



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y VALORACIÓN
ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN (F)
DEL *Rubulavirus porcino*, EXPRESADA EN LA
LEVADURA *Pichia pastoris*”**

TESIS

presentada para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
Área de Bioquímica y Biología Molecular

PRESENTA

M. en C. LUIS IGNACIO SIAÑEZ ESTRADA

Directores de Tesis

Dra. IRMA HERRERA CAMACHO. ICUAP-BUAP
Dr. GERARDO SANTOS LOPEZ. CIBIOR-IMSS

Puebla, Pue.

DICIEMBRE 2020



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dr. José Francisco Rivera Benítez, Dr. Julio Roberto Reyes Leyva, Dr. Jesús Hernández López y el Dr. Iván Sánchez Betancourt, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada “**Producción, purificación y valoración antigénica de la proteína de fusión (F) del Rubulavirus porcino, expresada en la levadura Pichia pastoris**”, que presenta el alumno **M.C. Luis Ignacio Siañez Estrada** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas,

Se extiende la presente a los dieciocho días del mes de noviembre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

Dr. José Francisco Rivera Benítez

Dr. Julio Roberto Reyes Leyva

Dr. Jesús Hernández López

Dr. Iván Sánchez Betancourt

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho y el Dr. Gerardo Santos López.

Los sueros de cerdos enfermos y sanos para los análisis de Western-blot fueron proporcionados por el Dr. José Francisco Rivera Benítez del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del INIFAP, a quien agradecemos su colaboración.

Este trabajo de tesis fue apoyado financieramente por:

- Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla, con fondos internos.
- Fondo FONSEC-SAGARPA-CONACYT. PROYECTO FONSEC 2017-6-292826. Aprobado en agosto-2018 hasta 2021. Convenio INIFAP-SADER-BUAP.

Agradezco a la Vicerrectoría de investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP (VIEP) por el apoyo otorgado para la asistencia al LII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos en Mérida en julio de 2018 y al XI Congreso Nacional de Virología, en Guanajuato en septiembre de 2019.

Como alumno del Posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP, para la realización de este trabajo agradezco el apoyo de:

- Beca CONACYT (num. registro: 442748) de agosto 2016 a junio 2020.
- Beca terminal de Tesis. VIEP-BUAP de octubre a diciembre 2020.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primeramente debo de agradecer a mi familia que fueron las personas que más batallaron por la realización de esta meta personal. Siempre estuvieron junto a mí apoyándome.

A mi esposa Esmeralda, solo me queda decirte que al fin lo conseguimos, ya que este logro es de ambos. Tú supiste ser Padre y Madre de nuestros hijos mientras estuve lejos, aun así nunca dejaste de apoyarme y creer en mí. Solo espero y este sea un logro que nos abra muchas puertas y permita acercarnos más a nuestros sueños.

A mi campeón Ian, hijo tú fuiste el motor de cada uno de mis días, junto con tu hermana son mi mayor proeza y por ti es que siempre seguí adelante. Espero y algún día leas este trabajo y sepas que siempre estuviste en mis pensamientos. El estar lejos de ti fue mi mayor sacrificio.

A mi reina Lía, hija contigo eh tenido la bendición de estar a tu lado siempre, verte crecer día a día me fortalece. Si algún día lees esto siempre recuerda que eres una guerrera, que tu papa te ama mucho y que voy a dar todo de mí, para que tú y Ian siempre tengan un futuro mejor.

A mi mama, gracias porque por ti estoy aquí, tu que siempre has dado todo por tus hijos este es también un logro tuyo, un logro que te tomo años de esfuerzo pero al fin lo logramos mama.

A mi hermano Antonio, solo quiero decirte gracias hermano por el apoyo y los consejos, solo puedo desearte bien y que siempre cuides a tu familia.

A mi papa solo decirte que te extraño mucho y siempre estás en mi corazón.

A mis amigos del laboratorio, Marbeth, Getulio, Dalia, Laura, Luis y todas las personas que tuve el privilegio de conocer en esta aventura gracias por apoyarme en el laboratorio y hacerme compañía en los buenos y malos días.

Lore eres mi mejor amiga, gracias por todas las enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme siempre que necesite de tu apoyo, siempre te voy a desear lo mejor en tu vida.

Finalmente pero no menos importante doy un agradecimiento muy especial a la Dra. Irma por darme la oportunidad y creer en mí sin conocerme, por confiar en mí y orientar mi camino cuando lo perdía. Siempre voy a estar muy agradecido con usted por todo su apoyo. Al Dr. Gerardo le agradezco por siempre guiarme en mi camino científico, por su apoyo profesional en cada una de mis actividades, así como sus consejos. A la Dra. Lulú y la Dra. Nora también les agradezco por orientarme y apoyarme en algunos experimentos y dar consejos sobre fallos en mi desarrollo experimental.

Gracias

ABSTRACT

Porcine rubulavirus (PRV), which belongs to the family *Paramyxoviridae*, causes blue eye disease in pigs, characterized by encephalitis and reproductive failure in newborn and adult pigs, respectively. There is not an effective treatment against PRV and there is also no information on effectiveness of available vaccines. Continuous outbreaks have occurred in Mexico since early 80s, which have caused serious economic losses to pig producers. Vaccination can be used to control this disease. We report in this study the immunoinformatic analysis of F and HN protein of PRV and expression of the F protein in *Pichia pastoris*.

Searching for effective antigen candidates against PRV, first we sequence PRV strain PAC1 F protein, then we used various immunoinformatics tools to predict antigenic determinants of B-cells and T-cells against the two glycoproteins of the virus (HN and F proteins). Finally, we perform a coupling with AutoDock Vina to determine the binding energies. We obtained the F gene sequence of a PRV strain collected in the early 1990s in Mexico and compared its amino acid profile with previous and more recent strains, obtaining an identity similarity of 97.78 to 99.26%. For the F proteins, seven linear B-cell epitopes, six conformational B-cell epitopes and twenty-nine T-cell MHC class I epitopes were predicted. For the HN proteins, sixteen linear B-cell epitopes, seven conformational B-cell epitopes and 34 T-cell MHC class I epitopes were predicted. The NRTYGPPAYVPPDNIIQS and AQATAAVAL epitopes present in the F protein could be important because they are recognized by both B cells and T cells. The *in silico* binding energy between the predicted epitopes on F and HN proteins to the swine MHC-I molecules were determined. The ranges of binding energy for these epitopes ranged from -5.8 to -7.8 kcal/mol. The second part of the study was to obtain strains of *Pichia pastoris* that express the F protein. The open reading frame (ORF) of F protein was amplified from the PAC1 strain of PRV by RT-PCR, then the F1 and F2-F1 regions were cloned into pPICZαB expression vector generating two constructs pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1. The vectors were integrated in the yeast chromosome, both transformant cells present a Mut⁺ phenotype. The strains were named X-33-eF1⁺ and X-33-eF2-1⁺. The proteins eF1 and eF2-1 were recovered from cell-free medium after 6 days. Both proteins were recognized by the serum of infected pigs with different strains by Western blot. The eF1 protein was purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), recovering 125 µg/100 ml. The present study aimed to assess the use F protein as antigen that could activate different responses of the immune system. The eF1 protein could be a candidate to propose for a vaccine or to use as an antigen in serological test, but more analysis have to be done to assure this.

RESUMEN

El *Rubulavirus porcino* (RVP), que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, causa la enfermedad del ojo azul en los cerdos, caracterizada por encefalitis y falla reproductiva en cerdos recién nacidos y adultos, respectivamente. No existe un tratamiento eficaz contra el RVP y tampoco hay información sobre la eficacia de las vacunas disponibles. En México se han producido continuos brotes desde principios de la década de los 80, que han causado grandes pérdidas económicas a los productores de cerdos. La vacunación se puede utilizar para controlar esta enfermedad. En este estudio se describe el análisis inmunoinformático de las proteínas F y HN de RVP y la expresión de la proteína F en *Pichia pastoris*.

Buscando candidatos a antígenos efectivos contra RVP, primero se secuenció el gen de la proteína F de RVP cepa PAC1, luego usamos varias herramientas inmunoinformáticas para predecir determinantes antigénicos de células B y células T contra las glicoproteínas del virus (proteínas HN y F). Finalmente, realizamos un acoplamiento con AutoDock Vina para determinar las energías de enlace. Obtuvimos la secuencia del gen F de una cepa de RVP recolectada a principios de la década de 1990 en México y comparamos su perfil de aminoácidos con cepas anteriores y recientes, obteniendo una identidad de 97.78 a 99.26%. Para las proteínas F, se predijeron siete epítomos lineales de células B, seis epítomos conformacionales de células B y veintinueve epítomos de MHC de clase I de células T. Para las proteínas HN, se predijeron dieciséis epítomos lineales de células B, siete epítomos conformacionales de células B y 34 epítomos de MHC de clase I de células T. Los epítomos NRTYGPPAYVPPDNIIQS y AQATAAVAL presentes en la proteína F pudieran ser importantes porque son reconocidos tanto por células B, como células T. Se determinó la energía de unión *in silico* entre los epítomos predichos en las proteínas F y HN y las moléculas de MHC-I de cerdo. Los rangos de energía de unión para estos epítomos oscilaron entre -5,8 y -7,8 kcal / mol. La segunda parte del estudio fue generar cepas de *Pichia pastoris* que expresan la proteína F. El marco de lectura abierto (ORF) de la proteína F se amplificó a partir de la cepa PAC1 de RVP por RT-PCR, luego las regiones F1 y F2-F1 se clonaron en el vector de expresión pPICZ α B generando dos construcciones pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1. Los vectores se integraron en el cromosoma de levadura, ambas células transformantes presentan un fenotipo Mut +. Las cepas se denominaron X-33-eF1 + y X-33-eF2-1 +. Las proteínas eF1 y eF2-1 se recuperaron del medio libre de células después de seis días. Ambas proteínas fueron reconocidas por el suero de cerdos infectados con diferentes cepas mediante Western blot. La proteína eF1 se purificó mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC), recuperando 125 μ g / 100 ml. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el uso de la proteína F como antígeno que podría activar diferentes respuestas del sistema inmunológico. La proteína eF1 podría ser un candidato para ser propuesto para una vacuna o para usar como antígeno en una prueba serológica, esto debido a que fue reconocida por sueros de cerdos infectados por diferentes cepas de RVP lo que sugiere que los determinantes antigénicos se mantienen independiente de la cepa de RVP, sin embargo, se deben realizar más análisis para asegurar esto.

ABREVIATURAS

D.O.	Densidad óptica
F	Proteína de fusión
F1	Péptido F1 de la proteína de fusión
F2	Péptido F2 de la proteína de fusión
F2-1	Péptidos F1 y F2 de la proteína de fusión
HN	Hemaglutinina neuraminidasa
IMAC	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
M	Proteína de matriz
MHC	Major histocompatibility complex o complejo mayor de histocompatibilidad
NP	Nucleoproteína
ORF	Open reading frame o marco de lectura abierto
PAC	Producción animal cerdos
P	Fosfoproteína
RVP	Rubulavirus porcino
VLPM	Virus de La Piedad, Michoacán

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. La enfermedad del ojo azul en cerdos	4
2.2. Distribución y brotes de RVP en México	4
2.3. Transmisión y cuadro clínico de RVP	5
2.4. Diagnóstico de la enfermedad del ojo azul.....	9
2.5. Prevención, control y vacunas contra enfermedad del ojo azul.....	10
2.6. Agente etiológico de la enfermedad del ojo azul	12
2.7. Estructura del genoma y regulación en la expresión de proteínas de RVP	13
2.8. Funciones de las proteínas de RVP	14
2.8.1. La proteína NP	14
2.8.2. Proteína L.....	14
2.8.3. Proteína P	15
2.8.4. Proteína M.....	15
2.8.5. Proteína HN	16
2.8.6. Proteína F.....	16
2.9. Ciclo de replicativo de RVP.....	18
2.10. Inmunidad en una infección por Rubulavirus porcino	20
2.10.1. Evasión de la respuesta inmune innata en la infección por Rubulavirus porcino.....	20
2.10.2. Respuesta inmune celular en la infección por RVP	20
2.10.3. Respuesta de anticuerpos.....	22
2.11. Expresión de proteínas de RVP en sistemas heterólogos	23
2.12. La proteína F como posible antígeno.....	25
2.13. Pichia pastoris como sistema de expresión.....	28
2.14. Diseño y desarrollo de vacunas mediante el uso de herramientas bioinformáticas	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVO GENERAL.....	32
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

7.1. Obtención de material genético de RVP, cepa PAC1.....	33
7.2. Amplificación por RT-PCR del marco de lectura de la proteína F de RVP...	33
7.3. Clonación del marco de lectura de la proteína F en el vector de resguardo pJET1.2/blunt	34
7.4. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con CaCl_2 y transformación	34
7.5. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (midiprep).....	35
7.6. Análisis informático de las proteínas estructurales de RVP.....	36
7.7. Predicción de epítomos continuos y discontinuos de células B.....	37
7.8. Predicción de epítomos citotóxicos de células T	37
7.9. Construcción del vector pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1.....	38
7.10. Preparación de células competentes y transformación de <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	40
7.11. Extracción de ADN genómico de <i>Pichia pastoris</i>	40
7.12. Expresión de la proteína eF1 y eF2-1	41
7.13. Detección de ARNm mediante RT-PCR.....	42
7.14. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección de eF1 y eF2-1.....	43
7.15. Purificación de eF1 y eF2-1.....	44
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
8.1. Obtención del marco de lectura de la proteína F de RVP.....	45
8.2. Construcción de vector pJET-Forf	46
8.3. Caracterización inmunogénica y fisicoquímica de las proteínas estructurales del RVP	49
8.4. Predicción de epítomos continuos de células B de las proteínas HN y F de RVP	50
8.5. Predicción estructural de la proteína F de RVP	53
8.6. Predicción de epítomos discontinuos de células B para las proteínas HN y F de RVP	56
8.7. Predicción de epítomos de células T citotóxicas para las proteínas HN y F de RVP	60
8.8. Construcción del vector pPICZ α B-F1.....	68
8.9. Obtención de la cepa X-33eF1+	71
8.10. Curva de crecimiento celular de la cepa productora X-33eF1+	74
8.11. Expresión y producción del péptido eF1	75

8.12. Detección de eF1 por sueros de cerdos infectados por RVP y cerdos no infectados (testigos).....	77
8.13. Purificación de eF1 mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados	79
8.14. Construcción del vector pPICZ-F2-1	82
8.15. Obtención de clonas de pPICZ-F2-1.....	83
8.16. Determinación del fenotipo Mut de la clona X-33eF2-1	84
8.17. Producción de eF2-1 en la cepa P. pastoris X-33eF2-1+	86
8.18. Detección de eF2-1 por sueros de cerdos infectados	88
8.19. Purificación de eF2-1 mediante Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados	89
9. CONCLUSIONES	91
10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	93
11. REFERENCIAS.....	94
APENDICE 12.1. TRABAJOS EN CONGRESOS.....	109
APENDICE 12.2. PUBLICACIONES	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiones con mayor seroprevalencia de RVP	4
Figura 2. Opacidad corneal producida por RVP.....	6
Figura 3. Alteraciones causadas por RVP en fetos.....	7
Figura 4. Atrofia testiculares por RVP.....	8
Figura 5. Histopatología de la cabeza del epidídimo.....	9
Figura 6. Estructura de <i>Rubulavirus porcino</i>	13
Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína F del virus de Parainfluenza 5.....	18
Figura 8. Ciclo replicativo de los paramixovirus.....	19
Figura 9. Reconocimiento de las proteínas de RVP.....	23
Figura 10. Respuesta inmune humoral específica inducida por rHN-PorVP en ratones medida por ELISA indirecto.	24
Figura 11. Antigenicidad y neutralización de anticuerpos anti-HN de RVP.....	25
Figura 12. Capacidad de neutralización de anticuerpos contra la proteína F.....	26
Figura 13. Producción de anticuerpos anti-F del virus de Newcastle.....	27
Figura 14. Cultivo infectado con RVP y amplificación del marco de lectura de gen F...45	
Figura 15. Mapa de restricción de pJET-Forf.....	46
Figura 16. Caracterización enzimática de pJET-Forf.....	47
Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína F de PAC1 y otras cepas de RVP.....	49
Figura 18. Estructura predicha de la proteína F.....	54
Figura 19. Esquema de los dominios estructurales de la proteína F.....	56
Figura 20. Epítomos discontinuos de células B de las proteínas F y HN predichos por el servidor ElliPro.....	59
Figura 21. Patrones de unión de epítomos F y HN para SLA-01*04:01.....	66
Figura 22. Obtención de la construcción pJET-F1.....	69
Figura 23. Mapa del vector recombinante de expresión pPICZ-eF1.....	70
Figura 24. Confirmación de la construcción del vector pPICZ-eF1 por restricción enzimática.....	71

Figura 25. Inserción del vector pPICZ α B-eF1 en el cromosoma de la cepa X33 de <i>P. pastoris</i>	71
Figura 26. Selección de clonas de pPICZ-eF1 a diferentes concentraciones de zeocina.....	72
Figura 27. Esquema de los eventos posibles de integración del vector recombinante en el cromosoma de <i>P. pastoris</i>	73
Figura 28. Obtención de cepas X-33eF1 Mut+.....	74
Figura 29. Curva de crecimiento de crecimiento celular de las cepas X-33wt y X-33eF1+ a lo largo del tiempo.....	75
Figura 30. Detección del ARN mensajero del eF1 en la cepa X-33eF1+ en condiciones de expresión con metanol.....	76
Figura 31. Producción de eF1 por la cepa X-33eF1+, durante 1-8 días en medio con metanol (BMMY).....	77
Figura 32. Western blot de eF1 recombinante producido por la cepa X-33eF1+ incubadas con suero de cerdo infectado con RVP de diferentes cepas.....	78
Figura 33. Perfil de elución del proceso de purificación de F1.....	80
Figura 34. Obtención de la construcción pPICZ-F2-1.....	82
Figura 35. PCR del ADN cromosómico de clonas de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas con pPICZ-F2-1.....	83
Figura 36. Selección de clonas positivas a F2-1 con diferentes concentraciones de zeocina.....	84
Figura 37. Representación de las posibles integraciones de eF1 en el genoma de <i>P. pastoris</i>	85
Figura 38. Determinación de fenotipo Mut+ mediante PCR de AOX1 de <i>P. pastoris</i> X-33eF2-1.....	85
Figura 39. Expresión de eF2-1 en medio extracelular.....	87
Figura 40. Inmunodetección de la proteína eF2-1. Reconocimiento con sueros de cerdos infectados con RVP mediante Western blot.....	88
Figura 41. Perfil de elución del proceso de purificación de eF2-1.....	89

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Epítomos reportados en IEDB de la proteína F.....	26
Tabla 2. Predicción de las propiedades inmunogénicas y fisicoquímicas de las proteínas estructurales de RVP (cepa LPMV/1984).....	50
Tabla 3. Epítomos de células B continuos de las proteínas HN y F de RVP (LPMV/1984).....	51
Tabla 4. Epítomos discontinuos de células B de las proteínas HN y F (LPMV/1984).....	56
Tabla 5. Lista de epítomos citotóxicos de fuerte unión de las proteínas HN y F (LPMV/1984).....	61
Tabla 6. Energías de unión de epítomos MHCII predichos y seleccionados para el alelo SLA-01*04:01 usando Autodock Vina.....	67
Tabla 7. Rendimiento de la purificación de eF1 a partir de 100 ml de medio libre de células.....	81

1. INTRODUCCIÓN

El *Rubulavirus porcino* (RVP) también llamado virus de La Piedad Michoacán (LPMV), es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul en cerdos. Esta enfermedad causa signos neurológicos, respiratorios y reproductivos, los cuales pueden estar acompañados de opacidad corneal. La enfermedad del ojo azul genera pérdidas económicas causadas por la alta tasa de mortalidad de neonatos y la infertilidad en los adultos [1, 2]. Se trata de un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario en sentido negativo, presenta seis proteínas estructurales: la nucleoproteína (NP), la proteína mayor (L), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M) y dos glicoproteínas de membrana, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) [3].

La enfermedad del ojo azul puede presentar diferentes signos y lesiones, los cuales varían dependiendo de la edad del cerdo. En cerdos en etapa de lactancia se presentan manifestaciones nerviosas progresivas, agudas y fatales [2]. En cerdos de 3 a 4 meses de edad las manifestaciones neurológicas son escasas y la tasa de mortalidad es baja. Pero en cerdos adultos los signos se limitan primordialmente al aparato reproductor. En hembras adultas se pueden presentar abortos, neonatos y una considerable reducción en la fertilidad. En machos adultos se ha observado epididimitis (inflamación severa en la cabeza del epidídimo), formación de granulomas, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad debido a una reducción notable en la motilidad y concentración de espermatozoides [2, 4]. La opacidad corneal se presenta solamente en 1 a 10% de los animales infectados de cualquier edad [2].

El diagnóstico de la enfermedad se realiza principalmente por la presencia de los signos clínicos como los ya mencionados, aunque se debe considerar que la encefalitis y fallas reproductivas pueden ser ocasionadas por otros virus que afectan cerdos. Las muestras de sangre se pueden utilizar para realizar inhibición de hemaglutinación, neutralización viral y pruebas de ELISA, donde se ocupan anticuerpos específicos contra el virus. La prueba de inhibición de la hemaglutinación es la más empleada, aunque frecuentemente puede dar falsos positivos. Se ha reportado la detección del RVP mediante RT-PCR en tiempo real, pero estas pruebas son caras e implican un costo alto

para el productor. Por lo tanto, existen campos de oportunidad para el desarrollo de pruebas rápidas, ya sea para la detección de anticuerpos específicos, o bien para la detección del antígeno viral, ya que parte importante del control de la enfermedad se basa en un diagnóstico rápido y acertado que permita realizar acciones para disminuir la propagación del virus a otros animales y a otras granjas [5].

Por lo cual es importante generar un método de control y prevención de la enfermedad. Una de las estrategias posibles es producir proteínas presentes en la envoltura del virus y emplearlas como posibles vacunas. El RVP posee dos glicoproteínas insertadas en su envoltura: La hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), las cuales tienen como función el reconocimiento del receptor sobre la célula hospedera (HN) y la fusión de las membranas celular y viral para que la célula pueda ser infectada. Estas proteínas son candidatos para desarrollar un método de prevención [1]. El desarrollo de posibles vacunas en la actualidad está auxiliado por el uso de la inmunoinformática, la cual permite evaluar antígenos *in silico*, determinando la posibilidad de inducir diversas respuestas en el sistema inmune sin necesidad de expresar la proteína. La evaluación de las proteínas de RVP empleando estas metodologías podría fortalecer la selección y diseño de futuros antígenos contra de RVP.

La producción de proteínas empleando la levadura *Pichia pastoris* es ampliamente utilizada. *P. pastoris* es un sistema de expresión común de proteínas debido a la capacidad de la levadura de realizar modificaciones post-traduccionales similares a otras células eucariotas, generando proteínas recombinantes funcionales y con la capacidad de generar una respuesta inmune. Otras ventajas que ofrece el sistema de expresión son el tiempo de crecimiento y expresión de la proteína, el cual es relativamente rápido comparándolo con otros sistemas de expresión eucariotas. Por lo cual, expresar y producir las proteína virales es un paso importante en el desarrollo de nuevas herramientas de detección y prevención de la enfermedad del ojo azul. El empleo de las proteínas HN y F, en conjunto, como posible vacuna puede que genere un efecto sinérgico en la respuesta inmune.

Aunque el RVP ha circulado en México al menos 40 años, el reto es erradicar la enfermedad, por lo que es importante centrarse en tres puntos importantes. Primero, en el desarrollo de un método de diagnóstico efectivo, rápido y económico que permita un uso amplio; segundo, la obtención de una vacuna eficaz contra distintas variantes del virus que circulan normalmente y, tercero, un programa de vigilancia epizootiológica, serológica y molecular que permita la actualización tanto del diagnóstico como de la vacuna. Estos puntos van a contribuir de forma importante en el control y la eliminación del RVP en granjas porcícolas en México y con ello enfocar esfuerzos hacia otras afecciones importantes en cerdos.

2. ANTECEDENTES

2.1. La enfermedad del ojo azul en cerdos

La enfermedad del ojo azul, anteriormente denominada síndrome del ojo azul en cerdos, es una enfermedad que puede cursar con un cuadro clínico localizado que afecta el sistema nervioso, respiratorio y reproductivo, se describió por primera vez en los años ochenta en La Piedad Michoacán, México. Es una enfermedad causada por *Rubulavirus porcino* (RVP). El RVP está clasificado actualmente como *Orthorubulavirus porcino*, en inglés, *Porcine orthorubulavirus* o PRV, dentro de la familia *Paramyxoviridae* [6].

2.2. Distribución y brotes de RVP en México

El primer reporte de la enfermedad se dio en 1981, en la región de La Piedad Michoacán. Los cerdos son los únicos animales en donde se han registrado afecciones clínicas por RVP en condiciones naturales. Cuevas-Romero *et al.*, (2015) reportaron que RVP se ha detectado solamente en México, en donde se ha informado de brotes en 16 de los 32 estados del país. La seroprevalencia oscila entre 9 y 23.7% en los estados más afectados, que son Michoacán, Jalisco y Guanajuato, por lo que RVP es un problema para productores de ganado porcino de estas regiones (figura 1) [7].



Figura 1. Regiones con mayor seroprevalencia de RVP (sombreado en azul). Tomado de Cuevas *et al.*, 2015 [7]

Si bien la información de los brotes de RVP es escasa, se han logrado asociar algunos, con la presencia de signos característicos que afectan principalmente sistema nervioso, respiratorio o reproductivo. Ejemplos de los primeros aislamientos son la cepas POA (paramixovirus del ojo azul), de 1980, y LPMV (*La Piedad Michoacan Virus*), de 1984. Esta última se considera la cepa de referencia, ya que es con la que se ha realizado la caracterización morfológica, bioquímica y molecular más extensa. Otras cepas son POA2-1988 (Puebla), CI-1991 (Michoacán), CII-1991 (Michoacán), CIII-1999 (Michoacán) y CIV-1999 (Michoacán), algunas de estas cepas forman parte de las vacunas actuales. Las cepas mencionadas se han reportado que causan cuadros neurológicos y respiratorios en neonatos [1, 8]. Otros brotes han sido asociados principalmente a fallas en el sistema reproductivo como PAC (Producción Animal, Cerdos, UNAM)2-1990 (Jalisco) y PAC3-1993 (Jalisco). Las cepas PAC1-1990 (Michoacán), PAC4-1993 (Michoacán) y PAC5-1994 (Texcoco) han sido cepas asociadas con brotes en los que se presentaron cuadros con afecciones en el sistema respiratorio, neurológico y reproductivo [9].

Entre los años 2001 y 2003, se presentaron 4 brotes en el estado de Jalisco, del 10% al 20% de los cerdos neonatos presentaron cuadros neurológicos y respiratorios. Además el 60% de los cerdos de tres a cuatro meses de edad presentaron neumonía y el 20% de estos cerdos un cuadro de encefalitis. Estas cepas se denominaron PAC6-2001, PAC7-2002, PAC8-2002 y PAC9-2003. Durante el brote la mortalidad de los animales aumentó 30% [10].

Los últimos brotes de RVP de los que se cuenta con información, datan de 2015. La secuenciación de 4 cepas neurovirulentas que afectaron los estados de Jalisco y México indica que existen mutaciones con respecto a los primeros brotes de RVP [11]. Aunque aún no ha sido determinado qué efecto puede tener estas mutaciones en la virulencia del patógeno.

2.3. Transmisión y cuadro clínico de RVP

Se ha reportado que la forma de transmisión de RVP es principalmente horizontal, animales infectados contagian a animales susceptibles a la infección

mediante secreciones del tracto respiratorio; pero también de forma vertical, ya que las cerdas infectadas pueden infectar a sus productos por vía trasplacentaria [12]. Se ha aislado RVP de muestras de semen por lo que no se descarta la transmisión venérea [1, 13]. Aun no se ha reportado algún mecanismo de transmisión proveniente de fauna silvestre o doméstica, o si existe algún reservorio de RVP, además de cerdo.

Algunos estudios sugieren que el virus puede diseminarse hacia otras granjas por el mismo personal que se encuentra en constante contacto con los animales. Esto debido a que el personal encargado del cuidado de cerdos ha presentado anticuerpos que reconocen al RVP. En un estudio en el que se analizaron 85 veterinarios se encontraron valores de seroprevalencia de 2.3% (inhibición de hemaglutinación) y 5.8% (neutralización viral). Estas investigaciones proporcionan un dato sobre el posible potencial zoonótico de RVP [14].

Uno de los signos clínicos más característicos de la enfermedad del ojo azul es la presencia de opacidad corneal unilateral o bilateral (Figura 2), en alrededor de 10% de los cerdos infectados por RVP [2]. Si bien la opacidad corneal no es el signo más nocivo en animales infectados, es importante debido a que dio la pauta para reconocer la presencia de la enfermedad y es por ello que recibió el nombre de “enfermedad del ojo azul” [7].



Figura 2. Opacidad corneal producida por RVP. Signo clínico asociado a la enfermedad del ojo azul causada por RVP. Tomado de Sánchez-Betancourt (2015).

Los cerdos recién nacidos (cinco días de edad) presentan signos de depresión, disnea descarga nasal, diarrea, hundimiento del globo ocular, secreción ocular, temblor muscular, anorexia, sialorrea y falta de coordinación desde los cuatro días post infección (pi). No se ha presentado una gran variación en las temperaturas rectales de los animales que cursan con la enfermedad, aunque en algunos casos se puede presentar hipotermia. Se puede presentar una disminución en la ganancia de peso corporal en los animales infectados por RVP [2, 15].

La necropsia muestra congestión y crecimiento de los nodos linfáticos (nodos cervicales, parótida, mediastino y traqueo bronquial) de cerdos infectados con RVP. Se han observaron anormalidades en el tracto respiratorio, con cuadros de neumonía y congestión en lóbulos cardiacos y diafragma. La tasa de mortalidad en cerdos de cuatro a 15 días de edad puede oscilar entre 40-100% de los cerdos infectados [1, 15].

Al presentar RVP la capacidad de atravesar la placenta, ocasiona la muerte y momificación del feto en cerdas gestantes (Figura 3). En estudios de infecciones experimentales en cerdas de seis a 10 semanas de gestación con la cepa PAC3-1992, se observaron lesiones en el endometrio así como la placenta. En los fetos se observó una disminución en el tamaño, así como momificación. La presencia del virus fue confirmada en pulmón, hígado y cerebro de los fetos [12].



Figura 3. Alteraciones causadas por RVP en fetos. Fetos momificados y no momificados. Tomado de Hernández-Jáuregui *et al.* (2004)[12].

En cerdos adultos (12 meses de edad), al inicio de la infección no se presenta signos clínicos de enfermedad (anorexia o apatía), cambios en la temperatura corporal o en el comportamiento (pérdida de libido). Se ha observado un aumento en el tamaño de los testículos 5 días pi, que persiste hasta 142 días pi. De forma contraria, también puede ocasionar la reducción de tamaño de uno de los testículos de hasta 50% [16]. En cerdos machos, la inflamación en la cabeza del epidídimo se ha registrado desde el día 12-15 pi. La reducción de la motilidad y la concentración de los espermatozoides se detectaron en muestras de semen en un cerdo de 21 días pi. En la examinación post-mortem, se encontraron nódulos en la cabeza del epidídimo de los cerdos sacrificados (15, 30, 45 y 64 días pi) y se pudo apreciar atrofia testicular derecha en un cerdo de 30 días pi (Figura 4) [13, 16]. El virus se ha aislado de muestras de semen de cerdos infectados entre los cinco a 48 días pi, lo que refleja la capacidad infectiva del virus en un tiempo prolongado. Además el virus ha podido ser aislado de testículos y epidídimo de los animales infectados [16].

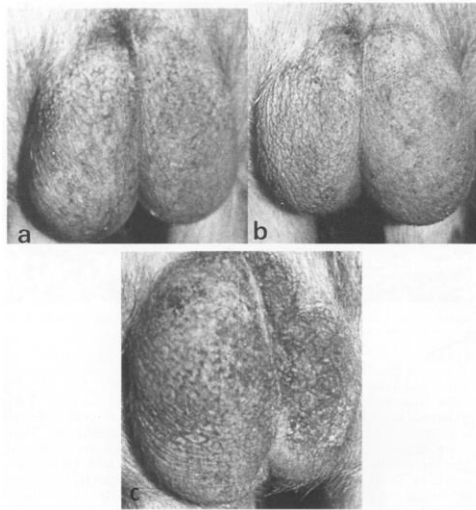


Figura 4. Atrofia testicular por RVP. a) 8 días pi b) 15 días pi c) 30 días pi. Tomado de Ramírez *et al.* 1997 [13]

Las alteraciones histopatológicas del epidídimo incluyen formación de granulomas espermáticos y degradación vacuolar del epitelio ductular (figura 5). Estas lesiones han sido asociadas a una infiltración de células mononucleares, así como a una fibroplasia intersticial. La degeneración de los ductos seminíferos, así como la infiltración de células mononucleares se han observado en el testículo atrofiado del cerdo 30 días

pi. En cerdos de 70 a 80 días pi se ha presentado fibrosis en la cabeza del epidídimo, en algunos cerdos se observó atrofia testicular derecha también asociada a la degeneración de los ductos seminíferos y la infiltración de linfocitos, así como la formación de células gigantes [13]. No se ha observado evidencia de alteraciones en los riñones, así como tampoco evidencia de lesiones en el tracto digestivo.

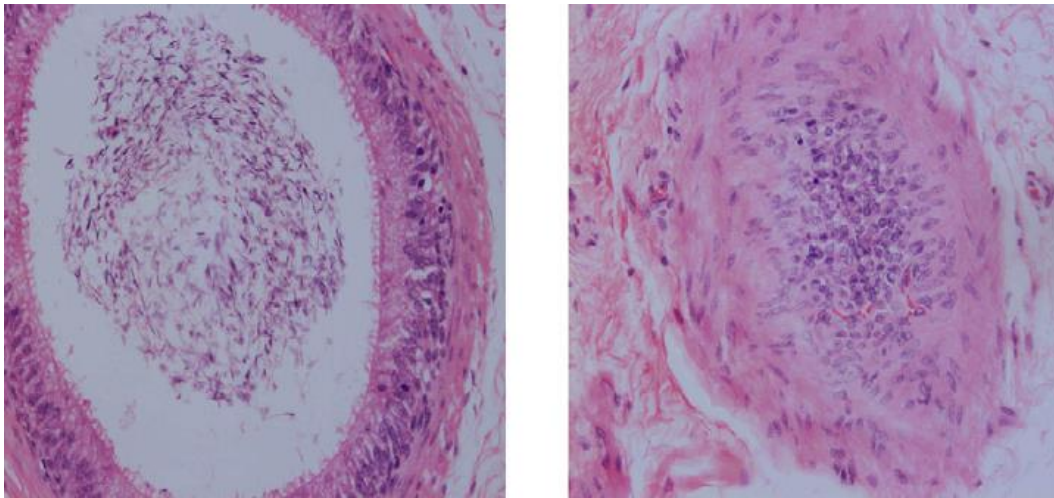


Figura 5. Histopatología de la cabeza del epidídimo. a) Cabeza de un epidídimo normal, b) degradación tubular en la cabeza del epidídimo. Ampliación 200X. Tomado de Rivera-Benítez *et al.* 2013 [16].

