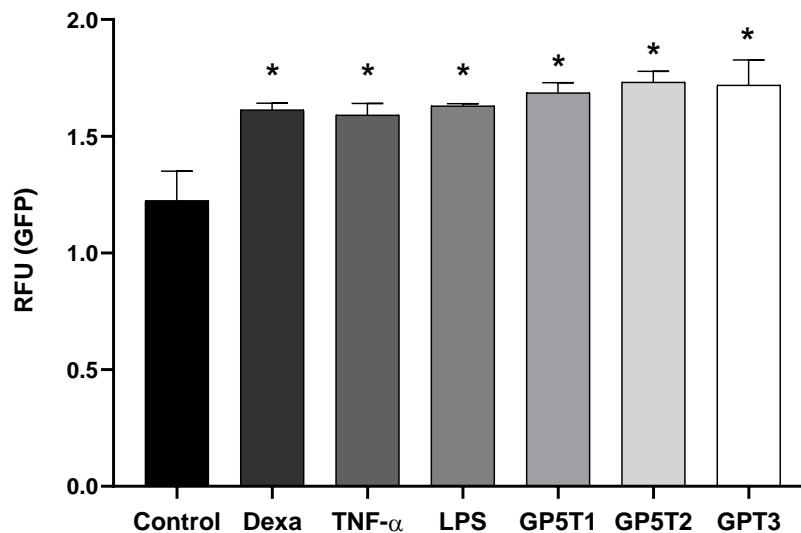


Figura 16. Activación del elemento *cis* NF- κ B en macrófagos de cerdo después de la estimulación con diferentes inductores. Expresión del gen reportero GFP, lo cual es directamente proporcional a la activación del elemento *cis* de NF- κ B, evaluación después de 8 h de tratamiento con los estímulos control: (LPS, DEXA y TNF- α) y los péptidos: GP5T1, GP5T2 y GP5T3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, post-hoc de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control.

9.3 ANALISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE P65

La fosforilación de p65 se evaluó mediante Western blot. La forma fosforilada de p65 es un indicador de su translocación al núcleo y su activación como factor de transcripción. La membrana de Western Blot fue analizada posterior a su revelado con fosfatasa alcalina. La captura de imagen de las membranas reveladas se realizó con un transiluminador Bio-imaging systems (ver figura 17). El análisis de las bandas se realizó por unidades relativas de fluorescencia mediante análisis con el software “GelQuant Express Analysis Software” este software analiza la imagen detectando las bandas más el fondo dándole un número relativo dependiente de la densidad de cada una de las bandas. En donde se observan valores mayores con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 en comparación al Control.

El software hace un análisis incluyendo el fondo de la imagen, detectando de manera automática las bandas una vez que se establecen los carriles de manera manual. El mismo

arroja un resultado en un valor numérico, comparando todas las bandas de la imagen de la membrana, las cuales se exportan a una base de datos para su posterior análisis estadístico.

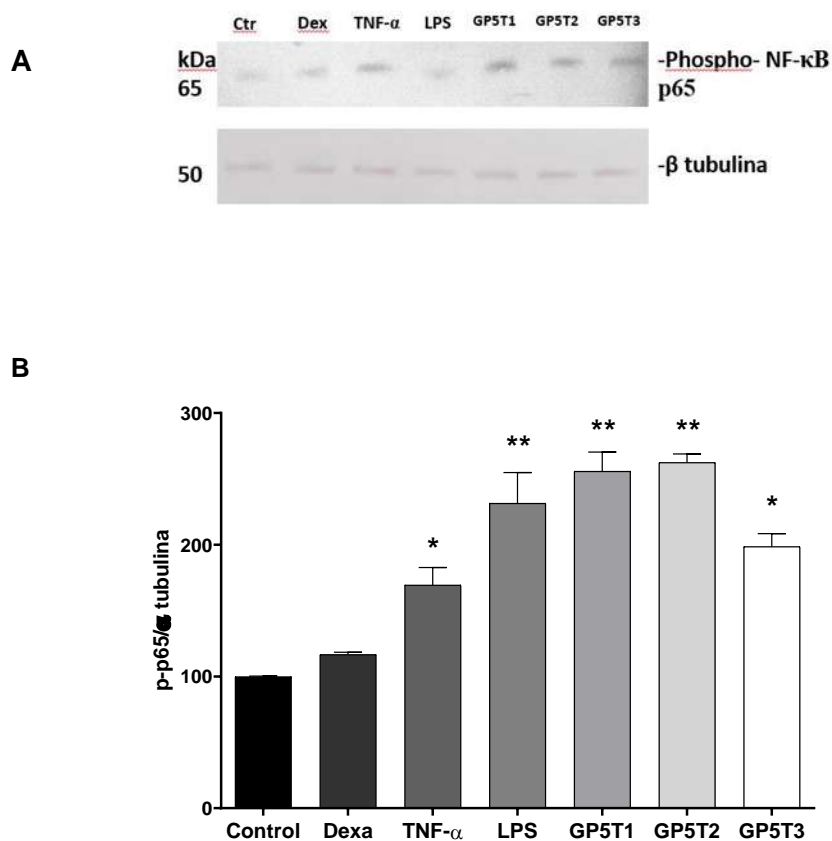


Figura 17. Inmunodetección de la proteína fosforilada p65 en proteínas totales obtenidas de macrófagos de cerdo después del tratamiento con diferentes estímulos. A) Los macrófagos de cerdo fueron tratados de la siguiente manera: Control; Dexametasona [1µg/ml]; TNFα [50ng/ml]; LPS [1 µl/ml]; GP5T1 [5µg/ml]; GP5T2 [5µg/ml] y GP5T3 [5µg/ml]. Se indica el peso molecular de acuerdo con un marcador de peso molecular de proteínas (Pageruler prestained protein ladder Thermo). Figura representativa de un gel. Se realizaron un total de 3 experimentos. Se utilizó como control de carga la expresión de β tubulina. B) Cuantificación de la expresión de fosfo-p65. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control.

