



**BUAP**

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“PRODUCCIÓN DE UNA FORMA ENZIMÁTICA ACTIVA  
E INMUNOGÉNICA DEL ECTODOMINIO DE LA  
HEMAGLUTININA NEURAMINIDASA (eHN) DEL *Rubulavirus*  
*porcino* EN LA LEVADURA *Pichia pastoris*”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL  
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

M. en C. José Luis Cerriteño Sánchez

ASESORES:

Dra. Irma Herrera Camacho

Dr. Gerardo Santos López

Puebla, Puebla. Abril, 2016.

## AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS INSTITUCIONALES

La parte experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la BUAP, bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho y el Dr. Gerardo Santos López.

Los ensayos de sero-nuetralización y determinación de la actividad neuraminidasa se realizaron en el Laboratorio de Virología Molecular del CIBIOR-IMSS, Metepec.

La inmunización de ratones y los ensayos de ELISA con sueros infectados se realizaron en el Laboratorio de Virología del CENID-INIFAP, bajo la asesoría de la Dra. Sandra Julieta Cuevas Romero, a quien agradecemos su colaboración.

Un reconocimiento especial a la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta por su apoyo académico y técnico a lo largo del desarrollo de esta tesis.

**Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:**

- Programa de apoyo a Proyectos de Investigación. VIEP-BUAP.  
Proyectos: HECI-NAT 2012, 2013, 2014 y 2015.
- Redes Temáticas-PROMEP-SEP-BUAP. CA: Bioquímica y Biología Molecular.  
Proyecto: 2013-2014, 2014-2015 y 2015-2016.
- Apoyo por los animales proporcionados para la obtención de anticuerpos:  
VIEP-BUAP y Bioterio Claude Bernard, BUAP.

**Para la realización de este trabajo agradezco el apoyo en becas de:**

- Beca CONACYT (núm.: 231269) 2012-2015.
- Beca de término VIEP-BUAP, marzo-abril 2016.



**BUAP**

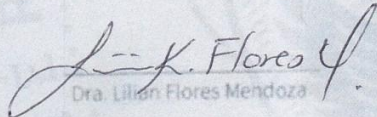
A QUIEN CORRESPONDA:

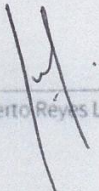
Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dra. Lilián Flores Mendoza, Dr. Julio Roberto Reyes Leyva, Dr. José Francisco Rivera Benitez y Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada "**Producción de una forma enzimática activa e inmunogénica del ectodominio de la hemaglutinina-neuraminidasa (eHN) del Rubulavirus porcino en la levadura Pichia pastoris**", que presenta el alumno **José Luis Cerriteño Sánchez** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

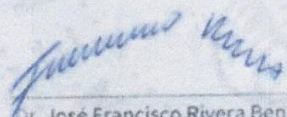
Se extiende la presente a los siete días del mes de abril del año dos mil dieciséis.

ATENTAMENTE

  
Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

  
Dra. Lilián Flores Mendoza

  
Dr. Julio Roberto Reyes Leyva

  
Dr. José Francisco Rivera Benitez

  
Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero

**60**  
AÑOS DE  
AUTONOMÍA  
UNIVERSITARIA

Posgrado en Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias Químicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 329 55 00 Ext. 7397  
posgrado.quimica@correo.buap.mx



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

# Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of *Porcine rubulavirus* hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*



José Luis Cerriteño-Sánchez<sup>a,b,c</sup>, Gerardo Santos-López<sup>c</sup>, Nora Hilda Rosas-Murrieta<sup>a</sup>, Julio Reyes-Leyva<sup>c</sup>, Sandra Cuevas-Romero<sup>d</sup>, Irma Herrera-Camacho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química del Instituto de Ciencias (ICUAP), Edificio 103F, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Químicas, Edificio FCQ10, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital General de Zona No. 5, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, Distrito Federal, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 October 2015

Received in revised form

23 December 2015

Accepted 26 February 2016

Available online 3 March 2016

## Keywords:

Hemagglutinin-neuraminidase

eHN

PoRV

Blue eye disease

## ABSTRACT

Blue-eye disease (BED) of swine is a viral disease endemic in Mexico. The etiological agent is a paramyxovirus classified as *Porcine rubulavirus* (PoRV-LPMV), which exhibits in its envelope the hemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein, the most immunogenic and a major target for vaccine development. We report in this study the obtaining of ectodomain of PoRV HN (eHN) through the *Pichia pastoris* expression system. The expression vector (pPICZαB-HN) was integrated by displacement into the yeast chromosome and resulted in a Mut<sup>+</sup> phenotype. Expressed eHN in the *P. pastoris* X33 strain was recovered from cell-free medium, featuring up to 67 nmol/min/mg after 6 days of expression. eHN was recognized by the serum of infected pigs with strains currently circulating in the Mexican Bajío region. eHN induces antibodies in mice after 28 days of immunization with specific recognition in ELISA test. These antibodies were able to inhibit >80% replication by viral neutralization assays in cell culture. These studies show the obtaining of a protein with similar characteristics to the native HN and which may be a candidate to propose a vaccine or to use the antigen in a serologic diagnostic test.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Blue eye disease (BED) of swine was detected in farms from La Piedad, Michoacan, Mexico in 1980 and spread to other Mexican states such as Guanajuato and Jalisco (Stephano et al., 1988; Stephano, 2000). The etiological agent is a paramyxovirus initially called La Piedad Michoacan Virus (LPMV) and subsequently classified as *Porcine rubulavirus* (PoRV) (Lamb et al., 2005), which causes a neurological, respiratory and reproductive syndrome accompanied by corneal opacity in 1–10% of cases (Moreno-López et al., 1986;

Stephano et al., 1988). BED generates economic losses caused by the high grade of neonatal mortality and infertility in adults.

Ramírez-Mendoza et al. (1997) conducted the virus isolation from several outbreaks with different pathological and clinical data. These isolates were referred to as Produccion Animal Cerdos 1 (PAC1), PAC2, PAC3, PAC4 and PAC5 (Ramírez-Mendoza et al., 1997; Reyes-Leyva et al., 2002). Recent studies indicate that, in the mid-western region of Mexico, one of the most important in the swine industry with a serological prevalence of PoRV between 9 and 23.7%, current circulating strains are antigenically different, suggesting that use of a vaccine with only one antigenic source may not be sufficient for disease control (Escobar-López et al., 2011). The presence of the virus in convalescent pigs that survived a natural infection was recently corroborated, which induces a durable humoral immune response. Transmission is possible to healthy pigs, demonstrating the importance of disease control and prevention (Cuevas-Romero et al., 2014).

\* Corresponding author at: Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química del Instituto de Ciencias (ICUAP), Edificio 103F, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico.

E-mail addresses: [irma.herrera@correo.buap.mx](mailto:irma.herrera@correo.buap.mx), [nora.rosas@correo.buap.mx](mailto:nora.rosas@correo.buap.mx) (I. Herrera-Camacho).



**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**  
 Dirección Divisinal de Patentes

OFICINA REGIONAL CENTRO

Solicitud: **MX/a/2015/011852**  
 Expediente: **8/SEP/2015** Hora: **18:18:28**  
 Fecha: **MX/E/2015/064354** 686017



Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:  
 Modelo Industrial  Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI.  
 Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s) <b>BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA / INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL</b>	
2) Nacionalidad (es): <b>MEXICANA</b>	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: <b>4 SUR 104, COL. CENTRO, C.P. 72000</b>	
Población, Estado y País: <b>PUEBLA, PUEBLA, MÉXICO</b>	
4) Teléfono (clave): ( 01 222 ) 229 55 00 Ext: 3058 5) Fax (clave): ( 01 222 ) 229 55 00 Ext: 5058	
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): <b>C. IRMA PILAR HERRERA CAMACHO; C. JOSÉ LUIS CERRITENO SÁNCHEZ; C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA; C. JULIO ROBERTO REYES LEYVA; C. GERARDO SANTOS LÓPEZ</b>	
7) Nacionalidad (es): <b>MEXICANA ; MEXICANA</b>	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, EDIF. 105H , CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 72570; CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ORIENTE, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, KM. 4.5 CARRETERA ATLIXCO METEPEC, C.P. 74360.</b>	
Población, Estado y País: <b>PUEBLA, PUEBLA, MÉXICO ; METEPEC, PUEBLA, MÉXICO</b>	
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):	
III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)	
11) Nombre (s): <b>MTRA. ROSA ISELA ÁVALOS MÉNDEZ</b> 12) R G P:	
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: <b>4 SUR 104, COL. CENTRO, C.P. 72000</b>	
Población, Estado y País: <b>PUEBLA, PUEBLA, MÉXICO</b> 14) Teléfono (clave): (01 222) 229 55 00 Ext: 3058 15) Fax (clave): (01 222) 229 55 00 Ext: 5058	
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: <b>LIC. JAIR ERIC VÁZQUEZ TORRES; LIC. GABRIELA SÁNCHEZ ESGUA</b>	
17) Denominación o Título de la Invención: <b>CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PRODUCCIÓN DE UNA FORMA ENZIMÁTICA ACTIVA E INMUNOGÉNICA DEL ECTODOMINIO DE LA HEMAGLUTININA NEURAMINIDASA (eHN<sub>62-576</sub>) DEL RUBULAVIRUS PORCINO EN LA LEVADURA <i>Pichia pastoris</i></b>	
18) Fecha de divulgación previa Día   Mes   Año	19) Clasificación Internacional <b>uso exclusivo del IMPI</b>
20) Divisinal de la solicitud Número   Figura jurídica   Día   Mes   Año	21) Fecha de presentación Día   Mes   Año
22) Prioridad Reclamada: País   Fecha de presentación (Día   Mes   Año)   No. de serie	
Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas	No. Hojas
<input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tarifa	<input type="checkbox"/> Documento de cesión de derechos
<input type="checkbox"/> Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> Constancia de depósito de material biológico
<input type="checkbox"/> Dibujo (s) en su caso	<input type="checkbox"/> Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input type="checkbox"/> Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad
<input type="checkbox"/> Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> Traducción
	<b>TOTAL DE HOJAS</b>
Observaciones:	
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.	
<b>Mtra. Rosa Isela Ávalos Méndez</b> Nombre y firma del solicitante o su apoderado	<b>PUEBLA, PUEBLA, A 28 DE AGOSTO DE 2015</b> Lugar y fecha

- José Luis Cerriteño Sánchez, Irma Herrera Camacho, Nora Hilda Rosas Murrieta, Gerardo Santos López. **Obtención de cepas de levadura *P. pastoris* y *S. pombe* productoras de la hemaglutinina-neuraminidasa del Rubulavirus porcino.** “III Encuentro Nacional de ciencias Luis Rivera Terrazas”. Puebla, Puebla. 26 de septiembre del 2012.
- José Luis Cerriteño Sánchez, Enrique Rojas Martínez, Gerardo Santos López, Nora Hilda Rosas Murrieta, Julio Reyes Leyva, Irma Herrera Camacho. **Construcción de un sistema de expresión para el ectodominio de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del Rubulavirus porcino en las levaduras *S. pombe* y *P. pastoris*.** “XXIX Congreso Nacional de Bioquímica”. Oaxaca, Oaxaca. 17 de noviembre del 2012.
- José Luis Cerriteño Sánchez, Nora Hilda Rosas Murrieta, Julio Reyes Leyva, Gerardo Santos López, Irma Herrera Camacho. **Construcción de un sistema de expresión para el ectodominio de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del Rubulavirus porcino (RVP) en la levadura *Pichia pastoris*.** “4° Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía”. Zapopan, Jalisco. Septiembre del 2013.
- José Luis Cerriteño Sánchez, Gerardo Santos López, Nora Hilda Rosas Murrieta, Julio Reyes Leyva, Irma Herrera Camacho. **Expression of the hemagglutinin-neuraminidase’s ectodomain from Rubulavirus porcine in the yeast *Pichia pastoris*.** “XXX Congreso Nacional de Bioquímica”. Guadalajara, Jalisco. 8 de noviembre del 2014.