2.4. Diagnóstico de la enfermedad del ojo azul

El diagnóstico de la enfermedad del ojo azul se ha enfocado principalmente en la detección de encefalitis, opacidad corneal y fallas reproductivas en cerdas, así como epididimitis y orquitis en machos, esto debido a que son signos consistentes durante la infección. Las lesiones histológicas como encefalitis no supurativa, queratitis o degradación tubular en el epidídimo (epididimitis) ayudan a confirmar el diagnóstico. Así como la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en neuronas o epitelio corneal en la conjuntiva otorgan evidencia contundente en el diagnóstico de la enfermedad del ojo azul [2].

Aunque se debe considerar que la encefalitis o fallas reproductivas pueden ser causadas por otros agentes infecciosos que afectan cerdos, por ejemplo el *Herpesvirus porcino* que genera la enfermedad de Aujeszky o pseudorabia; o el *Beta arterivirus porcino* que genera el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Estos virus

pueden cursar con cuadros clínicos similares, pero solo RVP causa opacidad corneal en conjunto con orquitis y epididimitis. Por lo que la presencia de ambos signos en un animal infectado es considerado auxiliar en el diagnóstico de enfermedad del ojo azul [2, 17].

Para el diagnóstico serológico se recomiendan dos muestras de suero con una diferencia de 15 días en la toma, para la confirmación de la enfermedad del ojo azul mediante inhibición de la hemaglutinación (IH), neutralización viral (NV) o ELISA. La IH es la prueba más empleada, pero se ha detectado la posibilidad de falsos positivos en una de cada 16 muestras analizadas cuando se emplean eritrocitos de pollo o cuando el antígeno se ha cultivado en embriones de pollo [18]. Por tanto, se recomiendan los eritrocitos bovinos. Los cerdos infectados naturalmente desarrollan anticuerpos que generalmente persisten de por vida.

Se ha visto que el cerebro es el mejor órgano para aislar el virus, así como para la detección de los antígenos virales. Aunque también se ha podido emplear muestras de pulmón y tonsilas [2]. Se ha empleado inmunofluorescencia y qRT-PCR para detectar al virus y determinar la carga viral del animal. Rivera-Benítez *et al.* (2013), mencionan que este ensayo es más sensible y puede detectar el gen P o el NP de todas las cepas circulantes. El ARN de RVP ha sido detectado en muestras de sangre (suero) de cerdos infectados entre los días 2 y 68 pi y en muestras de semen desde el día 2 pi, pudiéndose encontrar hasta el día 142 pi [16, 19].

2.5. Prevención, control y vacunas contra enfermedad del ojo azul

En la enfermedad del ojo azul no existe un tratamiento indicado para cerdos infectados. Los cerdos infectados con RVP se pueden recuperar de forma espontánea o morir. Aun no se ha logrado el control de la infección debido principalmente a que los animales pueden presentar cuadros subclínicos, así como a que RVP puede ocasionar infecciones persistentes [20]. Terapia antimicrobiana se utiliza comúnmente para tratar y prevenir enfermedades infecciosas secundarias [17].

Los programas de control en hatos es la mejor forma de prevenir la introducción de RVP en una granja. Los reemplazos deben seleccionarse de un hato sano y ponerse

en cuarentena antes de la introducción [17]. En los animales pie de cría no se debe mezclar animales de diferentes corrales, así como se debe eliminar cerdos que presenten un cuadro clínico sospechosos a RVP. Campos y Carbajal (1992) sugieren evaluar a los sementales serológica y clínicamente, así como también emplear inseminación artificial [21]. Otras medidas de bioseguridad son emplear cercas perimetrales, áreas de carga separadas, así como un control en la vida silvestre de la granja.

Para eliminar a RVP de granjas infectadas se realizan particas como cierre del hato, limpieza y desinfección, así cómo manejar producciones “todo dentro-todo fuera” [17]. Rivera-Benítez (2013), que la optimización de pruebas de diagnóstico como qRT-PCR pueden auxiliar para determinar el potencial de transmisión de RVP, por lo que implementar y mejorar las herramientas de diagnóstico contra RVP pueden contribuir al desarrollo de programas de control y erradicación de RVP, lo que a su vez prevendría una diseminación a otras regiones porcícolas en el mundo [5].

Existen tres vacunas comerciales contra RVP. La vacuna Innovac Ojo Azul® producida por el laboratorio Avimex, S.A. de C.V., es una vacuna emulsionada que contiene una suspensión de fluido de RVP cepa MG-55, obtenido de cultivo celular, inactivado químicamente y emulsionado en aceite mineral (adyuvante), indicada para lechones, cerdos en etapa de desarrollo y pie de cría. La vacuna Porcimune SOA® producida por el laboratorio Lapisa, S.A. de C.V.; es una vacuna que contiene dos cepas de virus completos inactivados químicamente (cepas LPMV-CI y LPMV-CIII), la cual se encuentra emulsionada con un adyuvante oleoso. Está indicada para animales de reemplazo, lechones, pie de cría, sementales y hembras. La vacuna AVILAB OJO AZUL® producida por Avilab es una vacuna elaborada con antígenos virales inactivados de *Rubulavirus porcino* (cepa POA02), cultivados en línea celular y emulsionados con adyuvantes oleosos. Indicada para uso en etapas de gestación, lactancia, desarrollo, reemplazo y reproductores. Sin embargo, algunos datos indican que una vacuna monovalente no podría generar protección contra todas las cepas circulantes de RVP [22].

2.6. Agente etiológico de la enfermedad del ojo azul

Rubulavirus porcino, recientemente nombrado *Orthorubulavirus porcino* es un virus del orden *Mononegavirales*, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, dentro de la subfamilia *Rubulavirinae*, la cual contiene 8 especies de virus en donde también se encuentra el virus de parotiditis [6].

El posible origen de RVP se ha sugerido, son los murciélagos, en un estudio por Salas *et al.*, (2004) se reportó la presencia de RVP en un murciélago de la especie *Rhogeessa parvula major*, obtenida en el estado de Colima, México. Wang *et al.* (2007), al comparar la secuencias del virus de Mapuera (rubulavirus que afecta murciélagos, aislado en 1979) con RVP, encontró que presentan mayor porcentaje de identidad entre sí, que con otro miembro del género *Rubulavirus* [23, 24]. Esto permite formular la hipótesis que el virus pudo haberse originado en los murciélagos y diseminarse a los cerdos de forma directa o mediante algún hospedero intermediario que aún no ha sido identificado.

Los virus dentro de esta subfamilia comparten similitudes en su estructura y organización. RVP es un virus pleomórfico que se compone de un bicapa lipídica que se genera a partir de la membrana plasmática de la célula hospedero (Figura 6a). En la bicapa lipídica se encuentran dos glicoproteínas, la proteína de fusión (F), de 59 kDa y la proteína hemaglutinina/neuraminidasa (HN) de 66 kDa. Debajo de la envoltura se encuentra la proteína de matriz (M), de 40 kDa que unen a las glicoproteínas de membrana y a la nucleocápside. La nucleocápside es una estructura empaquetada que se compone de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de sentido negativo asociado a la nucleoproteína (NP) de 68 kDa. A su vez la nucleocápside, esta formada por dos proteínas la fosfoproteína (P) de 52 kDa y la proteína mayor (L) de 200 kDa (figura 6b).

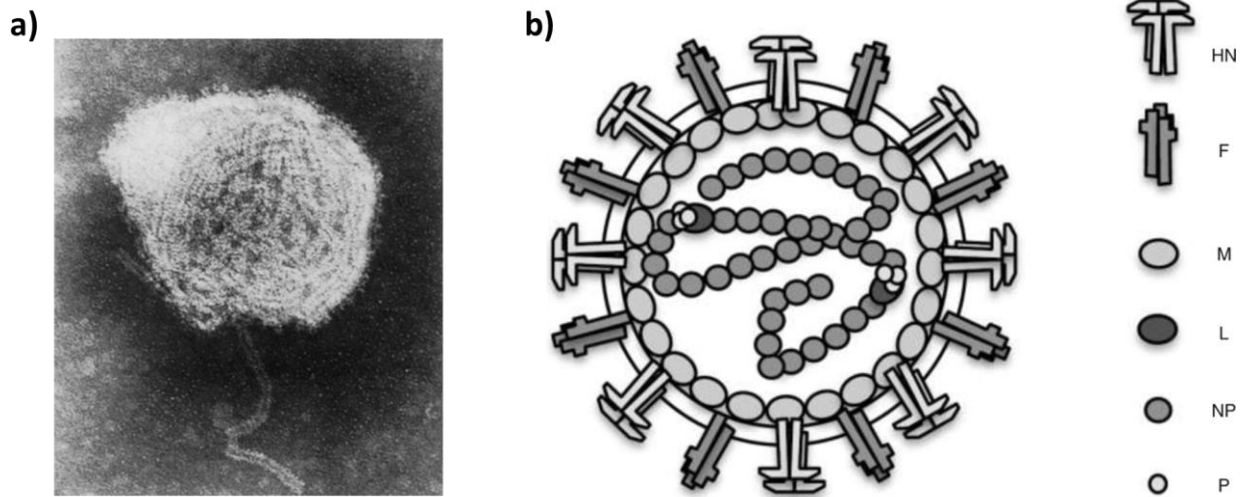


Figura 6. Estructura de *Rubulavirus porcino*. a) Microscopia electrónica de RVP. Tinción negativa del virus (X 85000). b) representación esquemática de las proteínas estructurales de RVP. Modificado de Hernández -Jáuregui et al. 2001 y Cuevas et al., 2015 [7, 25]

2.7. Estructura del genoma y regulación en la expresión de proteínas de RVP

La estructura del genoma de RVP es una cadena de ARN monocatenario en sentido negativo (15,180 nucleótidos), el cual contiene un solo promotor bipartita que se compone de los primeros 12 nucleótidos en la región 3' no traducida (UTR) del genoma y un segundo componente en la 5' UTR del gen NP, el cual regula el inicio de la traducción de todas las proteínas del virus. El promotor es seguido de los marcos de lectura abiertos (ORF) de los genes 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' en ese orden. Todos los genes de RVP terminan por una secuencia conservada de UUAAGAAAAA en el extremo 5' de cada gen. Se ha reportado sustituciones en el gen M de una U en vez de una A en la posición 4 y en el gen F de A en vez de U en la posición 1 en la secuencia de terminación [26].

Para el inicio de la replicación y síntesis de ARN mensajero, la proteína P unida a la proteína L, censan el genoma en búsqueda del promotor. Una vez que L se encuentra con el promotor, esto conduce a la separación de la cadena de la proteína NP del extremo 3' del ARN del genoma, lo que permite que el ARN acceda a la cavidad de síntesis interna y que se inicie la síntesis de ARN. Las proteínas NP que han sido desplazadas de forma transitoria deben seguir el movimiento de la plantilla de ARN a

través de los canales de la polimerasa L. Siempre las proteínas NP desplazadas deben remplazarse en el ARN del genoma para mantener la integridad del mismo conforme avance la síntesis de ARN. Los modelos de la interacción de la proteína L sugieren que solo pueden acceder a la cavidad de la polimerasa de 20 a 25 nucleótidos, por lo que solo es necesario separar pocas proteínas NP del ARN del genoma [27].

Existen pocos mecanismos de edición de los ARNm, el gen P presenta la capacidad de codificar cuatro proteínas, la proteína P, V, C e I, a partir del mismo gen mediante un proceso que se denomina, en los paramixovirus, tartamudeo de la polimerasa. Esto es debido a que el gen presenta un región rica de uracilos unidos a una subunidad de la proteína NP, lo que genera que la proteína L pueda retroceder por una interacción más débil y desplazar el marco de lectura para generar las otras proteínas [27].

2.8. Funciones de las proteínas de RVP

2.8.1. La proteína NP

La proteína NP es de 68 kDa. Esta proteína rodea el genoma viral completamente. Su principal función es estructural ya que facilita la transcripción y replicación del ARN viral. La proteína NP se asocia a seis nucleótidos y es debido a ello que, en los paramixovirus, solo los genomas que poseen múltiplos de seis se replican eficientemente, algo que ha sido denominado como la regla del seis o del hexámero. La posición en la cual se asocian las subunidades de la proteína NP con el genoma son muy importantes ya que un cambio en ellas puede presentar un efecto negativo en la replicación del genoma [27].

2.8.2. Proteína L

La proteína mayor o L es una ARN polimerasa dependiente de ARN, contiene 2,251 aminoácidos y su masa es de 255.15 kDa. La función es de replicar el genoma, así como el de generar los ARN mensajeros para su posterior traducción. Se ha comparado esta proteína con la proteína L del virus de la estomatitis vesicular, la cual es una proteína multifuncional con diversas actividades como el encapuchar el ARN

mensajero, la metilación, la poliadenilación de los ARN mensajeros sintetizados y la fosforilación de proteínas [28].

2.8.3. Proteína P

La proteína P o fosfoproteína de RVP tiene un tamaño de 52 kDa y está altamente fosforilada. La proteína P de los paramixovirus es esencial para la síntesis de ARN viral. El papel preciso de la fosforilación de la proteína P sigue siendo elucidado, estudios sugieren que la fosforilación puede estabilizar la estructura de la proteína P en el virus de parotiditis, ya que mutaciones dentro de estas regiones generan cambios conformacionales que afectan los dominios funcionales de la proteína P generando una disminución en la síntesis de ARN viral [29, 30].

La proteína P se encuentra asociada con la proteína L. Se hipotetiza que la interacción de P con la proteína NP estabiliza la unión de la polimerasa L, la cual recorre el complejo NP-ARN y también facilita la unión de proteínas NP libres al complejo de replicación para el recubrimiento de los nuevos genomas. La proteína P está compuesta por un dominio N-terminal y un dominio C-terminal. El dominio N-terminal es responsable del acompañamiento de las proteínas NP recién sintetizadas a el complejo de replicación, manteniendo los monómeros NP en una conformación abierta y evitando la oligomerización prematura. La función del dominio C-terminal aun no es clara [31].

2.8.4. Proteína M

La proteína de matriz o M es de 40 kDa. La proteína M coordina el ensamblaje de nuevos viriones al interactuar tanto con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas virales como con el complejo de ribonucleoproteína viral (genoma de ARN unido a la proteína NP), concentrando los componentes virales en sitios específicos en la membrana de donde brotan los virus [32]. La interacción con las glicoproteínas virales se demostró por la pérdida de co-localización cuando se truncan las colas citoplasmáticas de la proteína HN, F o ambas del virus parainfluenza 5 [33].

El papel central de la proteína M durante la infección en otros paramixovirus, se ha demostrado en experimentos donde las mutaciones de la secuencia de la proteína M

resultaron en una producción viral deficiente, y con una pérdida casi completa de la producción de partículas cuando el gen M está ausente [34].

2.8.5. Proteína HN

La proteína HN ha sido la proteína más estudiada de RVP. Se ha reportado un masa de 66 kDa [3]. La proteína HN es una proteína multifuncional que participa de forma activa en el reconocimiento del receptor de la célula hospedera, la unión al receptor y la posible activación de la fusión de membranas para el ingreso del genoma a la célula [35]. Posee una actividad enzimática de neuraminidasa, según el registro Expasy E.C 3.2.1.18, además se ha propuesto como factor de virulencia.

Se ha reportado que la proteína HN de RVP (cepa LPMV-1984) interactúa específicamente con los ácidos siálicos enlazados en alfa 2,3 (Neu5Ac(α 2,3)) por lo que esto indica que esta molécula es el receptor de la célula hospedero [36]. La proteína HN interacciona con el receptor de ácido siálico en dos regiones de la proteína (FPAYGGM y GSEGRI). El sitio activo de la actividad de neuraminidasa incluye una secuencia conservada de NRKSCS [15]. Se ha demostrado que el receptor de ácido siálico enlazado en alfa2, 3 (Neu5Ac (α 2, 3) es altamente expresada en el sistema nervioso central (SNC) de los cerdos recién nacidos y en los tejidos reproductivos de los cerdos adultos [37]. Debido a esto, se asocia el tropismo de RVP dependiendo de la edad del animal.

La proteína HN es la proteína inmunodominante de RVP y de otros paramixovirus, por ello se ha propuesto como antígeno para el desarrollo de una vacuna. Se han encontrado cambios genéticos en la proteína HN de cepas circulantes de RVP. A estas mutaciones se les ha asociado directamente con la variación antigénica que se ha encontrado entre cepas [10, 22].

2.8.6. Proteína F

La proteína de fusión (F) es una glicoproteína de fusión de clase I, estructuralmente similar al dominio de fusión en la hemaglutinina de los virus de la influenza. La proteína F es un homotrímero compuesto de monómeros de 541

aminoácidos con un peso de 51 kDa, cuya función es inducir la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedero.

La glicoproteína F se encuentra muy conservada entre los miembros de la familia *Paramyxoviridae*. La proteína F del RVP presenta 45% de identidad con la del virus de la parainfluenza 5 y 42% con la del virus de las paperas [26]. Esta proteína contiene un dominio hidrofóbico oculto (péptido de fusión) que solo se expone una vez que es activada por la proteína HN activa y cuya función es participar en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo cual permite que el virus se introduzca al citoplasma de la célula hospedera. Además, permite que RVP se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular. Esta característica genera la formación de sincicios (células gigantes multinucleadas) los cuales se pueden apreciar en los tejidos infectados por el virus [9].

La proteína F contiene un péptido señal en el extremo N-terminal que permite su transporte a la membrana de la célula hospedera. Se sintetiza como un precursor inactivo llamado F0, el cual sufre un corte generando el monómero maduro que se compone de dos subunidades F1 y F2, que permanecen conectados covalentemente mediante un enlace disulfuro intramonomérico. Se ha descrito que el corte lo realiza una endoproteasa del tipo furina en el sitio multibásico HRKKR, así como que posee sitios potenciales de N-glicosilación [38, 39]. Directamente adyacentes al péptido de fusión y al dominio transmembranal, se encuentran dos regiones anfipáticas α -helicoidales altamente conservadas con un patrón de repetición en heptada (HR) de 3-4 repetidos HR, denominados dominios HRA y HRB. La proteína F presenta dos estados estructurales, uno denominado estructura prefusión metaestable y otra denominada estructura postfusión (Figura 7), las cuales ya han sido elucidadas para el virus de parainfluenza 5, virus del sarampión y virus de Nipah [40].

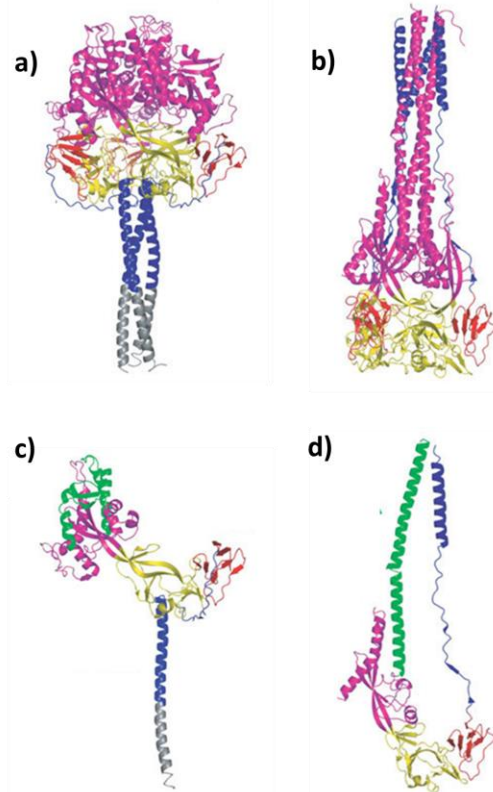


Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína F del virus de Parainfluenza 5. a) Estructura prefusión del trímero de la proteína F. b) estructura postfusión del trímero F. c) estructura prefusión del monómero de F. d) estructura postfusión del monómero de F. Modificado de Yin *et al.* 2006 [40]

2.9. Ciclo de replicativo de RVP

El ciclo replicativo de RVP consta de varias fases (figura 8). Lo primero que ocurre es el reconocimiento del receptor Neu5Ac ($\alpha 2, 3$) por la proteína HN, la cual sufre un cambio conformacional y activa la proteína F para generar un cambio estructural y exponer el péptido de fusión, el cual permite el ataque a la membrana de la célula hospedera y con ello ocurre la fusión independiente de pH de la membrana celular y viral. Esto provoca que la nucleocápside, que contiene el ARN viral, sea liberada en el citoplasma. Posterior a ello inicia la síntesis de ARN mensajero y su posterior traducción a proteínas virales. A la par también inicia la síntesis de un ARN denominado antígenoma (cadena complementaria al genoma viral), el cual funge como molde para dar origen a las copias del genoma viral. Se considera que estos puntos ocurren simultáneamente, debido a que se requiere de proteínas virales para mantener la estabilidad de los nuevos genomas. De las proteínas expresadas solo la proteína HN y F requieren ser sintetizadas

en ribosomas asociadas al retículo endoplásmico y que luego son transportadas al aparato de Golgi, del cual, a su vez, son transportadas a la membrana. La proteína M tiene afinidad por el complejo riboproteico (ARN viral, proteínas NP, P y L) y también se localiza en la membrana en donde puede interactuar con las colas citoplasmáticas de las proteínas HN y F, para el ensamble de la partícula viral, la cual es liberada mediante exocitosis, en donde la actividad de neuraminidasa (sialidasa) de la proteína HN participa de forma activa en este proceso de infección. Con la partícula liberada se puede dar inicio a la infección de otra célula [41].

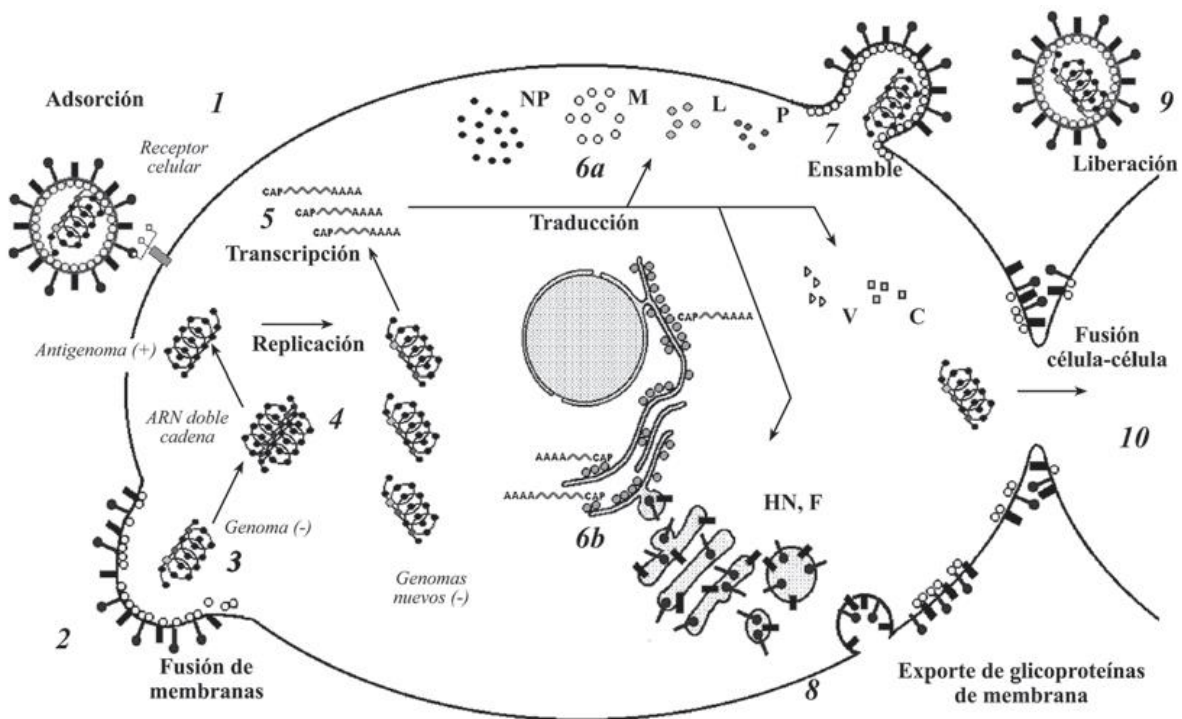


Figura 8. Ciclo replicativo de los paramixovirus. 1. Unión al receptor. 2. Fusión de membranas. 3. ingreso de genoma a célula hospedero. 4. Replicación viral. 5. Transcripción de ARNm. 6. Síntesis de proteínas. 7-8. Exporte de proteínas de membrana y ensamble de la partícula viral. 9-10. Liberación de la partícula o fusión de célula-célula. Tomado de Santos *et al.* 2004 [41]

En los paramixovirus, se ha reportado que, además de la infección mediante partículas virales, las células adyacentes a las células infectadas, se pueden infectar debido a que las primeras expresan las proteínas HN y F en su membrana y pueden fusionarse con las células no infectadas, de esta manera la información genética del virus

pasa directamente a la célula no infectada. Esto permite la propagación viral sin necesidad de que se dé el proceso de liberación de la partícula viral [9].

2.10. Inmunidad en una infección por Rubulavirus porcino

2.10.1. Evasión de la respuesta inmune innata en la infección por Rubulavirus porcino

En los paramyxovirus se ha descrito que la proteína V es un antagonista de la función del interferón, en la infección por RVP la expresión de la proteína V reduce la expresión de genes mediados por un promotor ISRE, pero no reduce la expresión de genes mediados por promotores GAS, esto sugiere que la proteína V de RVP puede contribuir a evadir la señalización del interferón tipo I, pero no la del interferón tipo II. Se encontró que la proteína V reduce la expresión de genes como ISG15 y MXA. El mecanismo propuesto para ello es la inhibición de la fosforilación de STAT1 y de STAT2, mediante la unión de la proteína V a STAT2, tanto en células de cerdo como humanas. Lo que no permite el transporte de estos factores al núcleo, por lo que no se genera la formación del complejo ISGF3 y por subsecuente la unión a los ISRE. Se identificó que RVP no induce la degradación de las proteínas STAT como otros paramyxovirus, solo inhibe su transporte al núcleo. Se ha observado que el bloqueo de la proteína V sobre la actividad antiviral del interferón del tipo I, facilita el establecimiento de la infección o incluso la presencia de coinfecciones [42].

2.10.2. Respuesta inmune celular en la infección por RVP

Los estudios de la respuesta inmune celular en la infección por RVP son escasos. La respuesta inmune mediada por células ha sido evaluada midiendo la capacidad de proliferación de las células mononucleares de sangre periférica hacia virus inactivados con calor y lectinas. Se identificó una fase de inmunosupresión en los cerdos infectados mediante la identificación de un bajo índice de estimulación de linfocitos estimulados con concanavalina A y fitohemaglutinina durante la primera semana pi. Esto pudiese desencadenar en alta susceptibilidad de infecciones secundarias en cerdos infectados

con RVP. La respuesta específica hacia RVP se observó cinco días después de la estimulación de células mononucleares en sangre periférica con el virus inactivo [43].

El fenotipo de las células mononucleares en sangre periférica indicó un incremento en monocitos (PoM1+) y de los linfocitos T (CD2+), esto ha sido corroborado por Cuevas *et al.*, (2009) quien encontró un aumento de linfocitos T (CD2+) a los 10 días pi e incluso hasta los 250 días pi en infecciones persistentes de RVP. Así como una cantidad baja de linfocitos B hasta la 4 semana pi. Al final de las ocho semanas pi, se observó un bajo número de células B (IgM+ en membrana), probablemente como resultado de la maduración de estas células a células productoras de anticuerpos, las cuales expresan IgG en la membrana y producen una gran cantidad de anticuerpos. El mayor número de células CD4-CD8+ se encontró en la primera semana pi, estas células han sido relacionadas a una actividad citotóxica, y frecuentemente se elevan en procesos infecciosos virales [43, 44].

La estimulación de células mononucleares en sangre periférica de cerdos infectados con antígenos virales induce un incremento de linfoblastos T CD4+CD8- y CD4+CD8+, en contraste, la estimulación con lectinas solo incrementa los linfoblastos T CD4+CD8-, lo que indica que el fenotipo CD4+CD8+ se da por la estimulación de los antígenos virales. El fenotipo CD4+CD8+ incrementa en toda la sangre de cerdos infectados con RVP, aunque disminuyen a la tercera semana pi, junto otras subpoblaciones de células T. Esto se atribuye a que las células efectoras permanecen en los órganos inmunocomprometidos. La función del fenotipo CD4+CD8+ en células T aún no está claramente establecido. Se sugiere que estas células pudiesen tener capacidad de memoria, debido a que estas células pueden reaccionar de forma específica con su antígeno en respuestas secundarias, lo que sugiere que la función de memoria y efectoras se encuentra presentes en esta subpoblación de linfocitos T. Este aumento en la población de linfocitos CD8+ ha sido corroborada 10 días pi y en infecciones persistentes de 250 días pi, así como la reducción de linfocitos CD4+ a los siete días pi [44, 45].

2.10.3. Respuesta de anticuerpos

La respuesta de memoria a antígenos virales se observó en los cerdos infectados desde la segunda semana pi. Lo que indica que la infección por RVP induce linfocitos de memoria que pueden ser reactivados, además las células mononucleares de los cerdos no infectados no responden a los antígenos virales, lo que confirma la especificidad de la respuesta de memoria [43].

La inducción de la respuesta de anticuerpos en una infección por RVP ha sido determinada por pruebas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización del virus. La seroconversión inicia desde la primera semana pi con la producción de anticuerpos neutralizantes, con títulos que oscila dentro de un rango de 4 a 6 \log^2 durante las primeras cuatro semanas pi. Los títulos de anticuerpos neutralizantes aumentan hasta 8.5 \log^2 en la quinta semana pi, se ha observado que estos títulos de anticuerpos se mantiene altos al menos hasta la séptima semana pi [43].

Un trabajo realizado en 2013, reportó que la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es limitado, ya que se llega a una cantidad constante de anticuerpos desde la novena semana hasta la semana 18 pi [16]. Los anticuerpos con capacidad de inhibir la hemaglutinación se presentan desde la segunda semana pi, con títulos de 5 \log^2 [43]. Esto se observó también en otro estudio, aunque los títulos que se presentaron fueron menores (2.8 \log^2) [16].

Los anticuerpos generados en una infección por RVP han sido caracterizados para determinar su especificidad, encontrando que estos responden contra 3 antígenos (68, 66 y 40 kDa), los cuales corresponden a las proteínas NP, HN y M respectivamente (Figura 9). Los ensayos de especificidad revelaron una predominancia antigénica de la proteína HN, esto debido a que en todos los cerdos infectados en este ensayo reconocieron a esta proteína a la tercera semana pi y se mantuvieron seropositivos durante el resto del estudio. La respuesta hacia la proteína M se dio a partir de la cuarta semana pi. Los anticuerpos en contra de la proteína NP se presentaron desde la quinta semana pi. Anticuerpos que reconocieran las proteínas F, P o L no fueron identificados por *Western blot* bajo las condiciones experimentales del ensayo [43].

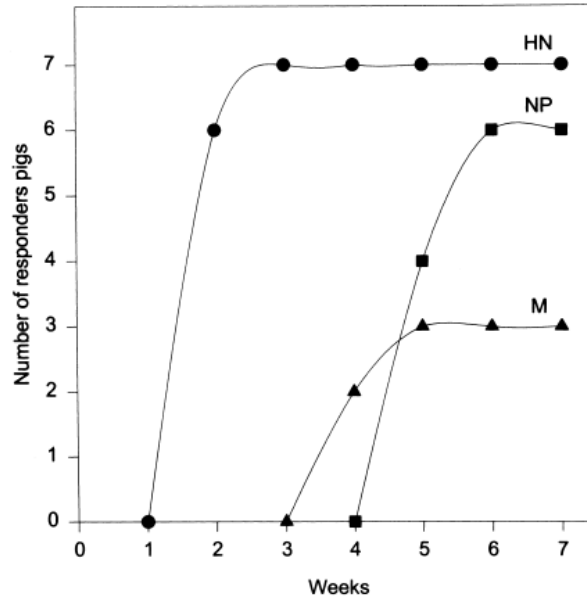


Figura 9. Reconocimiento de las proteínas de RVP. Reconocimiento por sueros de animales infectados experimentalmente. Tomado de Hernández *et al.*, 1998 [43].

2.11. Expresión de proteínas de RVP en sistemas heterólogos

La proteína HN es la única proteína de RVP que ha sido expresada en sistemas heterólogos. Cuevas-Romero *et al.* 2016 expresaron la proteína HN en el sistema de *Escherichia coli*. Se obtuvo una proteína de 544 aa con una masa de 61 kDa. El porcentaje de identidad de la proteína expresada es 97.6-99.6 % con las cepas de RVP reportadas en GenBank. La proteína recombinante fue reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-HN y por sueros de cerdos infectados con RVP obtenidos del INIFAP, México. Se emplearon 5 µg de proteína y se inocularon en ratones BALB/C (Edad cuatro a cinco semanas). Los ratones produjeron anticuerpos que reconocen la proteína a partir del séptimo día post inmunización y aumentaron la cantidad de anticuerpos hasta el día 28 (Figura 10)[46]. Este reporte confirma que la proteína HN es inmunogénica, aunque falta determinar si estos anticuerpos son neutralizantes o en su defecto pudiesen reconocer a otras cepas circulantes de RVP.

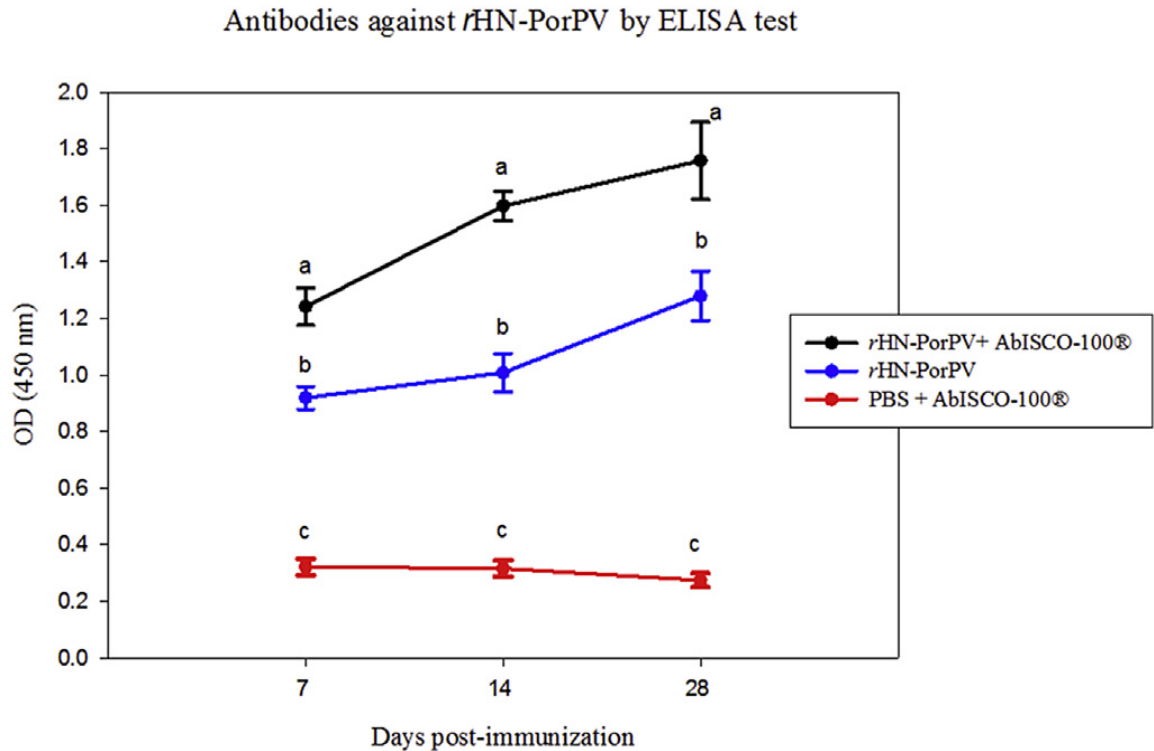


Figura 10. Respuesta inmune humoral específica inducida por rHN-PorVP en ratones medida por ELISA indirecto. Las unidades se representan como la DO recíproca de la absorbancia de los anticuerpos a 450 nm. Tomado de Cuevas-Romero *et al.* 2016 [46]

Dentro de nuestro grupo de trabajo tenemos una línea de expresión de proteínas de RVP en sistemas heterólogos. Cerriteño-Sanchez *et al.*, 2016 emplearon la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* para expresar la proteína HN de RVP cepa PAC1. La proteína expresada fue de 514 aa con una masa de ~60 kDa. La proteína recombinante eHN presentó actividad de neuraminidasa, lo que sugiere que mantuvo sus dominios similares a los de la proteína nativa, en términos de conformación.