El resultado de la figura 17 robustece la hipótesis de la participación de la vía NF-κB en la activación de macrófagos de cerdo en respuesta al tratamiento con los péptidos derivados de la proteína GP5 del PRRSV.

Los datos mostraron que los péptidos GP5T1, T2 y T3 son capaces de inducir la fosforilación de la proteína P65 igual que LPS el cual se sabe que es un fuerte inductor de la activación de la vía NF- κ B. Por lo que se puede asumir, con estos datos y aunado a lo obtenido previamente en el equipo de trabajo, que los macrófagos de cerdo pudieran ser polarizados al fenotipo M1 (proinflamatorio) a través del estímulo con péptidos derivados de la proteína GP5. Lo cual nos dice que estos péptidos son capaces de inducir la activación de la vía NF- κ B. Asimismo, el perfil de expresión de citocinas que se demostró en estudios previos en nuestro equipo de trabajo, indica que la vía NF- κ B puede estar involucrada en la activación de macrófagos alveolares.

9.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL SOBRENADANTE DEL MEDIO DE CULTIVO

Se cuantificó la expresión de citocinas a partir del sobrenadante del medio de cultivo de macrófagos de cerdo tratados con los péptidos a 8 h de iniciado estímulo control, control positivo y negativo. Las citocinas analizadas fueron IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ y se analizaron mediante la plataforma luminex.

La figura 18 muestra la detección de IL-1 β en el sobrenadante. Como se observa el péptido GP5T2 indujo un aumento de esta interleucina, en la gráfica se muestra una diferencia estadísticamente significativa respecto al control y a LPS (control positivo), y niveles similares a los inducidos por TNF- α .

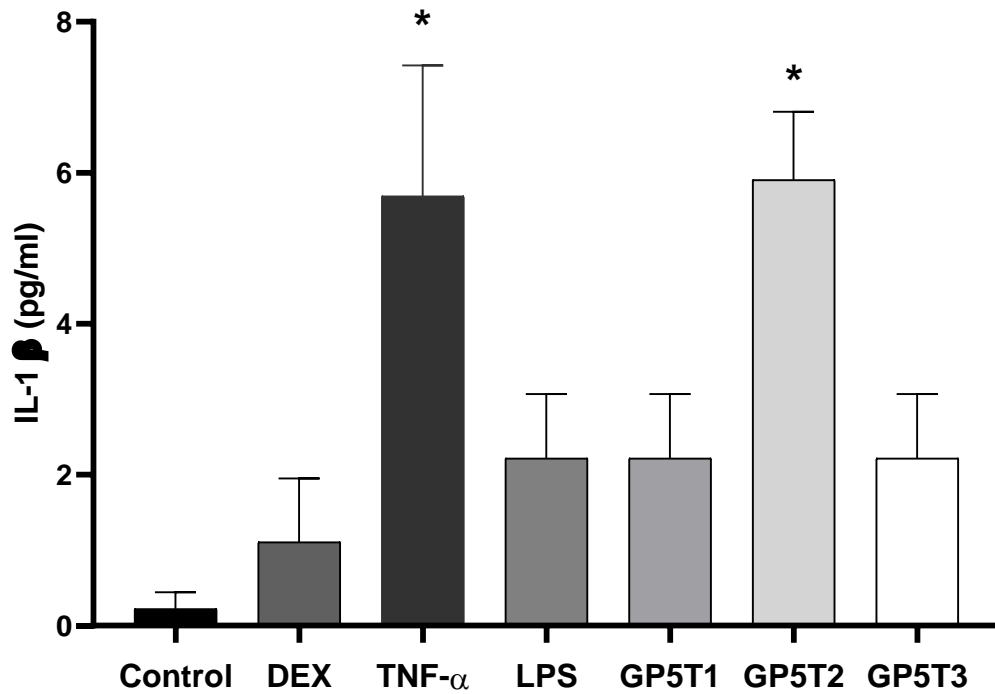


Figura 18. Expresión de IL-1 β por M Φ 3D4/31 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, prueba pos-hoc de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control.

La figura 19 muestra la detección de IL-10 en el sobrenadante. Los péptidos GP5T2 y GP5T3 indujeron un aumento de esta interleucina en comparación con el control y ambos controles positivos (TNF- α y LPS).