## Abstract

The blue eye disease (BED) of swine is a viral disease endemic in Mexico. It was observed by the first time at La Piedad, Michoacán, in 1980 and was spread faster to others states of Mexican Bajío. BED was characterized by neurological, respiratory signs, reproductive failure, mortality in piglets and the development of blue opacity in the corneal in low percentage of infected pigs. The etiological agent is a paramyxovirus initially called La Piedad, Michoacán Virus (LPMV) and then, classified as *Porcine rubulavirus* (PorPV-LPMV). This virus exhibits in its envelope the hemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein that is involved in cell receptor recognition and attachment, as well as possess neuraminidase activity (sialidase) that contributes to virus release. HN is the most immunogenic and a major target for vaccine development. Several studies indicate that the HN ectodomain (eHN) has the most important epitopes, the glycosylation sites and active domain. Therefore, we report in this study the obtaining of ectodomain of PorPV HN (eHN) through the *Pichia pastoris* expression system. Due to the capacity of the yeast to grow in simple mediums, produce proteins with posttranslational modifications, the security due to the absence of toxins and oncogenes. The eHN open reading frame (ORF) was amplified from the PAC1 strain of by PCR, then, was subcloned into pPICZ $\alpha$ B-eHN expression vector and was corroborated by restriction patrons and sequencing.

After that, the vector was integrated into the AOX1 promoter by displacement in the yeast chromosome and phenotype Mut<sup>+</sup> was obtained in the transformants. The phenotype was confirmed by PCR and growing the transformants in the MMH differential medium with methanol. The strain was named X33-eHN<sub>62-576</sub> and was carried to expression using methanol as unique carbon source and inducing in high cell densities, with 8 days of feeding with methanol. The eHN expressed into *P. pastoris* X33 was recovered from cell-free medium, featuring up to 67 nmol/min/mg after 6 days of expression. With the Lineweaver-Burk representation, were obtained the kinetic parameters of the eHN, was obtained 227.3 nmol/min/mg of Vmax and 2.86 mg/ml of Km. The eHN was recognized by the serum of infected pigs with strains currently circulating in the Mexican Bajío region by western blot and ELISA test. The protein was purified by one step of affinity chromatography with 92% yield and recovered 1.2 mg of purified protein by each l of culture. The eHN induces antibodies in mice strain CD-1, after immunization during 28 days with specific recognition in ELISA test. These antibodies were able to inhibit replication more than 80% by viral neutralization assays in cell culture. These studies show the obtaining of a protein (eHN) with similar characteristics to the native HN and which may be a good candidate to propose a vaccine or to use the antigen in a serological diagnostic test.

*Key words:* *Porcine rubulavirus*, *hemagglutinin-neuraminidase*, *eHN*, *Pichia pastoris*, *PorPV*, *Blue eye disease*.

## Resumen

La enfermedad del ojo azul (EOA) de los cerdos, es una enfermedad viral endémica en México, se detectó en La Piedad, Michoacán hacia el año 1980, propagándose rápidamente hacia otros estados del Bajío Mexicano. Se caracteriza por producir signos neurológicos, respiratorios, falla reproductiva, mortalidad en lechones y por el desarrollo de una opacidad azul en la córnea en un bajo porcentaje de animales infectados. El agente etiológico es un paramixovirus llamado inicialmente virus de La Piedad Michoacán y clasificado posteriormente como *Rubulavirus porcino* (PorPV-LPMV), el cual muestra en su envoltura la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), presenta actividad hemaglutinante y neuraminidasa, además de ser la más inmunogénica y un objetivo importante para el desarrollo de vacunas. Diversos estudios señalan al ectodominio de la proteína (eHN) como la región que posee todos los epítomos inmunogénicos, los sitios de glicosilación y el sitio activo. Por ello, en este estudio se describe por primera vez, la obtención del ectodominio de la HN del PorPV a través del sistema de expresión de *Pichia pastoris*, debido a la capacidad de la levadura de llevar a cabo modificaciones postraduccionales en las proteínas, la seguridad que ofrece por su ausencia de toxinas, oncogenes y la simplicidad de los cultivos. Se amplificó por PCR el marco de lectura del gen del eHN de la cepa de PAC1, posteriormente fue subclonado en el vector de expresión (pPICZαB-eHN), el cual fue corroborado por patrones de restricción y secuenciación, posteriormente se integró a la región promotora de AOX1 por desplazamiento en el cromosoma de la levadura, dando como resultado un fenotipo Mut<sup>+</sup>, el cual se determinó mediante PCR y crecimiento en medio diferencial con metanol (MMH). La cepa resultante fue denominada X33-eHN<sub>62-576</sub>, la cual fue llevada a expresión utilizando como fuente de carbono metanol e induciendo la expresión a altas densidades celulares con 8 días de alimentación con metanol. El eHN expresado en la cepa de *P. pastoris* X33 se recuperó en forma soluble a partir de medio libre de células, observándose hasta 67 nmol/min/mg de actividad neuraminidasa después de 6 días de expresión. Con la representación de Lineweaver-Burk se determinaron los parámetros cinéticos del eHN, se obtuvo un valor de V<sub>máx</sub> de 227.3 nmol/min/mg y una Km de 2.86 mg/ml. El eHN fue reconocido en western blot y ELISA por el suero de cerdos infectados con PorPV perteneciente a cepas que circulan actualmente en granjas persistentemente infectadas en la región del Bajío Mexicano. La proteína recombinante se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados con un rendimiento del 92%, recuperándose 1.2 mg de proteína pura por cada l de cultivo. El eHN induce la producción de anticuerpos en ratones de la cepa CD-1 después de inmunizar por 28 días con reconocimiento específico en la prueba de ELISA. Estos anticuerpos fueron capaces de inhibir la replicación del virus en más del 80% en ensayos de sero-neutralización viral en cultivo celular.

Estos estudios demuestran la obtención de una proteína (eHN) con características similares a la HN nativa y que puede ser un buen candidato para proponer una vacuna o utilizar el antígeno en una prueba de diagnóstico serológico.

*Palabras clave: Rubulavirus porcino, hemaglutinina-neuraminidasa, eHN, Pichia pastoris, PorPV, enfermedad del ojo azul.*



**ABREVIATURAS**

EOA: Enfermedad del ojo azul

VLPM: Virus de La Piedad, Michoacán

PorPV: *Rubulavirus porcino*

PAC: Producción Animal Cerdos

HN: Hemaglutinina neuraminidasa

eHN: Ectodominio de la hemaglutinina neuraminidasa

PI: Post infección

SNC: Sistema nervioso central

INF: Interferón

PK-15: Línea celular proveniente de riñón de cerdo

M: Proteína de matriz

P: Fosfoproteína

N: Nucleoproteína

F: Proteína de fusión

L: Proteína de alto peso molecular

ORF: Marco de lectura abierto

D.O.: Densidad óptica

**ÍNDICE**

**1. INTRODUCCIÓN..... 1**

**2. ANTECEDENTES ..... 4**

    2.1. *La enfermedad del ojo azul de los cerdos (EOA)* ..... 4

    2.2. *Seroprevalencia de la enfermedad del ojo azul* ..... 4

    2.3. *Posible origen del PorPV* ..... 7

    2.4. *Cuadro clínico* ..... 7

    2.5. *Respuesta inmune* ..... 11

    2.6. *Sinergismo del PorPV con patógenos* ..... 14

    2.7. *Avances en el diagnóstico de la enfermedad* ..... 15

    2.8. *Desarrollo de vacunas* ..... 15

    2.9. *Agente etiológico* ..... 16

    2.10. *Receptor celular* ..... 17

    2.11. *Distribución del virus y efecto citopático en infecciones experimentales* ..... 18

    2.12. *Ciclo replicativo del PorPV* ..... 19

    2.13. *Proteínas del PorPV asociadas a la envoltura* ..... 21

    2.14. *La hemaglutinina neuraminidasa HN* ..... 23

    2.15. *Expresión de la proteína HN del PorPV en sistemas heterólogos* ..... 26

    2.16. *Pichia pastoris como sistema de expresión* ..... 27

**3. JUSTIFICACIÓN..... 31**

**4. HIPÓTESIS..... 31**

**5. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO ..... 32**

**6. OBJETIVOS PARTICULARES..... 32**

**7. MATERIALES Y MÉTODOS..... 33**

    7.1. *Predicción del ectodominio de la HN y de sus regiones antigénicas* ..... 33

    7.2. *Amplificación por PCR del segmento codificante de eHN* ..... 33

    7.3. *Clonación del marco de lectura del eHN en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt.* 33

    7.4. *Preparación de células competentes de E. coli y transformación* ..... 34

    7.5. *Extracción de ADN plasmídico (maxipreps)*..... 35

    7.6. *Subclonación en el vector de expresión pPICZaB*..... 35

    7.7. *Preparación de células competentes y transformación de P. pastoris X33* ..... 36

7.8. Análisis de las transformantes de <i>P. pastoris</i> X33.....	37
7.9. Caracterización del crecimiento celular de X33-eHN <sub>61-576</sub> en YPD y BMGY .....	38
7.10. Expresión de la proteína eHN en X33-eHN <sub>61-576</sub> .....	38
7.11. RT-PCR .....	39
7.12. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección.....	40
7.13. Ensayos enzimáticos.....	41
7.14. Estudios cinéticos.....	42
7.15. Purificación del eHN .....	42
7.16. Inmunización de ratones .....	43
7.17. ELISA indirecto.....	43
7.18. Obtención del inóculo de trabajo del PorPV cepa PAC1.....	44
7.19. Titulación viral.....	44
7.20. Ensayos de sero-neutralización .....	45
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
8.1. Predicción del ectodominio de la HN del PorPV .....	46
8.2. Amplificación y clonación del eHN .....	50
8.3. Construcción de un sistema de expresión para el eHN .....	53
8.4. Obtención de cepas de <i>P. pastoris</i> productoras del eHN .....	57
8.5. Determinación del fenotipo Mut .....	59
8.6. Caracterización del crecimiento celular de X33-eHN <sub>62-576</sub> .....	64
8.7. Expresión del eHN .....	68
8.8. Actividad enzimática del eHN.....	73
8.9. Estudios cinéticos.....	75
8.10. La proteína eHN es reconocida por sueros de cerdos infectados con PorPV.....	78
8.11. Purificación del eHN.....	82
8.12. Producción de anticuerpos anti eHN.....	86
8.13. Creación de un inóculo de trabajo del PorPV cepa PAC1.....	87
8.14. Ensayos de sero-neutralización .....	89
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>93</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>11. TRABAJOS PRESENTADOS EN LA TESIS.....</b>	<b>113</b>

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estados con seroprevalencia del PorPV para el año 2011 ..... 6