Además, la proteína eHN fue reconocida por 4 sueros de cerdos infectados por diferentes cepas de RVP. Este resultado sugiere que la proteína eHN mantiene determinantes antigénicos presentes en diferentes cepas circulantes de RVP (Figura 11a). Se empleó esta proteína para inducir a la formación de anticuerpos en ratones CD-1 y los anticuerpos se produjeron a partir del día 7 post inmunización y aumento la cantidad de estos hasta el día 28. Estos anticuerpos presentaron capacidad de inhibir la

infección en células pK-15 infectadas con RVP cepa PAC1 hasta en un 80% (Figura 11b), lo cual muestra su capacidad de neutralizante contra el RVP [47].

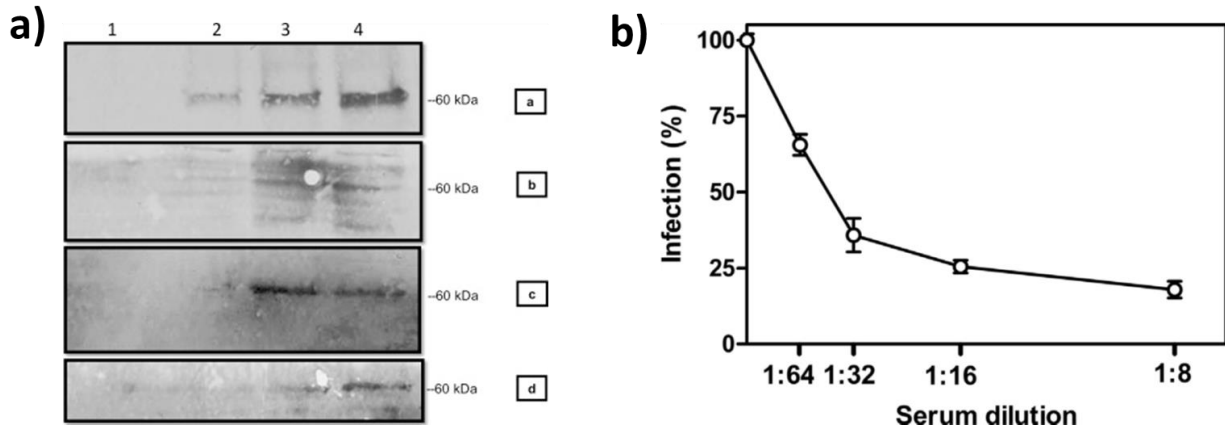


Figura 11. Antigenicidad y neutralización de anticuerpos anti-HN de RVP. a) Reconocimiento de proteína eHN por sueros de cerdos infectados con RVP. b) Capacidad de neutralizar la infección mediada por los anticuerpos anti-eHN, tomado de Cerriteño *et al.* 2016 [47].

2.12. La proteína F como posible antígeno

Solo se ha reportado la expresión de la proteína HN de *Rubulavirus porcino* en sistemas heterólogos. Los reportes de la falta de reconocimiento de los anticuerpos anti-HN de RVP por diferentes cepas circulantes sugiere que se deben buscar alternativas a posibles antígenos como la proteína F que induzcan anticuerpos protectores contra todas las cepas.

Aunque para el caso de RVP aún no ha sido reportado el reconocimiento de la proteína F por anticuerpos generados en infecciones naturales o experimentales, existen reportes de determinantes antigénicos en la proteína F de otros paramyxovirus, que son reconocidos por anticuerpos. La Immune epitope database (IEDB) tiene reportados 185 determinantes antigénicos específicas para la proteína F de otros paramyxovirus (tabla 1).

Tabla 1. Epítomos reportados en IEDB de la proteína F.

Antígeno	Virus	Num. Epítomos
Glicoproteína F0 Fusión	Virus de sarampión	131
Proteína F Paperas	Virus de parotiditis	3
Glicoproteína F0 Fusión	Respirovirus humano 3	4
Glicoproteína F0 Fusión	Virus del moquillo	20
Glicoproteína F0 Fusión	Avulavirus aviar 1	16
Glicoproteína F0 Fusión	Virus de Hendra	1
Proteína Fusión	Virus de la peste de los pequeños rumiantes	10

IEDB (<https://www.iedb.org/>); consultado 20/10/2020

Sumado a esto, existen reportes de que algunos de estos determinantes antigénicos presentan la capacidad de neutralizar el proceso de infección. Merz *et al.* (1980) infectaron células CV-1 con el virus de parainfluenza 5 (anteriormente virus símico 5), a las 9 h pi colocó los cultivos en presencia de anticuerpos monoclonales contra las proteínas HN o F del virus. El informe indica que los anticuerpos específicos anti F presentaron mayor porcentaje de neutralización que los anticuerpos específicos contra la proteína HN (Figura 12a,b y c) [48].

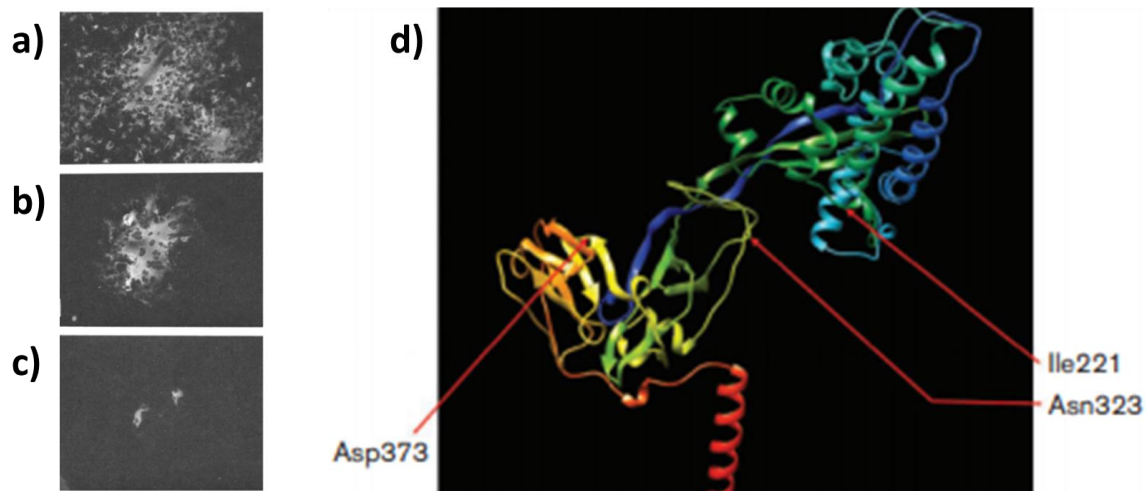


Figura 12. Capacidad de neutralización de anticuerpos contra la proteína F. a) Cultivo de células CV-1 infectadas con virus de parainfluenza 5 sin presencia de anticuerpos. b) Cultivo de células CV-1 infectadas con virus de parainfluenza 5 en presencia de anticuerpos anti-HN. c) Cultivo de células CV-1 infectadas con virus de parainfluenza 5 en presencia de anticuerpos anti-F. d) Epítomos conformacionales con capacidad neutralizante en el virus de parotiditis, Tomado de Merz *et al.*, 1980; Santak *et al.*, 2015.

Santak *et al.* (2015) reportó que existen determinantes antigénicos en la proteína F con capacidad suficiente para neutralizar el virus de parotiditis. Se utilizaron anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos conformacionales, encontrando que 3 anticuerpos que reconocen isoleucina 221, asparangina 323 y el ácido aspártico 373 presentan capacidad de inhibir la replicación del virus (Figura 12d).

En 2016, Kang *et al.*, expresaron la proteína F del virus de Newcastle en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Se empleó esta como antígeno y se dio seguimiento a la producción de anticuerpos empleando flagelina o hidróxido de aluminio/hidróxido de magnesio como adyuvantes. En ambos casos se obtuvo la producción de anticuerpos que reconocieron tanto la proteína de forma específica, como el virus completo (figura 13). El empleo de flagelina en conjunto con la proteína F induce una respuesta del tipo IgG2a más alta, demostrando que la flagelina como adyuvante puede favorecer una respuesta específica a F, además de la producción de IgG2a, a diferencia del uso de hidróxido de aluminio/hidróxido de magnesio. Una respuesta IgG2a está relacionada con la activación de la vía Th1, la cual desencadenaría en una respuesta activadora de linfocitos T citotóxicos [49].

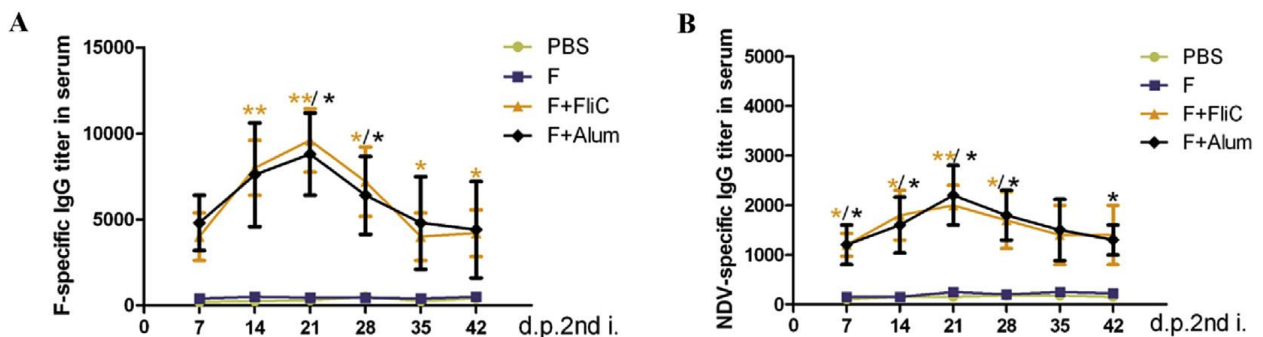


Figura 13. Producción de anticuerpos anti-F del virus de Newcastle. a) IgG específicas contra la proteína F. b) IgG específicas contra el virus de Newcastle. Tomado de Kang *et al.* 2016 [49].

Debido a estos reportes es posible suponer, que en el caso de RVP, la proteína F, pudiese presentar una respuesta inmune como antígeno que auxilie en contra de la infección.

2.13. *Pichia pastoris* como sistema de expresión

Pichia pastoris es un sistema de expresión eucariota que ha sido ampliamente usado debido a sus altos niveles de expresión. Entre las características que presenta este sistema se encuentran que la levadura puede crecer a altas densidades celulares, se conoce bien su sistema secreción de proteínas y se han diseñado diversos vectores para la manipulación genética de la levadura. En particular, para la expresión de proteínas eucarióticas tiene ventaja sobre los sistemas como *Escherichia coli*, debido a que se pueden expresar proteínas que requieren de modificaciones postraduccionales similares a las realizadas por células eucariotas superiores [50].

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica, es decir que presenta la capacidad de emplear metanol como única fuente de carbono para realizar su metabolismo. Esta capacidad es prevista por la enzima alcohol oxidasa, la cual cataliza el uso del metanol en las rutas de biosíntesis. Dentro del genoma de *P. pastoris* se encuentran dos genes encargados de expresar esta proteína. El gen AOX1 y AOX2. AOX1 es la proteína que se expresa en mayor proporción cuando la única fuente de carbono es metanol. Debido a ello se han empleado estrategias que utilizan el promotor del gen AOX1 para expresar proteínas recombinantes y obtener grandes cantidades de esta [50].

La estrategia de emplear al promotor AOX1 ha presentado la obtención de tres fenotipos diferentes en células transformadas con el gen de interés. Esto debido a que la levadura integra el gen de interés de forma específica mediante recombinación y dependiendo del fenómeno de recombinación que la levadura lleve a cabo es la presencia del fenotipo. Un fenotipo Mut+ es un fenotipo de desplazamiento en donde el gen de interés desplaza al gen AOX1, la levadura no pierde la capacidad de degradar el metanol. MutS es un fenotipo de sustitución en donde la levadura pierde parte del gen AOX1 por el evento de recombinación, y su capacidad de degradar metanol disminuye ya que solo el gen AOX2 se encuentra íntegro. Con el fenotipo Mut-, la cepa pierde la capacidad de degradar metanol y no puede sobrevivir en presencia de este debido a que la interrupción ocurre en ambos genes [51].

Los vectores más empleados para transformar a *P. pastoris* son los de la serie pPICZ α (Invitrogen). Estos vectores contienen un origen de replicación bacteriano para su propagación en *E. coli*. Un gen de resistencia a zeocina como antibiótico de selección. El gen de interés se encuentra flanqueado en el extremo N-terminal por un el péptido señal llamado factor α , el cual es un péptido que induce la secreción de la proteína de interés al medio extracelular. En el C-terminal puede contener etiquetas de cMyc o una de polihistidinas que permiten el reconocimiento de la proteína recombinante, así como facilita la purificación. El gen foráneo estará regulado por el promotor AOX1 y debido a ello la expresión de la proteína de interés se vuelve inducible solo en presencia de metanol como fuente de carbono.

Este sistema de expresión se ha empleado para producir proteínas virales como la proteína NP del virus de las paperas, la proteína NP del virus del sarampión, la proteína E del virus del dengue [52-54]. Por lo que su capacidad de expresión de posibles antígenos virales está demostrada.

2.14. Diseño y desarrollo de vacunas mediante el uso de herramientas bioinformáticas

El diseño de vacunas hacia enfermedades emergentes causadas por virus se ha facilitado gracias en el uso de herramientas bioinformáticas, que permiten la selección de posibles determinantes antigénicos, así como la predicción del tipo de respuesta que estas pudiesen inducir. Los inmunólogos han utilizado técnicas experimentales de alto rendimiento durante bastante tiempo, que han generado una gran cantidad de datos funcionales, clínicos y epidemiológicos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos enfoques computacionales para almacenar y analizar estos datos. Esto da lugar al campo llamado inmunoinformática. Ejemplos de este tipo de vacunas desarrolladas o de como las mutaciones afectan la inmunogenicidad por inmunoinformática son contra la COVID-19 o el virus de Mayaro [55, 56].

La inmunoinformática incluye el estudio y diseño de algoritmos para mapear epítomos de células B y T potenciales. Estos también pueden llevar a explorar los posibles sitios de unión para el desarrollo de nuevas vacunas. Esta metodología se denomina

“vacunología inversa”. Es bastante ventajosa porque los métodos convencionales necesitan cultivar patógenos y luego extraer sus proteínas antigénicas [57].

Las bases de datos han permitido seleccionar proteínas o péptidos con de forma rápida, para estimar no solo el tipo de respuesta que induce, si no también características adicionales como si la proteína es alergénica o tóxica. Este campo se ha acoplado bien al área de química computacional, ya que incluso permite determinar la capacidad de unión de un péptido algún complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las herramientas más empleadas en la predicción de los determinantes antigénicos MHC se basan en el uso de redes neuronales artificiales con capacidad de predecir la afinidad hacia alelos leucocitarios no solo humanos, sino también de algunos animales como cerdo, ratones o caballos, lo que permite realizar predicciones específicas hacia el organismo de interés, además estas bases de datos presentan una gran diversidad de alelos en cada especie, lo que incluso permite realizar este tipo de predicciones dependiendo de las poblaciones [58].

En el caso de las predicciones de los determinantes antigénicos de células B, los programas permiten realizar predicciones del tipo lineal (continuo) o conformacional (discontinuo). En el caso de determinantes antigénicos lineales. La capacidad de predicción de un solo algoritmo es baja, por lo que se debe de emplear al menos dos algoritmos de predicción, así como complementar los análisis determinando las características fisicoquímicas de cada determinante antigénico [59]. En el caso de determinantes antigénicos conformacionales, las herramientas son limitadas y permiten solo la predicción de regiones amplias con capacidad de reconocimiento por anticuerpos.

Esto en conjunto se han vuelto herramientas importantes en la biotecnología moderna pudiendo solventar problemas de diseño de vacunas en menor tiempo y costo en comparación al no emplear estas metodologías.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática que genera la enfermedad del ojo azul en la porcicultura del centro y bajío de la República Mexicana, que tiene como consecuencia la muerte de neonatos por afecciones nerviosas o la infertilidad de cerdos adultos y por ello una reducción de ingresos a productores de las regiones endémicas, se genera la necesidad de obtener nuevos métodos de detección y prevención. Con el objetivo de disminuir la tasa de incidencia de la infección por dicho virus, una de las alternativas es generar estos métodos, mediante la producción de proteínas recombinantes. Hasta la fecha son pocos los reportes de producción de proteínas de este virus. Aun no se ha reportado la producción de la proteína F en vectores de expresión del tipo eucarionte, la cual se puede usar como alternativa para generar nuevas vacunas o métodos de detección hacia este patógeno. En el grupo de trabajo se cuenta con la experiencia y conocimiento para desarrollar esta área, por lo cual al mismo tiempo pudiese aumentar el conocimiento de posibles métodos de prevención no solo en contra del RVP, si no en contra de otros miembros de la familia *Paramyxoviridae*, los cuales pueden aportar beneficios en los campos de la virología y la inmunología, generando nuevas perspectivas de prevención de diversas infecciones virales.

4. HIPÓTESIS

La proteína F del *Rubulavirus porcino* presenta determinantes antigénicos para ser considerado un posible antígeno.

La proteína F expresada en *P. pastoris* mantiene determinantes antigénicos para ser reconocida por anticuerpos generados en infecciones por RVP.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar mediante métodos inmunoinformáticos las proteínas HN Y F de *Rubulavirus porcino*. Producir el ectodominio de la proteína F del *Rubulavirus porcino* en el sistema de expresión *P. pastoris* y evaluar su capacidad para ser reconocida por anticuerpos generados en una infección por *Rubulavirus porcino*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Predecir los epítomos lineales y conformacionales de linfocitos B de las proteínas HN y F del *Rubulavirus porcino*.
- Predecir epítomos que se unan a MHC-I de las proteínas HN y F del *Rubulavirus porcino*.
- Realizar ensayos de acoplamiento molecular de los epítomos predichos con moléculas MHC-I.
- Obtener cepas de *P. pastoris* productoras de la proteína F del *Rubulavirus porcino*.
- Purificar la proteína F de RVP mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).
- Evaluar la antigenicidad de la proteína F recombinante mediante sueros de cerdos infectados con RVP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención de material genético de RVP, cepa PAC1

La línea celular de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC CCL-81) se cultivó en botellas de 25 cm² en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con suero bovino fetal al 5%, penicilina 100 U / ml y estreptomycinina 100 µg / ml, hasta obtener una confluencia del 80%. Se inoculó la cepa PAC1 de *Rubulavirus porcino* (Michoacán, México, 1990) en cultivos celulares confluentes y se incubó 1 h a 37°C, se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con PBS. Se añadió DMEM fresco a las células y 2.5% de suero fetal bovino, se incubó durante 72 h hasta que los efectos citopáticos fueron evidentes. Los sobrenadantes se aclararon mediante centrifugación a 3200 rpm, 30 min. Las partículas virales se concentraron mediante ultracentrifugación a 80,000 x g durante 1 h. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 250 µl de ddH₂O libre de nucleasas. Se adicionaron 500 µl de TRAzol, se mezcló mediante inversión y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó 6 veces por inversión. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, la muestra se separó en tres fases (fase orgánica, interfase y fase incolora acuosa). Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo estéril. Se adicionaron 250 µl de isopropanol absoluto (precipitar material genético), se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol 70%, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar durante 5 min y se resuspendió en 20 µl de ddH₂O libre de RNAsas.

7.2. Amplificación por RT-PCR del marco de lectura de la proteína F de RVP

El marco de lectura abierto de la proteína RVP F se obtuvo a partir del ARN extraído del cultivo de células VERO infectado con RVP cepa PAC1. Se diseñaron oligonucleótidos específicos agregando los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (partes subrayadas), respectivamente, se diseñaron con base en la secuencia de ADNc de RVP cepa LPMV (GenBank ID: Y10803.1): oligonucleótido sentido RuF0fw1 (5'-CCA GGA ATT CGG ATG CCA CAA GTT -3') (sitio de restricción *EcoRI* subrayado) y antisentido

RuF0rv1 (5'-GCG GCT CTA GAA GGT ATC TAA TGA ATT TAT CTC CCA -3') (sitio de restricción *Xba*I subrayado) e hibridan en la posición 1 al 1623 el cual es el ORF completo de la proteína F excluyendo el codón de paro. La RT-PCR se llevó a cabo empleando el sistema comercial SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen, EE. UU.) En un volumen de reacción de 50 μ l que contenía ~ 100 ng de plantilla de genoma viral, 4 μ l de SuperScript III RT / Platinum Taq, se adicionaron 25 μ l de master mix reaction 2X y 1 μ l de oligonucleótidos sentido y antisentido (10 μ M). La RT-PCR se realizó con el siguiente programa: síntesis de ADNc 50°C durante 30 min, PCR: pre desnaturalización 95° por 2 min, seguido de 40 ciclos de 98°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 1,5 min y extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (m/v).

7.3. Clonación del marco de lectura de la proteína F en el vector de resguardo pJET1.2/blunt

El producto obtenido de RT-PCR del gen F (1648 pb con los sitios de restricción adicionados), se extrajo y purificó del gel, empleando el sistema comercial GeneJet Gel Extraction (Fermentas) y se insertó en el vector pJET1.2 / blunt usando el sistema comercial CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFischer Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR incubó en una relación molar inserto/vector 1:3. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: se colocó 10 μ l de amortiguador de reacción 2X, 1 μ l de la enzima blunting DNA y se completó con agua a un volumen final de 18 μ l. Se incubó la mezcla a 70°C durante 5 min y se llevó a choque térmico en hielo. Se agregó el 1 μ l del vector pJET1.2/blunt (50 ng/ μ l) y 1 μ l de ligasa para obtener un volumen final de 20 μ l. Se incubó a 4°C durante 16 h. La mezcla de ligación se empleó para transformar células de *E. coli* competentes.

7.4. Preparación de células competentes de *E. coli* con $CaCl_2$ y transformación

El producto de ligación se denominó pJET-FT. Se emplearon células *E. coli* One Shot Top 10 (Invitrogen), Las células competentes se prepararon acorde a la metodología descrita por Sambrook [60]. Se empleó 5 ml de un precultivo en medio LB de *E. coli* One Shot Top 10 (crecido 37°C durante 16 h) para inocular 50 ml de medio LB,

el cual se incubó hasta una densidad óptica (D.O.) de 0.35 UA a 600 nm. EL cultivo se transfirió a un tubo de 50 ml y se colocó en hielo durante 10 min. Las células se recuperaron a 4100 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el tubo se colocó en posición invertida para eliminar restos de medio. El paquete celular se resuspendió en 15 ml de una solución fría de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂). Las células se recuperaron mediante centrifugación (4100 rpm durante 10 min 4°C), se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida para eliminar trazas de la solución. El paquete celular se re suspendió en 1 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Se realizó la transformación después de la preparación. Las células competentes pueden encontrarse resuspendidas hasta 12 h a 4°C sin perder la capacidad de transformar.

Para la transformación, se tomaron 200 µl de células competentes a las cuales se les adicionaron 10 µl de la mezcla de ligación. La mezcla se colocó en hielo por 30 min y se llevó a choque térmico a 42°C por 90 s en baño maría sin agitación, después se colocó en cama de hielo 2 min. Se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37°C durante 5 min en agitación moderada. Se transfirieron 100 µl de la mezcla de transformación a placas de agar KB + antibiótico (100µg/ml) y se crecieron a 37°C.

Las colonias que crecieron en presencia del antibiótico, posteriormente se seleccionaron y se inocularon en 5 ml de medio LB con antibiótico (100µg/ml) e incubadas 16 h a 37°C en agitación moderada.

7.5. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (midiprep)

El método de extracción empleado fue lisis alcalina. Se inoculó 5 ml de medio de cultivo e incubó 16 h a 37°C en agitación moderada. Se transfirió 1.5 ml del cultivo a un tubo nuevo estéril libre de nucleasas y centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y lavó el paquete celular con agua estéril y libre de nucleasas para retirar totalmente el medio de cultivo, Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto. Se resuspendió el paquete celular en 100 µl de RNAsa/TE en vórtex. (TE: 10 mM Tris pH 7.5 y EDTA 1 mM, RNAsa 5 mg/ml). Se adicionaron 450 µl de NaOH 100 mM/SDS 0.5% y mezcló por inversión 5-8 veces, se dejó incubar en hielo menos de 5 min. Se adicionaron 225 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y agitó por inversión. Se dejó incubando 10 min sobre hielo.

Se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:19), se mezcló mediante vórtex durante 1 min y se centrifugó a 12,000 rpm 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase soluble y se adicionó 1 volumen μ l de etanol frío al 99.9 % y dar vórtex. Se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 70 %. Se re suspendió con un vórtex y centrifugó a temperatura ambiente a 12,000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y seco durante 10 min invirtiendo los tubos y se resuspendió en 20 μ l de TE. El ADN plasmídico se analizó en geles de agarosa al 0.7% y mediante el uso de endonucleasas de restricción (*EcoRI*, *XbaI*, *HindIII*).

El producto clonado se secuenció utilizando oligonucleótidos de secuenciación sentido e antisentido pJET1.2 (incluidos en el sistema de clonación de PCR CloneJET), así como RuF1fw (5'-AAT GGA ATT CTT CAA CTA AGC CAG GCA CTT GG-3'), RuF1rv (5'-GGT AAT GTC TAG AAC AAT CTG CTC GTT CCG CA-3') y los oligonucleótidos RuF2fw (5'-GCA GGA ATT CGG GGT ATC AAC ACT GA-3'), utilizando el sistema de GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing y un secuenciador GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman-Coulter, Pasadena, CA, EE. UU.). Los análisis filogenéticos se realizaron en MEGA7 utilizando el método de Neighbor-joining [61]. El análisis de la secuencia de la proteína PAC1 se realizó utilizando el servidor SignalP-5.0, el servidor NetNGlyc 1.0 y el servidor SMART [62-64].

7.6. Análisis informático de las proteínas estructurales de RVP

Las secuencias de proteínas de las cepas de RVP se obtuvieron de GenBank y se utilizaron para diferentes análisis. Para analizar las propiedades antigénicas y estructurales de las proteínas se utilizó como referencia la secuencia del RVP cepa LPMV (1984, Acceso: Y10803). Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas estructurales de RVP, como el peso molecular, el índice alifático, el coeficiente de extinción, el punto isoeléctrico (pI) teórico, la hidropatía y la composición de aminoácidos, se determinaron utilizando el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La antigenicidad de las proteínas se determinó utilizando el servidor VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), que hace una predicción

independiente de la alineación basada en las propiedades fisicoquímicas de la proteínas [65]. El organismo objetivo seleccionado el servidor VaxiJen v2.0 fue "virus", con un umbral predeterminado de 0,4. Esta predicción condujo a la selección de proteínas antigénicas presentes en RVP para su posterior análisis.

7.7. Predicción de epítomos continuos y discontinuos de células B

Los epítomos continuos de células B se predijeron en el servidor Bepipred-1.0 (<http://tools.iedb.org/bcell/>) [66], utilizando una combinación de un modelo de Markov oculto y un método de propensión de escala en un umbral de 0.350 (sensibilidad = 0.49, especificidad = 0.75). Los epítomos predichos se analizaron con predicción de giros-beta de Chou & Fasman [67], Predicción de accesibilidad de superficie de Emini [68], Predicción de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar, y predicción de hidrofiliidad de Parker, utilizando un umbral de 1.0 en todos los algoritmos [69, 70].

Los epítomos discontinuos de células B de las proteínas F (cepa PAC1) y HN (PAC1) se modelaron primero por homología utilizando el servidor de reconocimiento de plegamiento en proteínas PHYRE2 en modo de modelado intensivo [71], y la herramienta MODELLER (<https://salilab.org/modeller/>). Posteriormente, las estructuras se validaron utilizando el servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Para determinar los epítomos discontinuos, se utilizó el servidor ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) [72]; este servidor usa el método de Thornton y un algoritmo de agrupamiento de residuos, con una puntuación mínima de 0.5 y una distancia máxima de 6 Å.

7.8. Predicción de epítomos citotóxicos de células T

Los epítomos de células T citotóxicas se predijeron utilizando el servidor NetMHCpan 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) a través de redes neuronales artificiales [73]. El servidor NetMHCpan 4.0 predice la unión de péptidos a cualquier molécula MHC conocida utilizando redes neuronales artificiales (ANN). El método se basa en una combinación de más de 180,000 datos de unión cuantitativos y ligandos eluidos de MHC derivados de espectroscopia de masas. Se usó el alelo leucocitario porcino (SLA-1: 0101; SLA-1: 0401; SLA-1: 0801), que se encuentra

ampliamente distribuido en poblaciones porcinas [74]. Para todos los epítomos seleccionados, la longitud del péptido se estableció en nonameros. El umbral para determinar la unión fuerte fue del 0.5%, para una unión débil, fue del 2%. Todos los péptidos predichos por el servidor NetMHCpan 4.0 se analizaron usando ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>), una herramienta que predice si un péptido es una toxina y puede causar daño celular [75].

Para el estudio de simulación de acoplamiento, utilizamos la estructura cristalina de la molécula SLA-1: 0401 (PDB ID: 3QQ3) [76]. El epítomo de la influenza, que formaba complejos en el surco de unión de SLA-1: 0401, así como las moléculas de agua y solventes se eliminaron usando AutoDockTools. Antes del estudio de acoplamiento, los nonameros predichos por el servidor NetMHCpan 4.0 se optimizaron utilizando PEP-FOLD 3.5 [77]. La simulación de acoplamiento (*docking*) molecular se llevó a cabo utilizando AutoDock Vina [78]. Con los resultados obtenidos se propuso la expresión de dos variantes de la proteína F de RVP (el péptido F1 y el péptido F2-F1)

7.9. Construcción del vector pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1

Para amplificar ambas regiones mediante PCR en punto final se empleó como plantilla el vector pJET-Forf, que contiene todo el marco de lectura de la proteína F de RVP de la cepa PAC1. El segmento que codifica para eF1 que comprende del aminoácido 129-489 (1,024pb), para ello se usó los oligonucleótidos sentido RuF1fw (5´-AAT GGA ATT CTT CAA CTA AGC CAG GCA CTT GG-3´) y antisentido RuF1rv (5´-GGT AAT GTC TAG AAC AAT CTG CTC GTT CCG CA-3), que contiene los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (subrayados en la secuencia) respectivamente. El segmento que codifica para eF2-1 que comprende del aminoácido 23-489 (1401 pb) se emplearon los oligonucleótidos sentido RuF2fw (5´-GCA GGA ATT CGG GGT ATC AAC ACT GA-3´) y antisentido RuF1rv (5´-GGT AAT GTC TAG AAC AAT CTG CTC GTT CC-3) que contiene los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (subrayados en la secuencia) respectivamente.

Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla de 20 µl, con 10 µl de PCR master mix 2X (Fermentas), 2 µM de cada oligonucleótido y 150 ng de ADN plasmídico como molde. El programa de amplificación fue el siguiente: pre

desnaturalización 2 min a 95 °C. 40 ciclos de 95 °C por 30 s de desnaturalización, 60° C por 30 s de alineamiento, 72 °C por 2 min de extensión y 72 °C por 10 min de extensión final. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 0.7% (masa/volumen).

Las regiones amplificadas de eF1 y eF2-1 se purificaron del gel de agarosa con el sistema comercial GeneJet Gel Extraction Kit (ThermoFischer Scientific), posteriormente se insertó en el vector de resguardo pJET1.2/blunt empleando el sistema comercial CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFischer Scientific), para introducirse en una cepa *E. coli* One Shot Top 10 mediante un choque térmico a células tratadas con CaCl₂. Las transformantes positivas que aceptaron el plásmido se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina (resistencia proporcionada por el vector). Después se tomó 1 colonia transformada y se inoculó en 5 ml medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml), se incubó durante 16 h a 37 °C. Se les realizó extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina.

Los plásmidos se sometieron a una doble digestión, primero con la enzima *EcoRI* (Fermentas) durante 16 h a 37 °C y posteriormente con la enzima *XbaI* (fermentas) 16 h a 37°C, para liberar el inserto eF1 y eF-1. El producto de digestión se purificó del gel de agarosa con el sistema comercial GeneJet Gel Extraction Kit y se ligó en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pPICZαB digerido previamente con *EcoRI* y *XbaI* (Invitrogen), en una relación molar inserto/vector 3:1 mediante una ligación con T4 ADN ligasa. Las construcciones se denominaron pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1 y se emplearon las mezclas de ligación para transformar células de *E. coli* One Shot Top 10. Las células transformantes se seleccionaron en presencia de 50 µg/ml del antibiótico zeocina (invitrogen). Se extrajo el ADN plasmídico y se purificó empleando el sistema comercial Hi-speed plasmid midi prep (Qiagen). Los fragmentos de los genes eF1 y eF2-1 insertados se confirmaron mediante secuenciación utilizando el sistema de secuenciación GenomeLab Dye Terminator y el secuenciador automático GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman-Coulter, Pasadena, CA, EE. UU.), así como mediante digestión enzimática con endonucleasas de restricción de las dos

construcciones. Las construcciones confirmadas se emplearon para transformar células de *P. pastoris* X-33 competentes.

7.10. Preparación de células competentes y transformación de *Pichia pastoris* X-33

Las células competentes de *P. pastoris* X-33 se prepararon bajo las especificaciones que se encuentran en el manual de la casa comercial Invitrogen (EasySelect *Pichia* Expression). Se realizó un pre cultivo de *P. pastoris* X-33 de 5 ml de medio YPD. Se empleó el pre cultivo para inocular 50 ml de medio YPD con una D.O. inicial de 0.1 UA a 600nm. Se incubaron las células en agitación 200 rpm a 30°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 1 UA a 600nm. Se recuperaron las células mediante centrifugación a 1500 x g por 10min a temperatura ambiente. El paquete celular se lavó con 25 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente. Se recuperaron las células mediante centrifugación a 1500 x g durante 10 min y finalmente se re suspendieron en 400 µl de LiCl 100 mM. Las células se alicuotaron en tubos con 50 µl de células para cada transformación. Se prefirió emplear inmediatamente para su transformación. Para la transformación se eliminó el LiCl de cada alícuota por centrifugación y las células se resuspendieron en 240 µl de PEG 50%, Se añadieron 36 µl LiCl 1 M, 25 µl de ADN monocatenario de esperma de salmón (2 mg/ml) y 50 µl de ADN plasmídico linearizado (~10 µg). El plásmido pPICZ-eF1 y pPICZ-F2-1 se linearizó con la enzima de restricción *PmeI* (fermentas) durante 16 h antes de la transformación. La mezcla de transformación se incubó a 30 °C por 30 min sin agitación y se realizó un choque térmico a 42 °C por 1 h. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 6000 rpm 5 min a temperatura ambiente y se re suspendieron en 1 ml de medio YPD y se incubaron a 30°C durante 1 h con agitación moderada. Las transformantes se seleccionaron en placas de agar YPD con zeocina (200 µg/ml) y se incubaron a 30 °C durante 2 días.