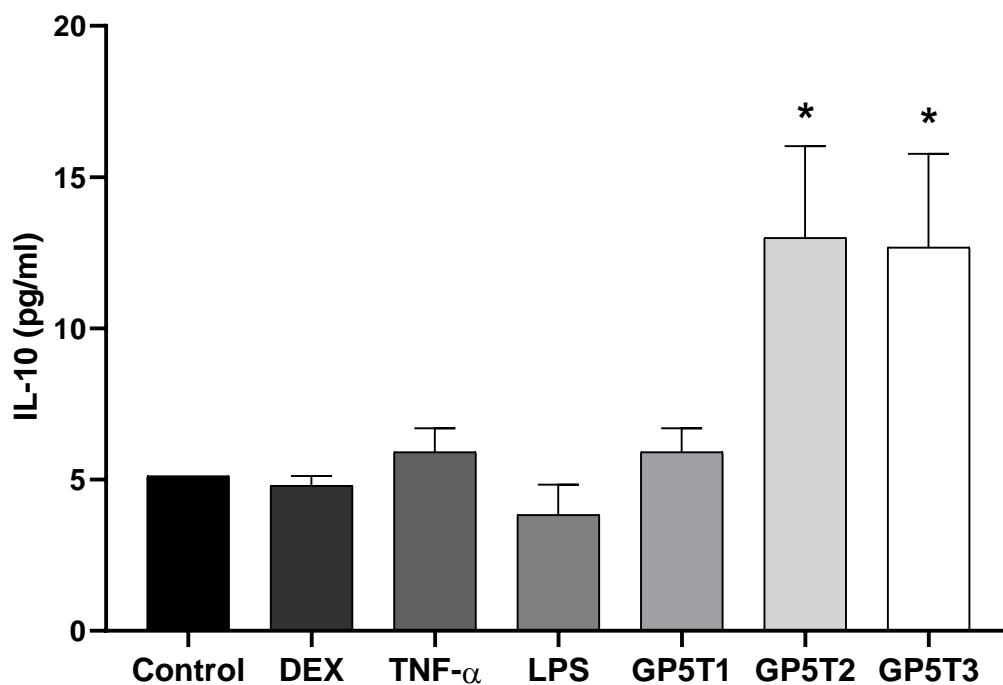


Figura 19. Expresión de IL-10 por MΦ 3D4/31 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control (C).

La figura 20, muestra los niveles de TNF- α secretados por los macrófagos de cerdo. El péptido GP5T2 fue capaz de inducir el aumento de esta citocina a niveles mayores a los observados en el control y LPS.

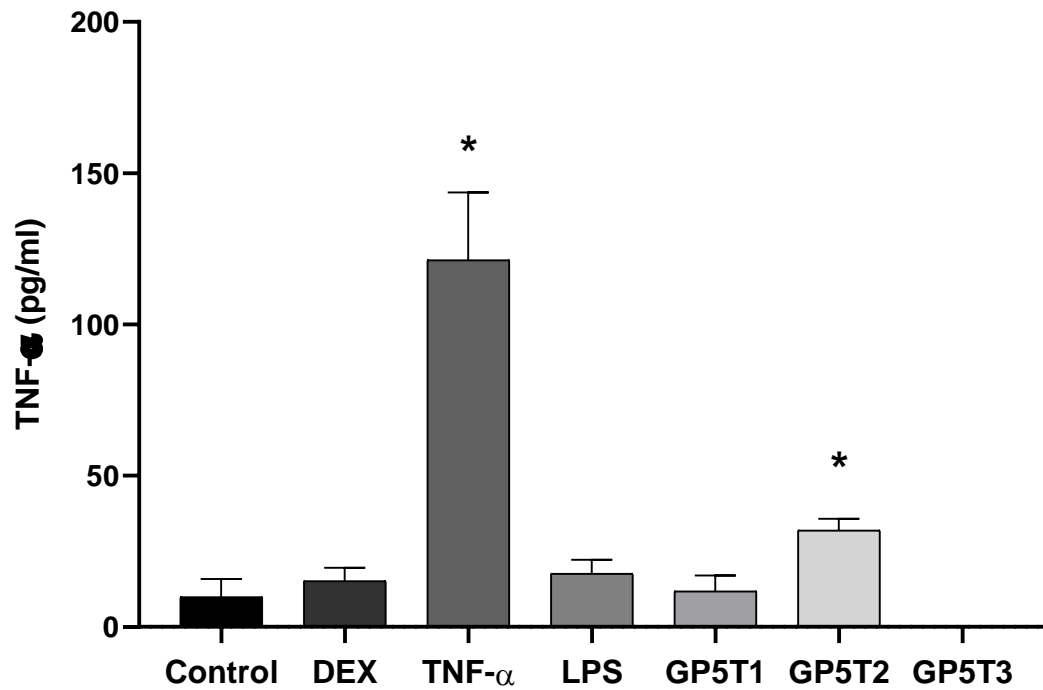


Figura 20. Expresión de TNF- α por M Φ 3D4/31 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba *pos hoc* de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control.

En cuanto IFN- γ , como se muestra en la figura 21, se aprecia un marcado aumento de la secreción en células tratadas con el péptido GP5T2, incluso aun mayor que con TNF- α . Esto indica que los péptidos inducen la secreción de esta citocina antiviral en macrófagos de cerdo.