Figura 2. Opacidad corneal..... 7

Figura 3. Alteraciones testiculares por PorPV ..... 8

Figura 4. Lesiones en la cola el epidídimo por PorPV ..... 9

Figura 5. Desarrollo de fetos momificados ..... 9

Figura 6. Concentración espermática en eyaculados de cerdos infectados ..... 10

Figura 7. Títulos de anticuerpos en cerdos infectados..... 12

Figura 8. Inmuno tinción del PorPV..... 17

Figura 9. Microscopia electrónica del PorPV..... 18

Figura 10. Formación de sincicios..... 19

Figura 11. Ciclo replicativo de los *paramixovirus* ..... 20

Figura 12. Representación esquemática del PorPV..... 21

Figura 13. Estructura del disacárido sialil $\alpha$ 2,3galactosa ..... 24

Figura 14. Predicción estructural de la hemaglutinina neuraminidasa..... 25

Figura 15. Reconocimiento de las proteínas del PorPV ..... 26

Figura 16. Levadura *P. pastoris* ..... 28

Figura 17. Predicción de la región transmembranal ..... 46

Figura 18. Sitios potenciales de N-glicosilación ..... 47

Figura 19. Análisis bioinformático de la proteína HN del PorPV de PAC1 ..... 48

Figura 20. Obtención del ORF del eHN..... 50

Figura 21. Vector pJET-eHN<sub>62</sub>..... 51

Figura 22. Patrones de restricción pJET-eHN<sub>62</sub> ..... 52

Figura 23. Amplificación del eHN a partir de los vectores de expresión..... 53

Figura 24. Vector de expresión pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>..... 55

Figura 25. Análisis del vector de expresión pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>..... 56

Figura 26. Secuenciación del vector pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>..... 57

Figura 27. Transformación de *P. pastoris* con el vector pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>..... 58

Figura 28. Amplificación de eHN en las cepas X33-eHN<sub>62-576</sub>..... 59

Figura 29. Integración del vector recombinante al genoma de *P. pastoris* ..... 60

Figura 30. Determinación del fenotipo Mut .....	61
Figura 31. Crecimiento en medio MMH .....	63
Figura 32. Peso seco de <i>P. pastoris</i> .....	65
Figura 33. Crecimiento de <i>P. pastoris</i> en medio BMGY .....	66
Figura 34. Producción intracelular de eHN en X33-eHN <sub>62-576</sub> .....	68
Figura 35. Producción extracelular de eHN .....	70
Figura 36. Biomasa producida por X33-eHN <sub>62-576</sub> .....	72
Figura 37. Cantidad de proteína extracelular .....	73
Figura 38. Actividad neuraminidasa en el medio libre de células.....	74
Figura 39. Curvas de velocidad enzimática.....	76
Figura 40. Curva de saturación de la proteína eHN por el sustrato.....	77
Figura 41. Representación de Lineweaver-Burk .....	77
Figura 42. Antigenicidad de la proteína eHN.....	79
Figura 43. Reconocimiento de eHN por sueros de cerdos infectados .....	81
Figura 44. Perfil de elución del proceso de purificación .....	83
Figura 45. Proteínas del proceso de purificación del eHN .....	84
Figura 46. Producción de anticuerpos anti-eHN por ELISA.....	86
Figura 47. Propagación del PorPV cepa PAC1 en la línea celular PK-15 .....	88
Figura 48. Titulación del PorPV PAC1 en la línea celular PK-15 .....	89
Figura 49. Ensayo de sero-neutralización .....	90
Figura 50. Disminución del porcentaje de infección.....	91
Tabla 1. Relación antigénica de las cepas de PorPV aisladas de 1993 al 2003.....	5
Tabla 2. Ecuaciones del modelo de crecimiento .....	38
Tabla 3. Rendimiento del proceso de purificación .....	85

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del ojo azul (EOA) de los cerdos se detectó en granjas de La Piedad, Michoacán, México en 1980 y se extendió a otros estados mexicanos como Guanajuato y Jalisco (Stephano et al., 1988; 2000). El agente etiológico es un paramixovirus inicialmente llamado virus de La Piedad Michoacán (VLPM) y posteriormente clasificado como *Rubulavirus porcino* (PorPV) (Lamb et al., 2005), provoca problemas neurológicos, respiratorios, síndrome reproductivo; además se ha observado el desarrollo de una opacidad de la córnea en 1 a 10 % de los casos (Moreno-López et al., 1986; Stephano, et al., 1988). La EOA genera pérdidas económicas causadas por el alto grado de mortalidad neonatal y la infertilidad en los adultos.

Ramírez-Mendoza et al., en 1997, llevaron a cabo el aislamiento de cepas de virus a partir de varios brotes con diferentes datos patológicos e historiales clínicos. Estos aislados fueron nombrados Producción Animal Cerdos 1 (PAC1), PAC2, PAC3, PAC4 y PAC5 (Ramírez-Mendoza et al., 1997; Reyes-Leyva et al., 2002). Estudios recientes indican que en la región oeste de México, importante en la industria porcina, existe una prevalencia serológica del PorPV entre 9 y 23,7%, las cepas que circulan actualmente son antigénicamente diferentes, lo que sugiere que el uso de una vacuna con una solo antígeno puede no ser suficiente para el control de la enfermedad (Escobar-López et al., 2011). La presencia de anticuerpos provenientes del virus en cerdos convalecientes que sobrevivieron a una infección natural fue confirmada por Wiman et al., 1998, lo que sugiere que se induce una respuesta inmune humoral duradera. Si se tiene en cuenta que la transmisión es posible a cerdos sanos, se resalta la importancia del control y prevención de esta enfermedad (Cuevas-Romero et al., 2014).

El PorPV es un virus pleomórfico de la familia *Paramyxoviridae*, el cual posee dos glicoproteínas insertadas en su envoltura: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), responsables de la unión a la célula hospedera y de la fusión membranal (Moreno-López et al, 1986). La proteína HN tiene un papel importante en el ciclo replicativo. La partícula viral se adsorbe a la membrana celular a través de la proteína

HN, que reconoce un receptor específico, un glicoconjugado con ácido siálico terminal (Reyes-Leyva et al., 1997). Un cambio conformacional de HN activa la proteína F, que expone un dominio altamente hidrofóbico. Entonces, las membranas virales y celulares se fusionan y el contenido del virión entra en la célula (Lamb y Kolakofsky, 1996).

La HN es la proteína más inmunogénica de PorPV. Mediante el uso de ensayos de Western blot, se observó el reconocimiento de HN en el 85% de los sueros de cerdos infectados experimentalmente durante la segunda semana después de la infección (PI) y el 100% de reconocimiento en la tercera semana PI (Hernández et al., 1998). La HN es una proteína de membrana de tipo II. En su ectodominio (eHN) se encuentran el sitio de reconocimiento, catalítico, glicosilación y los sitios antigénicos. La HN se asocia en tetrámeros constituidos por dímeros formados por enlaces no covalentes en la envoltura viral y presenta actividad hemaglutinante y de neuraminidasa. La actividad neuraminidasa consiste en la eliminación de los residuos de ácido siálico de los glicoconjugados en la célula hospedera, que permite la liberación de la progenie viral y evita la agregación, lo que facilita la diseminación viral (Lamb y Kolakofsky, 2001). En otros estudios basados en herramientas bioinformáticas, predijeron 18 péptidos en el Ectodominio de la HN como antígenos potenciales, lo que demuestra la importancia de esta región en la respuesta inmune (Zenteno Cuevas et al., 2007).

La levadura *Pichia pastoris* es un sistema de expresión común que se utiliza en la producción de proteínas recombinantes las cuales suelen plegarse correctamente y son funcionales en parte debido a su capacidad de glicosilación, similar a los organismos superiores (Cregg et al., 1989). Es un sistema seguro debido a la ausencia de oncogenes y toxinas, además de su fácil manipulación, crecimiento rápido y por la simplicidad de los medios de cultivo. *P. pastoris* se ha utilizado en la expresión de glicosidasas tales como el ectodominio de la neuraminidasa del virus de Influenza A / H3N2, generando 50% de protección contra la infección en los ratones infectados inmunizados con la proteína recombinante (Martinet et al., 1998). También se ha utilizado en la expresión del ectodominio de la neuraminidasa del virus de Influenza aviar A / H5N1, la cual presentó actividad enzimática (Yongkiettrakul et al., 2009) y en la expresión de la hemaglutinina del

virus influenza A / H1N1, la cual indujo producción de anticuerpos en ratones, que a su vez, fueron capaces de reducir el número de placas líticas durante la infección *in vitro* (Athmaram et al., 2011).

Desde que la EOA apareció en México en 1980, se han reportado pocos estudios sobre la prevención de esta enfermedad. Fuentes et al., en 1994, reportaron 71.4% de protección en la evaluación de una vacuna experimental contra la enfermedad en cerdos mediante pruebas de inmunogenicidad, seguridad, potencia e inmunidad pasiva. Actualmente, hay dos vacunas en el mercado que ofrecen una protección preventiva contra PorPV y están indicadas para animales de reemplazo cuya producción puede llegar a tener altos costos.

Las proteínas recombinantes proporcionan un recurso para el desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico, por este motivo, la posibilidad de expresar la proteína HN del PorPV fue atractivo para el desarrollo de este trabajo, debido a que es la proteína más expuesta e inmunogénica de PorPV y es un excelente candidato para desarrollar una nueva herramienta para el diagnóstico y la prevención de la EOA. En el presente trabajo se obtuvo una forma enzimáticamente activa e inmunogénica del ectodominio de la HN del PorPV en la levadura *P. pastoris*.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La enfermedad del ojo azul de los cerdos

Una enfermedad emergente caracterizada por el desarrollo de desórdenes respiratorios, reproductivos y del sistema nervioso central se descubrió en los años ochenta en la zona del Bajío. El agente etiológico es un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, del género *Rubulavirus*. Después de ser aislado fue llamado inicialmente virus de la Piedad Michoacán (VLPM) (Moreno-Lopez et al., 1986) o virus del síndrome del ojo azul (Stephano et al., 1988) y clasificado taxonómicamente como *Rubulavirus porcino* (Lamb et al., 2005).

### 2.2. Seroprevalencia de la enfermedad del ojo azul

Hasta la fecha han sido pocos los reportes acerca de la situación actual de la enfermedad, sin embargo todos los estudios indican que la enfermedad se mantiene endémica en la región del Bajío Mexicano.

En estudios realizados por Leguizamo-Ramírez en 2000, determinó anticuerpos contra PorPV en animales de abasto procedentes del Bajío por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación, reportó para el año 1997 una seropositividad del 8.6%, este porcentaje aumentó drásticamente hasta el 45% para el año 1998. En este estudio se incluyeron los estados de Jalisco, Guanajuato y Michoacán. Dichos resultados indican un gran aumento de la seroprevalencia de la enfermedad en tan sólo un año. En otros estudios, Martínez et al., 2001, reportaron un brote epizootico para dos granjas del municipio de Uriangato, Michoacán, fue posible identificar la enfermedad y se aisló el virus, habiendo un 71% de mortalidad en lechones lactantes.

Sánchez-Betancourt et al., en 2008, reportaron un brote atípico ocurrido en el estado de Jalisco en el año 2000 al 2003, afectando principalmente a la hembras gestantes. Del 10 al 20% de los animales pertenecientes a una granja presentaron signos neurológicos y respiratorios, el 60% de los animales de 3 a 4 meses presentaron neumonía y el 20% encefalitis. La mortalidad se incrementó hasta el 30%. En este brote se logró aislar las

cepas denominadas PAC6-PAC9; además lograron observar mutaciones en el gen HN de los aislamientos, los cuales generaron cambios en el potencial electrostático en la superficie de la proteína y estos cambios fueron asociados con el incremento de la virulencia.

En brotes que se presentaron de 1993 al 2000, los animales adultos sólo presentaron signos respiratorios y problemas reproductivos, mientras que en lechones se observaron signos neurológicos leves (Sánchez-Betancourt et al., 2012). La tabla 1 muestra las características de distintas cepas del PorPV.