7.11. Extracción de ADN genómico de *Pichia pastoris*

Las clonas resistentes se confirmaron por PCR amplificando el gen eF1 y eF2-1 empleando como molde ADN genómico purificado mediante el método de [79] modificado. Se realizó un cultivo de 3 ml en YPD + zeocina se incubó durante 24 h a

30°C. Se recuperaron las células mediante centrifugación por 2 min a 12,000 rpm. El paquete celular se lavó con 500 µl de ddH₂O y se recuperaron mediante centrifugación 2 min a 12,000 rpm. El paquete celular se resuspendió en 200 µl amortiguador de lisis (2% Triton X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH8, 0.38 mM de EDTA), ~200 µl Perlas de vidrio, 200 µl fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y 200 µl de TE. Se realizó el rompimiento de las células en vórtex durante 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se incubó con RNasa (37°C durante 15 min). Posteriormente se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se agitó en vórtex y se dejó precipitar 2 h a -20°C, Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min, el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70% y se recuperó mediante centrifugación. Se descartó el etanol con cuidado de no perder la patilla y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min. El ADN se resuspendió en 50 µl de ddH₂O.

La PCR se realizó empleando las combinaciones de los oligonucleótidos RuF1fw-RuF1rv y RuF2fw-RuF2rv para eF1 y eF2-1 respectivamente, con las condiciones anteriormente descritas. El fenotipo Mut de las clonas positivas a eF1 y eF2-1 se determinó mediante una PCR empleando los iniciadores comerciales 5´AOX1 y 3´AOX1 (Invitrogen) que alinean en el promotor nativo del gen AOX1 y la región 3´UTR del gen AOX1 respectivamente, los productos de PCR se analizaron mediante geles de agarosa al 0.7%. Las clonas seleccionadas se nombraron como X-33eF1+ y X-33eF2-1+

7.12. Expresión de la proteína eF1 y eF2-1

La inducción de la expresión de la proteína eF1 y eF2-1 se realizó partiendo de un pre cultivo de 5ml de la cepa X-33eF1+ y X-33eF-2+ en medio YPD el cual se creció durante 24 h a 30 °C. Los pre cultivos se emplearon para inocular 200 ml de medio complejo tamponado adicionado con glicerol (BMGY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 200 mM de fosfato de potasio pH6, 1.34% de YNB, 0.00004% de biotina y 1% de glicerol), en matraces de 1 l. Se incubó a 30°C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar una D.O. 600 nm de 6-8 UA. Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 200 ml de medio complejo tamponado adicionado con metanol (BMMY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 200 mM de fosfato de potasio pH6, 1.34%

de YNB, 0.00004% de biotina y 1% de metanol), en matraces de 1 l, se incubó a 30°C en agitación (250 rpm) para inducir la expresión. Se analizó la expresión durante 8 días adicionando el cultivo diariamente con metanol a una concentración final de 1% cada 24 h.

7.13. Detección de ARNm mediante RT-PCR

Para determinar la presencia de ARNm de eF1 se realizó una extracción de ARN total y una RT-PCR, a partir de 1 ml de cultivo tomado durante cada día de expresión de la cepa X-33eF1+ en medio BMMY. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 min a 4°C. Se lavó dos veces el paquete celular con 1 ml de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1%, las células se recuperaron mediante centrifugación (8000 rpm/ 5 min a 4 °C), posteriormente se incubaron en 30 µl de tampón de zimoliasa (50mM ácido cítrico, 50mM Na₂HPO₄, 40mM EDTA, 1.2M sorbitol pH 5.6) con 0.1 mg de Zimoliasa-20T (immuno) durante 30 min a 30 °C, se recuperó las células por centrifugación (3000 rpm/ 5 min a 4°C). El paquete celular se re suspendió en 1 ml de TRazol y se homogenizó por pipeteo, se incubó 5 min a 30°C y se adicionaron 200 µl de cloroformo y se homogenizó la mezcla mediante vórtex. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa, descartando la fase orgánica. Se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20°C durante 2 h, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se re suspendió en 20 µl de agua DEPC 0.1%. Se cuantificó mediante espectrofotometría en un equipo Nanodrop y 1 µg de ARN se trató con DNasa I (Invitrogen) 15 min a 37°C. La reacción de RT-PCR se realizó con el sistema comercial SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen), en una mezcla de reacción de 20 µl. La mezcla de RT-PCR fue la siguiente 10 µl de master mix reaction 2X, 2 µM de cada oligonucleótido (RuF1fw y RuF1rv), 1 µl de RT/Platinum Taq mix y 1 µg de ARN total como molde. El programa de RT-PCR fue el siguiente: Generación de cDNA 1 ciclo de 30 min a 55 °C. El programa de amplificación fue: pre desnaturalización 2 min a 95 °C. 40 ciclos de 95 °C por 30 s de desnaturalización, 60° C por 30 s de alineamiento, 72 °C por 1.5 min de extensión y 72 °C por 10 min de extensión final. El

producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (w/v).

7.14. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección de eF1 y eF2-1

Para los ensayos de electroforesis e Inmunodetección se tomaron 20 ml de cultivo cada día de expresión de la cepa X-33eF1+ y X-33eF2-1+ y se separó el medio de cultivo de las células mediante centrifugación (5000 rpm durante 10 min). Las proteínas del medio libre de células se concentraron 50 veces precipitando con sulfato de amonio al 80% de saturación. Se analizaron 10 µg de proteína total en PAGE-SDS (método de Laemmli, 1970). Las proteínas se tiñeron con azul de Coomasie (0.025 gr de azul de Coomasie, 50% metanol, 5% ácido acético y 45% agua) durante 30 min y desteñidas con una solución de desteñido (50% metanol, 5% ácido acético y 45% agua).

Para la inmunodetección (*Western-blot*), las proteínas se sometieron a electroforesis en PAGE-SDS y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en transferencia semi seca a 0.3 A durante 50 min, empleando un amortiguador de transferencia (1.515 g de Tris-base, 7.2 g de glicina, 100 ml de metanol, 0.5 g de SDS, aforado a 500 ml con ddH₂O), después de la transferencia se bloqueó con 20 ml de una solución 5% de leche baja en grasas en TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M de NaCl, 0.05% de tween 20) durante 16 h a 4 °C con agitación moderada. Se lavó tres veces, cada lavado fue de 10 min con TBS-tween pH8 en agitación y se incubó con el anticuerpo para la detección de la proteína recombinante. El anticuerpo primario fue una anti-His (Santacruz) en una dilución 1:10000 y como anticuerpo secundario se empleó un anti-IgG de ratón (Invitrogen) acoplado a peroxidasa. Se reveló en cuarto oscuro empleando luminol y peróxido de hidrogeno en una relación 1:1. Para la detección de anticuerpos presentes en sueros de cerdos infectados con RVP se empleó una dilución de 1:2000 el suero como anticuerpo primario y anti-IgG de cerdo acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:6000) como anticuerpo secundario. Las bandas se revelaron con el sustrato azul de nitrotetrazolio (BCIP-NBT; Promega).

7.15. Purificación de eF1 y eF2-1

Las proteínas del medio libre de células de X-33eF1+ y X-33eF2-1+ se concentraron 50 veces por precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación, se re suspendieron en un amortiguador de unión (amortiguador de fosfatos 50mM pH8, NaCl 0.3M) y se dializaron por 24 h en membranas de nitrocelulosa contra el amortiguador de unión para eliminar las trazas remanentes. Para la purificación se empleó una matriz de agarosa-NiTA (General electric) empaquetada en un volumen de columna de 5 ml. La columna se higienizó previo a la purificación mediante la adición de 3 volúmenes de ddH₂O, 0.5 volúmenes de columna de EDTA 0.005 M, 2 volúmenes de columna de NaCl 0.5 M, 3 volúmenes de columna de ddH₂O, 2 volúmenes de columna de NaOH 0.5 M y 3 volúmenes de columna de ddH₂O. Para la activación de la matriz se adicionaron 0.5 volumen de columna de NiCl₂ 2M, 5 volúmenes de columna de ddH₂O y 2 volúmenes de NaCl 0.5M. La columna se equilibró adicionando 5 volúmenes de amortiguador de unión con imidazol (amortiguador de fosfatos 50mM ph8; 0.3 M de NaCl y 10 mM imidazol), se dejó incubar 15 min a 4°C. La muestra se encontraba en 2 volúmenes de columna concentrada, previamente dializada, los cuales se cargaron a la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de amortiguador de lavado (amortiguador de fosfatos 50mM ph8; 0.3 M de NaCl y 10 mM imidazol). Finalmente, se eluyó con 3 volúmenes de columna de amortiguador de elución (amortiguador de fosfatos 50mM ph8; 0.3 M de NaCl y 300 mM imidazol). Las fracciones obtenidas en la elución se analizaron mediante PAGE-SDS y *Western blot* (empleando anti-cMyc, suero PAC1 y suero PAC3). La concentración de la proteína se cuantificó por el método de Sedmak y Grossberg (1977) empleando BSA cristalina como estándar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Obtención del marco de lectura de la proteína F de RVP

El marco de lectura abierto de la proteína F del RVP se obtuvo a partir de ARN-total extraído de células VERO infectado con RVP cepa PAC1 (figura 14a). Como testigo positivo se amplificó una región del gen de HN viral (613 pb).

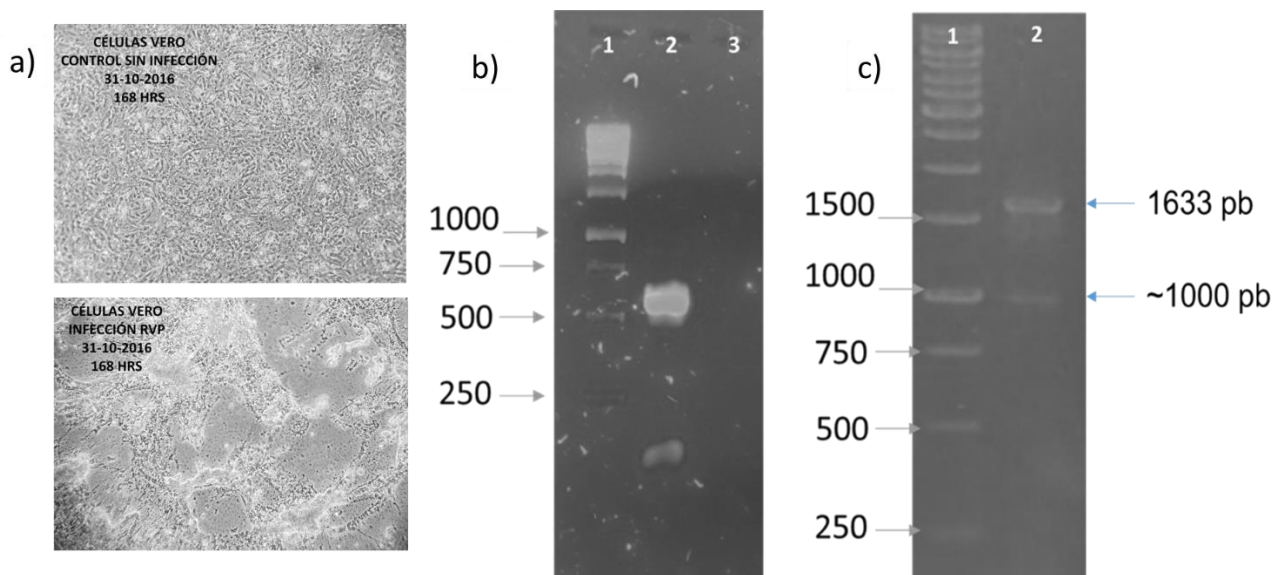


Figura 14. Cultivo infectado con RVP y amplificación del marco de lectura de gen F. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%: a) células VERO infectadas con RVP b) amplificación de un fragmento de HN (Carril 1 MPPM; Carril 2 HN [613 pb]; carril 3 testigo negativo;) c) amplificación del marco de lectura de F (carril 1 MPPM; Carril 2 ORF de F [1633 pb]).

El marco de lectura de la proteína F se amplificó con iniciadores específicos diseñados en este trabajo, a los cuales se le adicionaron los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (subrayados respectivamente).

RuF0fw1: 5´-CCAGGAAATTCGGATGCCACAACAACAAGTT -3´

RuF0rv1: 5´-GCGGCTCTAGAAGGTATCTAATGAATTTATCTCCCA-3´

En la Figura 14b, se muestra el producto de PCR de HN (613 pb), empleado como testigo positivo de presencia de ARN de RVP. En la figura 14c se muestra el producto

esperado de PCR para el marco de lectura de F (1633 pb), está banda se purificó del gel, para evitar la contaminación de la amplificación de una segunda banda inespecífica (~1000 pb). La banda de 1633 pb purificada se clonó en el vector de resguardo (pJET1.2/blunt).

8.2. Construcción de vector pJET-Forf

Se clonó el marco de lectura (ORF) del gen F en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt, generando la construcción pJET-Forf; se obtuvieron dos clonas positivas a pJET-Forf (resultados no mostrados) resistentes a ampicilina. Se extrajo el ADN plasmídico mediante lisis alcalina de las clonas y se realizó la caracterización mediante endonucleasas de restricción. En la Figura 15 se aprecia el mapa del vector pJET-Forf, con 4622pb con sus sitios de corte por enzimas de restricción.

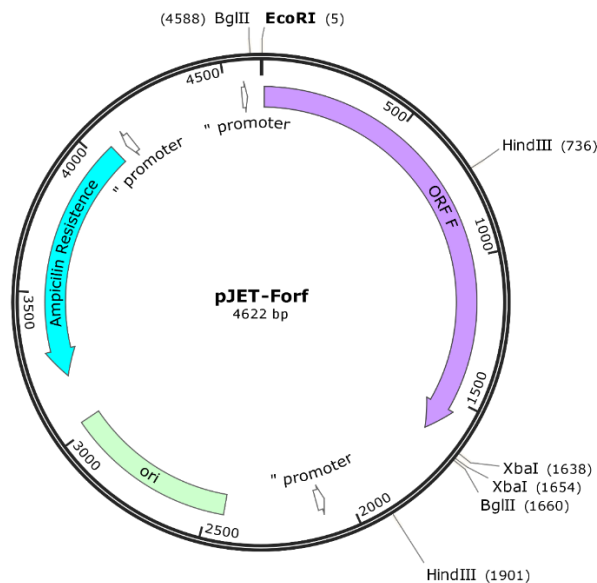


Figura 15. Mapa de restricción de pJET-Forf. Se muestran los sitios de restricción característicos de la construcción (*EcoRI*, *XbaI*, *HindIII*).

En Figura 16 se muestra la digestión del vector en geles de agarosa. Los patrones de restricción son los esperados para cada una de las enzimas empleadas: *EcoRI* linealiza la construcción pJET-Forf ya que el sitio de restricción es único (Figura 15), teniendo un fragmento de 4,622 pb (Figura 16a), el sitio *EcoRI* es importante y característico debido a que se adicionó en el extremo 5' de la secuencia de F, para

subclonar en el vector pPICZαB. *HindIII* presenta dos sitios de restricción, uno que se encuentra dentro de la secuencia del ORF de F y el otro en el esqueleto del vector pJET (Figura 15), los cuales generan dos fragmentos (3,457 y 1,165 pb) (figura 16a). *XbaI* presenta dos sitios de restricción, uno adicionado en el extremo 3' del ORF de F y el otro dentro del vector (Figura 15); por lo que se forman dos fragmentos (4,606 y 16 pb); si bien, en el gel sólo se aprecia un producto de digestión (4,606 pb) (figura 16b), se debe a que el fragmento de 16 pb es muy pequeño y se pudo perder por el porcentaje de agarosa empleado en el corrimiento electroforético. Como confirmación se realizó la doble digestión con *EcoRI-XbaI* (figura 16b), la cual libera el ORF de F (1,633pb) y el resto del vector pJET1.2 (2,973 pb).

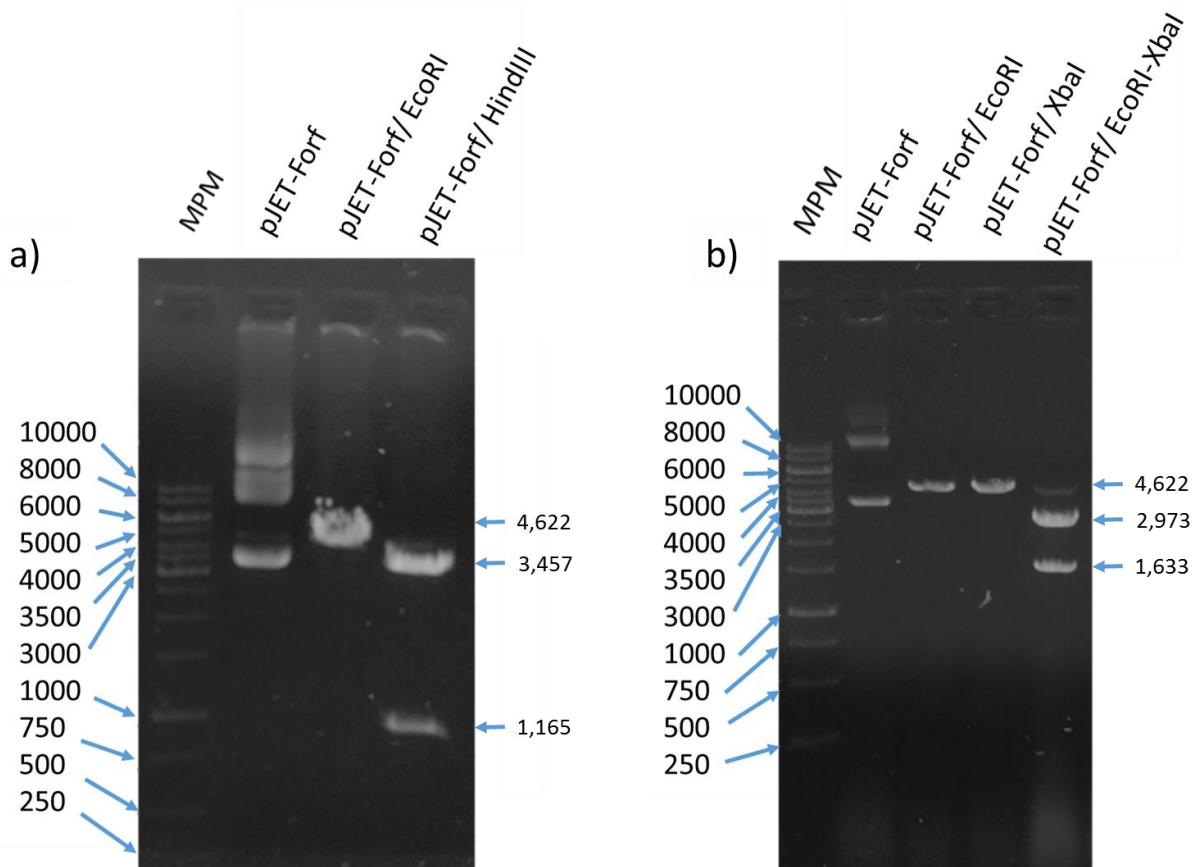


Figura 16. Caracterización enzimática de pJET-Forf. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%: a) Caracterización por endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*. b) Caracterización y liberación del ORF de F0 por endonucleasas *EcoRI* y *XbaI*.

El ORF F se secuenció empleando 5 iniciadores específicos que hibridan en la secuencia de F. Con la secuenciación se confirmó que el vector pJET-Forf contiene el marco de lectura completo de la proteína F de RVP cepa PAC1. Con estos resultados se confirma la construcción pJET-Forf.

Esta secuencia se depositó en GenBank (Acceso: MK984607) y se comparó con otras doce secuencias F previamente depositadas en la misma base de datos. La secuencia de aminoácidos de PAC1 F tiene una identidad del 97.78 al 99.26% con otras secuencias F de RVP y está agrupada en el grupo de la cepa de referencia LPMV/1984 (Figura 17), con la que tiene una identidad del 99.26%.

Se observaron cuatro cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de LPMV. La proteína F del aislado de Michoacán / 2013 tuvo la menor identidad con PAC1 (97.78%). No se ha encontrado ninguna de las sustituciones en el sitio de corte de la proteína F (HRKKR). Algunos informes sugieren que el sitio de corte en la proteína F participa en la virulencia de RVP [7].

Con el análisis de la secuencia de la proteína F se pueden identificar dos grandes grupos en donde la proteína F de la cepa PAC1 se encuentra dentro del grupo de la cepa de referencia LPMV. En un estudio previo se reportó que la proteína HN de la cepa PAC1 también se encontraba dentro del grupo de la cepa de referencia LPMV [80]. Esto puede ser debido a que son virus de los brotes más cercanos temporalmente. Aunque esto contrasta de cierta forma, ya que presenta alto porcentaje de identidad con brotes recientes del 2015.

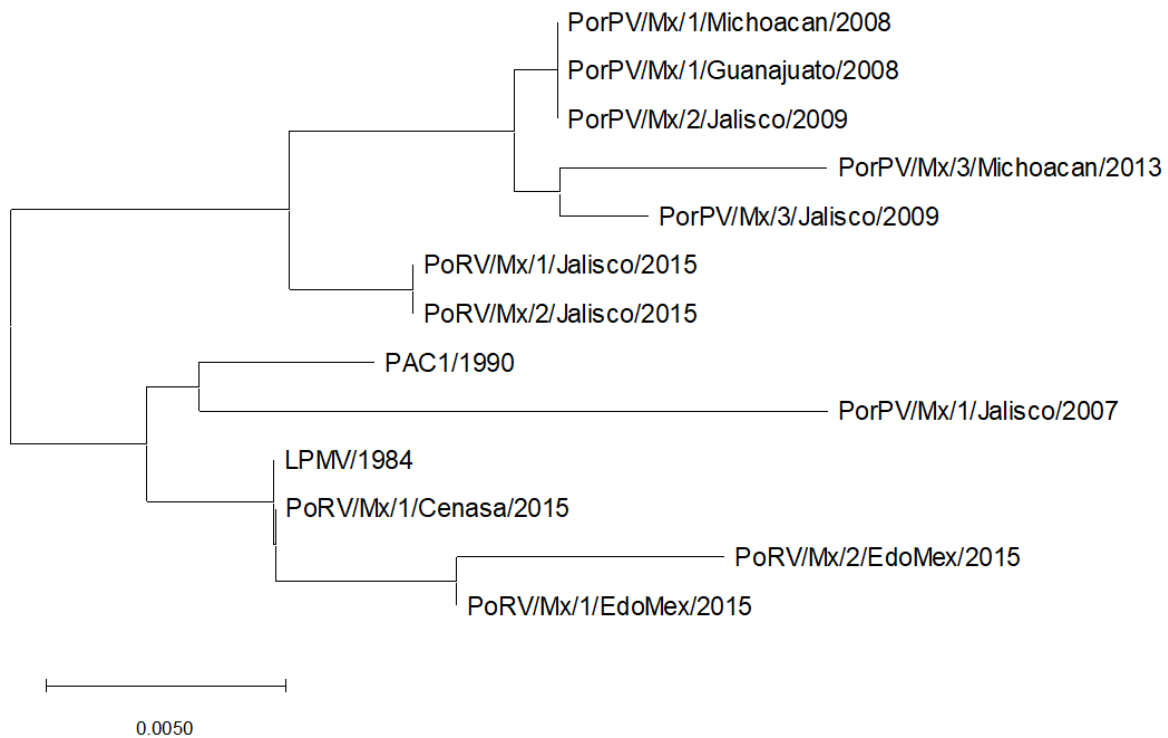


Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína F de PAC1 y otras cepas de RVP. La historia evolutiva se infirió mediante el método de unión de vecinos (*neighbor-joining*). La figura muestra el árbol óptimo, con la suma de las longitudes de las ramas = 0.05507775. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas están en unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Hubo un total de 541 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7.

8.3. Caracterización inmunogénica y fisicoquímica de las proteínas estructurales del RVP

Para determinar si la proteína F de RVP podría ser empleada como antígeno, se evaluó la antigenicidad general de las proteínas estructurales de RVP. La antigenicidad de las proteínas virales se determinó utilizando el servidor Vaxijen V2.0, seleccionando “virus” como organismo de estudio y un umbral de 0.4 (predeterminado)[65]. Este servidor predice una puntuación de antigenicidad general para cada secuencia (Tabla 2). Utilizamos la cepa de referencia LPMV/1984 como modelo para presentar los resultados del análisis. De todas las secuencias evaluadas, solo la proteína P no se consideró como

antígeno (0.3560). Se predijo que las glicoproteínas de membrana HN y F serían las proteínas más antigénicas (0.5271 y 0.5154 respectivamente); estas secuencias se sometieron a análisis adicionales.

Tabla 2. Predicción de las propiedades inmunogénicas y fisicoquímicas de las proteínas estructurales de RVP (cepa LPMV/1984).

Proteína	Tamaño (aa)	Peso Molecular (Da)	Punto isoeléctrico	Coefficiente de extinción ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	-R (Asp + Glu)	+ R (Arg + Lys)	Índice alifático	GRAVY ^a	Valor Vaxijen ^b
F	541	58311.66	6.15	43610	35	31	119.52	0.371	0.5084
HN	576	63324.82	8.44	88335	30	36	85.38	0.089	0.5271
M	369	41657.72	9.45	37275	33	48	89.08	-0.183	0.4645
NP	545	60096.80	5.30	50560	63	53	88.22	-0.191	0.5101
L	2251	255269.74	6.33	307795	245	225	97.64	-0.102	0.4163
P	404	42475.98	5.49	17085	43	38	77.33	-0.372	0.3560

Los valores predichos se calcularon considerando la composición de aminoácidos de las proteínas. El análisis se realizó utilizando el servidor Vaxijen V2.0

^a GRAVY (del inglés grand average of hydropathy) gran promedio de hidropatía.

^b Denota una probable proteína antigénica (Vaxijen score ≥ 0.4).

La capacidad antigénica de las proteínas estructurales de la cepa de referencia LPMV de RVP analizada en el servidor Vaxijen V2.0, sugiere que la proteína F pudiese generar una respuesta inmune, al igual que corrobora lo obtenido en trabajos experimentales sobre la proteína HN y NP (ambas con una puntuación > 0.5) en donde se ha comprobado la generación de anticuerpos que reconocen dichas proteínas [43, 47]. Otros estudios han utilizado el servidor Vaxijen para seleccionar antígenos prometedores contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C, proteínas estructurales con una puntuación de Vaxijen > 0.4 [81, 82].

8.4. Predicción de epítomos continuos de células B de las proteínas HN y F de RVP

El servidor Bepipred 1.0 (servidor IEDB) predijo epítomos continuos de células B utilizando un umbral de 0.350. Los epítomos de células B tienen una longitud variable; en el presente estudio, el enfoque fue en péptidos lineales con una longitud mínima de 5 residuos (Tabla 3). Se predijeron 8 epítomos lineales únicos, con 5 residuos o más, para la proteína F (cepa LPMV), mientras que se predijeron 16 epítomos lineales para la

proteína HN (cepa LPMV). Estos epítomos se evaluaron utilizando la herramienta de predicción de giro beta de Chou & Fasman, las herramientas de medición de la accesibilidad a la superficie Emini, las herramientas de medición de antigenicidad Kolaskar y Tongaonkar, el índice de hidrofiliidad de Parker y el análisis de conservación de epítomos, con un umbral de 1.0. Para la proteína F, tres epítomos estaban por encima del nivel umbral de 1.0, con una conservación superior a 80% (LASPDQS; PQLTNPAL y NRTYGPPAYVPPDNIIQS). Para la proteína HN, solo un epítomo estaba por encima del nivel umbral de 1.0, con una conservación del 80% (PQFSQRAAASY).

Los resultados de conservación de los epítomos de células B mostraron que la mayoría de los epítomos F no se vieron afectados por las mutaciones presentes en la proteína F; por el contrario, los epítomos de HN se vieron afectados por estas mutaciones, con algunos epítomos presentes en solo el 30.43% de las secuencias de HN.

Tabla 3. Epítomos de células B continuos de las proteínas HN y F de RVP (LPMV/1984).

Proteína	Epítomos células B continuos	Posición	Tamaño	Chou (1.0)	Emini (1.0)	Kolaskar (1.0)	Parker (1.0)	Conservación (%)
F	MPQQQ	1-5	5	1.012	3.215	0.987	3.18	100.00
	LASPDQS	60-66	7	1.153	1.851	1.04	3.429	100.00
	KNAEKVEQ	135-142	8	0.9	5.687	0.975	4.8	93.33
	ALGETNAA	146-153	8	0.924	0.768	0.981	2.85	100.00
	PQLTNPAL	212-219	8	1.047	1.499	1.049	1.86	93.33
	LGYGG	320-324	5	1.282	0.507	1.007	2.9	100.00
	FQEPTT	401-406	6	0.96	2.807	0.973	2.85	100.00
	NRTYGPPAYVPPDNIIQS	430-447	18	1.162	6.479	1.024	2.144	100.00
HN	ITSWTPD	68-74	7	1.109	1.321	0.972	1.571	91.30
	DCSSACP	116-122	7	1.269	0.335	1.12	4.286	100.00
	IGAPTES	141-147	7	1.049	0.903	0.989	3.057	100.00
	FIPTSTTTQGCT	161-172	12	1.046	0.672	1.014	2.542	95.65
	CADGGHSN	195-202	8	1.296	0.53	0.998	5.063	100.00
	IQSASDGS	210-217	8	1.177	0.995	1.001	4.412	100.00
	RSETDYAYAGNSPPQ	255-268	14	1.218	15.015	0.979	4.386	82.61
	HPTGL	286-290	5	1.116	0.906	1.04	1.18	100.00

VGSGTL	301-306	6	1.1	0.35	1.05	1.7	95.65
PQFSQRAAASY	348-358	11	1.001	2.581	1.04	2.409	100.00
TPPSVSSM	435-442	8	1.174	1.244	1.035	2.625	30.43
ARPGKGGCPGNHCP	451-465	15	1.316	0.6	1.018	3.967	34.78
WPLTDPRSGVGGT	477-489	13	1.195	1.047	0.988	2.269	43.48
GLDSTSERMA	496-505	10	1.038	1.655	0.954	3.46	30.43
TQPAAYT	526-532	7	0.983	2.218	2.971	3.25	95.65
CFRDTDTG	536-543	8	1.143	1.066	0.975	4.063	78.26

El sombreado gris indica los epítomos con valor arriba de 1 en todos los parámetros y conservación superior a 80%.

Las secuencias de epítomos correspondieron a aminoácidos de la cepa LPMV/1984. La conservación (%) indica si la secuencia del epítomo se encuentra en todas las cepas de RVP reportadas en el NCBI (<http://tools.iedb.org/conservancy/>).

Los determinantes antigénicos reconocidos por las células B son importantes, porque pueden inducir al sistema inmunológico de un organismo a obtener protección de memoria mediada por la producción de anticuerpos y con esto otorga al organismo la capacidad de actuar rápidamente contra la reinfección por RVP. En algunos paramixovirus, la presencia de estos anticuerpos es suficiente para neutralizar la infección. Hay informes de anticuerpos con actividad neutralizante que pueden reconocer las proteínas HN y F del virus de parotiditis, virus de la enfermedad de Newcastle, virus del sarampión o virus Nipah (proteína F) [49, 83-85].

La respuesta de memoria de los anticuerpos en los cerdos supervivientes, en el caso de una infección por RVP, sugiere que es duradera; por eso es tan importante determinar las posibles regiones antigénicas que pueden activar la respuesta de las células B [20]. Los resultados del análisis predicen que la proteína HN contiene más determinantes antigénicos para las células B (16 epítomos) que la proteína F (8 epítomos). BepiPred es una herramienta confiable que ya se ha utilizado en inmunoinformática para el posible diseño de vacunas contra virus emergentes como el SARS-CoV-2 [86].

Para HN, solo PQFSQRAAASY, y para la proteína F, solo LASPDQS, PQLTNPAL y NRTYGPPAYVPPDNIIQS cumplieron los criterios, con base en los parámetros evaluados, es decir, la antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar, el método de Chou &

Fasman y la hidrofiliidad de Parker, que se han utilizado no sólo para predecir qué región de una proteína es antigénica, sino incluso para determinar cómo algunas mutaciones pueden afectar la antigenicidad de un epítipo [56].

Los epítipos ATRSETDYY y AAYTTTTTCF de la proteína HN son péptidos con una importante capacidad inmunogénica, ya que son reconocidos como determinantes antigénicos de las células B. Además, ya se ha informado in vitro que estos epítipos son reconocidos por anticuerpos generados durante la infección por RVP. Zenteno y col. (2007) estudiaron algunos péptidos que tienen secuencias comunes con dos de los epítipos que proponemos en el presente estudio (ATRSETDYY y AAYTTTTTCF). Esos péptidos fueron capaces de inducir anticuerpos en ratones y uno de ellos pudo inhibir la actividad hemaglutinante del RVP, lo que sugiere que estos péptidos posiblemente pueden estar involucrados en el reconocimiento de carbohidratos que son parte del receptor del virus [87]. Estos hallazgos sugieren que es posible que los anticuerpos dirigidos contra estos epítipos puedan neutralizar la infección.

En la selección de epítipos, se debe dar prioridad a aquellos con alta conservación entre las cepas de RVP. Los determinantes antigénicos de la proteína F se conservan en comparación con otras secuencias de RVP conocidas, lo que sugiere que los epítipos de la proteína F utilizados como antígenos podrían ser dianas muy útiles contra diferentes cepas de RVP. La conservación relativamente baja (30.43% fue el valor más bajo) de algunos determinantes antigénicos de la proteína HN (Tabla 2) puede estar relacionada con la diversidad antigénica reportada en otros estudios sobre RVP [10, 22].

Hasta la fecha, este sería el primer informe sobre cómo las mutaciones en la secuencia de la proteína HN pueden afectar directamente a los determinantes antigénicos predichos. Aunque hay pocas mutaciones en la proteína HN [7], afectan a la región que comprende los residuos 435-509. La región globular de la proteína HN contiene la mayoría de los determinantes antigénicos continuos y discontinuos.

8.5. Predicción estructural de la proteína F de RVP

El marco de lectura reportado de la proteína F de RVP de las cepas LPMV y PAC1 es de 1626 pb. El marco de lectura codifica para una proteína de 541 aminoácidos [38].

Se realizó una predicción y un análisis de estructura para continuar con el análisis de posibles determinantes antigénicos discontinuos de la proteína F mediante las herramientas de bioinformática TMHMM Server v.2.0, SignalP-5.0, NetNGlyc 1.0 Server, MODELLER y PHYRE2 tanto para la cepa LPMV/1984 y PAC1.

La proteína F de los Rubulavirus, género al cual pertenece el RVP, contiene dos regiones sumamente hidrófobas (Figura 18a), como posibles regiones transmembranales, pero se ha descrito que sólo la región cercana al carboxilo terminal de la proteína es la que funciona como dominio transmembranal, la otra región no es técnicamente una región transmembranal aunque tiene una función similar cuando induce el proceso de fusión entre la membrana de la célula hospedera y la envoltura viral.