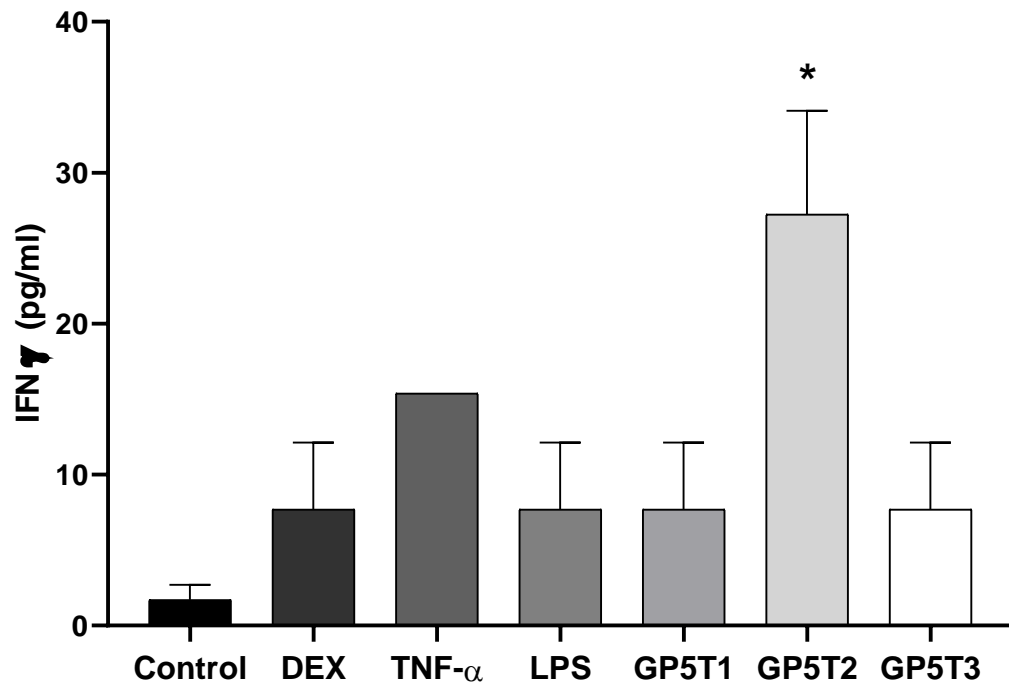


Figura 21. Expresión de IFN- γ por M Φ 3D4/31 con los estímulos control: LPS, DEXA, TNF- α y péptidos: GP5T1, GP5T2 Y GP5T3. Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía, pos-hoc con prueba de Tukey. Los asteriscos representan un valor de $P \leq 0.05$ con respecto al control (C).

10.- DISCUSIÓN

El PRRSV, desde su aparición a finales de la década de los 80, ha cobrado una gran relevancia en el sector porcícola debido a las altas tasas de morbilidad en individuos jóvenes. Esto se refleja en pérdidas millonarias anuales debido a la ausencia de una vacuna que sea eficaz para prevenir el PRRS. Y sumado a esta ineficacia, se tiene el riesgo de activación del virus vacunal, causando brotes epidémicos en diversas granjas en el mundo.

El PRRSV tiene diversos mecanismos por los cuales evade la respuesta inmune del hospedero. Esto lo logra a través de diferentes proteínas codificadas en su genoma. También la prevalencia de PRRSV en granjas donde hay brotes es muy alta debido a que la vía respiratoria es una vía muy efectiva de entrada al hospedero. Esta es una vía que muchos virus utilizan para ingresar a su huésped, la cual resulta ser altamente efectiva. Por otra parte, cobra mucha importancia el hecho que en la mayoría de las granjas porcícolas hay un elevado índice de hacinamiento de los animales, sin importar el grado de tecnificación de estas. Todo esto genera un ambiente ideal para la diseminación del virus y brotes esporádicos, lo cual se traduce en pérdidas económicas en todo el mundo. Las pérdidas económicas principalmente se dan por la incapacidad de individuos jóvenes para obtener una ganancia diaria de peso y pérdidas en cerdas gestantes.

La principal célula que infecta el PRRSV es el macrófago alveolar. Los macrófagos son una de las principales líneas de defensa de la inmunidad innata ante patógenos, esto gracias a la capacidad de estas células de secretar citocinas y otros mediadores inflamatorios en función del estatus de activación del macrófago (proinflamatorio o antiinflamatorio). Además, tienen funciones como células presentadoras de antígeno, que sirven como un puente de comunicación con la respuesta adaptativa.

La vía NF- κ B es importante durante las infecciones virales ya que regula la respuesta inflamatoria en varios tipos celulares, culminando en la secreción de diferentes citocinas tanto inflamatorias como antiinflamatoria. La activación de esta vía es mediada a través de receptores celulares lo que da como resultado una cascada de señalizaciones que culmina con la transcripción de diferentes genes relacionados con inflamación, crecimiento y supervivencia celular.(Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) Esto lo hace actuando mediante factores

de transcripción propios de la vía. Los cuales están formados por dímeros que varían de acuerdo con el tipo celular en el que nos encontremos. (S. Mitchell *et al.*, 2016)

Se sabe que los macrófagos pueden ser activados para secretar de citocinas proinflamatorias a través de péptidos de los patógenos o los mismos péptidos del hospedero. Por ejemplo, Veldhuizen estimuló macrófagos de cerdo con péptidos de la defensa del huésped (HDPs) como catelicidinas y defensinas de cerdo. Posteriormente realizó análisis con ELISA. De esto último encontró un aumento de TNF- α secretado por los macrófagos estimulados con HDPs (Veldhuizen *et al.*, 2014), por lo que sugiere que esta línea celular fue capaz de responder ante el estímulo de péptidos.