Tabla 1. **Relación antigénica de las cepas de PorPV aisladas de 1993 al 2003;** tomado de Sánchez-Betancourt et al., 2012.

Cepa Viral	PAC2/ 1990	PAC3/ 1992	PAC4/ 1993	PAC6/ 2001	PAC7/ 2002	PAC8/ 2002	PAC9/ 2003
PAC2/1990	1	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5
PAC3/1992		1	0.7	0.5	0.5	0.3	0.3
PAC4/1993			1	0.7	0.7	0.5	0.5
PAC6/2001				1	1	1	1
PAC7/2002					1	1	1
PAC8/2002						1	0.7
PAC9/2003							1

En la tabla 1, se puede observar que dos cepas están relacionadas antigénicamente cuando su valor de antigenicidad es mayor a 0.5 y son antigénicamente similares si este valor es igual a 1. En este estudio se observó que todas las cepas tienen relación antigénica, con excepción de la cepa PAC3, la cual no posee relación con las cepas PAC8 y PAC9. Basados en estos resultados y en los análisis de la secuencia de aminoácidos de sus proteínas HN, pudieron concluir que algunas variaciones en la secuencia de la proteína y características antigénicas se preservan a lo largo del tiempo, además comenzaban a surgir cepas antigénicamente distintas, las cuales circulan en una misma región (Sánchez-Betancourt et al., 2012).

Un estudio realizado en los estados de Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por medio de inhibición de la hemaglutinación, mostró que en un mismo estado están

circulando cepas antigénicamente diferentes, sugiriendo que el uso de una vacuna con un solo antígeno puede ser insuficiente para el control de la enfermedad. Al mismo tiempo se encontró que el Estado de México presentó mayor diversidad antigénica respecto a Michoacán y Guanajuato (Riaño-Cruz, 2011).

En otros reportes de Quezada et al., en 2008, haciendo uso de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación y dos aislados virales del PorPV, encontraron una seroprevalencia superior al 59% al analizar 144 muestras de cerdos de campo procedentes del Bajío.

En el estudio llevado a cabo por Escobar-López et al., en 2011, en el que se analizaron 1013 sueros de cerdos no vacunados provenientes del centro-sur del país, se identificó a cepas muy relacionadas con PAC4 como las más frecuentes en Guanajuato, PAC6 en Jalisco, PAC9 en Michoacán y el Estado de México presentaron una baja seroprevalencia. La prevalencia serológica del RVP en los cuatro estados estudiados fue del 9 al 23.7%. Las variaciones antigénicas halladas implican que el uso de una vacuna monovalente no proveerá una completa protección contra los diversos subtipos del RVP y los resultados confirman que el RVP sigue presente en la región centro-oeste de México (figura 1).



Figura 1. **Estados con seroprevalencia del PorPV para el año 2011.** Estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco mostrados en azul; tomado de Cuevas-Romero et al., 2015.

### 2.3. Posible origen del PorPV

Salas-Rojas et al., en 2004, al estudiar la prevalencia del virus de la rabia en murciélagos no hematófagos de las costas de Colima, México, encontraron una muestra positiva para PorPV en una macho de la especie *Rhogeessa parvula major*.

En 1995 se publicó el trabajo de Henderson et al., donde describen el estudio molecular del *Virus de Mapuera* (MPRV), un virus aislado en 1979 de las glándulas salivales del murciélago *Sturnira lilium*. En este estudio se identificaron la presencia de las proteínas HN, L, N, F, P, M y la proteína no estructural V, sugiriendo que el virus pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y al género *Rubulavirus*. De manera sobresaliente, Wang et al., 2007, al comparar la secuencia y la organización del genoma viral señalan que el PorPV y el virus MPRV están más relacionados entre sí que otros miembros del género *Rubulavirus*, sugiriendo que el PorPV se pudo originar en los murciélagos y propagarse a los cerdos directamente o mediante algún hospedero intermediario, dando origen a los brotes surgidos en México en los años ochenta.

### 2.4. Cuadro clínico

Durante la infección con *Rubulavirus porcino*, es característico el desarrollo de una opacidad corneal (coloración azul) uni o bilateral en un bajo porcentaje de animales infectados. Este hecho fue fácilmente reconocible por veterinarios y productores, por lo que se acuñó el nombre coloquial de “enfermedad del ojo azul” (figura 2) (Cuevas-Romero et al., 2015).



Figura 2. **Opacidad corneal**, en un animal infectado con PorPV durante una infección natural; tomado de Cuevas-Romero et al., 2015.

Martínez-Bautista en 2010, encontró alteraciones testiculares durante la infección experimental con PorPV a partir del día 14.5 + 2.4 de infección, dichas alteraciones consistieron en cambio de la longitud y diámetro testicular unilateral o bilateral. En algunos casos hubo disminución notable en el diámetro y longitud de ambos testículos a partir de la quinta semana post infección (PI) y permaneció hasta el término del estudio (figura 3).

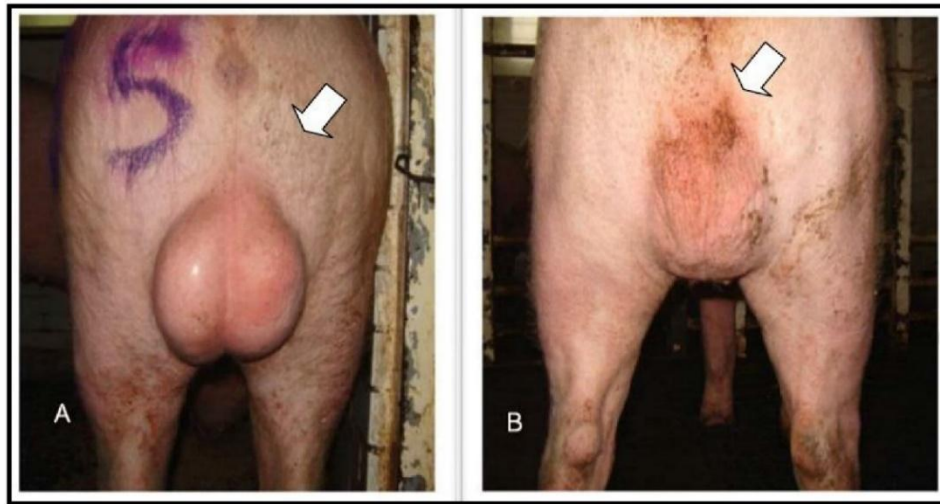


Figura 3. **Alteraciones testiculares por PorPV.** (A) Antes de la inoculación con *Rubulavirus porcino*, (B) alteraciones testiculares en la quinta semana de infección; tomado de Martínez-Bautista, 2010.

En el análisis histológico del tracto reproductor de los cerdos infectados se confirmó que los animales cursaron por un proceso inflamatorio con degeneración epitelial y zonas con reparación del tejido afectado, en testículo, cabeza y cola de epidídimo. A nivel de la cola del epidídimo se observó desprendimiento epitelial, degeneración tubular e infiltrado mononuclear, vesículas de citoplasma en luz tubular, ausencia de espermatozoides, espermatozoides intravasculares, necrosis focal de células intersticiales (figura 4).

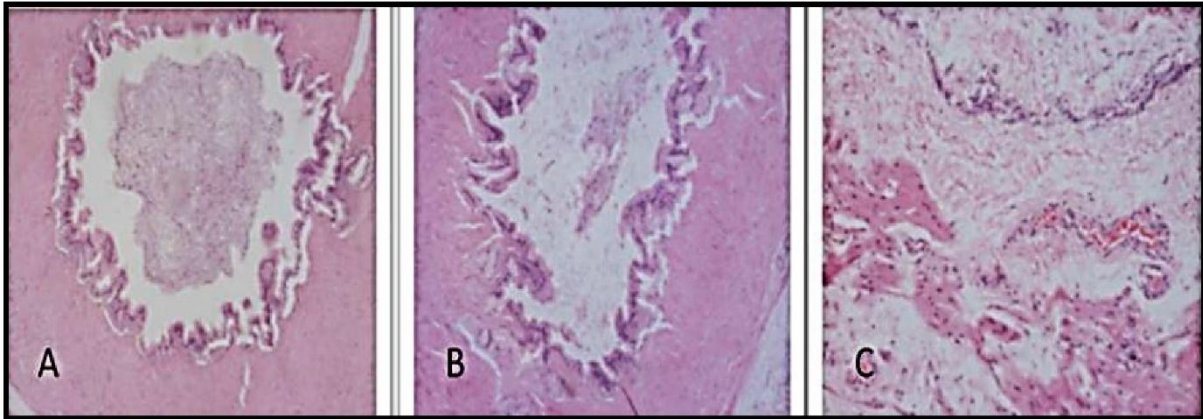


Figura 4. **Lesiones en la cola el epidídimo por PorPV.** (A) Epidídimo normal, (B) desprendimiento epitelial, (C) degeneración tubular e infiltrado mononuclear; tomado de Martínez-Bautista, 2010.

El PorPV es capaz de replicarse en tejidos de cerdas gestantes, atravesar la placenta y causar la muerte fetal y momificación, esto fue demostrado por Hernández-Jáuregui et al., 2004, al infectar experimentalmente cerdas gestantes con la cepa PAC3 a la semana 6 o 10 de gestación. En la placenta y el endometrio se observó el desarrollo de lesiones macroscópicas y también de hemorragias. Se observó desarrollo de equimosis cutánea, tamaño menor al normal, deshidratación y momificación en los fetos, además, el virus pudo ser aislado de pulmón, hígado y cerebro (figura 5).



Figura 5. **Desarrollo de fetos momificados**, durante la infección experimental con PorPV cepa PAC3 en hembras gestantes; tomado de Hernández-Jáuregui et al., 2004.

Por otro lado, animales de 3 días de edad infectados experimentalmente con el virus VLPM presentaron severos signos neurológicos a los 6 días post infección (PI), falleciendo a los 8 días PI. Solamente el 30% de los animales de 17 días de nacidos infectados experimentalmente presentaron signos neurológicos, sin observar signos en animales de 30 días de nacidos. Se encontró replicación del virus 1 día PI en el tracto respiratorio y en las amígdalas, sugiriendo a estos tejidos como el primer sitio de replicación. En cerdos más grandes, la invasión hacia el sistema nervioso central (SNC) es muy parecida a lo observado en virus de más baja virulencia como la pseudorrabia. La replicación inicial del virus puede ocurrir en la mucosa nasal y propagarse al SNC vía los nervios olfatorios y trigémino, todo combinando con viremia. Las excreciones del tracto respiratorio y de la orina son las vías principales de propagación de la enfermedad, mientras que las heces presentan muy bajas concentraciones del virus (Allan et al., 1996).