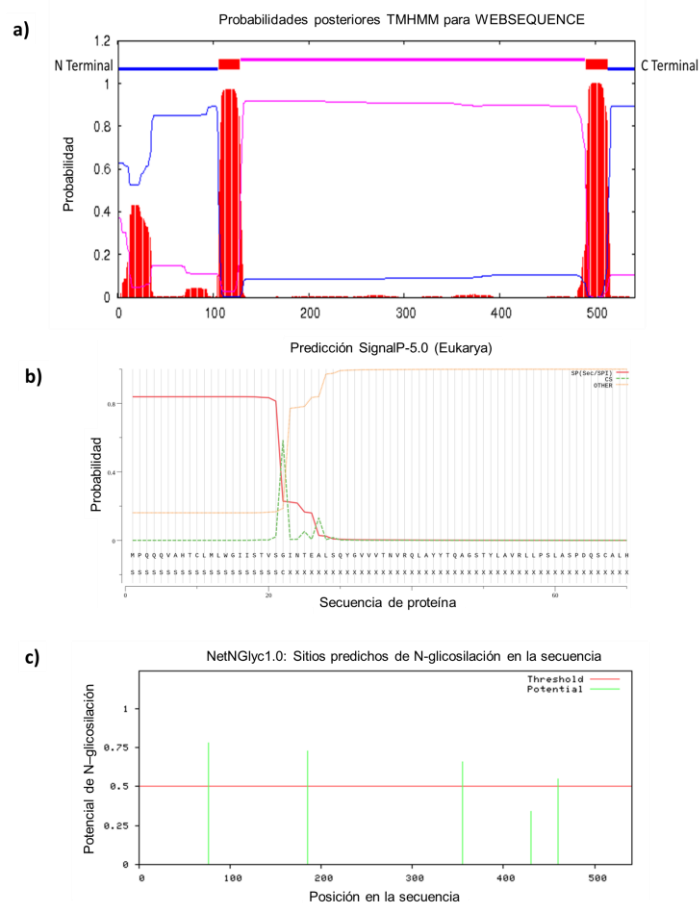


Figura 18. Estructura predicha de la proteína F. a) Predicción de la regiones transmembranales de la Proteína F empleando TMHMM v2.0. (—) porción intermembranal, (■) porción transmembranal, (—) porción expuesta. b) Predicción del sitio de corte mediante la herramienta SignalP-5.0. c) Posibles sitios de N-glicosilación de la proteína F de RVP.

El análisis de secuencia de la proteína F de la cepa PAC1 en SignalP-5.0 (figura 18b) encontró un péptido señal con un sitio de corte entre las posiciones 22 y 23. Además la predicción con SignalP-5.0 sugiere que el péptido señal se procesa siguiendo la vía SEC/Péptidasa señal I, la cual es la ruta de transporte más importante de proteínas al citosol, llevando al precursor F0 hacia la translocasa SEC membranal en donde se remueve el péptido señal y se ancla la proteína F a la membrana. Este puede ser un punto a considerar en la expresión de la proteína F tanto en sistemas procariontas y eucariotas, ya que este péptido señal pudiese funcionar en ambos sistemas ya que son homólogos [88].

El servidor NetNGlyc 1.0 (figura 18c) mostró cinco sitios de N-glicosilación potenciales (cuatro de ellos por encima del umbral de 0.5). Para la proteína F de RVP cepa LPMV ya se habían reportado estos 5 sitios potenciales. Existen reportes que la glicosilación en una proteína puede ser parte importante para que esta induzca una respuesta inmune. Estudios de N-glicosilación en la proteína de envoltura del virus de Ébola reportan que con el simple hecho de que se elimine un sitio de glicosilación existe una gran disminución en la antigenicidad y inmunogenicidad de la proteína [89]. Es por ello que en proteína glicosiladas es conveniente emplear sistemas de expresión con capacidad de generar estas modificaciones post-traduccionales.

Con base en otras herramientas de bioinformática se realizó una predicción de la estructura por homología de la proteína F, así como un esquema de los posibles aminoácidos que comprenden los dominios de la proteína F (Figura 19). La estructura de la proteína F, se compone de dos regiones (F1 y F2) que contienen diferentes dominios. F1 y F2 se encuentran unidos por un puente disulfuro que forma la proteína activa. De manera similar a lo que ocurrió con la predicción de regiones transmembranales, los programas predicen dos posibles dominios transmembranales; los estudios en la estructura de la proteína F de los paramyxovirus como por ejemplo el virus de la parainfluenza 5 [40], reportan que uno de esos dominios es conocido como péptido fusión, y se encuentra en el inicio de la región que comprende F1 (aa 106-128) y es la que se encuentra oculta de manera normal como antes se mencionó. Tanto el péptido fusión como la región transmembranal son dos regiones sumamente hidrófobas, lo cual

se debe considerar ya que pueden generar un problema debido al posible anclaje de estas regiones a la membrana de la levadura al momento de la expresión y purificación de la proteína de interés.

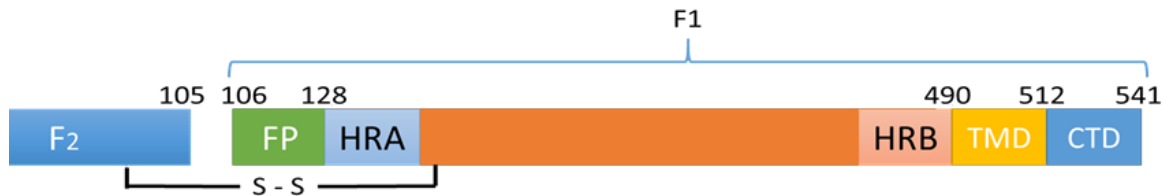


Figura 19. Esquema de los dominios estructurales de la proteína F. péptido señal (PS), región F2 (F2), péptido fusión (FP), repetidos heptaméricos A y B (HRA,HRB), región F1 (F1), dominio transmembranal (TMD) y dominio interno (CTD).

8.6. Predicción de epítomos discontinuos de células B para las proteínas HN y F de RVP

La estructura de las proteínas HN y F se predijo por homología con MODELLER y PHYRE2, utilizando algoritmos de predicción de estructura ab initio para los dominios transmembranales. Los dos modelos se validaron mediante el servidor RAMPAGE. En las proteínas HN, el 93.9% de los residuos estaban en las regiones favorecidas, el 4.5% de los residuos en las regiones permitidas y el 1.6% en las regiones atípicas. En las proteínas F, el 93.1% de los residuos se encontraban en las regiones favorecidas, el 5.9% en las regiones permitidas y el 0.9% en las regiones atípicas.

Se predijeron epítomos discontinuos de células B utilizando el servidor ElliPro. Se predijeron seis epítomos para la proteína F (Tabla 4); los epítomos con la puntuación más alta (0.872) se localizaron en el tallo de la proteína F (Figura 20). Se predijeron siete epítomos para la proteína HN, cuatro de ellos localizados en el dominio principal de la proteína.

Tabla 4. Epítomos discontinuos de células B de las proteínas HN y F (LPMV/1984).

Proteína	No.	Residuos	Numero de residuos	Valor
Proteína F	1	_:E448, _:L450, _:S453, _:G454, _:N455, _:L456, _:I457, _:A458, _:V459, _:N460, _:N461, _:S462, _:L463, _:S464, _:S465, _:A466, _:L467, _:N468, _:H469, _:L470, _:A471, _:T472, _:S473, _:E474, _:I475, _:L476, _:R477, _:K478,	67	0.872

		<p>_:Q479, _:Q480, _:I481, _:W482, _:T483, _:S484, _:S485, _:L486, _:G487, _:I488, _:S489, _:T490, _:I491, _:V492, _:A493, _:L494, _:V495, _:I496, _:I497, _:G498, _:I499, _:L500, _:I501, _:I502, _:C503, _:L504, _:V505, _:V506, _:T507, _:W508, _:A509, _:A510, _:L511, _:W512, _:A513, _:L514, _:L515, _:K516, _:E517</p>		
	2	_:V518, _:R519, _:G520, _:L521, _:N522, _:S523, _:A524, _:V525, _:N526, _:S527, _:Q528, _:L529, _:S530, _:S531, _:Y532, _:V533	16	0.763
	3	_:P58, _:S59, _:L60, _:A61, _:S62, _:P63, _:D64, _:Q65, _:S66, _:C67, _:A68, _:L69, _:H70, _:S71, _:I72, _:I73, _:N74, _:N76, _:A77, _:T78, _:Q80, _:A81, _:S84, _:A87, _:E88, _:N91, _:L92, _:I93, _:S94, _:T95, _:A96, _:L97, _:R98, _:E99, _:Q100, _:H101, _:R102, _:K103, _:K104, _:R105, _:F106, _:A107, _:G108, _:V109, _:A110, _:I111, _:G112, _:L113, _:T114, _:A115, _:L116, _:G117, _:V118, _:A119, _:V131, _:N134, _:K135, _:E138, _:K139, _:E141, _:Q142, _:L143, _:S144, _:Q145, _:A146, _:G148, _:E149, _:T150, _:N151, _:A152, _:Q169, _:I171, _:Q172, _:N173, _:Q174, _:I175, _:N176, _:T177, _:A178, _:I179, _:L180, _:P181, _:Q182, _:I183, _:H184, _:N185, _:L186, _:S187, _:C188, _:Q189, _:V190, _:I191, _:D192, _:A193, _:Q194, _:L195, _:G196, _:N197, _:I198, _:L199, _:S200, _:N216, _:N266, _:L267, _:Q268, _:N269, _:M270	107	0.696
	4	_:M1, _:P2, _:Q3, _:I23, _:V364, _:V365, _:G366, _:S367, _:F368, _:L369, _:R371, _:N376, _:G377, _:V378, _:V379, _:N382, _:C383, _:A384, _:D385, _:M386, _:S387, _:C388, _:V389, _:C390, _:F391, _:D392, _:P393, _:Q394, _:E395, _:I396, _:I397, _:Y398, _:Q399, _:N400, _:F401, _:Q402, _:E403, _:V407, _:I408, _:D409, _:I410, _:K411, _:K412, _:C413, _:G414, _:K415, _:V416, _:Q417, _:L418, _:D419, _:T420, _:L421, _:T422, _:F423, _:T424, _:I425, _:S426, _:T427, _:F428, _:A429, _:N430, _:R431, _:T432, _:Y433, _:G434	65	0.68
	5	_:D156, _:L157, _:I158, _:D159, _:A160, _:T161, _:K162, _:N163, _:L164	9	0.665
	6	_:D536, _:K537, _:F538, _:I539, _:R540, _:Y541	6	0.587
Proteína	1	_:R23, _:L24, _:C25, _:F26, _:R27, _:I28, _:F29, _:L31, _:H49, _:T50, _:L51, _:L52, _:T53, _:T54, _:T55, _:Q56, _:F57, _:L58, _:T59, _:S60, _:I61, _:G62, _:N63, _:L64, _:Q65, _:S66, _:T67, _:I68, _:T69, _:S70, _:W71, _:T72, _:P73, _:D74, _:V75, _:Q76, _:A77, _:M78, _:L79, _:S80, _:I81, _:S82, _:N83, _:Q84, _:L85, _:I86, _:Y87, _:T88, _:T89, _:S90, _:I91, _:T92, _:L93, _:P94, _:L95, _:K96, _:I97, _:S98, _:T99, _:T100, _:E101, _:M102, _:S103, _:I104, _:L105, _:T106, _:A107, _:I108, _:R109, _:D110, _:H111, _:C112, _:H113, _:C114, _:P115, _:D116, _:S118, _:S119, _:C121	79	0.865
HN	2	_:Q211, _:S212, _:A213, _:S214, _:D215, _:G216, _:S217, _:P218, _:L219	9	0.731
	3	_:N431, _:F432, _:L433, _:T434, _:T435, _:P436, _:P437, _:S438, _:V439	9	0.726
	4	_:N129, _:D130, _:P131, _:R132, _:Y133, _:M134, _:S135, _:G136, _:F140, _:I141, _:G142, _:A143, _:P144, _:T145, _:E146, _:S147, _:I148, _:N149, _:I150, _:T151, _:F152, _:G153, _:P154, _:L155, _:F156, _:G157, _:I158, _:P159, _:S160, _:P181, _:L479, _:T480, _:D481, _:P482, _:S484, _:G485, _:V486, _:G487, _:G488, _:T489, _:S490, _:L491, _:R538, _:D539, _:T540, _:D541, _:T542, _:G543, _:K544, _:I545, _:Y546, _:R568, _:E569, _:I570, _:K571, _:I572, _:Q573, _:S574, _:R575, _:Y576	60	0.676

5	_:T164, _:S165, _:T166, _:T167, _:T168, _:Q169, _:G170, _:T192, _:A193, _:G194, _:C195, _:A196, _:D197, _:G198, _:G199, _:H200, _:S201, _:N233, _:A253, _:T254, _:R255, _:S256, _:T258, _:D259, _:Y260, _:Y261, _:A262, _:G263, _:N264, _:S265, _:P266, _:P267, _:P287, _:T288, _:G289, _:L290, _:A291, _:N292, _:G293, _:V295, _:G318, _:M319, _:Q320, _:Q321, _:I322, _:L323, _:A324, _:N325, _:Q326, _:S327, _:G328, _:E329, _:I330, _:N331, _:Q332, _:F333, _:F334, _:T335, _:P336, _:N338, _:A339, _:T340, _:V341, _:R342, _:C343, _:A344, _:M345, _:A346, _:Q347, _:P348, _:Q349, _:F350, _:S351, _:Q352, _:R353, _:A354, _:A355, _:A356, _:S357, _:Y358, _:Y359, _:P360, _:R361, _:F363, _:S364, _:N365, _:R366, _:W367, _:Y381, _:Q382, _:T383, _:Q384, _:L390, _:P391, _:N392, _:R393, _:M394, _:V395, _:M397, _:W419, _:E448, _:P453, _:G454, _:K455, _:G456, _:G457, _:P459, _:G460, _:N461, _:S462, _:H463, _:C464, _:P465, _:A466, _:T467, _:C468, _:T470, _:D498, _:S499, _:T500, _:S501, _:E502, _:M504, _:A505, _:I512, _:G513, _:E514, _:S515, _:L516, _:L517, _:S518, _:K519, _:T520, _:Y521, _:L522, _:L523, _:S524, _:K525, _:T526, _:Q527, _:P528, _:A529, _:G554, _:K555, _:V556, _:L557, _:L558, _:G559, _:E560	149	0.626
6	_:I9, _:M10, _:H11, _:L12, _:A13, _:Q14, _:P15, _:A16, _:I17, _:A18, _:T21, _:W22	12	0.569
7	_:G407, _:D408, _:R409	3	0.502

Las secuencias de epítomos corresponden a los aminoácidos de la cepa LPMV/1984. La puntuación ElliPro de cada epítomo se define como un valor del índice de protrusión promedio sobre los residuos del epítomo; los valores ≥ 0.5 se consideran significativos para un epítomo discontinuo [72].

Los epítomos discontinuos de células B comprenden residuos ubicados remotamente alejados en la estructura primaria que se acercan debido al plegamiento de la proteína. Solo el 10% de los epítomos de células B son lineales y El 90% son discontinuos [90]. Es por ello que es importante el emplear herramientas para evaluar estas determinantes antigénicas. Además de que de cierta manera habla de la importancia de conseguir un sistema de expresión que pueda mantener la conformación de la proteína, los sistemas eucariotas como las levaduras han demostrado presentar esta capacidad en la mayoría de las proteínas recombinantes expresadas.

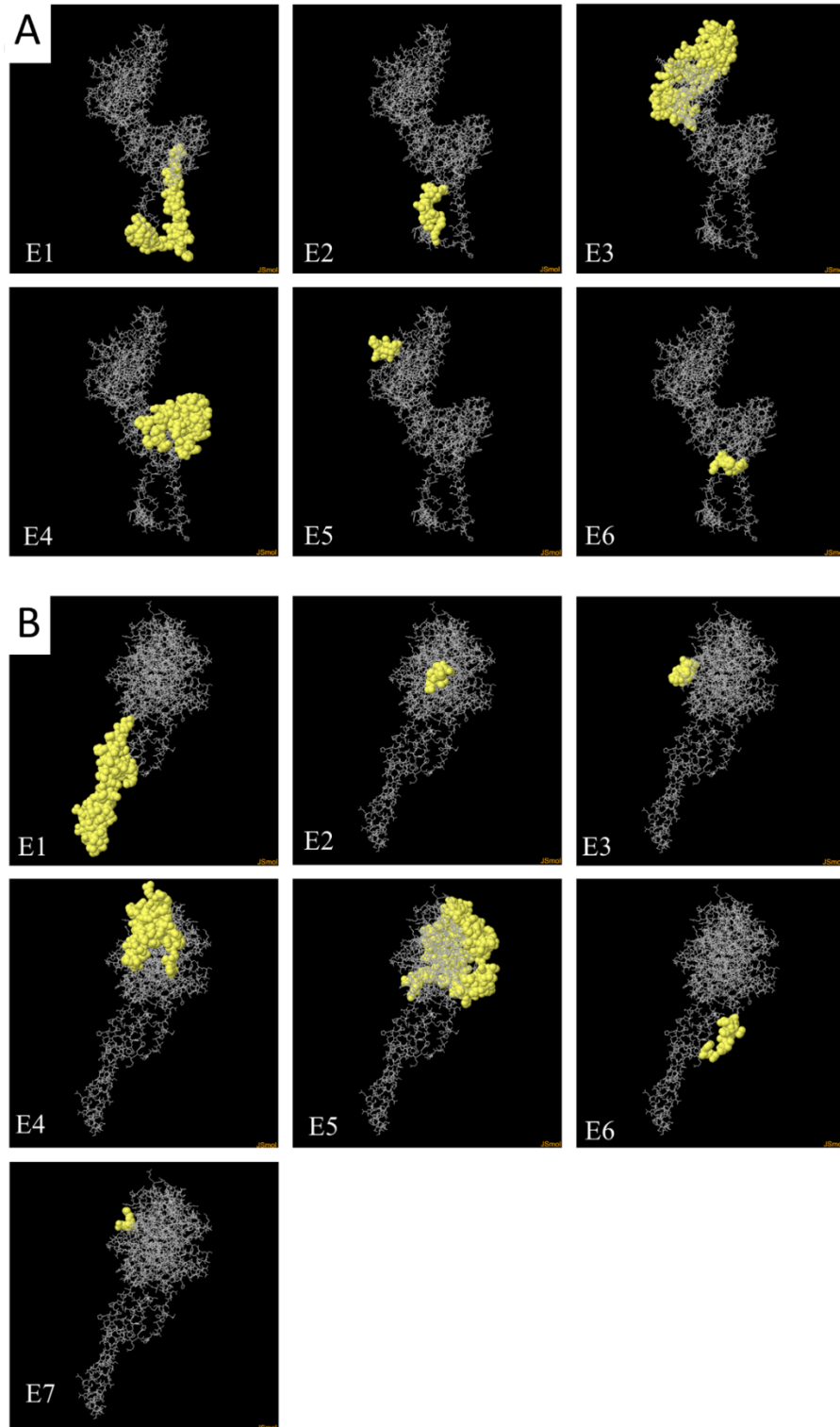


Figura 20. Epítomos discontinuos de células B de las proteínas F y HN predichos por el servidor ElliPro. Los residuos de epítomos predichos se muestran como bolas amarillas. A) Epítomos discontinuos de la proteína F 1-6 (E1-E6). B) Epítomos discontinuos de la proteína HN 1-7 (E1-E7). Visualización realizada en Jmol.

8.7. Predicción de epítomos de células T citotóxicas para las proteínas HN y F de RVP

Los determinantes antigénicos presentados mediante MHC-I activan una respuesta celular inmunitaria. Este tipo de respuesta normalmente activa las células citotóxicas que lisan las células infectadas por RVP. La aparición de esta respuesta se puede determinar mediante la unión de péptidos a los alelos HLA en el organismo huésped. Para los epítomos de células T citotóxicas se utilizó el servidor NetMHCpan 4.0 (DTU Bioinformatics), que predice la unión de péptidos MHC-I mediante redes neuronales artificiales. Existen reportes sobre el uso de esta herramienta para predecir epítomos contra las vacunas contra el virus de la hepatitis C o el virus del herpes simple [91, 92].

En los cerdos, el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el antígeno leucocitario porcino (SLA) tienen un papel importante como mediador de la inmunidad celular, que puede eliminar virus y reconocer otros antígenos en cerdos. Sin embargo, este alelo es altamente polimórfico, lo que puede causar dificultades para la detección de epítomos adecuados para una vacuna. Es por ello que los alelos MHCI utilizados para el análisis fueron SLA-1*04:01, SLA-1*01:01 y SLA-1*08:01. Estos alelos se distribuyeron ampliamente en la población porcina (Presentes en 54%, 31% y 31% de cerdos analizados) [74, 93]. La tabla 4 muestra los péptidos que se unen fuertemente para las moléculas de MHCI seleccionadas (el umbral para una unión fuerte que se consideró fue de afinidad ≤ 5000 y rango (*rank*) $\leq 0.5\%$; para una unión débil el rango es $\leq 2\%$). Se obtuvieron veintinueve epítomos citotóxicos para la proteína F y 34 para la proteína HN. La inmunogenicidad predicha de los péptidos se evaluó utilizando el servidor de inmunogenicidad de clase I (IEDB). Se predijo que dieciséis péptidos para la proteína F y veintidós para la proteína HN son inmunogénicos ya que presentan un valor de inmunogenicidad positivo.

ToxinPred es una herramienta *in silico* que predice si un péptido es una toxina que puede causar daño a las células. ToxinPred utiliza una máquina de vectores de soporte (SVM) para predecir la toxicidad junto con las mutaciones [75]. Se predijo que ninguno de los péptidos es tóxicos. Esto indica que cualquiera de los epítomos predichos podría

usarse en un sistema biológico. La predicción de la toxicidad de los péptidos se basa en el reconocimiento de motivos que están presentes en proteínas o péptidos que se sabe experimentalmente que son tóxicos. En estudios similares, se ha demostrado que algunos péptidos con capacidad inmunogénica son tóxicos y deben descartarse [94], pero esta característica aparentemente no está presente en los péptidos HN y F predichos. Se seleccionaron los péptidos que fueron reconocidos por dos alelos; que tenían inmunogenicidad positiva y un porcentaje de conservación del 100% (Tabla 5). El mayor número de péptidos se encontró en el fragmento de péptido F1, que por tanto puede proponerse como la región más inmunogénica de la proteína.

Tabla 5. Lista de epítomos citotóxicos de fuerte unión de las proteínas HN y F (LPMV/1984).

Proteína	Secuencia peptídica	Posición	Alelo	Afinidad	Unión %	Inmunogenicidad	Toxicidad	Conservación %
F	VTNVRQLAY	35	SLA-1:0401; SLA-1:0801	225.2; 493	0.1733; 0.3729	-0.38559	No-toxina	6.67%
	YTQAGSTYL	44	SLA-1:0101; SLA-1:0401; SLA-1:0801	880.3;352.6; 566.1	0.0234; 0.2668; 0.4247	-0.09036	No-toxina	100.00%
	SIINYNTL	71	SLA-1:0101	4084.9	0.4736	0.0827	No-toxina	93.33%
	ILSPIAENL	82	SLA-1:0101	3731.1	0.397	0.18229	No-toxina	100.00%
	TAAQATAAV	120	SLA-1:0101	2424.2	0.1769	0.02666	No-toxina	100.00%
	AQATAAVAL	122	SLA-1:0101; SLA-1:0801	3079.5; 539.6	0.2805; 0.405	0.18439	No-toxina	100.00%
	KVEQLSQAL	139	SLA-1:0101	3419.8	0.3423	-0.32549	No-toxina	93.33%
	AQLGNILSL	193	SLA-1:0801	345.8	0.2643	0.04346	No-toxina	93.33%
	QLGNILSLY	194	SLA-1:0401; SLA-1:0801	404; 146.4	0.306; 0.0974	-0.02245	No-toxina	93.33%

YLTELTTFV	202	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	651.1; 117.9	0.4918; 0.19597 0.0699		No-toxina	93.33%
LTPALSPL	214	SLA- 1:0101	1756.4	0.1007	-0.1317	No-toxina	93.33%
LGDMSSGL	249	SLA- 1:0101	3256.8	0.3116	-0.45051	No-toxina	100.00%
STAKVLDLV	285	SLA- 1:0101	2259.8	0.1547	-0.1623	No-toxina	100.00%
VLELGSEVL	312	SLA- 1:0101	3419.4	0.3422	0.00723	No-toxina	100.00%
ELGSEVLGY	314	SLA- 1:0801	522.6	0.3931	-0.00867	No-toxina	100.00%
TMSHILCPF	330	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	584.6; 149.9	0.4437; 0.1001	0.04603	No-toxina	100.00%
RVLSTDMKY	342	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	239.2; 220.5	0.1836; 0.1554	-0.00588	No-toxina	100.00%
FSPVGSFL	361	SLA- 1:0101	2931.5	0.2551	0.03882	No-toxina	100.00%
FALVNGVVI	372	SLA- 1:0101	4050.1	0.4662	0.1225	No-toxina	100.00%
CADMSCVCF	383	SLA- 1:0101	3773.9	0.4057	-0.37801	No-toxina	100.00%
CFDPQEIIY	390	SLA- 1:0401	468.9	0.3575	0.16757	No-toxina	100.00%
KVQLDTLTF	415	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	179.6;303.3	0.1332; 0.2285	0.0227	No-toxina	100.00%
QLDTLTFTI	417	SLA- 1:0101	1194.3	0.0499	0.19348	No-toxina	100.00%
TLFTISTF	420	SLA- 1:0801	412.5	0.3109	0.17654	No-toxina	100.00%
RTYGPPAYV	431	SLA- 1:0101	4108.4	0.4785	0.04252	No-toxina	100.00%
SLSSALNHL	462	SLA- 1:0101	3295	0.3189	-0.17907	No-toxina	100.00%
TSSLGISTI	483	SLA- 1:0101	3976.5	0.4505	-0.02352	No-toxina	100.00%

	AVNSQLSSY	524	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	39.1; 77	0.0195; 0.032	-0.52809	No-toxina	100.00%
	VMGDKFIRY	533	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	556; 237.3	0.4212; 0.17	0.07608	No-toxina	100.00%
Proteína	MSQLGTDQI	1	SLA- 1:0101	2346.7	0.1666	-0.02818	No-toxina	100.00%
HN	FMLTFDHTL	43	SLA- 1:0101	2038	0.1276	0.22032	No-toxina	100.00%
	AMLSISNQL	77	SLA- 1:0801	530	0.398	-0.26934	No-toxina	100.00%
	YTTSITLPL	87	SLA- 1:0101; SLA- 1:0801	873.6; 447.8	0.0231; 0.3394	-0.00357	No-toxina	100.00%
	QMLLNDRPY	125	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	575.6; 350.3	0.4367; 0.2675	0.0207	No-toxina	100.00%
	MLLNDRPYM	126	SLA- 1:0801	362.7	0.2761	0.04257	No-toxina	100.00%
	ALGPSHWCY	178	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	198.1; 170.6	0.1506; 0.1145	0.02463	No-toxina	100.00%
	QSASDGSP	211	SLA- 1:0101	2854.9	0.2425	-0.24637	No-toxina	100.00%
	SASDGSP	212	SLA- 1:0101	1374.2	0.0606	-0.16995	No-toxina	100.00%
	ASDGSP	213	SLA- 1:0101; SLA- 1:0401	600.2; 477.7	0.0147; 0.364	-0.14608	No-toxina	95.65%
	LLITARSYY	219	SLA- 1:0801	148.9	0.0993	0.0273	No-toxina	82.61%
	AVVPGGCAM	240	SLA- 1:0801	292	0.2173	0.0445	No-toxina	100.00%
	ATRSETDYY	253	SLA- 1:0401	348.3	0.2634	0.00093	No-toxina	95.65%
	TLYNEYLLF	305	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	608.1; 106.4	0.4613; 0.0585	0.07047	No-toxina	95.65%

EINQFFTPY	329	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	271.8; 236.8	0.2068; 0.1696	0.13182	No-toxina	100.00%
FSQRAAASY	350	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	260.2; 566.9	0.198; 0.4253	0.02577	No-toxina	100.00%
SQRAAASY	351	SLA- 1:0801	219.5	0.1545	-0.01068	No-toxina	100.00%
AAASYPRY	354	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	278.2; 236.8	0.2119; 0.1696	-0.13997	No-toxina	100.00%
RSAIVACPY	369	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	540.9; 617.7	0.409; 0.4605	0.17167	No-toxina	95.65%
QTQCTLIPL	382	SLA- 1:0101	2022.2	0.1256	0.04135	No-toxina	65.22%
MMGSEGRIF	396	SLA- 1:0801	445.8	0.3379	0.09537	No-toxina	100.00%
FTLGDRLFY	404	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	422.2; 319.6	0.3213; 0.2439	0.15986	No-toxina	95.65%
TLGDRLFYY	405	SLA- 1:0401; SLA- 1:0801	334.3; 177.3	0.2519; 0.1189	0.16992	No-toxina	95.65%
SSSWWPYPL	416	SLA- 1:0101	484.4	0.01	0.36485	No-toxina	100.00%
SSWWPYPLL	417	SLA- 1:0101	1620	0.0851	0.26467	No-toxina	100.00%
SWWPYPLLY	418	SLA- 1:0801	674.2	0.4964	0.03086	No-toxina	100.00%
LLYQVGLNF	424	SLA- 1:0801	312.7	0.2375	-0.0588	No-toxina	95.65%
VSSMTQVPL	439	SLA- 1:0101	1661.5	0.0894	-0.27328	No-toxina	95.65%
MTQVPLEHL	442	SLA- 1:0101	3435	0.345	0.0861	No-toxina	91.30%
GVYADVWPL	471	SLA- 1:0801	657.9	0.4864	0.27909	No-toxina	95.65%
GLDSTSERM	496	SLA- 1:0101;	3605.9; 160.6	0.3756; 0.1184	-0.16246	No-toxina	30.43%

		SLA- 1:0401					
STSERMAPV	499	SLA- 1:0101	4076.9	0.4719	-0.04131	No-toxina	26.09%
MAPVNYLAI	504	SLA- 1:0101	2548.8	0.1936	0.04166	No-toxina	73.91%
AAYTTTTCF	529	SLA- 1:0801	378.2	0.2863	0.11346	No-toxina	100.00%

El sombreado en Gris: Determinantes antigénicas que son reconocidas por dos o más alelos, presentan un valor de inmunogenicidad positivo y una conservación de 100%. La conservación (%) indica si la secuencia del epítipo se encuentra en todas las cepas de RVP reportadas en el NCBI (<http://tools.iedb.org/conservancy/>).

Una forma de predecir el comportamiento de estos determinantes antigénicos es evaluar su capacidad de unión a MHCI y evaluar su capacidad inmunogénica mediante acoplamiento molecular [55, 95]. En el acoplamiento (*docking*) molecular, las coordenadas del centro de la caja de la ranura de unión de SLA-1*04:01 fueron X = 18.213, Y = 2.001 y Z = 41.238, y el tamaño de la caja de la cuadrícula fue X = 30, Y = 30 y Z = 30. La Tabla 6 muestra los valores de energía de unión de los epítipos predichos para el receptor de SLA-01*04:01. Estos valores sugieren que todos los epítipos de la proteína F encajan en el surco de unión de la molécula de SLA (Fig. 21). AQATAAVAL tiene una energía de enlace de -7.0 kcal / mol. Los cinco epítipos de HN también encajan en el surco de unión. FSQRAAASY tiene una energía de enlace de -7.8 kcal / mol. Las energías de unión para estos epítipos oscilaron entre -5.8 y -7.8 kcal / mol. Las energías de unión de todos los péptidos predichos estuvieron dentro de un rango similar a los reportados en un análisis de Docking molecular con moléculas MHC-I para otros virus, incluido el virus del herpes simple o el virus de la encefalitis de Saint Louis [96, 97].

El péptido NRTYGPPAYVPPDNIIQS en la proteína F también puede ser importante porque, además de ser considerado un determinante antigénico con capacidad de unión a células B y células T MHCI, tiene la capacidad de teóricamente inducir una respuesta inmune del tipo citotóxica, la cual pudiese ser importante para eliminar el virus y cesar el proceso de infección por RVP.

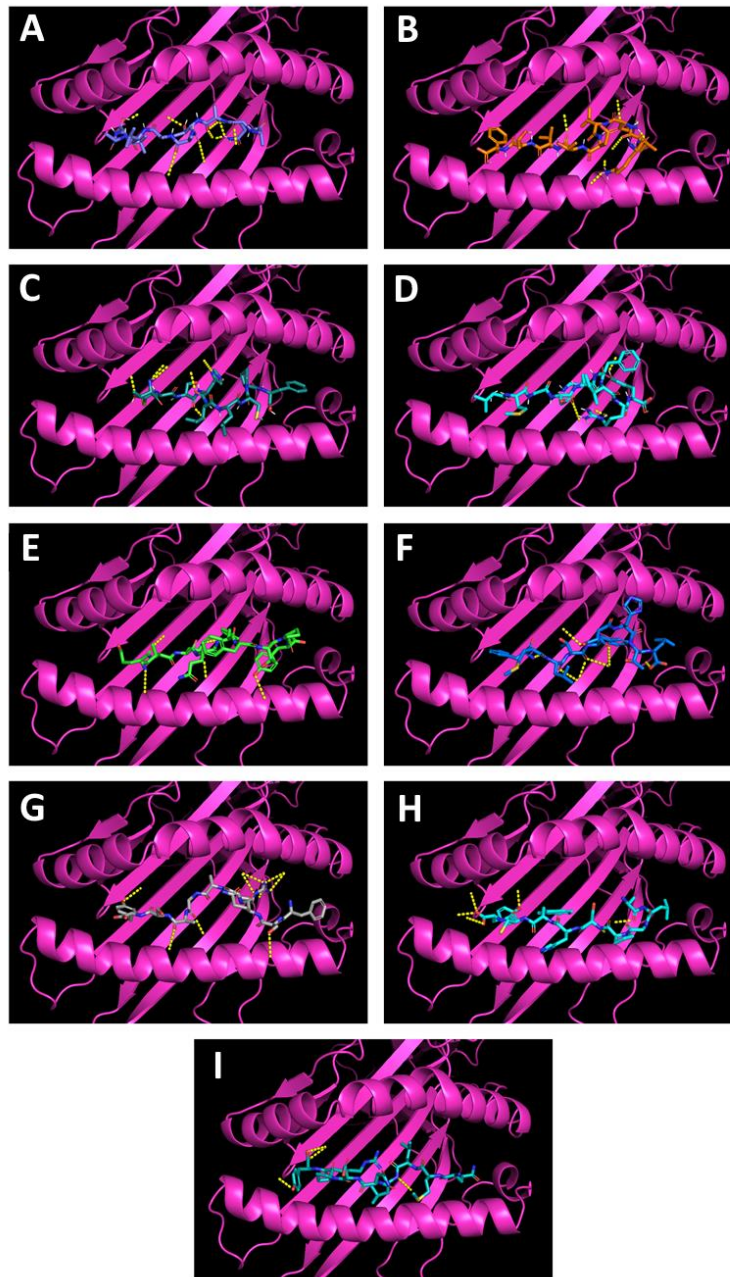


Figura 21. Patrones de unión de epítomos F y HN para SLA-01*04:01. Los residuos de epítomos predichos se muestran como líneas. El SLA-01*04:01 se muestra en magenta. Epítomos F: A) AQATAAVAL, B) KVQLDTLTF, C) TMSHILCPF, D) VMGDKFIRY. Epítomos de HN: E) EINQFFTPY, F) FMLTFDHTL, G) FSQRAAASY, H) ALGPSHCWCY e I) QMLLNDPRY. Las líneas de trazos amarillos indican enlaces de hidrógeno entre el péptido y la molécula de SLA. Visualización realizada mediante software PyMol.