Partiendo de esto se propuso dilucidar la participación en la activación de macrófagos de cerdo (la cual es la célula blanco del PRRSV) utilizando péptidos virales derivados del mismo virus del PRRS los cuales se sabe que son epítomos de reconocimiento para linfocitos T. Por lo que en el presente trabajo se propuso analizar esto, ya que en la infección por PRRSV los macrófagos adquieren importancia en el contexto de la comunicación de la respuesta inmune innata con la respuesta adaptativa celular a través de secreción de citocinas inflamatorias y moléculas de señalización.

Como se observa en las figuras 18, 20 y 21 el péptido GP5T2 es capaz de inducir la expresión de citocinas inflamatorias a las 24 horas del estímulo. En el contexto de una infección esto es muy importante ya que las citocinas analizadas tienen una amplia gama de funciones biológicas. Por ejemplo, entre las funciones de TNF- α encontramos la de aumentar la expresión de genes proinflamatorios como el mismo TNF- α e interleucinas mediante la unión a su receptor (TNFR1), así como inducción de apoptosis.(Varfolomeev & Vucic, 2018). Para el caso de las células estimuladas con TNF- α , se observó un aumento de la misma citocina con diferencia estadísticamente significativa respecto a los 3 péptidos. Es decir que el mismo TNF- α induce el aumento de la secreción de esta misma citocina. Esto último pudiese explicarse mediante la acción de TNF- α como activador de las mismas vías que aumentan su expresión mediante retroalimentación positiva referencia. Por otro lado, IL- β funciona como un amplificador de la respuesta inmune innata induciendo la diferenciación de monocitos en Macrófagos M1 y la comunicación con la respuesta adaptativa, ya que esta citocina activa la proliferación de linfocitos B y la expansión de T citotóxicos (*Bent et al.*, 2018). Como se puede observar en la figura 18 el péptido GP5T2 indujo un aumento en la

secreción de IL- β a las 24 h de estimulación. De esto se puede inferir que este péptido tiene la propiedad de inducir la polarización de macrófagos a un fenotipo proinflamatorio con un perfil de secreción de esta citocina. Por otro lado, IFN- γ tiene funciones antivirales mediante acción como citocina citotóxica (junto con granzima B y perforina) (Jorgovanovic *et al.*, 2020) y a su vez potencia la función de las APC para presentar antígenos a linfocitos T, además de que tiene funciones antivirales (Kak *et al.*, 2018b). Partiendo de los datos observados en la figura 22 podemos inferir que ante el estímulo con GP5T2 los macrófagos de cerdo secretan esta citocina proinflamatoria y que pudiese ser un indicador de la activación de este para realizar función proinflamatorias.

El hallazgo de la secreción de citocinas por parte de macrófagos estimulados por el péptido GP5T2 es muy importante. Ya que nos está indicando la capacidad de este péptido de inducir un estado de actividad proinflamatoria en los macrófagos de cerdo. Sumado a esto tenemos los hallazgos de activación de NF- κ B (los cuales se hablan más adelante en esta sección), lo que sugiere la capacidad del péptido de polarizar a estas células a su fenotipo proinflamatorio (M1). Todo esto es muy importante ya que GP5T2 pudiera ser un actor en la activación y subsecuente polarización de macrófagos para poder eliminar el PRRSV del organismo.

Por otra parte, es importante mencionar que tanto GP5T2 como GP5T3 indujeron un aumento en la secreción de IL-10. Esta citocina tiene funciones antiinflamatorias inhibiendo la secreción de otras citocinas (Saraiva *et al.*, 2020). Su presencia es importante ya que en cualquier proceso inflamatorio normal esta citocina actúa como un contrapeso y freno para evitar la inflamación excesiva en tejidos y subsecuente daño tisular.

Los macrófagos modulan su respuesta efectora en presencia de diversos estímulos a través de vías de señalización, las cuales, dependiendo del estímulo, tendrán diferentes respuesta por parte de la célula. Dentro de las posibles vías implicadas en la activación de macrófagos en respuesta a estos péptidos tenemos la vía NF- κ B. Esto debido a que en nuestro equipo de trabajo se encontró que el perfil de mRNA de citocinas en macrófagos de ratón, tratados con los 3 péptidos, es muy sugerente de la participación de esta vía (Piña Díaz, 2021 tesis de licenciatura).

El virus, a través de diversas proteínas estructurales y no estructurales, es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador (Hanzhong Ke & Dongwan Yoo, 2017). Por lo cual es de suma importancia estudiar como interactúan estas proteínas virales con la célula blanco. Hasta el momento no se tiene mucha información respecto a la interacción de péptidos derivados de GP5 del PRRSV con macrófagos. Partiendo de esto radica el interés de descubrir de qué manera se pudiera inducir una activación del macrófago de cerdo mediante su interacción con proteínas virales.