En estudios realizados por Estrada-Barrón en 2008, se determinó que el PorPV está asociado a leucospermia, disminuyendo la concentración espermática en verracos. La concentración espermática en eyaculados de cerdos infectados presenta una caída del 66% manteniéndose baja a lo largo de 22 semanas post-infección (PI) (figura 6)

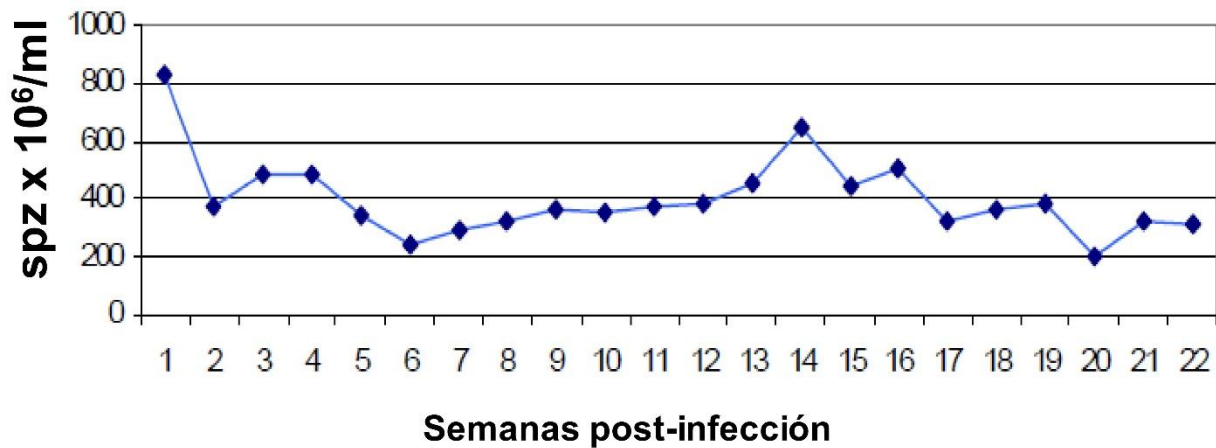


Figura 6. **Concentración espermática en los eyaculados de cerdos infectados;** modificado de Estrada-Barrón, 2008.

También se describió un aumento de las formas anómalas en los espermatozoides, como lo son la gota proximal y la cola en látigo con incrementos de hasta el 5%, se

encontraron leucocitos en el semen cuyas mayores concentraciones se observan en la semana 7 a 11 PI; sin embargo la enfermedad no afecta el volumen seminal. Estos datos sugieren un efecto negativo en la calidad del semen de cerdos infectados, dando como resultado la incapacidad de fecundar de los machos. Solís et al., en 2007, describieron estudios similares, donde también se observó un incremento en anomalías de los espermatozoides, muerte y reducción de la motilidad, además el virus se detectó en el semen de los animales y por tanto se propone la vía venérea con una forma de transmisión del virus. Más recientemente, Rivera-Benítez et al., 2013, al infectar experimentalmente verracos adultos con la cepa PAC3, observó un aumento del tamaño testicular en un 66% de los animales infectados, epididimitis, disminución en la concentración y motilidad espermática. Se logró aislar el virus a partir de las muestras seminales y se observó persistencia del ARN proveniente del virus en las muestras seminales, por tanto el uso de semen proveniente de animales infectados con PorPV son un factor de riesgo para diseminar la enfermedad durante la inseminación artificial.

### *2.5. Respuesta inmune*

Cuevas-Romero en 2000, al analizar animales convalecientes en una granja del municipio de Zumpango, Estado de México que presentó un brote de la enfermedad, encontró que cerdos convalecientes con 5 semanas de edad permanecieron clínicamente sanos en los subsiguientes 5 a 13 meses post-infección. Los cerdos permanecieron sin signos clínicos, sin poder identificar el antígeno viral en tejidos, suero y secreciones nasales. Sin embargo presentaron niveles elevados de anticuerpos circulantes. Este resultado pudo deberse a cambios en la expresión de los receptores celulares a las 8 semanas de edad que ocasiona menor susceptibilidad a la enfermedad. También, en otros estudios Rivera-Benítez et al., en 2013, reportaron signos clínicos persistentes en animales de 12 meses de edad infectados experimentalmente con PorPV, encontrando un aumento de los anticuerpos a partir de la segunda semana PI, los cuales se mantienen altos durante las 20 semanas que se analizaron los animales, esto mediante la técnica de la inhibición de la hemaglutinación y por seroneutralización viral (figura 7).



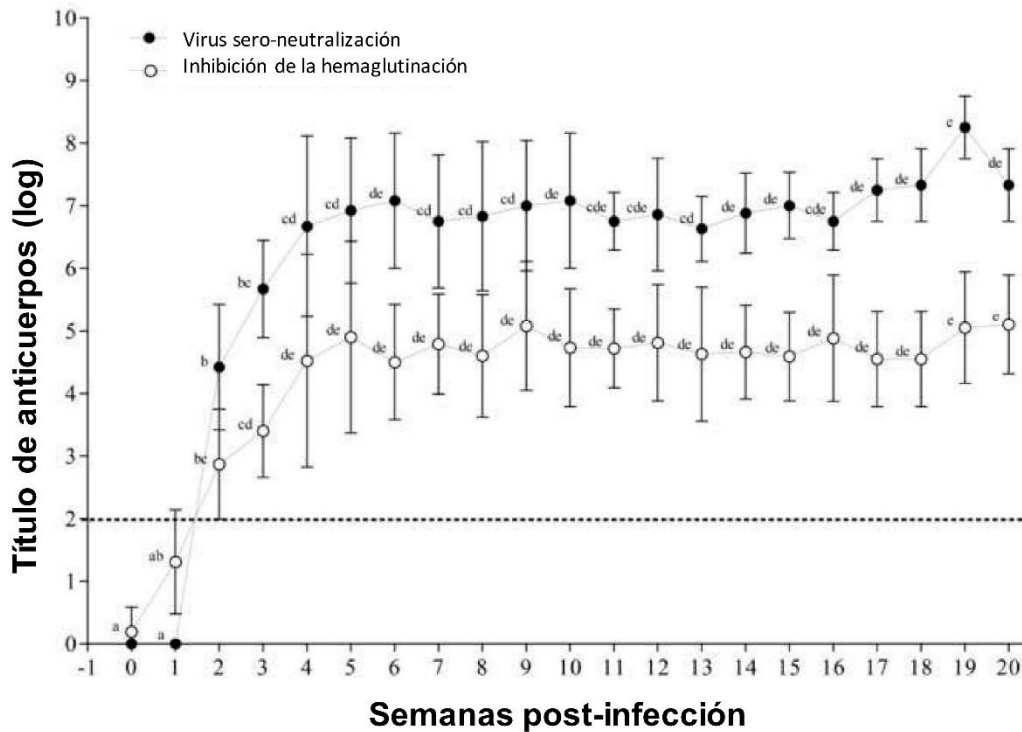


Figura 7. **Títulos de anticuerpos en cerdos infectados.** Comparación de los títulos obtenidos semanalmente por inhibición de la hemoaglutinación y virus suero neutralización en cerdos infectados con PorPV; modificado de Rivera-Benítez et al., 2013.

Durante la infección por PorPV existe una fase de viremia que permite su diseminación del sitio de inoculación hacia otros órganos. El virus se identificó asociado a eritrocitos del día 4 al 12 post-inoculación (PI) y asociado a leucocitos del día 12 al 20 PI, lo que sugiere que utiliza estas células como medio de diseminación sistémica. La producción de anticuerpos se identificó desde la primera semana PI, pero los títulos más elevados se encontraron el día 16 PI, lo que coincidió con la eliminación del virus libre en sangre. Ninguno de los animales infectados mostró anomalías en la biometría hemática durante la fase de viremia (Reyes-Leyva et al., 2004).

Por medio de ensayos de suero-neutralización se demostró que los anticuerpos provenientes de cerdos infectados con la cepa de PAC4 protegen contra el virus de la misma cepa hasta un 100% de protección, mientras que al confrontar los sueros con otras cepas se encontró 75% de protección contra PAC2, PAC6, PAC8 y PAC9; mientras que hubo un 83% de protección contra PAC3. Por otro lado sueros inmunes provenientes de la

cepa PAC9 protegen 82% contra la cepa PAC2 y PAC3, 91% contra PAC4 y 100% contra las cepas PAC6 y PAC8. El virus PAC4 es la primer variante de la cepa LPM (primer aislado); los virus PAC2 y PAC 3 son variantes similares al virus LPM y PAC4, sin embargo el resto de los aislamientos virales se observan filogenéticamente más distantes que los anteriores. Se observa que el virus más distante antigénicamente es PAC9 aislado en el año 2003 (Sánchez-Betancourt et al., 2008 a).

El sistema inmune del cerdo expresa células dobles positivas CD8+ CD4+, las cuales se han asociado a la respuesta antiviral. Después de 5 días de estimulación con el antígeno viral se estudiaron la presencia del fenotipo de las células T. Se encontró un incremento del 185% de las células CD4+ respecto al control y una presencia del 21% de células dobles positivas CD8+ CD4+, las cuales están casi ausentes en el control, se sugiere que estas células participan en la regulación de la respuesta inmune frente al PorPV en cerdos (Hernández et al., 1998). Durante la infección experimental con la cepa VLPM se ha observado un incremento en los niveles de las células T CD8+, CD4+ and CD2+ después de 10 días PI. Particularmente la población T CD8+ que se mantiene alta durante toda la infección hasta el estado de persistencia (Cuevas et al., 2009). Por otro lado, se ha logrado observar que los genes del IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  son estimulados en células SH-SY5Y infectadas con el RVP; y que la expresión de los genes involucrados en la inducción del estado antiviral STAT1, STAT2 y P48 es estimulada a bajas dosis de infección pero inhibida a altas concentraciones del virus. Esto sugiere que el virus podría tener algún mecanismo para inhibir la expresión de estos genes (Flores-Ocelot et al., 2011). En el trabajo de Pisanelli et al., en 2016, proponen que la proteína V del PorPV evade la respuesta al interferón tipo I pero no la del tipo II. Se encontró una reducción en los niveles de los transcritos de los genes ISG15 y MXA en células que expresan la proteína V del PorPV y estimuladas con el interferón tipo I comparadas con las células control. La proteína V no afecta los niveles de las proteínas STAT1 y STAT2, pero inhibe su translocación al núcleo. Además, la proteína V se une a la proteína STAT2 en células humanas y de cerdo, por ello, la proteína sirve como un antagonista de la respuesta a interferón tipo I.

## 2.6. Sinergismo del PorPV con otros patógenos

Se han llevado a cabo estudios para demostrar sinergismo entre el PorPV y otros virus de importancia clínica en cerdos. En 2008 se trató de demostrar esta asociación entre el *Herpesvirus suis* tipo 1 y el PorPV, se encontró que animales infectados con ambos virus expresaron signología clínica inespecífica cuyo patrón clínico consistió en cabeza baja, lagaña, dificultad respiratoria, depresión, anorexia, postración y somnolencia. Además se encontró mayor número de lesiones en tejidos y órganos; sin embargo comparado con los grupos infectados con un sólo tipo de virus no fue posible demostrar un aumento significativo en los signos del cuadro clínico. Por tanto no ha sido posible demostrar el sinergismo entre ambos virus, a pesar de los casos posibles que se han observado en campo (Pérez-Ponce, 2008).

También se determinó si puede existir un sinergismo entre la infección por PorPV y *Actinobacillus pleuropneumonie*. Una enfermedad viral que causa inmunodepresión y una bacteria gram-negativa que se ha descrito en cerdos persistentemente infectados con virus. Se usaron cerdos convencionales libres de enfermedades, inoculando por nebulización primero con PorPV y posteriormente con *A. pleuropneumonie* durante 30 min. Se lograron aislar ambos agentes infecciosos, con lesiones macroscópicas esperadas para ambos; sin embargo los resultados no muestran evidencias de sinergismo entre ambos ya que los signos y lesiones fueron similares en los grupos testigo (Torres-Pérez, 2005).