Tabla 6. Energías de unión de epítomos MHC I predichos y seleccionados para el alelo SLA-01*04:01 usando Autodock Vina

Proteína	Secuencia de péptido	Energía de unión (kcal/mol)
Proteína F	AQATAAVAL	-7.0
	TMSHILCPF	-5.8
	KVQLDTLTF	-6.6
	VMGDKFIRY	-6.3
Proteína HN	FMLTFDHTL	-7.3
	QMLLNDRPY	-6.4
	ALGPSHWCY	-7.3
	EINQFFTPY	-6.8
	FSQRAAASY	-7.8

Actualmente, se están considerando varios enfoques para diseñar posibles vacunas para RVP. Las ventajas del uso de herramientas inmunoinformáticas ya se han demostrado para otros patógenos como el virus de Ébola, el virus de Zika o el virus de Oropouche [95, 98, 99]. El diseño de vacunas quiméricas empleando solo determinantes antigénicos con capacidad de activar la respuesta inmune ya han sido propuestas, ejemplo de este tipo de vacunas es una vacuna quimérica empleando determinantes antigénicos de la proteína S de SARS-CoV-2 que se compone siete epítomos MHC-I, ocho epítomos de linfocitos B lineales y tres epítomos que activan respuestas mediadas por interferón γ , la cual fue expresada en *E. coli* [100].

De acuerdo con los resultados de los estudios de predicción, se decidió expresar en *P. pastoris* dos variantes del ectodominio de la proteína F.

Proteína eF1: comprende la región F1, desde el aminoácido 129 al 489, con lo que se pretende evitar el péptido fusión y la región transmembranal (figura 19).

Proteína eF2-1: que abarca a F2 y F1, desde el aminoácido 23 al 489 (Figura 19), tomando en consideración que la región F2 presenta epítomos de clase MHC I, esto como alternativa para intentar abarcar la mayor cantidad de posibles epítomos, sin necesidad de expresar la región transmembranal que en un momento dado pudiese anclarse a la membrana y generar problemas técnicos para la purificación de las proteínas recombinantes.

8.8. Construcción del vector pPICZαB-F1

Se generó la construcción pPICZαB-F1, para obtener la proteína, denominada ectodominio F1 (eF1) que comprende la región F1, desde el aminoácido 129-489. Para cumplir este objetivo se generaron dos construcciones. El vector pJET-F1 (figura 22), como construcción de resguardo y el vector pPICZαB-F1 (figura 23), como construcción de expresión de F1 en *P. pastoris*.

A partir del pJET-Forf, se amplificó la región F1 empleando los siguientes iniciadores:

RuF1fw: 5'-AATGGAATTCTTCAACTAAGCCAGGCACTTGG-3'

RuF1rv: 5'-GGTAATGTCTAGAACAATCTGCTCGTTCCGCA-3'

En la figura 22a se muestra el mapa de la construcción pJET-F1, esta construcción se caracteriza por que el plásmido presenta resistencia a ampicilina. El ORF de F1 se insertó en pJET1.2 y se caracterizó mediante endonucleasas de restricción (figura 22b y 22c). Los patrones de restricción son los esperados para cada una de las enzimas empleadas: *EcoRI* linealiza la construcción pJET-F1 de 4,021pb (figura 22b) ya que el sitio de restricción es único, además de que es característico del péptido F1 debido a que se adicionaron a los oligonucleótidos empleados para amplificar el ORF. *HindIII* presenta dos sitios de restricción, uno que se encuentra dentro de la secuencia de F1 y el otro en el esqueleto del vector pJET, generando dos fragmentos de restricción de 3,034 y 987 pb (figura 10b). Como confirmación se realizó la doble digestión con *EcoRI-XbaI* (figura 10c), la cual libera la secuencia que expresa F1 (1,036 pb) y el esqueleto del vector PJET1.2 (2,973 pb). También en la figura 9c se muestra F1 purificado mediante extracción de banda del gel de agarosa, este purificado se empleó para clonar F1 en pPICZαB.

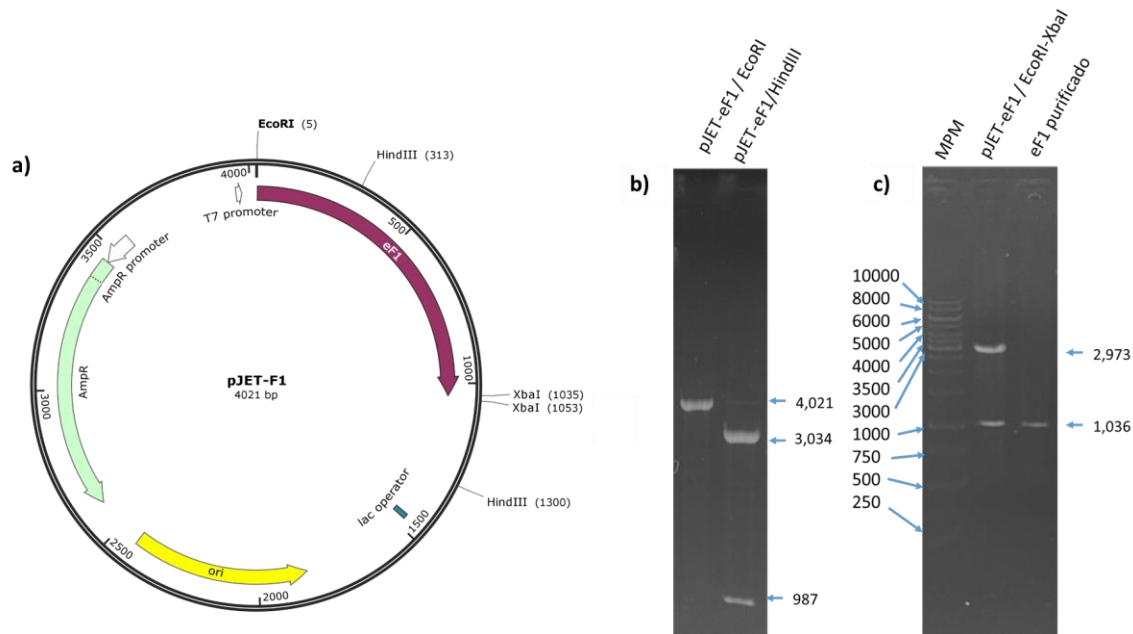


Figura 22. Obtención de la construcción pJET-F1. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%: a) Mapa de restricción de la construcción pJET-F1 b) Caracterización mediante endonucleasas de restricción pJET-F1; c) Liberación y purificación de F1.

El ORF de F1 fue clonado en un vector pPICZ α B linearizado, con el objetivo de obtener la construcción pPICZ-F1 (Figura 23). La construcción es de 4,564; el vector pPICZ α B contiene un gen que da resistencia a zeocina. La proteína F1 se encuentra regulada por las regiones no traducibles del gen de AOX1, que le permiten a la levadura *P. pastoris* crecer con metanol como fuente de carbono. Además la proteína F1 recombinante va a en el extremo amino terminal un péptido señal factor α , que permite su exportación al medio extracelular. En el extremo carboxilo de la proteína F1 se le adicionaron dos etiquetas *cmc*y polihistidinas, para su identificación mediante anticuerpos, además la etiqueta polihistidinas facilita el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados.

Después de obtener clones resistentes a zeocina, se purificaron los plásmidos, para confirmar la construcción. La figura 11 muestra los plásmidos digeridos enzimáticamente; se observan los productos esperados. La enzima *EcoRI* tiene solo un sitio de corte (figura 23) y genera un fragmento de 4,564 pb (figura 24). La enzima *HindIII* tiene dos sitios de corte, uno dentro del ORF de F1 y el otro en el vector pPICZ α B (Figura

23), lo que genera dos fragmentos (3,916 y 648 pb) (figura 24). Además, se realizó un corte con la enzima *PmeI*, la cual linealiza la construcción y produce un fragmento de 4,564 pb. La presencia del sitio único *PmeI*, es importante ya que genera un corte con extremos parejos directamente en la región 5'UTR AOX1, lo que promueve la recombinación e inserción del gen de interés dentro del gen AOX1 del genoma de *P. pastoris*.

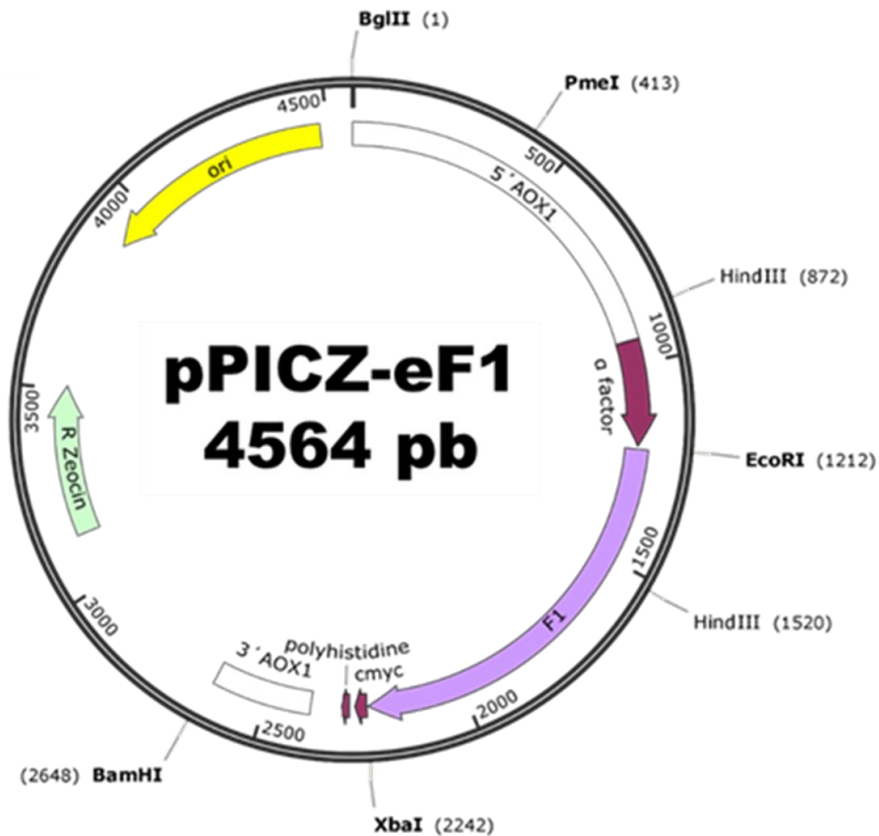


Figura 23. Mapa del vector recombinante de expresión pPICZ-eF1. Codifica el péptido eF1 que comprende desde el aminoácido 129 al 489, fusionada a las etiquetas c-myc y 6His, así como el péptido señal α -factor para la secreción al medio de la proteína.

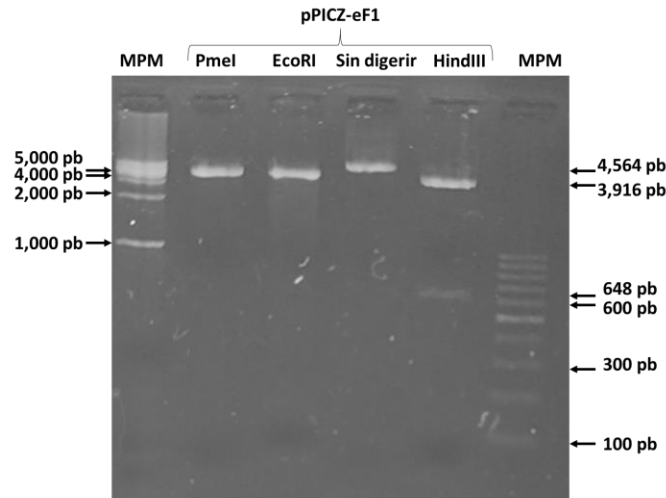


Figura 24. Confirmación de la construcción del vector pPICZ-eF1 por restricción enzimática. Corrimiento electroforético en gel de agarosa. MPM: Marcador de peso; Enzimas de restricción: *PmeI*; *EcoRI*; sin digerir; *HindIII*.

8.9. Obtención de la cepa X-33eF1+

La transformación se realizó mediante choque térmico, empleando el método de LiCl. Previamente se linealizó la construcción pPICZ-F1 con la enzima *PmeI*. Después del proceso de transformación se seleccionaron las células empleando zeocina (200 µg/ml), a los dos días de cultivo se observó el crecimiento de colonias aisladas (figura 25a).

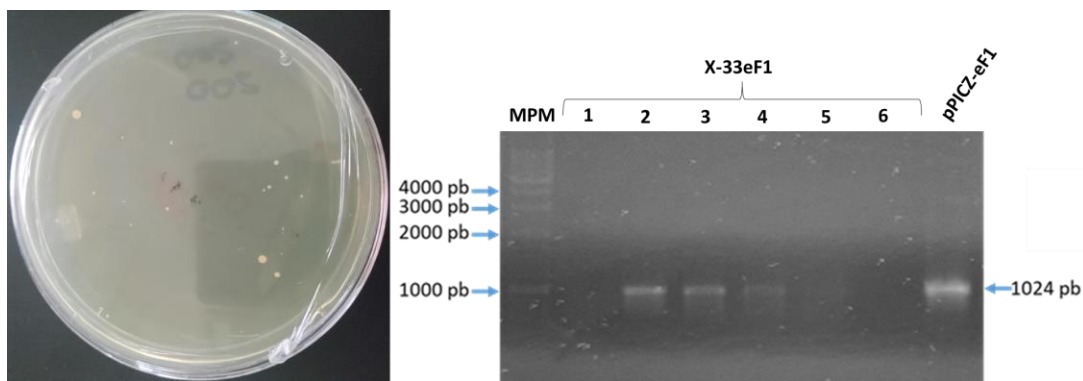


Figura 25. Inserción del vector pPICZ α B-eF1 en el cromosoma de la cepa X33 de *P. pastoris*. Clonas *P. pastoris* X-33 transformadas con el vector pPICZ-eF1 y seleccionadas en medio con zeocina (izquierda). Confirmación de clonas X-33-eF1 por PCR a partir de ADN cromosomal, usando iniciadores que generan un fragmento de 1,024 pb correspondiente al inserto del gen eF1 (derecha). MPM marcador de peso molecular; X-33eF1 clonas 1-6: pPICZ-eF1 testigo positivo.

Se seleccionaron 5 colonias y se pasaron a una segunda ronda de selección con zeocina (200 mg/ml), en donde, aparentemente, las 5 siguen creciendo en presencia del antibiótico, en cambio un testigo negativo no presenta este fenotipo.

Con extractos cromosómicos de las clonas resistentes se amplificó por PCR la región F1 (1,024 pb); se empleó como testigo positivo el vector pPICZ-eF1. Se obtuvieron 4 clonas que fueron positivas a la amplificación de la región F1 (Figura 25b).

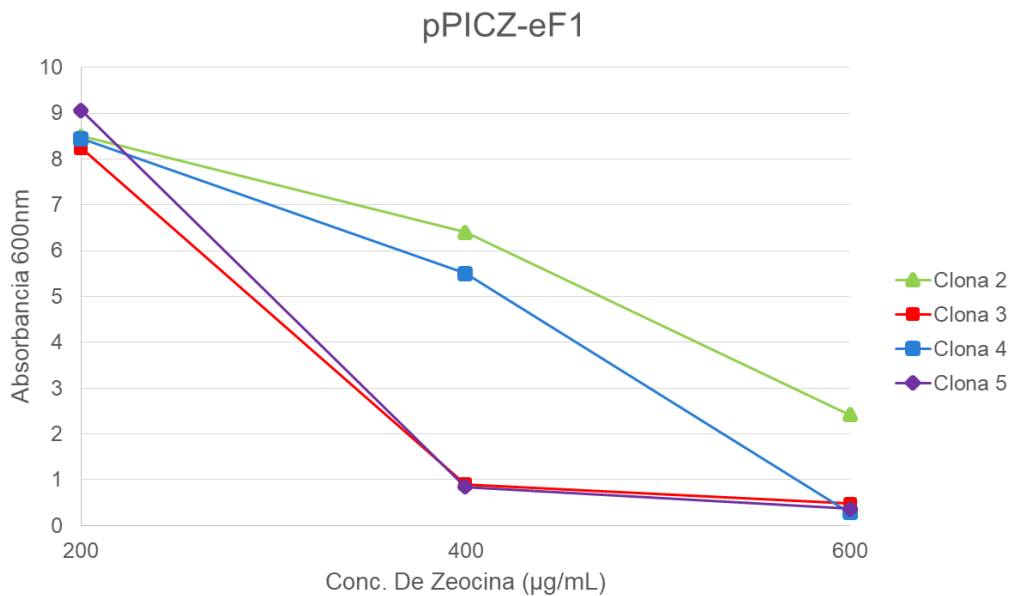


Figura 26. Selección de clonas de pPICZ-eF1 a diferentes concentraciones de zeocina.

Una forma indirecta de determinar la posibilidad de que una clona haya presentado una inserción múltiple dentro del genoma, es analizando su tolerancia a diferentes concentraciones de zeocina. Ya que si la clona crece a mayores concentraciones de zeocina, es posible que sea porque genera mayor cantidad de proteína que supera el efecto de la antibiótico [101]. Se crecieron las 4 clonas positivas a eF2-1 en concentraciones de 200, 400 y 600 µg/ml (Figura 26). Solo las clonas 2 y 4 crecieron a concentraciones de 600 µg/ml de zeocina. La selección de una clona con altas concentraciones de zeocina (hasta 600 µg / ml) sugiere la posibilidad de que si la levadura crece en estas altas concentraciones, el evento de inserción del gen de interés ocurrió más de una vez. En protocolo de expresión de proteínas de interés en *P. pastoris* se busca la obtención de clonas con múltiples copias del gen de interés ya que esto se

asocia con la capacidad de la levadura de producir una mayor cantidad de proteína recombinante [102, 103]. En nuestro caso, el clon seleccionado puede crecer en altas concentraciones de zeocina, por lo que posiblemente sea un clon con múltiples copias del gen eF1.

Debido a que la inserción de eF1 en el cromosoma de *P. pastoris* es específica de secuencia y ocurre en el gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), se puede determinar la forma en la cual se insertó el gen. Existen dos formas de inserción del gen de interés dentro del genoma (figura 27): la primera es una sustitución del gen AOX1 (MutS) y la segunda es un desplazamiento del gen AOX1 (Mut+), esto tiene una importancia biotecnológica por que determina la manera en la cual se va a expresar y producir la proteína de interés.

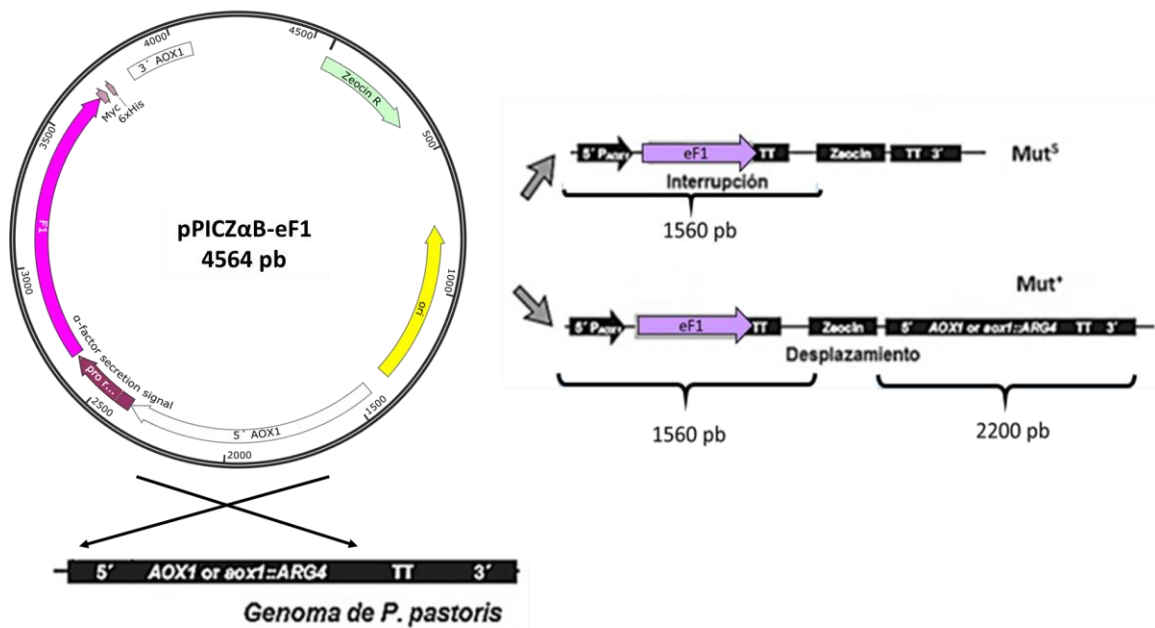


Figura 27. Esquema de los eventos posibles de integración del vector recombinante en el cromosoma de *P. pastoris*.

En la figura 28 se muestra la PCR del cromosoma de dos clonas seleccionadas (clona 2 y 4). Se emplearon como testigos la cepa X-33wt (testigo sin transformar), en donde el producto de PCR obtenido fue de ~2,220 pb, lo cual concuerda con el reportado en el manual de Invitrogen para el gen de AOX1; también se empleó el vector vacío

pPICZ α B (testigo de vector sin inserto), en donde el producto de PCR obtenido fue una banda de ~580 pb, la cual ha sido reportada por la casa comercial Invitrogen; como testigo positivo para eF1 se empleó el vector de transformación pPICZeF1, dando un producto esperado de 1560 pb que corresponde a la región F1 flanqueada por los reguladores 5' y 3' del gen AOX1. Para las clonas 2 y 4 se obtuvieron dos productos de PCR (2,200 y 1,560), las cuales representan el gen AOX1 y el gen eF1. Esto significa que la inserción de eF1 dentro del genoma fue por desplazamiento en el gen AOX1 y el fenotipo es Mut+. Por lo que las clonas 2 y 4 pueden crecer en metanol y expresar la proteína eF1 desde que se inicia el cultivo.

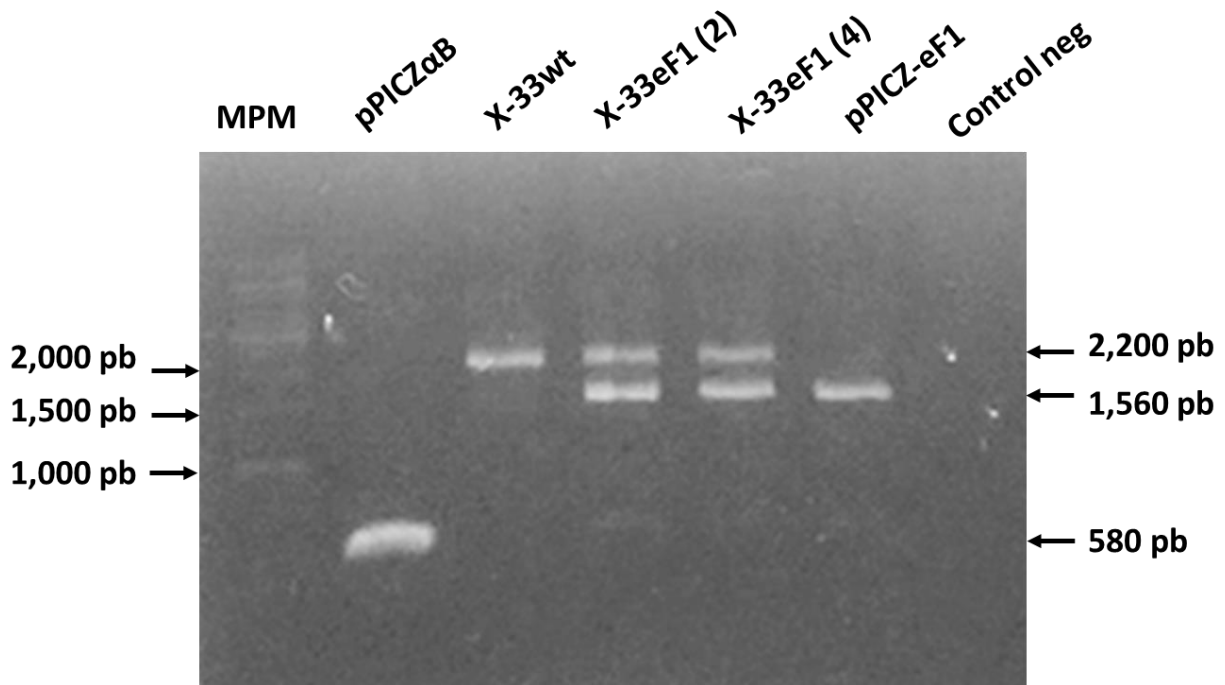


Figura 28. Obtención de cepas X-33eF1 Mut+. MPM marcador de peso molecular; PCR de: pPICZ α B vector vacío, y pPICZ-eF1. PCR de cromosoma de cepas 1,2 y 4 X-33eF1.

8.10. Curva de crecimiento celular de la cepa productora X-33eF1+

En la curva de crecimiento obtenida para las cepas X-33eF1+ y X-33wt no se aprecian diferencias en su crecimiento (Figura 29). Esto es importante porque asegura que la inserción del gen F1 dentro del cromosoma de la levadura no genero alteraciones que afecten el crecimiento de esta cepa. Se encontraron velocidades específicas similares para las dos cepas. Se obtuvieron tiempo de duplicación similares para ambas

cepas de alrededor de 3 horas, los cuales son tiempos aproximados para ser considerados un crecimiento típico de levadura.

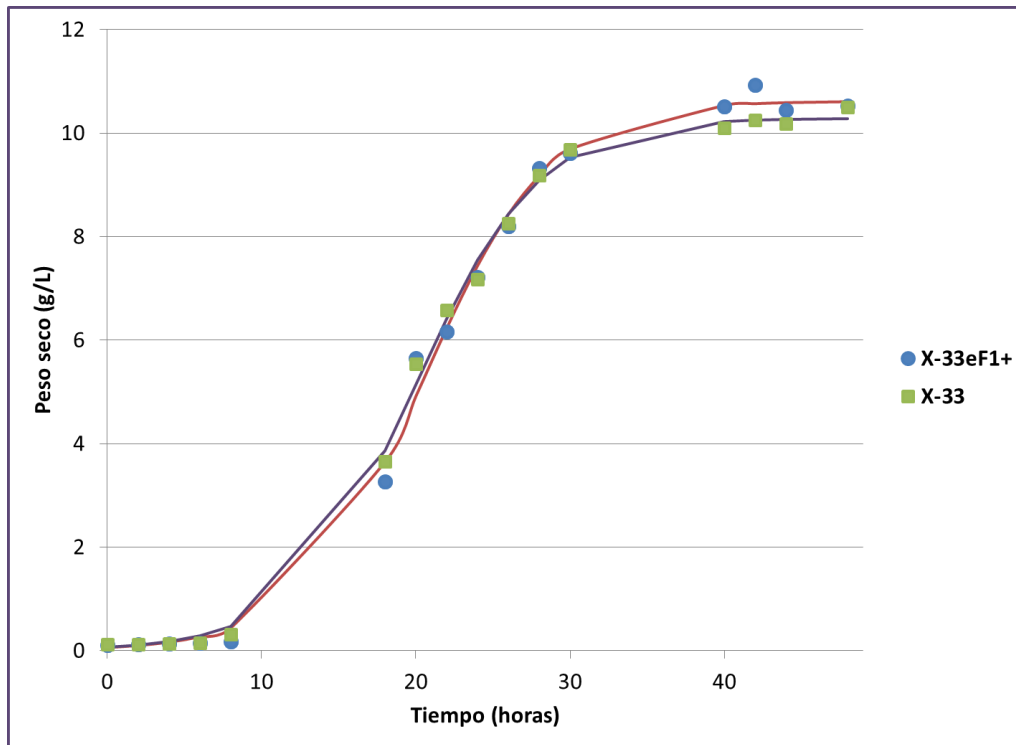


Figura 29. Curva de crecimiento de crecimiento celular de las cepas X-33wt y X-33eF1+ a lo largo del tiempo.

En un trabajo previo, se reportó que el tiempo de duplicación de *P. pastoris* que expresa el ectodominio de la proteína (eHN) fue de 3.5 h. Este es un tiempo de duplicación similar obtenido en el presente estudio. Kastilan y col en el 2017 reportaron que los tiempos de duplicación en *P. pastoris* son rápidos y que oscilan dentro de un rango de 1-3 h [104]. Por lo que, el tiempo obtenido se encuentra dentro de este rango, lo que indica de cierta manera que la expresión de la proteína F1 no tiene afectaciones que comprometan el metabolismo de la levadura.

8.11. Expresión y producción del péptido eF1

Con la cepa productora de eF1 denominada X-33eF1+, se realizó un cultivo en presencia de metanol y se fue monitoreando día a día la expresión del ORF eF1 (ARN mensajero) y la producción del eF1 en el medio libre de células. En la figura 30 se muestra las bandas de amplificadas por RT-PCR del ARN mensajero del gen eF1; se

observa un solo producto de 1,056 pb de 1 a 4 días de inducción con metanol en la cepa X-33eF1+, mientras que a los 4 días, bajo las mismas, condiciones no se observa ningún producto en la cepa testigo X-33wt.

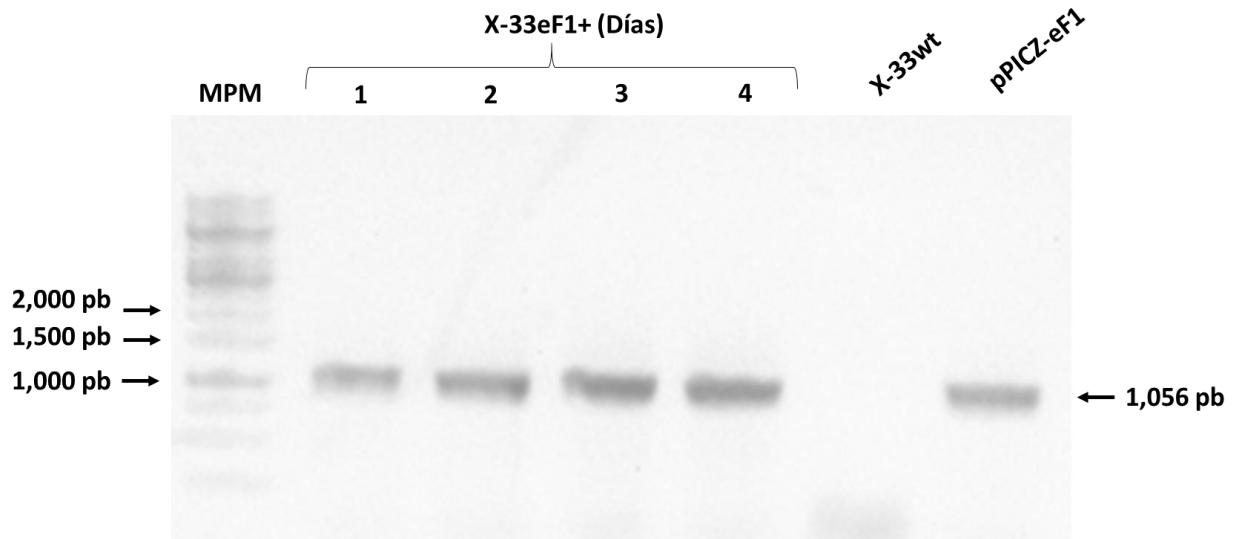


Figura 30. Detección del ARN mensajero del eF1 en la cepa X-33eF1+ en condiciones de expresión con metanol. Gel de agarosa del RT-PCR del ARN-total. MPM: marcador de peso; X-33eF1+ 1-4 días: RT-PCR de la cepa X-33eF1+ en crecimiento con metanol. X-33wt: RT-PCR de la cepa original X-33. PCR del vector de expresión pPICZ-eF1.

Con respecto a la producción del péptido eF1 en el medio libre de células, en la figura 31a se muestra un PAGE-SDS de las proteínas (10 µg) presentes en el medio libre de células. Como se puede apreciar en el gel, se encuentra una banda a la altura de 41kDa, peso molecular de eF1. La identificación de eF1 se realizó mediante *Western blot* empleando un anticuerpo que reconoce la etiqueta de polihistidinas (figura 31b). En cambio, en la cepa X-33eF1+ está una banda a la altura de 41 kDa, la cual inicia a partir del día 1 y aumenta su intensidad hasta el día 6 en donde aparentemente se mantiene constante. Lo que muestra que el número de días para obtener la mayor producción de eF1 es el día 6. En el testigo negativo X-33/pPICZ no hay detección de una proteína a la altura de 41kDa.

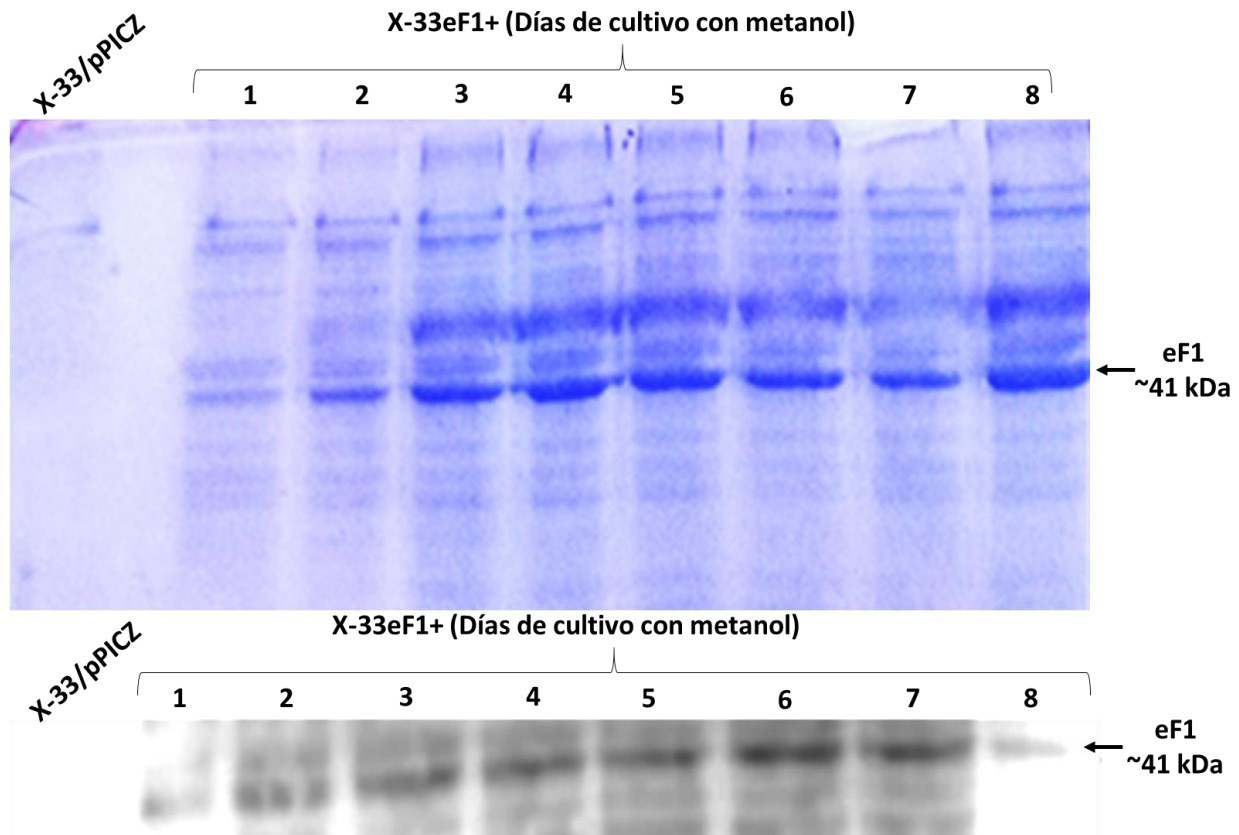


Figura 31. Producción de eF1 por la cepa X-33eF1+, durante 1-8 días en medio con metanol (BMMY). Arriba: PAGE-SDS (muestras con proteínas 10 µg) teñido con azul de Coomassie. Abajo: *Western blot* empleando un anticuerpo anti-His.