Previamente, en nuestro grupo de trabajo, mediante revisión de la literatura y análisis *in silico*, se identificaron y sintetizaron 3 péptidos obtenidos de la secuencia de la proteína GP5 del PRRSV del genotipo americano VR2332 el cual es de mayor prevalencia en nuestro país. Estos péptidos guardan un alto grado de conservación entre las cepas circulantes del virus de aproximadamente un 80%. (Piña Díaz, 2021) El objetivo del presente trabajo fue valorar la participación de epítomos de reconocimiento para linfocitos T derivados de la proteína GP5 del PRRSV en la activación de macrófagos de cerdo a través de un modelo *in vitro*.

En este trabajo, se utilizaron estímulos previamente reportados en la literatura, tales como LPS y TNF- α , los cuales son fuertes inductores del fenotipo proinflamatorio (fenotipo M1). LPS es un componente abundante de la membrana de las bacterias gram negativas, el cual se conoce como inductor de la polarización macrófagos a fenotipos proinflamatorios. Mientras que TNF- α es una potente citocina proinflamatoria la cual se encuentra en procesos inflamatorios de diversa etiología. A su vez se utilizó dexametasona la cual es conocida como corticoesteroide sintético con función antiinflamatoria la cual puede inducir a los macrófagos a un fenotipo antiinflamatorio (Desgeorges *et al.*, 2019).

En nuestro grupo de trabajo previamente se habían realizado experimentos para valorar la activación de esta vía con sistema de reportero y también análisis de mRNA de diferentes citocinas proinflamatorias utilizando macrófagos de ratón. Los resultados de estos experimentos sugirieron la participación de la vía NF- κ B en la activación de macrófagos en modelo de ratón *in vitro* (Piña Díaz, 2021). Ahora el siguiente paso fue corroborar y expandir el trabajo previamente realizado utilizando el modelo de macrófago de cerdo. La importancia de este modelo radica en que el hospedero definitivo y único del PRRSV es el macrófago de

cerdo. Debido a esto último este modelo adquirió gran relevancia para el estudio de la interacción de péptidos virales con macrófagos.

Los datos encontrados en la realización de detección de proteína p-P65 en extractos totales de proteínas de macrófagos alveolares de cerdo (línea celular 3D4/31) mediante western blot tratados con los controles positivos (TNF- α y LPS) control negativo (dexametasona) y los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3, mostraron un aumento en la expresión de la proteína p-P65 a las 8 horas del estímulo dando. Lo cual aunado a los perfiles de mRNA previamente encontrados en modelos de macrófagos de ratón, se tiene la vía NF- κ B como posible vía en la que los macrófagos pudieran estar siendo activados en respuesta a estos péptidos virales. Autores como Hwang han demostrado en esta línea celular (3D4/31) que antes estímulos como TNF- α y extracto de *A. sessiliflorus* activa la vía NF- κ B en estos macrófagos para ejercer efectos inflamatorios para remoción de ciertos patógenos. (Hwang *et al.*, 2019)

En la figura 17 se observa que los péptidos GP5T1 y GP5T2 fueron capaces de inducir la expresión de la proteína p-P65 al igual que LPS. LPS es un conocido inductor de la vía NF- κ B a través de su unión a receptores TLR4 en la superficie de las células. (Y. Wang *et al.*, 2019) Por lo que estos péptidos fueron eficaces para la activación de la vía y consecuente transcripción de genes principalmente proinflamatorios. Aunque de momento no hay certeza del receptor por el que estos péptidos pudieran estar activando la vía NF- κ B. Por lo que queda indagar cual es el receptor que medía la interacción de los péptidos con la activación de la vía.

Por otra parte, también se demostró la transactivación del elemento *cis* de respuesta de NF- κ B en macrófagos de cerdo. Esto robustece la hipótesis de la participación de la vía NF- κ B en la modulación de la respuesta de polarización de macrófagos a fenotipo M1 (proinflamatorio). A su vez se observa en la figura 16 que los 3 péptidos derivados del PRRSV fueron capaces de inducir un aumento sustancial en la expresión de GFP medida a través de RFU. Como se observa en la figura 16 los péptidos fueron tan efectivos como TNF- α para inducir activación de NF- κ B. Todo esto es muy importante ya que se conoce bien que TNF- α funciona a manera de retroalimentación positiva para la activación de esta vía de señalización y su misma secreción por la célula (Hwang *et al.*, 2019). De todo lo anterior

tenemos que los péptidos fueron capaces de inducir activación de la vía NF- κ B en macrófagos de cerdo. A esto se agregan los perfiles de citocinas analizados que indica que estas células son polarizadas a fenotipos proinflamatorios en respuesta a los péptidos virales.

El hecho de observar transactivación del elemento *cis* de respuesta de NF- κ B en macrófagos tratados con los péptidos, en comparación con células sin tratamiento, nos indica que, de manera indirecta, la vía NF- κ B está siendo activada. Esto fue valorado esto a través del gen reportero (GFP). Este dato se robustece con los datos observados en la figura 17 donde también se observa la fosforilación de p65, lo cual indica que se encuentra en su forma activa la cual se encuentra dentro del núcleo para actuar como factor de transcripción. Estos dos datos sugieren que la polarización del macrófago al fenotipo M1 (previamente sugerida por el perfil de citocinas) está siendo orquestada por NF- κ B. Esta vía parece ser activada por los péptidos derivados del PRRSV.