En el estudio presentado por Rivera-Benitez et al., en 2016, se evaluó los efectos al infectar con el virus de influenza porcina H1N1 (swH1N1) cerdos en crecimiento persistentemente infectados con PorPV. En este trabajo fue posible demostrar la co-infección de ambos virus mediante inmunohistoquímica del epitelio bronquial. Se observó un incremento de la temperatura rectal en 3 de 6 animales, un aumento en los signos respiratorios respecto al grupo infectado sólo con PorPV ó swH1N1 y un incremento en los niveles del swH1N1 en el segundo día después de la co-infección.

### *2.7. Avances en el diagnóstico de la enfermedad*

En el 2013 se demostró la posibilidad de detectar la infección persistente por PorPV mediante RT-PCR en tiempo real. A partir de leucocitos de sangre periférica se amplificó una región del gen P, analizando dos granjas confirmadas con PorPV en Zumpango-Estado de México y Pénjamo-Guanajuato, además fue posible la detección de la enfermedad en una granja de Toluca sin antecedentes de infección, en cerdos que serológicamente fueron negativos e incluso sin antecedentes de signos clínicos a ojo azul. La aplicación de este método mostró una alta sensibilidad, pudiendo detectar desde 100 a 0.1 ng/ $\mu$ L de ARN viral. Fue posible diferenciar entre concentraciones de ARN viral en las diferentes granjas y entre animales, indicando diferentes niveles de circulación del virus, por ello puede ser una herramienta importante para controlar y erradicar la enfermedad incluso dentro de un mismo recinto mediante el manejo de los animales, del uso conjunto de ELISA y el RT-PCR en tiempo real podría ayudar a la detección temprana de la enfermedad. Los resultados sugieren una relación entre el grado de infección de las granjas y la seroprevalencia actual de la enfermedad del ojo azul en la República Mexicana (Lara-Romero, 2013). Resultados similares han sido reportados por Cuevas-Romero et al., en 2013, utilizando la misma metodología, pudieron detectar hasta 10 copias del gen por reacción, determinando que la técnica es 1000 veces más sensible que el RT-PCR en punto final y es posible detectar cualquier variante del virus. En 2013, Rivera-Benítez et al., utilizaron la misma técnica para amplificar el gen NP, pudiendo detectar 20 copias por reacción con una sensibilidad de hasta el 87% en animales clínicamente enfermos (Rivera-Benítez et al., 2013 a).

### *2.8. Desarrollo de vacunas*

Varios han sido los reportes acerca del desarrollo de vacunas para prevenir y controlar la enfermedad del ojo azul de los cerdos. Fuentes et al., en 1994, reportaron 71.4% de protección en la evaluación de una vacuna experimental contra la enfermedad en cerdos mediante pruebas de inmunogenicidad, seguridad, potencia y medida de la inmunidad pasiva. En los trabajos presentados por Correa et al., en 2001, evaluaron la antigenicidad de una vacuna inactivada desarrollada por el INIFAP contra la EOA, por medio de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación. Se vacunaron lechones de 28 días de una granja de Uriangato, Guanajuato, que presentó un brote epizootico, observándose producción de

anticuerpos a partir de 37 días post vacunación. De manera más sobresaliente, en el trabajo de Martínez et al., en 2001, para dos granjas del mismo municipio donde fue diagnosticada la enfermedad, reportó el control de los brotes 8 días posteriores a la vacunación con la vacuna del INIFAP y después de casi 12 meses de seguimiento no se volvieron a reportar nuevos brotes en ambas granjas. En trabajos posteriores, Cuevas et al., en 2011, encontraron anticuerpos anti HN en sueros de 36 lechones procedentes de 3 madres que fueron inmunizadas con el antígeno recombinante HN del virus VLPM, demostrando la transferencia de inmunoglobulinas anti VLPM por medio del calostro durante la inmunización usando una proteína recombinante.

Actualmente, hay dos vacunas comerciales en el mercado que ofrecen una protección preventiva contra PorPV y están indicadas para animales de reemplazo. La producción de estas vacunas puede llegar a tener altos costos. El laboratorio Avimex, S. A. de C. V., ofrece una vacuna obtenida mediante infección de cultivo celular que consiste en una emulsión en aceite mineral, la cual contiene virus inactivados, adyuvantes e inmunoestimulantes. Está indicada para lechones, cerdos en etapa de desarrollo y pie de cría. Por otro lado Lapisa, S. A. de C. V., provee otra vacuna que contiene la cepa VLPM-CI y CIII, la cual contiene  $1 \times 10^6$  UFP, inactivadas químicamente y emulsionados en un adyuvante oleoso. Está indicada para animales de reemplazo, lechones, pie de cría, sementales y hembras.

### *2.9. Agente etiológico*

El PorPV es un virus pleomórfico, mediante microscopia electrónica se observan partículas con una morfología típica de un paramixovirus, usualmente son esféricos pero ocasionalmente pleomórficos con un diámetro de 150-160 nm, en su superficie se observan espículas de glicoproteínas similar a lo reportado para otros paramixovirus (Hernández-Jáuregui et al., 2001) (figura 8).

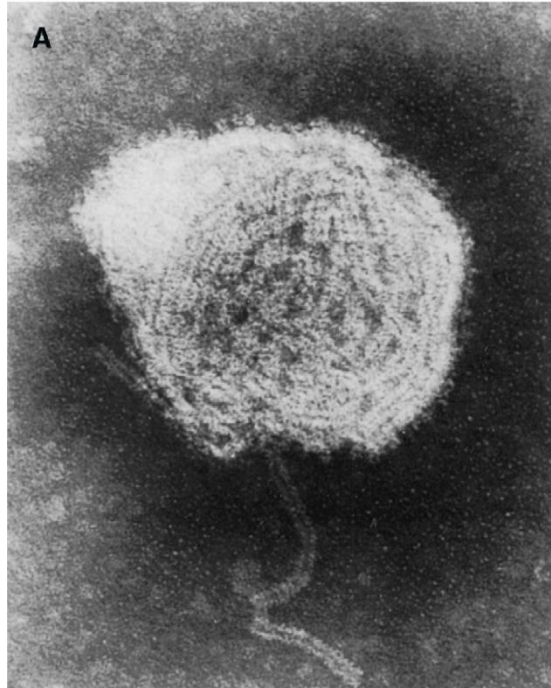


Figura 8. **Microscopía electrónica del PorPV.** Tinción negativa del virus mostrando una membrana irregular con proyecciones como espículas (X 85000); tomado de Hernández-Jáuregui et al., 2001.

### 2.10. Receptor celular

Por medio de ensayos de competencia usando una lectina de la planta (*Maackia amurensis*), específica para el oligosacárido NeuAc $\alpha$ 2,3Gal, así como también mediante la incubación del virus con este oligosacárido, fue posible inhibir la infección, mientras que la incubación con el oligosacárido NeuAc $\alpha$ 2,6Gal no logró inhibir la infección del virus, por tanto el reconocimiento de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal es muy importante, ya que es determinante en la infección y patogénesis del PorPV (Reyes-Leyva et al., 1997).

En estudios realizados por Mendoza-Magaña et al., en 2001, mediante western blot se analizaron las proteínas provenientes de diferentes cortes del cerebro de cerdos adultos y crías de 60 días de edad, se pudo observar que el PorPV reconoce a una proteína de aproximadamente 116 kDa en todas las muestras analizadas, tanto en animales adultos como en las crías. El PorPV es capaz de infectar neuronas y células gliales obtenidas de corteza cerebral, hipocampo y cerebelo y es posible que el PorPV se una específicamente al ácido siálico unidos a residuos de lactosa  $\alpha$ 2-3 en una parte de la glicoproteína neuronal de 116 kDa (Mendoza-Magaña et al., 2007).

En otros trabajos realizados para conocer la expresión de ácido siálico durante la maduración de los cerdos, se encontraron diferencias entre distintos grupos de edad, los cuales se deben en parte a la expresión diferencial de NeuAca $\alpha$ 2,3Gal en los tejidos, ya que se encuentra una mayor proporción de este oligosacárido en el sistema nervioso central de cerdos neonatos y en el sistema reproductor de cerdos adultos que en otros tejidos. Las diferencias en la expresión tisular de ácidos siálicos parecen guardar una relación con cambios hormonales durante el proceso de maduración de los animales (Vallejo et al., 2000; Reyes-Leyva et al., 2002).

### 2.11. Distribución del virus y efecto citopático en infecciones experimentales

Mediante inmuno tinción con oro y usando un anticuerpo contra la proteína HN, durante la infección experimental con PorPV en líneas celulares, se observan las partículas virales alrededor de la superficie de la membrana celular a los 5 min PI, después de transcurrido el tiempo se puede observar el virus a través del citoplasma a 60 min PI (Hernández-Jáuregui et al., 2001), que es aparentemente el tiempo que le lleva al virus llegar a la célula (figura 9).

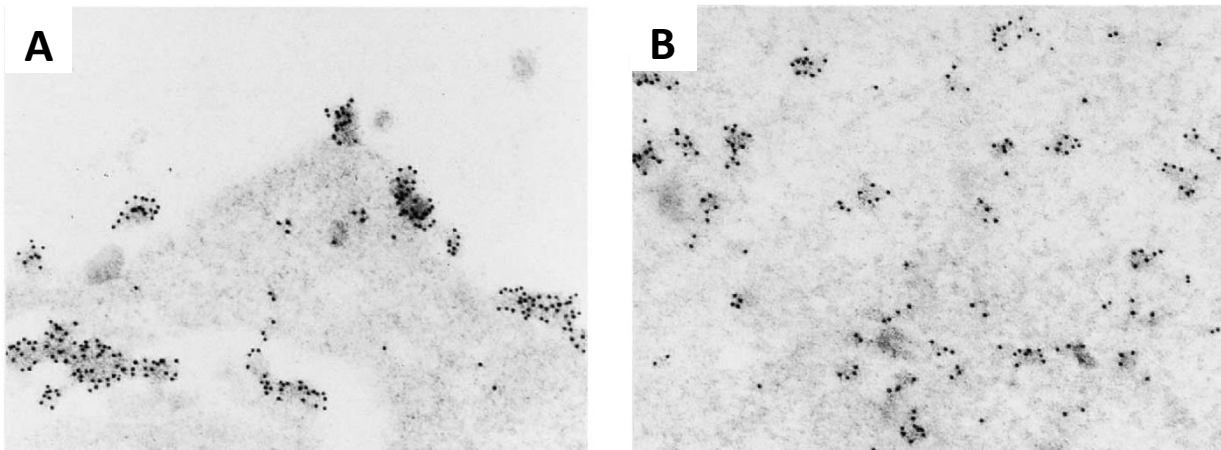


Figura 9. **Inmuno tinción del PorPV.** Tinción oro usando anticuerpos contra la proteína HN durante la infección con PorPV en la línea celular PK-15. (A) Tinción 5 min PI, (B) Tinción 60 min PI; tomado de Hernández-Jáuregui et al., 2001.

Durante la infección en cultivo celular utilizando la línea celular PK-15, el PorPV forma gran cantidad de células gigantes multinucleadas, conocidas como sincicios, 48 h PI,

que van acompañados de varios efectos sobre la células, entre las que se pueden observar necrosis, degeneración celular y múltiples cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Los sincicios generalmente contienen más de 50 núcleos (Hernández-Jáuregui et al., 2001), esto debido a las proteínas de la superficie del virus, la HN y la proteína de Fusión que se encargan de generar este efecto citopático (figura 10).