Se ha reportado que para la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle, el tiempo de inducción en donde se obtiene la mayor cantidad de proteína recombinante es a las 144 h [49]. Además, dentro del grupo de trabajo, el tiempo de expresión donde se obtiene la mayor cantidad de eF1 es similar al reportado para la proteína HN también expresada en *P. pastoris* [47].

8.12. Detección de eF1 por sueros de cerdos infectados por RVP y cerdos no infectados (testigos)

Se realizaron ensayos de inmunodetección de la proteína eF1 con sueros proporcionados por el Dr. Rivera-Benítez (INIFAP). Se emplearon sueros de cerdos sanos (3 sueros) y de cerdos infectados por 6 cepas distintas (PAC1, LPMV, PAC3, PAC4, Qro/93/2013, Mich/147/2013). En la figura 32 se puede apreciar que en todos los sueros de cerdos sanos no existe el reconocimiento de una proteína de 41 kDa. El suero

de cerdo infectado con la cepa PAC1 reconoce una proteína a la altura de 41kDa, peso de la eF1. Los resultados fueron similares en las cepas LPMV, PAC3, PAC4, Qro/93/2013 y Mich/147/2013 (estas últimas dos de brotes recientes [15]) en el que hay reconocimiento de la proteína eF1 (41kDa y también de la proteína de 20 kDa). Como testigo negativo se empleó medio libre de células de una cepa transformada con el vector pPICzαB vacío. No se presentó reconocimiento de ninguna proteína por todos los sueros.

La proteína eF1 es reconocida por sueros de cerdos infectados con RVP obtenidos de diferentes brotes durante 19 años, este resultado contrasta con lo reportado por Hernández y col. 1998, donde no se encontraron anticuerpos específicos que reconocieran la proteína F [43]. Este es un resultado importante ya que sugiere que los determinantes antigénicos de la región F1 no se han visto afectados por mutaciones adquiridas por las cepas con el tiempo. El hecho de que se mantengan los determinantes antigénicos sugiere la posibilidad de utilizar la proteína eF1 como un antígeno que podría proteger contra varias cepas de RVP. Además, como la proteína eF1 es reconocida por diferentes cepas, permite el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico serológico de RVP.

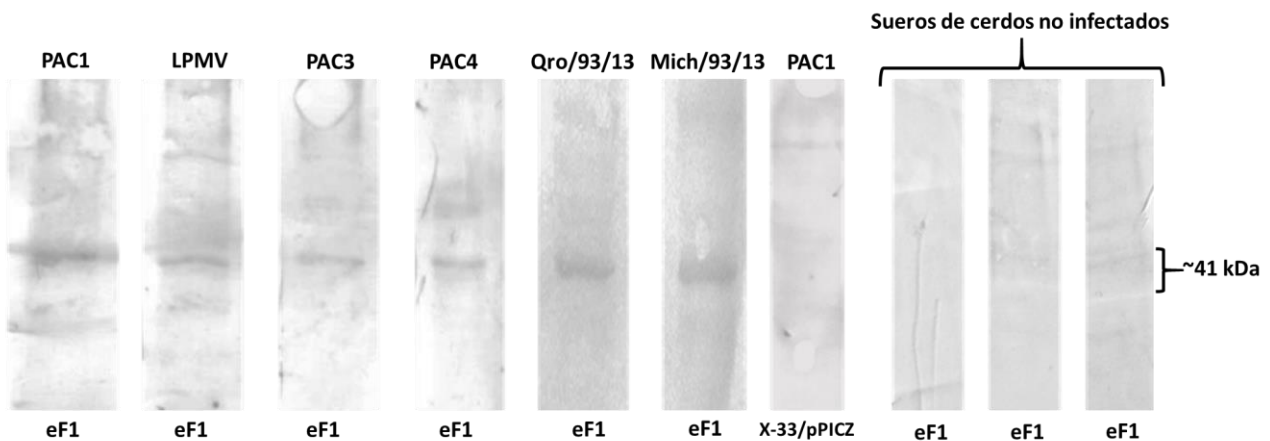


Figura 32. Western blot de eF1 recombinante producido por la cepa X-33eF1+ incubadas con suero de cerdo infectado con RVP de diferentes cepas. Proteínas extracelulares de X-33eF1+ detectadas con sueros de diferentes cepas de RVP; proteínas extracelulares de X-33eF1+ con sueros de cerdos sin infección. X-33wt proteínas extracelulares de la cepa X-33.

8.13. Purificación de eF1 mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

Se realizó una precipitación diferencial del medio libre de células con sulfato de amonio al 80% de saturación. El medio libre de células se concentró 10 veces y se procedió a purificar mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Ni^{+2}). La proteína recombinante eF1 contiene en su extremo C-terminal una etiqueta de polihistidinas. Este método facilita la purificación de proteínas realizando sólo un paso de purificación.

En la figura 33a se muestra el cromatograma de las fracciones de la purificación de eF1. Donde la región de muestra/no pegado (NP) son todas las proteínas que no tienen interacción con el níquel (volumen de elución: 1-6 ml). Como se puede apreciar en el cromatograma, en la fracción NP, gran parte de la proteína presente en el medio libre de células no interacciona con la resina, esto debido a que no contienen motivos de histidinas que permitan esta interacción. El lavado (L) es la fracción de proteínas que no tienen afinidad por el níquel, pero no eluyeron en el no pegado. En esta fracción se puede observar que la columna regresa al equilibrio, ya que la absorbancia es prácticamente cero al final de los lavados (volumen de elución: 7-22 ml). Las proteínas con afinidad al níquel se eluyeron (E) con 300 mM de imidazol (molécula que compite con las histidinas) (volumen de elución: 23-32 ml). Como se puede apreciar en el cromatograma se obtuvo un pico a 25 ml, el cual se debe a que en esa fracción pudiese encontrarse la mayor cantidad de proteína de interés.

En la figura 33b se muestra el corrimiento de SDS-PAGE de cada una de las fracciones, en donde se puede observar que las proteínas contaminantes eluyen en las fracciones del no pegado y lavados. Y en la elución se recupera solo una banda correspondiente a eF1, debido a que contiene la cola de 6 histidinas que permiten que se adhiera a la matriz de Ni-NTA de la columna. Cabe mencionar que parte de la proteína eF1 no se adhiere a la columna y se pierde en la fase no pegado y en la fracción de lavado, esto posiblemente debido a una saturación de la columna por un exceso de proteínas, también existe la posibilidad de que la cola de histidinas haya sido degradada o

también por posibles interacciones proteína-proteína que pudiesen generar que la cola de 6 histidinas no tenga un contacto adecuado con la matriz de la columna esto último se ha reportado en la purificación de una proteína HA del virus de influenza aviar H5N2 [105]. Sin embargo, lo que hay que destacar es que en la elución con imidazol se pude recuperar eF1 aparentemente pura, ya que no se aprecian otras proteínas.

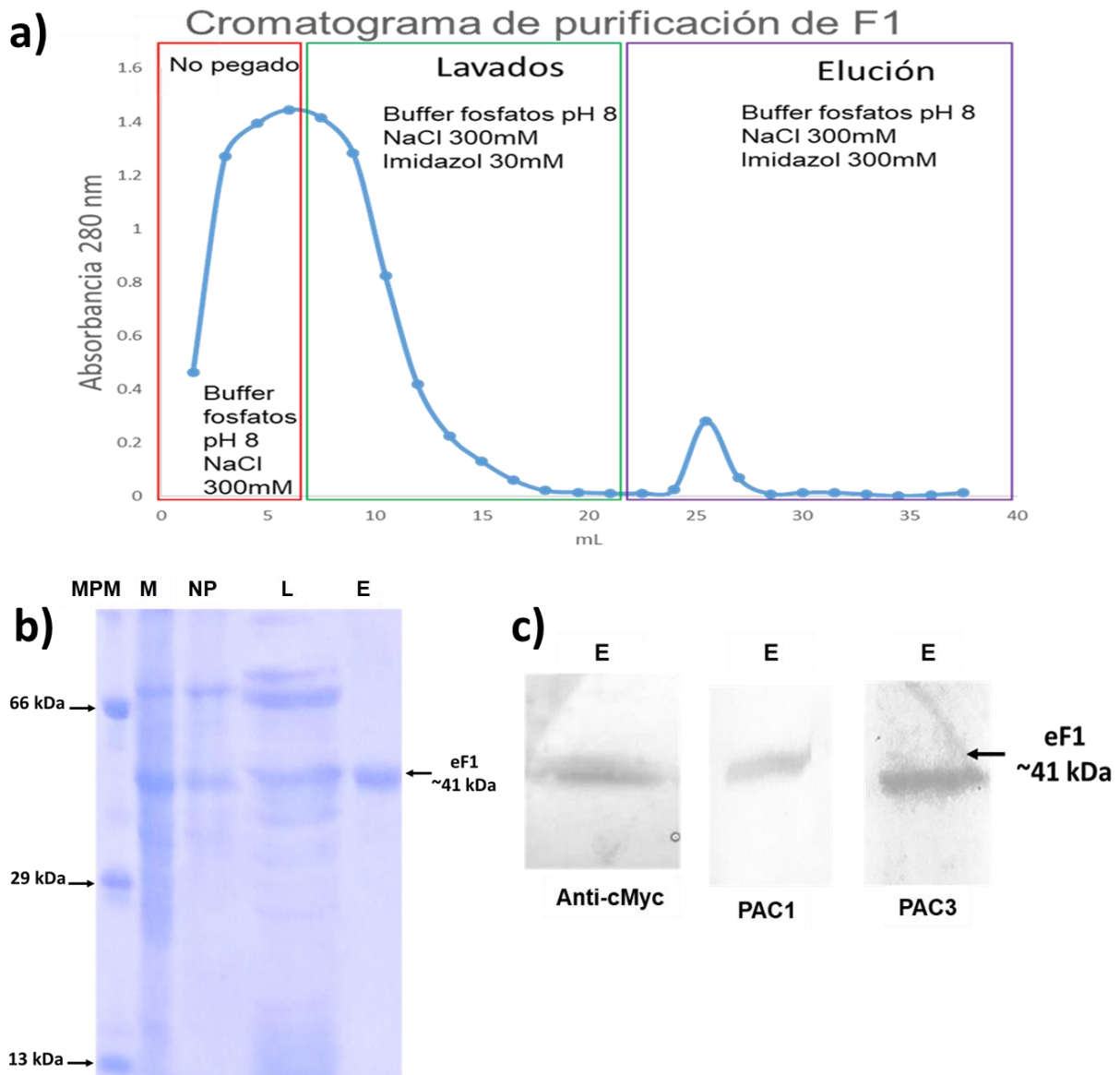


Figura 33. Perfil de elución del proceso de purificación de F1. a) Cromatograma de fracciones recolectadas. b) SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación. c) *Western blot* con anti-cMyc, suero PAC1 y suero PAC3 de la fracción de elución.

La figura 33c confirma que la proteína que se obtiene en la fracción de elución es la proteína eF1, esto debido a que se da un reconocimiento fuerte por parte del anticuerpo anti-cMyc, el cual es un anticuerpo que reconoce exclusivamente la etiqueta cMyc que también contiene la proteína recombinante. De forma importante también se da un reconocimiento fuerte de la proteína que se obtiene en la elución por sueros de cerdos infectados por RVP cepa PAC1 y PAC3, lo que corrobora que se trata de la proteína recombinante eF1, además de que fortalece el resultado de que en una infección por RVP si se producen anticuerpos específicos en contra de la proteína F. Además hay que mencionar que al darse el reconocimiento de solo una banda de proteína (eF1), de cierta forma indica que el péptido se mantiene integro después del proceso de purificación y no se encuentran trazas de productos de degradación de este péptido. La inmunodetección es más sensible que el SDS-PAGE y de encontrarse trazas de la proteína recombinante posiblemente mostraría alguna otra señal en el *Western blot*.

Después del proceso de purificación el rendimiento de la proteína eF1 es de 125 µg por 100 ml de medio libre de células, es decir, el 30% de la proteína eF1 total que se introduce en la columna Ni-NTA (tabla 7).

Tabla 7. Rendimiento de la purificación de eF1 a partir de 100 ml de medio libre de células

Proteína Total (100 ml)	Proteína eF1	Proteína eF1 pura	% de rendimiento
6215 ±296 µg	410 ±24.2 µg	125 ±0.20 µg	~ 30 %

El comportamiento de la proteína al purificarse por IMAC es típico para este tipo de cromatografía, la cantidad obtenida para la proteína eF1 de 125 µg/100ml, es similar a 120 µg/100ml obtenidos para la proteína HN, también la expresión de eF1 es dos veces mayor a la proteína λ1 de reovirus (50 µg/100ml) y similar a la cantidad de proteína T obtenida de poliomavirus (100µg/100ml) [47, 106, 107]. Obtener la proteína eF1 con un grado alto de pureza permite plantear la posibilidad de llevar el estudio a otros niveles, como probar la proteína eF1 como antígeno en modelos murinos o porcinos y determinar si la proteína recombinante puede o no generar una respuesta inmune que proteja contra RVP.

8.14. Construcción del vector pPICZ-F2-1

Otra alternativa a la proteína eF1, fue generar la construcción del vector pPICZ-F2-1, para obtener la proteína que se denominó ectodominio F2-1 (eF2-1) que comprende la región F2 y F1, del aminoácido 23 al 489.

A partir del pJET-Forf se amplificó la región F2-1 empleando los siguientes iniciadores:

RuF2fw: 5'-GCAGGAATTCGGGGTATCAACACTGA-3'

RuF1rv: 5'-GGTAATGTCTAGAACAAATCTGCTCGTTCC-3

Para cumplir este objetivo se generaron dos construcciones: pJET-F2-1 (no mostrado), como construcción de resguardo y obtención de F2-1 y pPICZ-F2-1 (figura 34a), como construcción de expresión de F2-1 en *P. pastoris*.

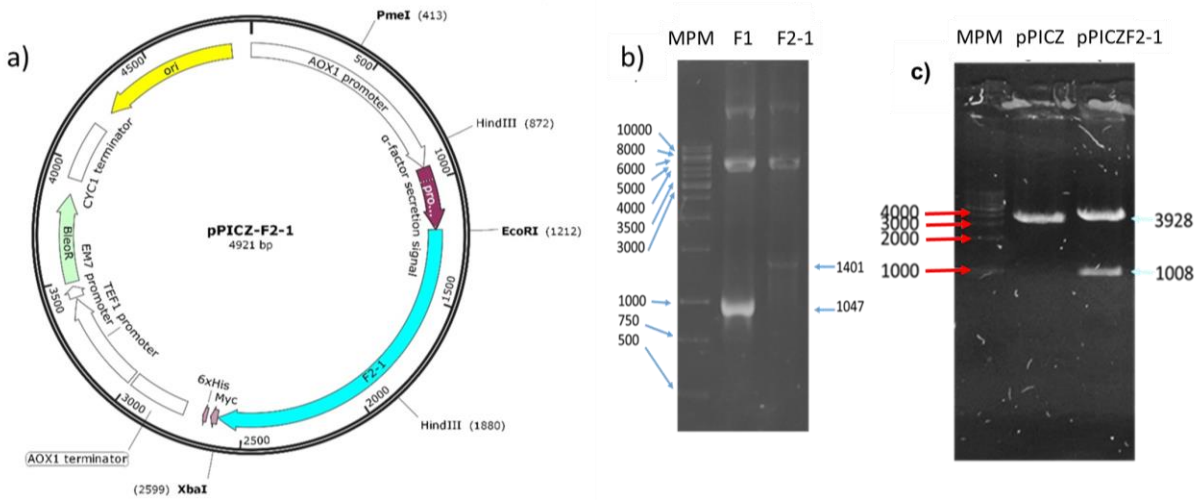


Figura 34. Obtención de la construcción pPICZ-F2-1. a) Mapa de restricción de pPICZ-F2-1; se muestran los sitios de restricción característicos de la construcción (*EcoRI*, *XbaI*, *HindIII* y *PmeI*) b) Amplificación de eF21 (Carril 1 MPM; Carril 2 F1 [1047 pb]; carril 3 eF21 [1401]). c) Restricción con *HindIII* de clona pPICZF21.

En la figura 34b se muestra F1 como testigo positivo (1,047 pb), así como el producto de PCR eF21 (1,401 pb), que comprende la región F2 y F1 (aa 23-489). Las bandas de alto peso molecular corresponden al plásmido pJET-Forf que se empleó como molde. El producto de PCR se purificó y clonó en el vector pPICZαB y se caracterizó con

la enzima *Hind*III, la cual corta dentro del inserto y en el esqueleto del vector (figura 34a) generando dos fragmentos (3,928 y 1,008 pb). En el carril 3 de la figura 34c se aprecian los dos fragmentos dentro de los pesos esperados por lo cual esta clona se seleccionó y resguardó.

8.15. Obtención de clonas de pPICZ-F2-1

Se obtuvieron 4 clonas con resistencia a zeocina (200 µg/ml). A las cuales se extrajo el ADN genómico y se realizó una PCR con los iniciadores RuF2fw y RuF1rv; en todas las clonas seleccionadas se amplificó un producto de 1401 pb (Figura 35). Estas clonas se crecieron en diferentes concentraciones de zeocina (200, 400 y 600 µg/ml) para buscar en cuáles el evento de inserción ocurrió más de una vez (Figura 36).

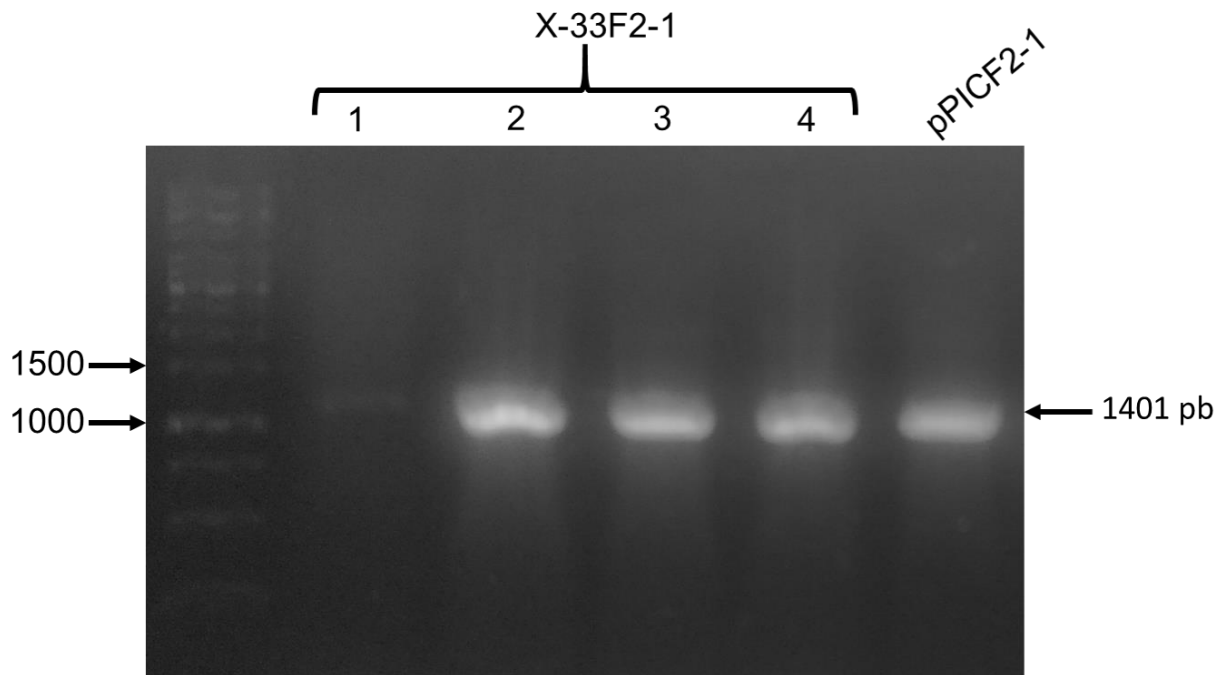


Figura 35. PCR del ADN cromosómico de clonas de *P. pastoris* X-33 transformadas con pPICZ-F2-1 y resistente a zeocina. Carril 1) Marcador de peso molecular, carril 2-5) clonas resistentes a zeocina, Carril 6) testigo positivo

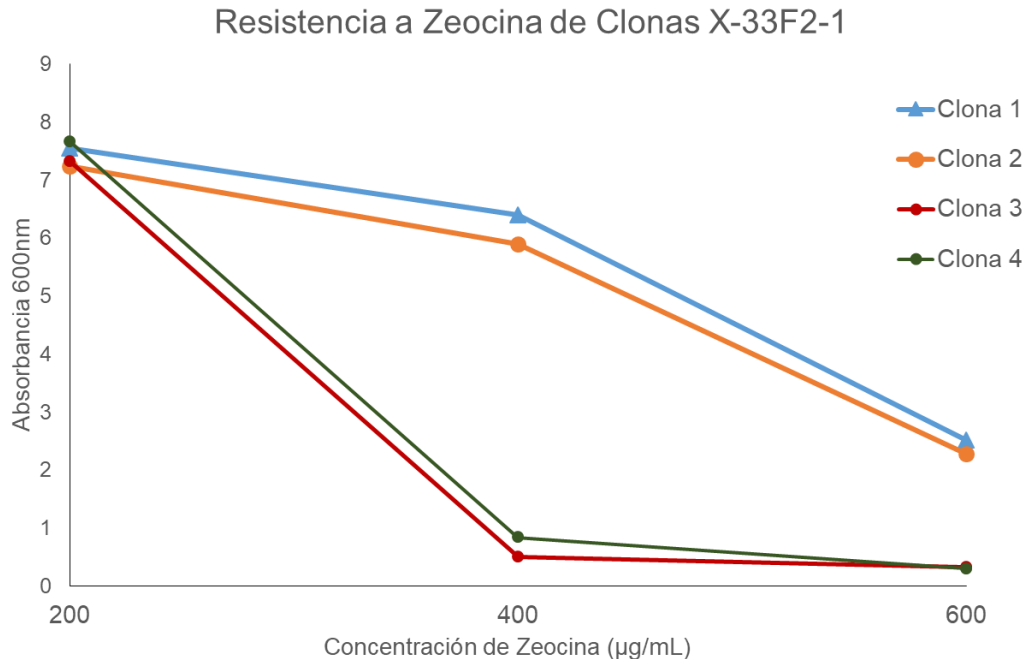


Figura 36. Selección de clonas positivas a F2-1 con diferentes concentraciones de zeocina

Las clonas 1 y 2 crecen en todas las concentraciones analizadas, en cambio, las clonas 3 y 4 crecen en la concentración de 200 µg/ml (Figura 36). Este resultado sugiere que las clonas 1 y 2 pudiesen tener más de una copia dentro de su genoma. Por lo que se seleccionaron para su caracterización fenotípica.

8.16. Determinación del fenotipo Mut de la clona X-33eF2-1

Debido a que la inserción de F2-1 en el cromosoma de *P. pastoris* es específica de secuencia y ocurre en el gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), se puede determinar la forma en la cual se insertó el gen (Figura 37). El gen se puede insertar de dos maneras: desplazando (Mut+) o sustituyendo AOX1 (MutS). Es importante determinar el fenotipo Mut porque establece la forma en la que se va a realizar el crecimiento y expresión en la cepa productora de F2-1. Cepas con un fenotipo Mut+ pueden crecer en presencia de metanol debido a la presencia del gen AOX1, mientras con un fenotipo MutS el crecimiento se ve afectado en metanol debido a la ausencia de AOX1. El análisis del fenotipo se realiza mediante una PCR específica amplificando el gen AOX1, en donde un fenotipo Mut+ presenta dos productos de PCR (gen AOX1 y gen F2-1) y un fenotipo MutS presenta solamente un producto (gen F2-1) (figura 37).

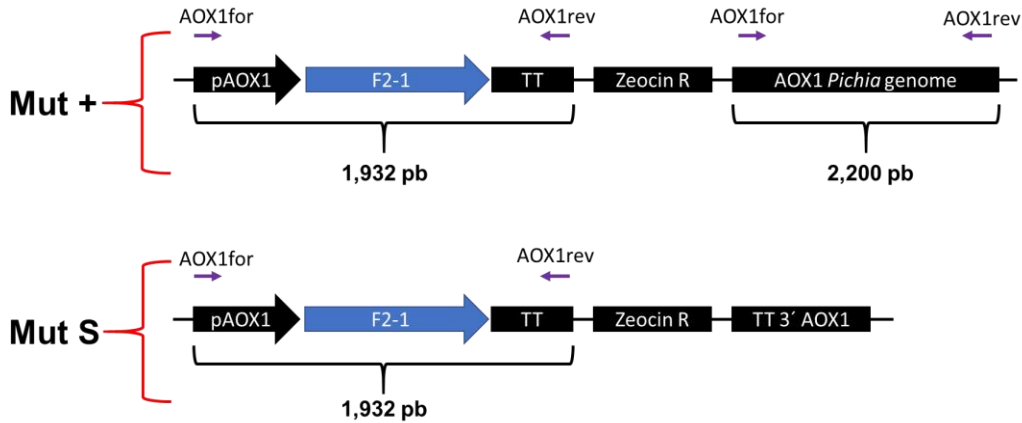


Figura 37. Representación de las posibles integraciones de eF1 en el genoma de *P. pastoris* (Modificado del manual de Invitrogen)

En la figura 38 se muestra la PCR del cromosoma de las cepas seleccionadas con diferentes concentraciones de zeocina (Figura 36) y denominadas como X-33eF2-1 (1 y 2), para ello se emplearon oligonucleótidos comerciales dirigidos hacia las regiones reguladoras 5' y 3' del gen AOX1.

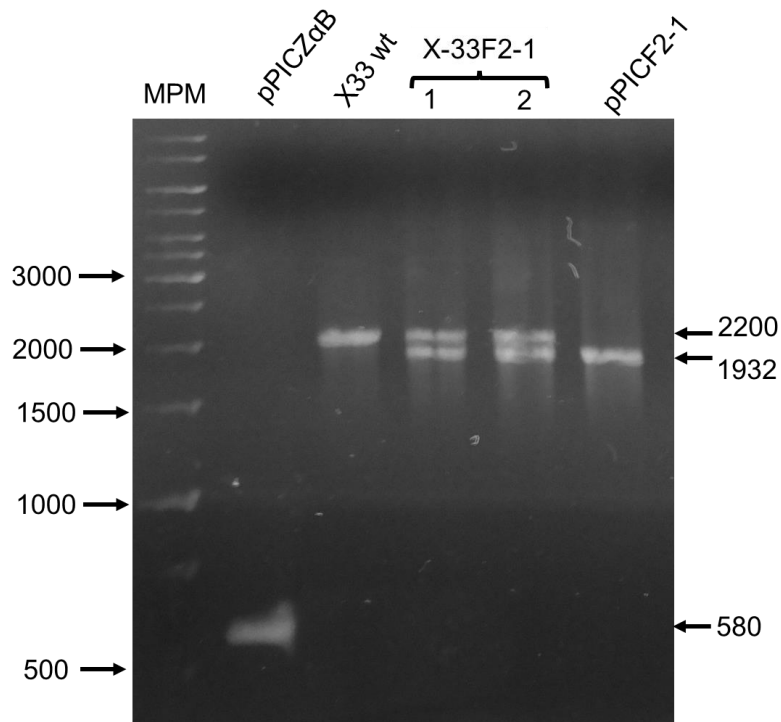


Figura 38. Determinación de fenotipo Mut+ mediante PCR de AOX1 de *P. pastoris* X-33eF2-1. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 pPICZαB, carril 3 X-33wt, carril 4 X-33eF2-1 (clona 1), carril 5 X-33eF2-1 (clona 2), carril 6 pPICZ-F2-1

Se empleo como testigo la cepa X-33wt (cepa sin transformar), en donde el producto de PCR obtenido fue de ~2,200 pb. El tamaño concuerda con el reportado en el manual de Invitrogen para el gen de AOX1; también se empleó el vector vacío pPICZ α B (testigo de vector sin inserto), en donde el producto de PCR obtenido fue una banda de ~580 pb, la cual ha sido reportada por la casa comercial Invitrogen; como testigo positivo para eF2-1 se empleó el vector de transformación pPICZ-F2-1, dando un producto esperado de 1,932 pb que corresponde a la región F2-1 flanqueada por los reguladores 5' y 3' del gen AOX1. Para ambas cepas X-33F2-1 (1 y 2) se obtuvieron dos productos de PCR (2,200 y 1,932 pb), las cuales representan el gen AOX1 y el gen F2-1. Esto significa que la inserción de F2-1 dentro del genoma fue por desplazamiento y el fenotipo es Mut+. Por lo que ambas cepas seleccionadas pueden crecer en metanol y expresar la proteína F2-1 desde que se inicia el cultivo. Se han relacionado dos factores principales que afectan la producción de una proteína recombinante en *Pichia*, el primero es la cantidad de copias del gen de interés en el genoma, hay que considerar que estas clonas crecen en concentraciones elevadas de zeocina (figura 36) posiblemente por una múltiple integración genética. El segundo factor es como se asimila el metanol por la célula transformada y se ha reportado para la expresión de la β -galactosidasa que un fenotipo Mut+ presenta hasta 5 veces más producción de proteína recombinante que un fenotipo MutS [108].

8.17. Producción de eF2-1 en la cepa *P. pastoris* X-33eF2-1+

Para producir el ectodominio F2-1 se empleó la cepa X-33eF2-1+ y la metodología fue la descrita en el manual de Invitrogen para una cepa con fenotipo Mut+. La cepa se crece en un medio BMGY hasta alcanzar una D.O. de 3-4 a 600 nm. Se transfirió a un medio complejo + 1% metanol (BMMY). Analizando 40 ml del cultivo los días 2, 4, 6 y 8. El peso molecular de la proteína eF2-1 con las etiquetas cmyc y polihistidinas fue de 53.5 kDa. En la figura 39a se muestra un PAGE-SDS de las proteínas (10 μ g) presentes en el medio libre de células. Como se puede apreciar en el gel, se encuentra una banda a la altura de 53.5 kDa, posiblemente eF2-1.

La identificación de eF2-1 se realizó mediante Western blot empleando dos anticuerpos diferentes que reconocen las dos etiquetas (figura 39b y 39c). Como testigo

se empleó medio libre de células de una cepa de *P. pastoris* transformada con el vector pPICZ sin inserto, en donde no se detecta ninguna banda. La inmunodetección corroboró que la proteína recombinante se secreta al medio libre de células desde el día 2 ya que se pudo detectar la presencia de una banda a la altura de 53.5 kDa. La cantidad de proteína aumenta los días 4, 6 y 8. Este resultado permite concluir que la máxima producción de eF2-1 se da el día 8. En el Western blot además se pudo detectar otra proteína a la altura de 43.5 kDa, posiblemente F1. Esto es posible debido a que la proteína F2-1 se compone de dos péptidos (F2 (10kDa) y F1 (43.5)), los cuales se encuentran unidos por enlaces disulfuro.

Las condiciones reductoras en el PAGE-SDS pueden generar la ruptura de estos enlaces disulfuro, debido a que la proteína F2-1 contiene las etiquetas en el extremo carboxilo se puede detectar F1, pero no F2. En el PAGE-SDS tampoco se pudo apreciar a F2 (10 kDa). Este comportamiento de la proteína F ya había sido reportado para RVP en donde mediante marcaje radioactivo detecta la presencia de F0 y F1 bajo condiciones desnaturizantes [3].

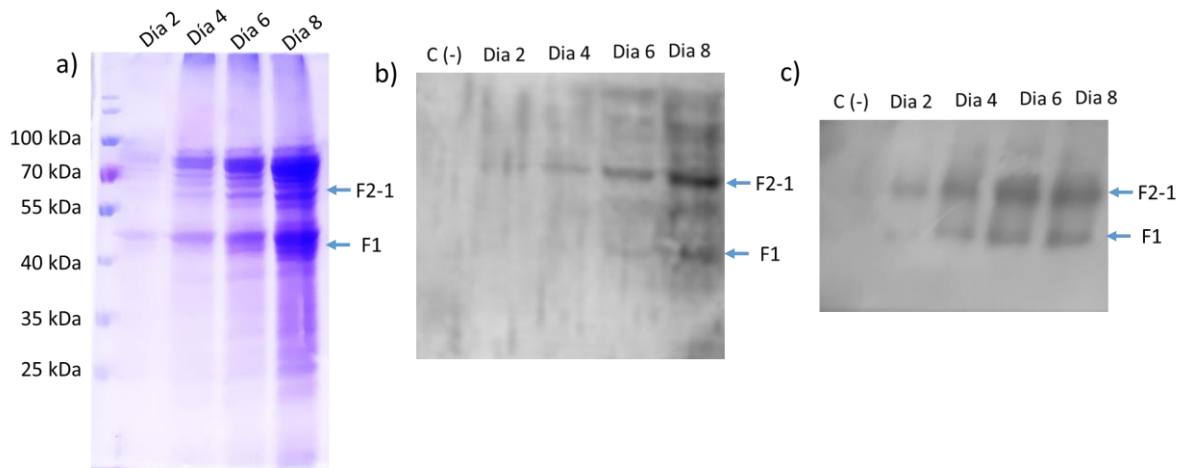


Figura 39. Expresión de eF2-1 en medio extracelular a) PAGE-SDS de las proteínas del medio libre de células durante la producción de eF2-1 b) Western blot de la proteína eF2-1 empleando anti-His (C(-) X-33(pPICZ), Carriles 2-5 (Días 2,4,6,y 8 de expresión respectivamente). c) Western blot de la proteína eF2-1 empleando anti-cMyc (C(-) X-33(pPICZ), Carriles 2-5 (Días 2,4,6,y 8 de expresión respectivamente).

8.18. Detección de eF2-1 por sueros de cerdos infectados

Se realizó la inmunodetección de la proteína eF2-1 con sueros de cerdos infectados de manera experimental (proporcionados por el Dr. Francisco Rivera Benítez, INIFAP). Se emplearon sueros de cerdos no infectados (testigo) y de cerdos infectados por 6 distintas cepas (PAC1, LPMV, PAC3, PAC4, Qro/93/2013, Mich/147/2013). En la figura 40a se puede apreciar que en el suero testigo no existe el reconocimiento de proteínas. En la figura 40b el suero de cerdo infectado con la cepa PAC1 reconoce una proteína a la altura de 53.5 kDa, peso de la proteína eF2-1, aunque como se aprecia, también se reconoce a la proteína de 43.5 kDa. Los resultados fueron similares en las cepas LPMV, PAC4 y Mich/147/2013. En los sueros de cerdos infectados por las cepas Qro/93/2013 y PAC3, el reconocimiento de la proteína eF2-1 es débil. En todos los sueros también se empleó como testigo negativo de expresión, medio libre de células de una cepa transformada con el vector pPICzαB vacío. No se presentó reconocimiento de ninguna proteína en todos los sueros.