En resumen, los datos hasta ahora obtenidos parecen perfilar esta vía como la responsable de la inducción de polarización y secreción de citocinas en macrófagos ante la interacción con estos péptidos virales. Esto es muy importante ya que estos péptidos se perfilan como posibles inductores de cambios fenotípicos en el macrófago para realizar funciones inflamatorias y antivirales, las cuales, en el contexto de la infección por PRRSV, son primordiales para la neutralización y eliminación del virus. Por lo que estos péptidos pudieran ser usados en potenciales modelos vacunales para la prevención del PRRS y disminución del impacto en la producción de carne de cerdo en el mundo.

De momento queda la interrogante de cómo son reconocidos los péptidos de la proteína GP5, ¿Estos serán reconocidos a través de receptores de membrana o serán reconocidos mediante un receptor intracelular?

Además, es de importancia mencionar que todos los resultados obtenidos en el presente trabajo se realizaron en modelo *in vitro* por lo que queda trabajar con estos péptidos y su interacción en modelos *in vivo*. Dado que en el animal se dan interacciones mucho más complejas en estos sistemas y están presentes otras variables que hay que tomar en cuenta, lo cual se ha estado trabajando en nuestro grupo de trabajo.

11.- CONCLUSIONES

En resumen, los datos del presente trabajo demostraron que en macrófagos de cerdo tratados con los péptidos GP5T1, GP5T2 y GP5T3 aumentó la fosforilación de p65 a las 8 h al igual que LPS y a mayor al control. De igual, manera GP5T1 y GP5T2 aumentaron la fosforilación de p65 mucho más en comparación con TNF- α . Lo cual sugiere que estos péptidos pudieran tener un papel preponderante en la activación de macrófagos mediante la activación de la vía NF- κ B. Esta última idea se robustece al demostrarse que los tres péptidos también fueron capaces de inducir activación de la vía a través del análisis con sistema de gen reportero.

De igual manera al valorar la activación de macrófagos se demostró que los péptidos GP5T1 y GP5T2 indujeron un aumento de las interleucinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ en sobrenadante de medio de cultivo a 24 h de estimulación con los péptidos.

En resumen, durante la historia natural de la infección por PRRSV la polarización de macrófagos a fenotipo proinflamatorio (M1) se ve bloqueada mediante la modulación de la respuesta inmune por el virus hacía fenotipos antiinflamatorios que favorecerían la propagación del virus. Por lo que los péptidos GP5T1 y GPT2 pudieran ser útiles en la activación de macrófagos y a su vez en la potencialización de la respuesta inmune en general que favorecería la neutralización del virus.

12.- BIBLIOGRAFÍA

Abbas. (2018). *Inmunología celular y molecular*.

Ait-Lounis, A., & Laraba-Djebari, F. (2015). TNF-alpha modulates adipose macrophage polarization to M1 phenotype in response to scorpion venom. *Inflammation Research*, 64. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0876-z>

Bent, R., Moll, L., Grabbe, S., & Bros, M. (2018). Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19082155>

Bradford, M. M. (1976a). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).

Bradford, M. M. (1976b). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).

Carvajal, J. M. (2020). *Role of CD163 and other biomarkers of interest in the immunopathogenesis of PRRSV-1 at lung level*.

Chase-Topping, M., Xie, J., Pooley, C., Trus, I., Bonckaert, C., Rediger, K., Bailey, R. I., Brown, H., Bitsouni, V., Barrio, M. B., Gueguen, S., Nauwynck, H., & Doeschl-Wilson, A. (2020). New insights about vaccine effectiveness: Impact of attenuated PRRS-strain vaccination on heterologous strain transmission. *Vaccine*, 38(14), 3050–3061. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.02.015>

Constable Peter. (2017). Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. In *Medical Journal of Australia* (Vol. 1, Issue 6). <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1964.tb133965.x>

Desgeorges, T., Rogatsky, I., Baumann, H., Libert, C., Caratti, G., Mounier, R., Tuckermann, J., & Chazaud, B. (2019). Glucocorticoids Shape Macrophage Phenotype for Tissue Repair. *Frontiers in Immunology | Www.Frontiersin.Org*, 1, 1591. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01591>

DOF - *Diario Oficial de la Federación*. (n.d.). Retrieved July 24, 2021, from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, 6. <https://doi.org/10.3791/253>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Isolation and quantification of DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 403–414. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093336>

Hanzhong Ke, & Dongwan Yoo. (2017). *The viral innate immune antagonism and alternative vaccine design for PRRS virus*.

Holtkamp, D. J. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72–84.