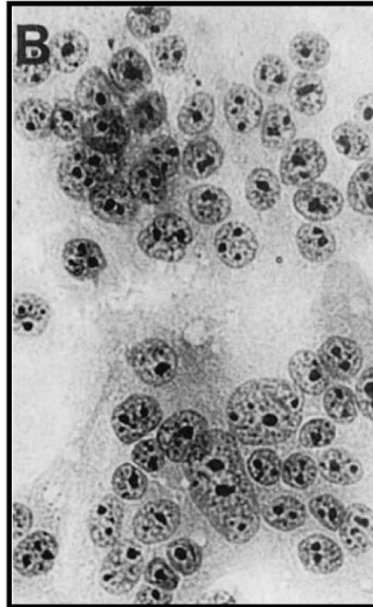


Figura 10. **Formación de sincicios.** Sincicios durante la infección con PorPV 48 h PI en la línea celular PK-15; tomado de Hernández-Jáuregui et al., 2001.

### 2.12. Ciclo replicativo del PorPV

El ciclo biológico del *Rubulavirus porcino* se puede observar en la figura 11, el cual incluye diferentes fases. En la primera fase de reconocimiento la proteína HN reconoce el receptor celular, el oligosacárido NeuAca<sub>2,3</sub>Gal) (figura 11, paso 1), posteriormente la proteína sufre un cambio conformacional que activa la proteína F. Bose et al., en 2012, proponen un modelo sencillo para la activación de la proteína F en los paramixovirus, en el cual la proteína HN alberga en su tallo la región de activación, una vez que se une al receptor celular, esta región queda expuesta y permite a la proteína F interactuar con la región de activación de la proteína HN. Mediante esta interacción la proteína F expone un dominio altamente hidrofóbico lo cual promueve la fusión de la membrana viral y celular (figura 11, paso 2). La fusión del virus a la membrana celular provoca la liberación del genoma al citoplasma (figura 11, paso 3). Reyes-Leyva et al., en 2002, describen el proceso en los rubulavirus una vez liberado el genoma, ya que poseen su propia polimerasa se



sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo que sirve de molde para los nuevos genomas (figura 11, paso 4), por otro lado, se sintetizan los mensajeros que codifican para las proteínas virales (figura 11, paso 5 y 6a). La proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular y las proteínas NP, P y L se acoplan al genoma recién sintetizado (figura 11 paso 7). Santos-López et al., en su revisión del 2004, describen que la proteínas HN y F son sintetizadas en el retículo endoplásmico, modificadas en el aparato de Golgi y finalmente expresadas en la membrana citoplasmática, en contacto con la proteína M (figura 11, paso 6b y 8). La afinidad que tienen las proteínas del genoma con la proteína M y esta con las proteínas HN y F promueve la formación de la partícula viral, la cual se libera por exocitosis (figura 11, paso 9). Gracias a la presencia de las proteínas HN y F en la membrana celular, la fusión de membranas sin la participación de toda la partícula viral es posible y de esta manera la infección también se puede propagar a células vecinas (figura 11, paso 10). La fusión de membranas durante la infección experimental con PorPV en líneas celulares se puede observar fácilmente mediante el microscopio de contraste de fases, como lo demuestran Borraz-Argüello et al., en 2008.

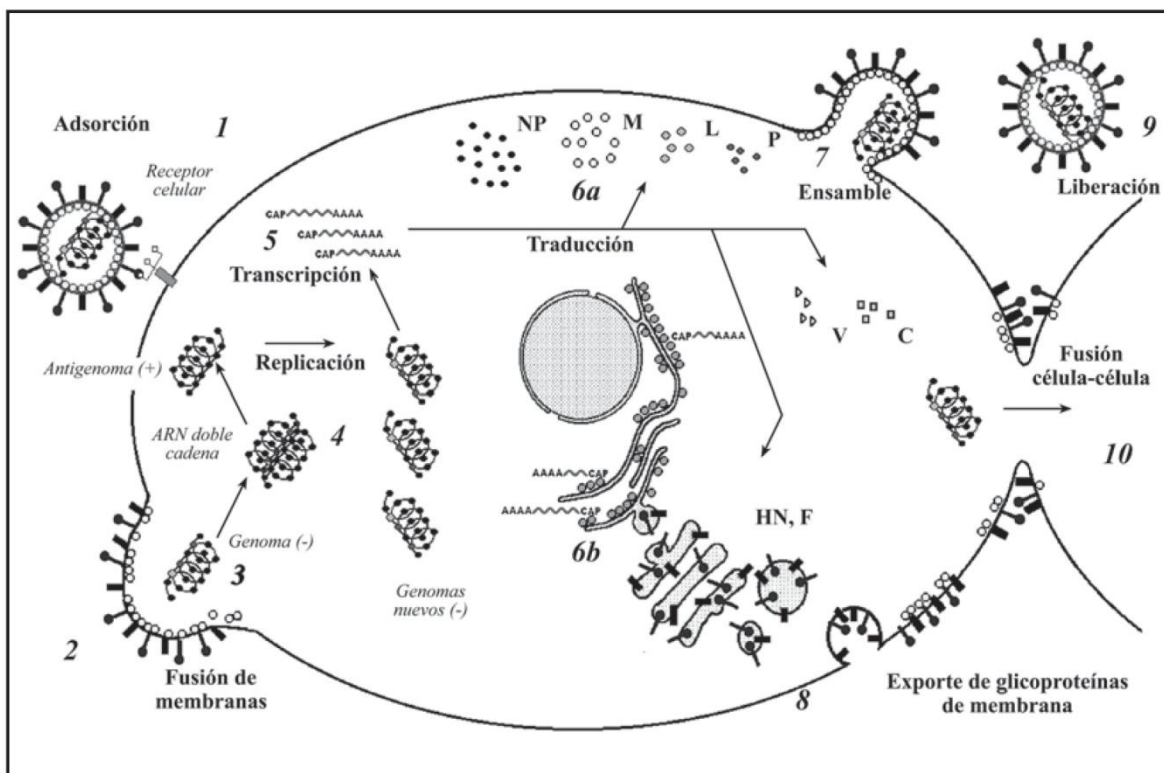


Figura 11. Ciclo replicativo de los paramixovirus; tomado de Santos-López et al., 2004.

### 2.13. Proteínas del PorPV asociadas a la envoltura

En el trabajo descrito por Sundqvist et al., 1990, se lograron identificar las proteínas del virus VLPM. Al menos seis proteínas estructurales se observaron en los geles de SDS-PAGE, con pesos moleculares de 200, 68, 66, 59, 52 y 40 kDa. Se identificaron dos proteínas glicosiladas (la hemaglutinina-neuraminidasa de 66 y la proteína de fusión de 59 kDa). Se logró identificar la fosfoproteína (P), correspondiente al peso de 52 kDa y la nucleoproteína NP de 68 kDa. Una proteína de 40 kDa se asoció con la proteína de Matriz (M) y una proteína de 200 kDa como parte catalítica de la polimerasa (L). Las proteínas las más abundantes fueron la proteína M y la NP. Al comparar los corrimientos electroforéticos con los de otros paramixovirus se encontró similitud con el Virus de Sendai, Virus de la enfermedad de Newcastle y el Virus de la Parainfluenza bovina tipo 3. En la figura 12, se presenta un esquema del PorPV donde se puede observar las diferentes proteínas que conforman la partícula viral. Las glicoproteínas HN y F se encuentran expuestas en la superficie de la membrana interaccionando con la proteína M. En la nucleocápside, las proteínas NP, L y P se asocian al genoma del virus.

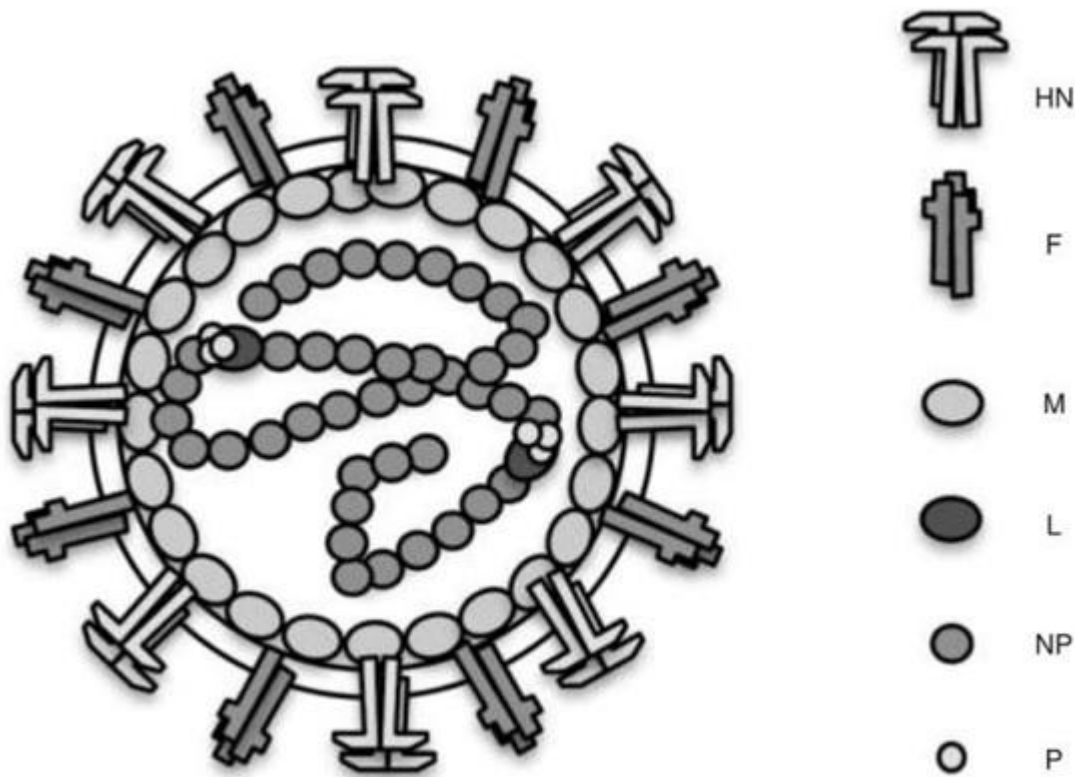


Figura 12. **Representación esquemática del PorPV.** Modificado de Cuevas-Romero et al., 2015.

La membrana del PorPV presenta tres tipos de proteínas: las glicoproteínas HN y F son transmembranales, con dominios activos en el exterior del virión y la proteína M asociada a la parte interna de la membrana.

El PorPV posee una proteína de matriz M, con 369 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 41657 Da, en general es hidrofóbica, posee una identidad del 46% con la proteína de matriz del virus de paperas humano (Berg et al., 1991). En el virus Sendai, la proteína de matriz M tiene funciones importantes durante la infección, se cree que media las interacciones entre las glicoproteínas de la membrana plasmática, el complejo ribonucleoproteína y el citoesqueleto de la célula hospedera durante el ensamble y gemación de los virus, además, se ha visto que está relacionada con la transcripción viral (Marx et al., 1974). En infecciones persistentes como el sarampión, el gen M se ha encontrado altamente mutado, dichas mutaciones afectan la estructura terciaria de la proteína, haciendo imposible que interactúe con la nucleocápside (Hirano et al., 1992). Sin embargo, en el caso del PorPV, que también causa persistencia, se han logrado identificar, en aislamientos de zonas enzóticas provenientes del Estado de México por medio de RFLP, bajos porcentajes de mutaciones en este gen, indicando que existen cambios importantes en la proteína de matriz una vez que la infección se establece (Arreola-Ledesma, 2005).