Este resultado es importante, porque corrobora los resultados obtenidos en este trabajo para la variante eF1. Además, el reconocimiento de dos bandas a la altura de 53.5 y 43.5 kDa confirma que la proteína eF2-1 ha sido degradada en los péptidos F2 y F1 por las condiciones reductoras del PAGE-SDS, es decir, se rompió el puente disulfuro que los une, aunque parcialmente ya que se sigue observando tanto eF2-1 como F1.

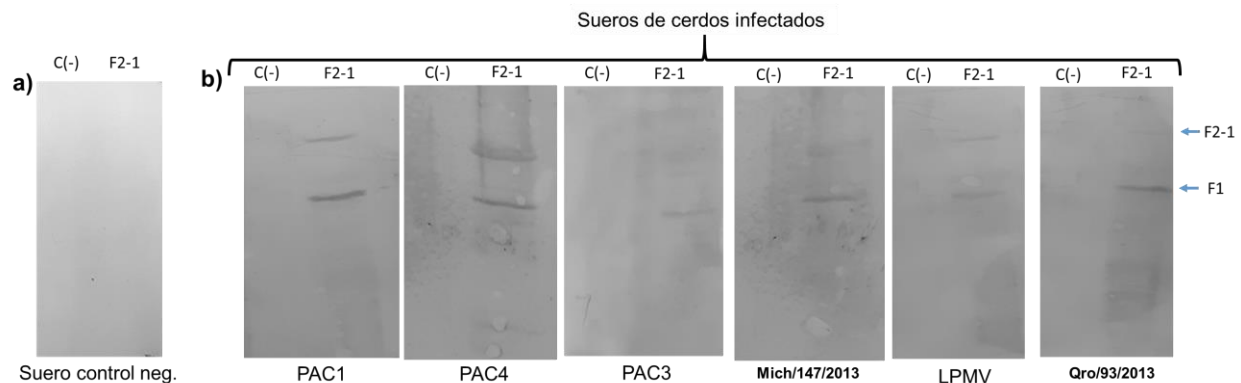


Figura 40. Inmunodetección de la proteína eF2-1. Reconocimiento con sueros de cerdos infectados con RVP mediante Western blot. a) Sueros de cerdo testigo no infectados. b) Suero de cerdos infectados.

8.19. Purificación de eF2-1 mediante Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

Se realizó una precipitación diferencial del medio libre de células con sulfato de amonio al 80% de saturación. El medio libre de células se concentró 10 veces y se procedió a purificar mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. En la figura 41a se muestra el cromatograma de la purificación de eF2-1. Donde la región de muestra/no pegado son todas las proteínas que no tienen interacción con el níquel (Volumen de elución: 1-6 ml). El lavado es la fracción de proteínas que no tienen afinidad por el níquel, pero que no eluyeron en el no pegado. En esta fracción se puede observar que la columna regresa al equilibrio, ya que la absorbancia es prácticamente cero al final de los lavados (volumen de elución: 7-22 ml). Las proteínas con afinidad por el níquel se eluyeron con 300 mM de imidazol (volumen de elución: 23-32 ml). En la figura 41b se muestra el corrimiento de SDS-PAGE de cada una de las fracciones, se aprecia que las fracciones de NP y L se elimina parte de la proteína recombinante, además la fracción de elución presenta tres proteínas principalmente, dos correspondientes a eF2-1 y a F1, una tercera de alrededor de 70 kDa contaminante. Como se aprecia en la fracción de lavado del cromatograma, la columna no llega a un equilibrio, lo que genera la presencia de proteínas contaminantes. Será necesario realizar modificaciones al procedimiento para encontrar las condiciones óptimas de purificación.

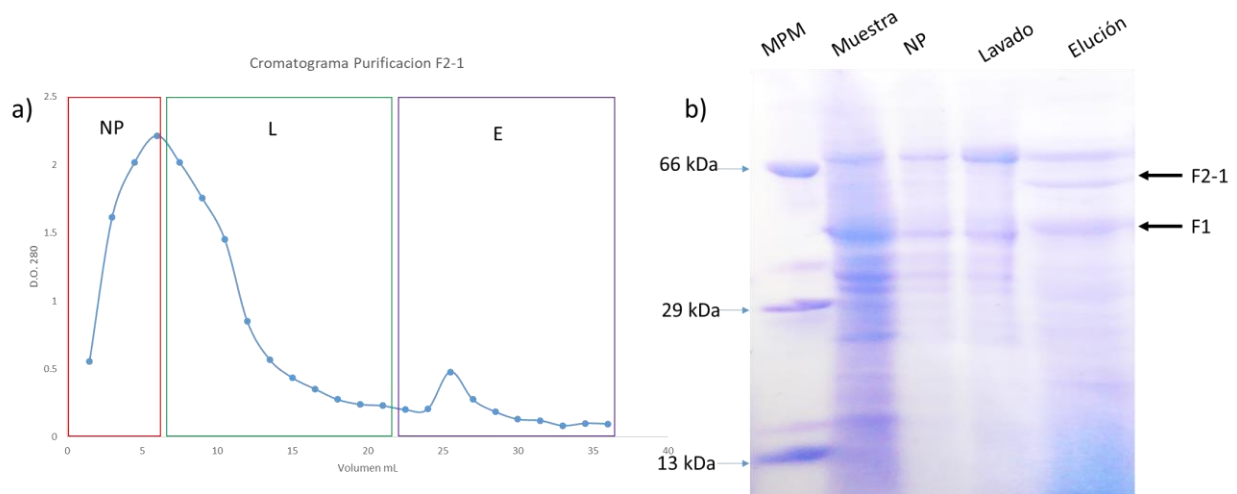


Figura 41. Perfil de elución del proceso de purificación de eF2-1. a) Cromatograma de fracciones recolectadas. b) SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación.

Este resultado no es definitivo, ya que no se han conseguido las condiciones más favorables para la purificación de eF2-1, además de que los resultados en la purificación, sugieren que el producto final sería una mezcla de eF2-1 y eF1, aunque para ello se requiere de un corrimiento de proteínas en condiciones no reductoras para corroborarlo. Se requieren de más ensayos para determinar si es emplear este tipo de muestras en posteriores análisis, ya que con los resultados no se puede asegurar la composición exacta de la mezcla y por ende no se podrían dar resultados precisos sobre la capacidad antigénica de eF2-1.

9. CONCLUSIONES

En el trabajo fue posible obtener y secuenciar el ORF de la proteína F cepa PAC1 de *Rubulavirus porcino*. Los análisis filogenéticos muestran que son pocas las mutaciones acumuladas dentro del ORF de la proteína F desde las primeras cepas en los años 80s y las recientes.

El análisis de determinantes antigénicos de la proteína F y HN muestran que en la proteína F son más conservados que los de HN. Esto permite pensar que los epítomos de la proteína F pueden ser los mismos en todas las cepas de RVP. Los análisis de inmunoinformática son de gran utilidad para el diseño de nuevas vacunas debido a su precisión.

Se obtuvieron dos cepas productoras de *Pichia pastoris* de dos variantes de la proteína F (eF1 y eF2-1), ambas presentaron un fenotipo Mut+ las cuales son capaces de crecer en presencia de metanol.

Las proteínas recombinantes eF1 y eF2-1 fueron producidas en forma soluble presentes en medio libre de células y se pudieron detectar mediante Western blot desde el día 1 de expresión.

Ambas proteínas fueron reconocidas por sueros de cerdos infectados con diferentes cepas de RVP. Siendo este el primer reporte de la presencia de anticuerpos específicos que reconocen la proteína F de RVP, en su forma recombinante.

Al ser reconocida la proteína F por sueros de diferentes cepas fortalece más la idea de que los determinantes antigénicos en la proteína F son conservados y se mantienen en todas las cepas.

La proteína eF1 logró ser purificada mediante IMAC empleando un solo paso de purificación, lo que disminuye costos en la obtención de la proteína recombinante. Se obtuvo rendimiento de 120 µg de proteína por cada 100 ml de cultivo.

La proteína eF2-1 no pudo ser purificada en un solo paso, por lo que como perspectiva sería optimizar el método de purificación.

El antígeno eF1 puede ser un buen candidato para realizar análisis de inmunogenicidad en cerdos con el objetivo de determinar si puede funcionar como un buen antígeno para incorporarlo a una vacuna o en algún método de detección rápido de RVP, esto debido a que fue reconocido por sueros de cerdos infectados por diversas cepas de RVP.

10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Las perspectivas sobre el proyecto en el desarrollo de posible vacunas o métodos de diagnóstico para RVP son:

- El obtener la proteína eF1 pura en grandes cantidades (~50 mg) para realizar ensayos en cerdos empleando la proteína eF1 con el objetivo de determinar si es capaz de inducir a la formación de anticuerpos en el organismo de interés (cerdo).
- El obtener la proteína eHN pura en grandes cantidades (~50 mg) empleando la metodología descrita por Cerriteño-Sanchez *et al.*, 2016 para realizar ensayos en cerdos empleando esta proteína con antígeno, con el objetivo de determinar la capacidad de inducción de la respuesta inmune específica contra RVP directamente en el organismo de interés.
- Realizar combinaciones eF1-eHN para determinar si existe un efecto sinérgico en la respuesta inmune en cerdos empleando ambos antígenos.
- Se debe probar la eficacia de los anticuerpos que pueden producirse en los cerdos empleando a las proteínas eHN y eF1, esto mediante la inoculación de lechones con cada antígeno respectivamente y retando al lechón con una cepa de RVP, en donde se puede analizar la presencia de signos clínicos, histopatología o carga viral mediante qRT-PCR, con la finalidad de determinar si los anticuerpos específicos anti-eHN y anti-eF1 inhiben y disminuyen la infección por RVP.
- Se propone también el buscar condiciones que permitan purificar a la proteína eF2-1 para poder ser empleada como posible antígeno a valorar.
- Probar los determinantes antigénicos predichos por las herramientas inmunoinformáticas mediante la síntesis de los péptidos o el diseño de una proteína quimérica que contenga los determinantes antigénicos de la proteína HN y F.

11. REFERENCIAS

1. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of virology*. 1986;91(3):221-31. doi: 10.1007/BF01314282.
2. Stephano H, Gay G, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *The Veterinary record*. 1988;122 (1): 6-10.
3. Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal of General Virology*. 1990;71(3):609-13. doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-3-609>.
4. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magana ML, Dueñas SH. Experimental Infection of Swine and Cat Central Nervous Systems by the Pig Paramyxovirus of the Blue Eye Disease. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1997;44(1-10):461-76. doi: 10.1111/j.1439-0450.1997.tb00997.x.
5. Rivera-Benítez JF, García-Contreras AdC, Reyes-Leyva J, Hernández J, Sánchez-Betancourt JI, Ramírez-Mendoza H. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Archives of virology*. 2013;158(9):1849-56. doi: 10.1007/s00705-013-1672-0.
6. Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon WG, Duprex P, Easton A, Fouchier R, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J Gen Virol*. 2019;100(12):1593-4. Epub 2019/10/15. doi: 10.1099/jgv.0.001328. PubMed PMID: 31609197; PubMed Central PMCID: PMCPMC7273325.
7. Cuevas-Romero JS, Blomström A-L, Berg M. Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015;5:29602-. doi: 10.3402/iee.v5.29602. PubMed PMID: 26584829.

8. Paniagua-Buelnas NA. Estudio de la variación genética y antigenética del virus del síndrome del ojo azul (VSOA). Tesis de doctorado CINVESTAV, IPN. 2011;México D.F.
9. Reyes-Leyva J, Santos-López G, Hernández J, Espinosa B, Borraz-Argüello M, Ramirez-Mendoza H, et al. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje Bioquímico*. 2002;XXVI:99-125.
10. Sánchez-Betancourt JI, Trujillo ME, Mendoza SE, Reyes-Leyva J, Alonso RA. Genetic and antigenic changes in porcine rubulavirus. *Can J Vet Res*. 2012;76(1):33-7. PubMed PMID: 22754092.
11. García-Barrera AA, Del Valle A, Montañó-Hirose JA, Barrón BL, Salinas-Trujano J, Torres-Flores J. Full-genome sequencing and phylogenetic analysis of four neurovirulent Mexican isolates of porcine rubulavirus. *Archives of virology*. 2017;162(6):1765-8. doi: 10.1007/s00705-017-3267-7.
12. Hernández-Jáuregui P, Ramírez Mendoza H, Mercado García C, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental Porcine Rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) Infection in Pregnant Gilts. *Journal of Comparative Pathology*. 2004;130(1):1-6. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00058-6).
13. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology*. 1997;117(3):237-52. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80018-7).
14. Rivera-Benítez JF, Rosas-Estrada K, Pulido-Camarillo E, de la Peña-Moctezuma A, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza H. Serological Survey of Veterinarians to Assess the Zoonotic Potential of Three Emerging Swine Diseases in Mexico. *Zoonoses and Public Health*. 2014;61(2):131-7. doi: 10.1111/zph.12055.
15. Herrera J, Gómez-Núñez L, Lara-Romero R, Diosdado F, Martínez-Lara A, Jasso M, et al. Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Res*. 2017;230:50-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.010>.

16. Rivera-Benítez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, García-Contreras AdC, Reyes-Leyva J, Hernández J, et al. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary Microbiology*. 2013;162(2):491-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.037>.
17. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. *Paramyxoviruses: Diseases of Swine* 2019.
18. Ramirez MH, Carreon NR, Mercado García C. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Veterinaria Mexico*. 1996;27:257-9.
19. Cuevas-Romero S, Blomström A-L, Alvarado A, Hernández-Jauregui P, Rivera-Benitez F, Ramírez-Mendoza H, et al. Development of a real-time RT-PCR method for detection of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV). *Journal of Virological Methods*. 2013;189(1):1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.12.009>.
20. Cuevas-Romero S, Hernández-Baumgarten E, Kennedy S, Hernández-Jáuregui P, Berg M, Moreno-López J. Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: The detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Res*. 2014;188:155-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.012>.
21. Campos, Carbajal. Citado por Sánchez-Betancourt, J.I., Trujillo, M.E., Mendoza, S., Reyes-Leyva, J. (2020). *Biología molecular del rubulavirus porcino: Enfermedad del ojo azul. Los Porcicultores y su Entono*. 1992.
22. Escobar-López AC, Rivera-Benitez JF, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt JI. Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2012;59(5):416-20. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01286.x.
23. Wang LF, Hansson E, Yu M, Chua KB, Mathe N, Crameri G, et al. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in

- the Americas. *Archives of virology*. 2007;152(7):1259-71. Epub 2007/03/27. doi: 10.1007/s00705-007-0959-4. PubMed PMID: 17385069; PubMed Central PMCID: PMC7086891.
24. Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz MadL, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setién A. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98(10):577-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.10.019>.
 25. Hernández-Jáuregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, et al. Uptake of Porcine Rubulavirus (LPMV) by PK-15 Cells. *Archives of Medical Research*. 2001;32(5):400-9. doi: [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00314-9).
 26. Linné T, Berg M, Bergvall A-C, Hjertner B, Moreno-López J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*. 1992;33(1):263-73. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90054-W](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90054-W).
 27. Kolakofsky D. Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology*. 2016;498:94-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.018>.
 28. Svenda M, Berg M, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res*. 1997;48(1):57-70. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01426-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01426-8).
 29. Bloyet LM, Schramm A, Lazert C, Raynal B, Hologne M, Walker O, et al. Regulation of measles virus gene expression by P protein coiled-coil properties. *Science advances*. 2019;5(5):eaaw3702. Epub 2019/05/16. doi: 10.1126/sciadv.aaw3702. PubMed PMID: 31086822; PubMed Central PMCID: PMC6506246.
 30. Fuentes SM, Sun D, Schmitt AP, He B. Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. *Future Microbiol*. 2010;5(1):9-13. doi: 10.2217/fmb.09.93. PubMed PMID: 20020826.

31. Cox RM, Krumm SA, Thakkar VD, Sohn M, Plemper RK. The structurally disordered paramyxovirus nucleocapsid protein tail domain is a regulator of the mRNA transcription gradient. 2017;3(2):e1602350. doi: 10.1126/sciadv.1602350 %J Science Advances.
32. Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(9):1416-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.005>.
33. Waning DL, Schmitt AP, Leser GP, Lamb RA. Roles for the Cytoplasmic Tails of the Fusion and Hemagglutinin-Neuraminidase Proteins in Budding of the Paramyxovirus Simian Virus 5. 2002;76(18):9284-97. doi: 10.1128/JVI.76.18.9284-9297.2002 %J Journal of Virology.
34. Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A. Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cellular microbiology*. 2007;9(5):1203-14. Epub 2007/01/16. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00860.x. PubMed PMID: 17217427.
35. Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Archives of virology*. 1992;122(3):331-40. doi: 10.1007/BF01317194.
36. Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (α 2,3) lactose-containing structures. *Archives of virology*. 1993;133(1):195-200. doi: 10.1007/BF01309755.
37. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000;126(3):415-24. doi: 10.1016/s0305-0491(00)00213-3. PubMed PMID: 11007184.

38. Sundqvist A, Bergvall A-C, Moreno-Lopez J, Berg M, Linne´ T. Analysis of the Fusion Protein Gene of the Porcine Rubulavirus LPMV: Comparative Analysis of Paramyxovirus F Proteins. *Virus Genes*. 1997;14(1):55-61. doi: 10.1023/A:1007987407250.
39. Aggarwal M, Plemper RK. Structural Insight into Paramyxovirus and Pneumovirus Entry Inhibition. *2020*;12(3):342. PubMed PMID: doi:10.3390/v12030342.
40. Yin H-S, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*. 2006;439(7072):38-44. doi: 10.1038/nature04322.
41. Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello MT, Ramírez -Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Archivos de medicina veterinaria*. 2004;36:119-36.
42. Pisanelli G, Laurent-Rolle M, Manicassamy B, Belicha-Villanueva A, Morrison J, Lozano-Dubernard B, et al. La Piedad Michoacán Mexico Virus V protein antagonizes type I interferon response by binding STAT2 protein and preventing STATs nuclear translocation. *Virus Res*. 2016;213:11-22. Epub 11/03. doi: 10.1016/j.virusres.2015.10.027. PubMed PMID: 26546155.
43. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998;64(4):367-81. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00169-X).
44. Cuevas JS, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009;127(1):148-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.008>.
45. Rodríguez-Ropón A, Hernández-Jauregui P, Sánchez-Torres L, Favila-Castillo L, Estrada-Parra S, Moreno-López J, et al. Apoptosis in Lymph Nodes and Changes in Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Pigs Infected with Porcine

- Rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology*. 2003;128(1):1-8. doi: <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0598>.
46. Cuevas-Romero JS, Rivera-Benítez JF, Hernández-Baumgarten E, Hernández-Jaúregui P, Vega M, Blomström A-L, et al. Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of Porcine rubulavirus. *Protein Expression and Purification*. 2016;128:1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.08.002>.
47. Cerriteño-Sánchez JL, Santos-López G, Rosas-Murrieta NH, Reyes-Leyva J, Cuevas-Romero S, Herrera-Camacho I. Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of Porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. 2016;223:52-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.035>.
48. Merz DC, Scheid A, Choppin PW. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 1980;151(2):275. doi: 10.1084/jem.151.2.275.
49. Kang X, Wang J, Jiao Y, Tang P, Song L, Xiong D, et al. Expression of recombinant Newcastle disease virus F protein in *Pichia pastoris* and its immunogenicity using flagellin as the adjuvant. *Protein Expr Purif*. 2016;128:73-80. Epub 2016/08/23. doi: 10.1016/j.pep.2016.08.009. PubMed PMID: 27546452.
50. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 1993;11(8):905-10. doi: 10.1038/nbt0893-905.
51. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000;24(1):45-66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x %J FEMS Microbiology Reviews.
52. Slibinskas R, Zvirbliene A, Gedvilaite A, Samuel D, Jin L, Beard S, et al. Synthesis of mumps virus nucleocapsid protein in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*. 2003;103(1):43-9. doi: 10.1016/s0168-1656(03)00068-3. PubMed PMID: 12770503.

53. Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Staniulis J, Sasnauskas K. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 2004;107(2):115-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.018>.
54. Batra G, Raut R, Dahiya S, Kamran N, Swaminathan S, Khanna N. *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. *Journal of Virological Methods*. 2010;167(1):10-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.002>.
55. Khan S, Khan A, Rehman AU, Ahmad I, Ullah S, Khan AA, et al. Immunoinformatics and structural vaccinology driven prediction of multi-epitope vaccine against Mayaro virus and validation through in-silico expression. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;73:390-400. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.06.006>.
56. Kim S-J, Nguyen V-G, Park Y-H, Park B-K, Chung H-C. A Novel Synonymous Mutation of SARS-CoV-2: Is This Possible to Affect Their Antigenicity and Immunogenicity? 2020;8(2):220. PubMed PMID: doi:10.3390/vaccines8020220.
57. Tomar DN, De R. Immunoinformatics: A Brief Review. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1184:23-55. doi: 10.1007/978-1-4939-1115-8_3.
58. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003;12(5):1007-17. Epub 2003/04/30. doi: 10.1110/ps.0239403. PubMed PMID: 12717023; PubMed Central PMCID: PMC2323871.
59. Oli AN, Obialor WO, Ifeanyichukwu MO, Odimegwu DC, Okoyeh JN, Emechebe GO, et al. Immunoinformatics and Vaccine Development: An Overview. *Immunotargets Ther*. 2020;9:13-30. doi: 10.2147/ITT.S241064. PubMed PMID: 32161726.
60. J.F S, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*2001.

61. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054.
62. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*. 2019;37(4):420-3. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z.
63. Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *2004*;46:203-6.
64. Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*. 2017;46(D1):D493-D6. doi: 10.1093/nar/gkx922.
65. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:4-. doi: 10.1186/1471-2105-8-4. PubMed PMID: 17207271.
66. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006;2:2-. doi: 10.1186/1745-7580-2-2. PubMed PMID: 16635264.
67. Chou PY, Fasman GD. Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1978. p. 45-148.
68. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *1985*;55(3):836-9.
69. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *1990*;276(1-2):172-4. doi: 10.1016/0014-5793(90)80535-q.
70. Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues

- with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 1986;25(19):5425-32. doi: 10.1021/bi00367a013.
71. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015;10:845. doi: 10.1038/nprot.2015.053.
 72. Ponomarenko J, Bui H-H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:514-. doi: 10.1186/1471-2105-9-514. PubMed PMID: 19055730.
 73. Jurtz V, Paul S, Andreatta M, Marcatili P, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J Immunol*. 2017;199(9):3360-8. Epub 10/04. doi: 10.4049/jimmunol.1700893. PubMed PMID: 28978689.
 74. Sørensen MR, Ilsøe M, Strube ML, Bishop R, Erbs G, Hartmann SB, et al. Sequence-Based Genotyping of Expressed Swine Leukocyte Antigen Class I Alleles by Next-Generation Sequencing Reveal Novel Swine Leukocyte Antigen Class I Haplotypes and Alleles in Belgian, Danish, and Kenyan Fattening Pigs and Göttingen Minipigs. *Front Immunol*. 2017;8:701-. doi: 10.3389/fimmu.2017.00701. PubMed PMID: 28670315.
 75. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Open Source Drug Discovery C, et al. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One*. 2013;8(9):e73957. doi: 10.1371/journal.pone.0073957.
 76. Zhang N, Qi J, Feng S, Gao F, Liu J, Pan X, et al. Crystal Structure of Swine Major Histocompatibility Complex Class I SLA-1*0401 and Identification of 2009 Pandemic Swine-Origin Influenza A H1N1 Virus Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Peptides. 2011;85(22):11709-24. doi: 10.1128/JVI.05040-11 %J *Journal of Virology*.
 77. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic*

- Acids Research. 2016;44(W1):W449-W54. doi: 10.1093/nar/gkw329 %J Nucleic Acids Research.
78. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61. doi: 10.1002/jcc.21334. PubMed PMID: 19499576.
79. Hoffman CS. Preparation of yeast DNA. *Current protocols in molecular biology.* 2001;Chapter 13:Unit13.1. Epub 2008/02/12. doi: 10.1002/0471142727.mb1311s39. PubMed PMID: 18265095.
80. Santos-López G, Borraz-Argüello MT, Márquez-Domínguez L, Flores-Alonso JC, Ramírez-Mendoza H, Priem B, et al. Neuraminidase activity of blue eye disease porcine rubulavirus: Specificity, affinity and inhibition studies. *Research in veterinary science.* 2017;114:218-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.008>.
81. S Rao B, Gupta K, Kumari S, Gupta A, Pujitha K. Conserved HIV Wide spectrum antipeptides – A hope for HIV Treatment. *Advanced Techniques in Biology & Medicine.* 2013. doi: 10.4172/2379-1764.1000102.
82. Idrees S, Ashfaq UA. Structural analysis and epitope prediction of HCV E1 protein isolated in Pakistan: an in-silico approach. *Virology Journal.* 2013;10(1):113. doi: 10.1186/1743-422X-10-113.
83. Šantak M, Örvell C, Gulija TK. Identification of conformational neutralization sites on the fusion protein of mumps virus. *Journal of General Virology.* 2015;96(5):982-90. doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000059>.
84. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, et al. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(49):19535. doi: 10.1073/pnas.0707830104.
85. Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet J-C, Roth JA, et al. Recombinant Nipah Virus Vaccines Protect Pigs against Challenge. *Journal of Virology.* 2006;80(16):7929. doi: 10.1128/JVI.00263-06.

86. Baruah V, Bose S. Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. 2020;92(5):495-500. doi: 10.1002/jmv.25698.
87. Zenteno-Cuevas R, Huerta-Yepez S, Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, González-Bonilla C, Ramírez-Mendoza H, et al. Identification of Potential B Cell Epitope Determinants by Computer Techniques, in Hemagglutinin–Neuraminidase from the Porcine Rubulavirus La Piedad Michoacan. *Viral Immunology*. 2007;20(2):250-60. doi: 10.1089/vim.2006.0066.
88. Denks K, Vogt A, Sachelaru I, Petriman NA, Kudva R, Koch HG. The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Molecular membrane biology*. 2014;31(2-3):58-84. Epub 2014/04/26. doi: 10.3109/09687688.2014.907455. PubMed PMID: 24762201.
89. Dowling W, Thompson E, Badger C, Mellquist JL, Garrison AR, Smith JM, et al. Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *Journal of virology*. 2007;81(4):1821-37. Epub 2006/12/06. doi: 10.1128/JVI.02098-06. PubMed PMID: 17151111.
90. Mukonyora M. A Review of Important Discontinuous B-Cell Epitope Prediction Tools. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 2015;06. doi: 10.4172/2155-9899.1000358.
91. Hasan M, Islam S, Chakraborty S, Mustafa AH, Azim KF, Joy ZF, et al. Contriving a chimeric polyvalent vaccine to prevent infections caused by herpes simplex virus (type-1 and type-2): an exploratory immunoinformatic approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020;38(10):2898-915. doi: 10.1080/07391102.2019.1647286.
92. Dewi SK, Ali S, Prasasty VD. Broad Spectrum Peptide Vaccine Design Against Hepatitis C Virus. *Current Computer - Aided Drug Design*. 2019;15(2):120-35. doi: 10.2174/1573409914666181003151222.
93. Pedersen LE, Harndahl M, Rasmussen M, Lamberth K, Golde WT, Lund O, et al. Porcine major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and analysis of their peptide-

- binding specificities. *Immunogenetics*. 2011;63(12):821-34. Epub 07/08. doi: 10.1007/s00251-011-0555-3. PubMed PMID: 21739336.
94. Zheng J, Lin X, Wang X, Zheng L, Lan S, Jin S, et al. In Silico Analysis of Epitope-Based Vaccine Candidates against Hepatitis B Virus Polymerase Protein. *Viruses*. 2017;9(5):112. doi: 10.3390/v9050112. PubMed PMID: 28509875.
95. Adhikari UK, Tayebi M, Rahman MM. Immunoinformatics Approach for Epitope-Based Peptide Vaccine Design and Active Site Prediction against Polyprotein of Emerging Oropouche Virus. *J Immunol Res*. 2018;2018:6718083-. doi: 10.1155/2018/6718083. PubMed PMID: 30402510.
96. Chauhan V, Goyal K, Singh MP. Identification of broadly reactive epitopes targeting major glycoproteins of Herpes simplex virus (HSV) 1 and 2 - An immunoinformatics analysis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018;61:24-35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.004>.
97. Hasan A, Hossain M, Alam J. A Computational Assay to Design an Epitope-Based Peptide Vaccine against Saint Louis Encephalitis Virus. 2013;7:BBI.S13402. doi: 10.4137/bbi.S13402.
98. Khan MA, Hossain MU, Rakib-Uz-Zaman SM, Morshed MN. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Ebola viruses: an immunoinformatics study. *Scandinavian journal of immunology*. 2015;82(1):25-34. Epub 2015/04/11. doi: 10.1111/sji.12302. PubMed PMID: 25857850; PubMed Central PMCID: PMC7169600.
99. Usman Mirza M, Rafique S, Ali A, Munir M, Ikram N, Manan A, et al. Towards peptide vaccines against Zika virus: Immunoinformatics combined with molecular dynamics simulations to predict antigenic epitopes of Zika viral proteins. *Scientific Reports*. 2016;6(1):37313. doi: 10.1038/srep37313.

100. Kar T, Narsaria U, Basak S, Deb D, Castiglione F, Mueller DM, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10895. doi: 10.1038/s41598-020-67749-1.
101. Kim SJ, Lee JA, Kim YH, Song BK. Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2009;19(9):966-71. Epub 2009/10/08. doi: 10.4014/jmb.0901.018. PubMed PMID: 19809254.
102. Yu M, Wen S, Tan T. Enhancing production of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Pichia pastoris*. 2010;10(5):458-64. doi: 10.1002/elsc.200900102.
103. Vogl T, Gebbie L, Palfreyman RW, Speight R. Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;84(6):e02712-17. doi: 10.1128/AEM.02712-17.
104. Kastilan R, Boes A, Spiegel H, Voepel N, Chudobová I, Hellwig S, et al. Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*. 2017;7(1):11991. doi: 10.1038/s41598-017-11819-4.
105. Hu YC, Luo YL, Ji WT, Chulu JLC, Chang PC, Shieh H, et al. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. *Journal of Virological Methods*. 2006;135(1):43-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.023>.
106. Bisailon M, Bergeron J, Lemay G. Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus lambda1 protein. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(29):18298-303. Epub 1997/07/18. doi: 10.1074/jbc.272.29.18298. PubMed PMID: 9218469.
107. Peng Y-C, Acheson NH. Production of active polyomavirus large T antigen in yeast *Pichia pastoris*. *Virus Res*. 1997;49(1):41-7. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)01455-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)01455-X).

108. Singh A, Narang A. The Mut+ strain of Komagataella phaffii (*Pichia pastoris*) expresses PAOX1 5 and 10 times faster than Muts and Mut- strains: Evidence that formaldehyde or/and formate are true inducers of AOX. 2019:573519. doi: 10.1101/573519 %J bioRxiv.

APENDICE 12.1. TRABAJOS EN CONGRESOS





La Sociedad Mexicana de Virología y la Asociación Mexicana de Bioseguridad
otorgan la presente

CONSTANCIA

a *SIAÑEZ ESTRADA LUIS IGNACIO*, Rosas Murrieta Nora, Reyes Leyva Julio., Rivera Benítez Francisco, Santos López Gerardo, Herrera Camacho Irma .

por su valiosa exposición del trabajo libre en CARTEL intitulado

Expresion y purificacion del ectodominio de la proteína de fusión de un paramixovirus en la levadura pichia pastoris

presentado en el **XI CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA**

que tuvo lugar del 4 al 7 de septiembre de 2019 en los Espacios Magnos de la Universidad de Guanajuato.

Ciudad de Guanajuato, Guanajuato, México, a 7 de septiembre de 2019.

Dr. Ramón González García Conde
Presidente

Sociedad Mexicana de Virología AC
Folio: XICNV-C020



QFB Lissete Valenzuela Fabris
Presidenta

Asociación Mexicana de Bioseguridad AC

APENDICE 12.2. PUBLICACIONES

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of *Porcine rubulavirus*

Luis I. Síañez-Estrada^{1,2,3}, José F. Rivera-Benítez⁴, Nora H. Rosas-Murrieta¹, Julio Reyes-Leyva³, Gerardo Santos-López^{3*}, Irma Herrera-Camacho^{1*}

1 Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **2** Posgrado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **3** Laboratorio de Biología Molecular y Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Metepec, México, **4** Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Ciudad de México, México

* gerardo.santos.lopez@gmail.com (GSL); irma.herrera@correo.buap.mx (IHC)



OPEN ACCESS

Citation: Síañez-Estrada LI, Rivera-Benítez JF, Rosas-Murrieta NH, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Herrera-Camacho I (2020) Immunoinformatics approach for predicting epitopes in HN and F proteins of *Porcine rubulavirus*. PLoS ONE 15(9): e0239785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239785>

Editor: Heidi E. Drummer, Macfarlane Burnet Institute for Medical Research and Public Health, Australia, AUSTRALIA

Received: May 29, 2020

Accepted: September 14, 2020

Published: September 25, 2020

Copyright: © 2020 Síañez-Estrada et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: JFR-B and IH-C (FONSEC-SAGARPA-CONACYT 2017-06-292826) LIS-E and IH-C (Vicerrectory for Research and Postgraduate Studies [VIEP]).

Competing interests: NO authors have competing interests

Abstract

Porcine rubulavirus (PRV), which belongs to the family *Paramyxoviridae*, causes blue eye disease in pigs, characterized by encephalitis and reproductive failure in newborn and adult pigs, respectively. There is no effective treatment against PRV and no information on the effectiveness of the available vaccines. Continuous outbreaks have occurred in Mexico since the early 1980s, which have caused serious economic losses to pig producers. Vaccination can be used to control this disease. Searching for effective antigen candidates against PRV, we first sequenced the PAC1 F protein, then we used various immunoinformatics tools to predict antigenic determinants of B-cells and T-cells against the two glycoproteins of the virus (HN and F proteins). Finally, we used AutoDock Vina to determine the binding energies. We obtained the F gene sequence of a PRV strain collected in the early 1990s in Mexico and compared its amino acid profile with previous and more recent strains, obtaining an identity similarity of 97.78 to 99.26%. For the F proteins, seven linear B-cell epitopes, six conformational B-cell epitopes and twenty-nine T-cell MHC class I epitopes were predicted. For the HN proteins, sixteen linear B-cell epitopes, seven conformational B-cell epitopes and thirty-four T-cell MHC class I epitopes were predicted. The ATRSETDYY and AAYTTTTCF epitopes of the HN protein might be important for neutralizing the viral infection. We determined the *in silico* binding energy between the predicted epitopes on the F and HN proteins and swine MHC-I molecules. The binding energy of these epitopes ranged from -5.8 to -7.8 kcal/mol. The present study aimed to assess the use of HN and F proteins as antigens, either as recombinant proteins or as a series of peptides that could activate different responses of the immune system. This may help identify relevant immunogens, saving time and costs in the development of new vaccines or diagnostic tools.