- Holtkamp, D. J., Kliebenstein, J. B., Neumann, E. J., Zimmerman, J. J., Rotto, H. F., Yoder, T. K., Wang, C., Yeske, P. E., Mowrer, C. L., & Haley, C. A. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72–84.
- Hwang, E., Kim, G. W., Song, K. D., Lee, H. K., & Kim, S. J. (2019). The enhancing effect of *Acanthopanax sessiliflorus* fruit extract on the antibacterial activity of porcine alveolar 3D4/31 macrophages via nuclear factor kappa B1 and lipid metabolism regulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(11), 1776–1788. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0874>
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. In *Biomarker Research* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018a). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 9, Issue 1, pp. 64–79). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018b). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 9, Issue 1, pp. 64–79). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>
- Kapetanovic, R. (2012). *Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide*.
- Kappes, M. A., & Faaborg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479–480, 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>
- Ke, H., Lee, S., Kim, J., Liu, H. C., & Yoo, D. (2019). Interaction of PIAS1 with PRRS virus nucleocapsid protein mediates NF- κ B activation and triggers proinflammatory mediators during viral infection. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47495-9>
- Ke, H., & Yoo, D. (2017). *Viral Innate Immune Antagonism and an Alternative Vaccine Design for PRRS Virus*.
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Li, B., Fang, J., Zuo, Z., Yin, S., He, T., Yang, M., Deng, J., Shen, L., Ma, X., Yu, S., Wang, Y., & Ren, Z. (2018). *Activation of Porcine Alveolar Macrophages by Actinobacillus pleuropneumoniae Lipopolysaccharide via the Toll-Like Receptor 4/NF-B-Mediated Pathway*. <https://doi.org/10>
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., & Leahy, D. J. (2013). Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*, 529, 227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5>
- Lopez, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(3), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune

system. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 129–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>

Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M., & Hayashi, Y. (2014). *IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu090>

Mastropiero G, & Líneas, D. E. (2014). *GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES REPORTERAS DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR FACTOR KAPPA-B*.

Mitchell, J. P., & Carmody, R. J. (2018). NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 335, pp. 41–84). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.007>

Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NF κ B system. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* (Vol. 8, Issue 3, pp. 227–241). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>

Montaner-Tarbes, S., HA, D. P., M, M., & L, F. (2019). Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*, 6(FEB). <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00038>

Nathues, H., Alarcon, P., Rushton, J., Jolie, R., Fiebig, K., Jimenez, M., Geurts, V., & Nathues, C. (2017). Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level – An economic disease model. In *Preventive Veterinary Medicine* (Vol. 142, pp. 16–29). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.006>

Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J. G., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., Cárabez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2008). Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(2), 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02056.x>

Perez Duran, F. (2020). *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA SUBUNIDADES PROTEICAS DEL VIRUS PRRS EN UN MODELO MURINO*.

Piña Díaz, M. (2021). *ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA CELULAR A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO*.

Renken, C., Nathues, C., Swam, H., Fiebig, K., Weiss, C., Eddicks, M., Ritzmann, M., & Nathues, H. (2021). Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Management*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00183-x>

Roques, E., Girard, A., St-Louis, M. C., Massie, B., Gagnon, C. A., Lessard, M., & Archambault, D. (2013). Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but nondisseminating adenovectors. *Veterinary Research*, 44(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-17>

- Saraiva, M., Vieira, P., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- Schneider, W. (2014). *Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses*.
- Shi, C., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., & Zhang, J. (2015). PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Archives of Microbiology*, 197(4), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1088-1>
- Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016a). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>
- Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016b). Establishing porcine monocyte-derived macrophage and dendritic cell systems for studying the interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00832>
- Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J. G., & Yoo, D. (2012). Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In *Viruses* (Vol. 4, Issue 4, pp. 424–446). <https://doi.org/10.3390/v4040424>
- Tang, C., Sun, J., Zhou, B., Jin, C., Liu, J., Gou, Y., Chen, H., Kan, J., Qian, C., & Zhang, N. (2018). Immunomodulatory effects of polysaccharides from purple sweet potato on lipopolysaccharide treated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Food Biochemistry*, 42(3). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12535>
- Thaa, B., Sinhadri, B., Tiesch, C., Krause, E., & Viet, M. (2008). Signal Peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence. *Encyclopedia of Neuroscience*, 3690–3690. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_5393
- Varfolomeev, E., & Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, 101, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>
- Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26(36), 4747–4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
- Veldhuizen, E. J. A., Schneider, V. A. F., Agustindari, H., van Dijk, A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L. M., Bikker, F. J., & Haagsman, H. P. (2014). Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095939>
- Wahyuningtyas, R., Lai, Y. S., Wu, M. L., Chen, H. W., Chung, W. bin, Chaung, H. C., & Chang, K. T. (2021). Recombinant antigen of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Prrsv-2) promotes m1 repolarization of porcine alveolar macrophages and th1 type response. *Vaccines*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/vaccines9091009>

- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
- Wang, S., Lu, M., Wang, W., Yu, S., Yu, R., Cai, C., Li, Y., Shi, Z., Zou, J., He, M., Xie, W., Yu, D., Jin, H., Li, H., Xiao, W., Fan, C., Wu, F., Li, Y., & Liu, S. (2022). Macrophage Polarization Modulated by NF-κB in Polylactide Membranes-Treated Peritendinous Adhesion. *Small*, *18*(13). <https://doi.org/10.1002/sml.202104112>
- Wang, Y., Guo, J., Qiao, S., Li, Q., Yang, J., Jin, Q., & Zhang, G. (2016). GP5 Protein-based ELISA for the Detection of PRRSV Antibodies. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *19*(3), 495–501. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0062>
- Wang, Y., Hu, H., Yin, J., Shi, Y., Tan, J., Zheng, L., Wang, C., Li, X., Xue, M., Liu, J., Wang, Y., Li, Y., Li, X., Liu, F., Liu, Q., & Yan, S. (2019). TLR4 participates in sympathetic hyperactivity Post-MI in the PVN by regulating NF-κB pathway and ROS production. *Redox Biology*, *24*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101186>