La glicoproteína F es muy conservada entre los miembros de la familia *Paramyxoviridae* y otras familias de virus con genoma de ARN de cadena negativa. Esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca en el citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular. La proteína de fusión F es una proteína de 541 residuos de aminoácidos, posee tres regiones hidrofóbicas que corresponden al péptido señal, el péptido de fusión y el dominio de anclaje a la membrana. El gen de esta proteína es relativamente estable, ya que sólo se han encontrado pocos cambios en los nucleótidos entre los aislados de 1984 a 1988. Posee un sitio de procesamiento que consiste en una serie de aminoácidos básicos (HRKKR), lo que la hace

susceptible a la proteólisis y posee cinco sitios potenciales de N-glicosilación (Berg et al., 1997). En contraste, en el trabajo de Cuevas-Romero et al., en 2016, un aislado proveniente de ARN de la proteína F del PorPV obtenido de pulmón del Estado de Jalisco, mostró sustituciones en el sitio de procesamiento (RRRKR en lugar de HRKKR) y estos cambios pueden estar relacionados con el tropismo y patogenicidad del virus.

Al parecer, durante la interacción con los receptores celulares la HN sufre un cambio de conformación que permite contactar un dominio de la proteína F, que a su vez expone el péptido hidrofóbico involucrado directamente en el ataque a la membrana celular, para iniciar de esta forma la introducción a la célula hospedera. Esta interacción F-HN es específica de especie viral, ya que se ha observado que la co-expresión en cultivos celulares de proteínas de distintos paramixovirus no producen fusión celular (Deng y col., 1995).

#### 2.14. La hemaglutinina neuraminidasa HN

La HN es la principal estructura relacionada con las primeras etapas de la infección por el PorPV, es decir, durante el reconocimiento de la célula hospedera, la unión, la fusión y la penetración (Lamb y Kolakofsky, 1995). La proteína purificada por intercambio iónico está constituida principalmente por aminoácidos hidrofóbicos y no polares con un peso molecular aproximado de 66 kDa calculado en geles de SDS-PAGE, de los cuales un 4% del peso de la proteína corresponde a los carbohidratos, donde se han podido identificar residuos de manosa, galactosa, N-acetyl-glucosamina, N-acetyl-galactosamina y ácido N-acetyl-neuraminico en una proporción molar de 3:3:4:1:1. Es capaz de aglutinar los eritrocitos de humano, cerdo, caballo, conejo, rata, ratón y pollo. Por medio de ensayos de inhibición de la hemaglutinación se observó que sólo el Neu5Ac( $\alpha$ 2,3)lactosamina y la incubación a 65 °C por 30 min son inhibidores de la actividad hemaglutinante (Reyes-Leyva et al., 1999).

La proteína posee actividad de neuraminidasa, en una estructura del disacárido sialil $\alpha$ 2,3galactosa, la enzima es capaz de remover un residuo de ácido N-acetil-neuramínico unido en enlace glicosídico alfa al carbono 3 de la galactosa (figura 13). Los

estudios indican que esta molécula es componente del receptor celular del *Rubulavirus porcino* (Reyes-Leyva et al., 2002).

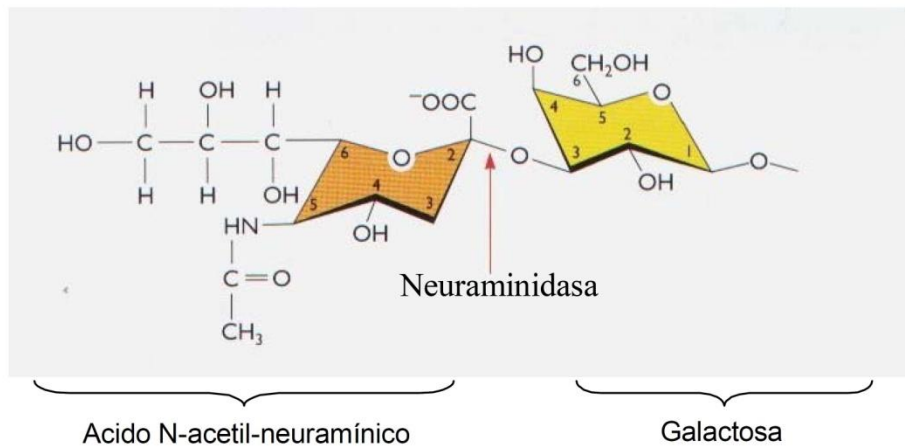


Figura 13. **Estructura del disacárido sialilo2,3galactosa.** Se muestra el sitio de corte de la enzima neuraminidasa; tomado de Reyes-Leyva et al., 2002.

Mediante purificación por isoelectroenfoque se determinó que el punto isoeléctrico de la proteína es de 4.4, tuvo la mayor actividad a un pH de 3 a 3.5 en un amortiguador de acetatos 0.1 M, con una temperatura óptima de 37 °C, aunque mantiene más del 80% de su actividad en un rango de 30 a 55 °C (Santos-López et al., 2004). Posee 576 residuos de aminoácidos con un peso molecular de la secuencia aminoacídica de 63.3 kDa, además de 4 sitios potenciales de glicosilación. Posee una región hidrofóbica cercana al N-terminal sugiriendo el dominio de anclaje a la membrana. Al comparar la secuencia aminoacídica con otros paramixovirus se encontró un 43% de identidad con el virus de simio 5 y un 41% con el virus de las paperas (Sundqvist et al., 1992).

En estudios de predicción de la estructura de la proteína HN indican que su plegamiento se organiza en cadenas  $\beta$  antiparalelas. La región hidrofóbica es una cadena  $\beta$ , aunque es poco común para un dominio transmembranal y tiene una alta tendencia a formar trímeros o tetrámeros (figura 14). Posee varias regiones altamente conservadas que poseen funciones estructurales y enzimáticas, uno de ellos se encuentra en los residuos de aminoácidos 233-239, cuya secuencia es NRKSCSI/V/L, el cual posiblemente este asociado a variaciones antigénicas, alteraciones conformacionales, formación de sincicios y una drástica disminución de la actividad neuraminidasa. Otro de ellos es la secuencia

GA/SEGRI/V/L presente en los residuos de aminoácidos 398-404, probablemente implicado en el procesamiento intracelular y en el plegamiento adecuado de la proteína (Zenteno-Cuevas et al., 1998).

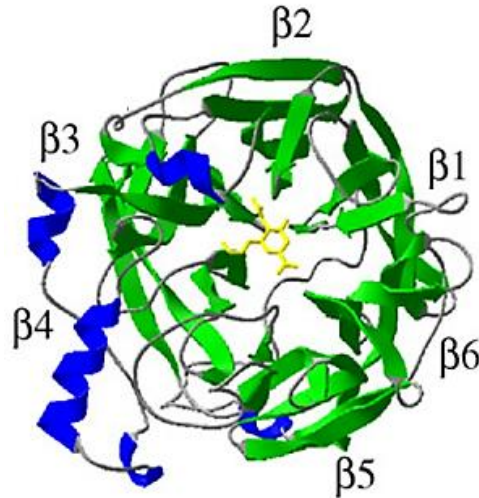


Figura 14. **Predicción estructural de la hemaglutinina neuraminidasa;** tomado de Sánchez-Betancourt et al., 2008.

Esta proteína forma dímeros y tetrámeros que exponen varios sitios de unión al receptor celular sobre la membrana viral (Markwell y Fox, 1980; Reyes-Leyva et al., 2002).

Mediante western blot, utilizando sueros de cerdos infectados experimentalmente, se observó su capacidad de reconocimiento hacia las proteínas del PorPV a lo largo del tiempo. Se pudo observar respuesta hacia las proteínas HN, NP y M, habiendo una predominancia antigénica hacia la proteína HN, ya que seis de los siete animales analizados fueron capaces de reconocer la proteína desde la segunda semana PI y a las 3 semanas todos los animales responden contra la proteína. Respuesta contra la proteína M se observó hasta la cuarta semana PI en sólo tres animales y respuesta hacia la proteína NP fue observada a partir de la cuarta semana PI en cuatro animales, llegando a responder seis animales hasta la semana 7 (Hernández et al., 1998) (figura 15).

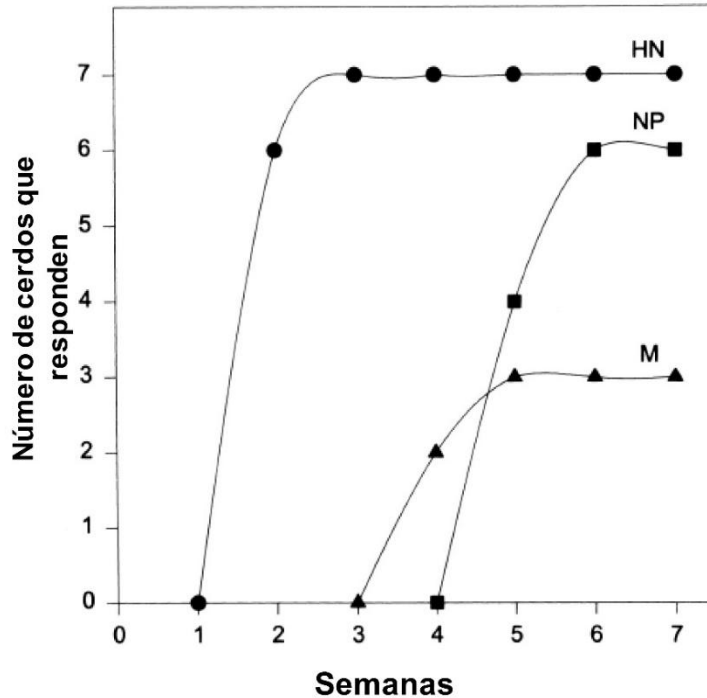


Figura 15. **Reconocimiento de las proteínas del PorPV.** Reconocimiento por sueros de animales infectados experimentalmente; tomado de Hernández et al., 1998.

### 2.15. Expresión de la proteína HN del PorPV en sistemas heterólogos

Han sido pocos los ejemplos de expresión de proteínas recombinantes del PorPV. La HN ha sido en la mayoría de los casos la proteína de mayor interés para producirla debido a lo descrito por todos los investigadores acerca de su importancia para establecer la infección y la respuesta inmune observada en los animales. El Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Genética y Biología Molecular se presentan dos ejemplos. En el trabajo de Aguilar-Martínez, en 2001, se clonó el gen de la HN de las cepas CI, CII y CIII en un vector de expresión, posteriormente se realizó la expresión *in vitro* utilizando un sistema de transcripción-traducción acoplado, la expresión mediante el sistema baculovirus infectando células de insecto Sf-9, sin embargo al realizar el reconocimiento de las proteínas utilizando un anticuerpo monoclonal contra la HN del virus, no se logró observar reconocimiento hacia las proteínas heterólogas. En el trabajo de Paniagua-Buelnas, en 2011, se expresó la proteína HN de la cepa CI *in vitro* utilizando nuevamente un sistema de transcripción-traducción acoplado con la adición de vesículas microsomales, logrando observar proteína

glicosilada cuyo peso molecular aumento pero no se logró observar reconocimiento por parte de los anticuerpos dirigidos contra la HN. Con estos trabajos se logró demostrar que la proteína posee cambios postraduccionales específicos y necesarios para generar respuesta inmune, que son difíciles de obtener en sistemas heterólogos.

Paralelamente a nuestro trabajo de tesis, participamos en dos trabajos de expresión: en el trabajo realizado por Flores-González, en 2015, se clonó el gen del ectodominio de la HN de la cepa de PAC1 en un vector de expresión para la levadura de *Schizosaccharomyces pombe*, ya que es un sistema de expresión heterólogo capaz de llevar a cabo glicosilaciones similares a las de organismos superiores. La proteína producida en la levadura pudo ser reconocida por sueros de cerdos infectados con PorPV y con el anticuerpo anti *c-myc*, etiqueta colocada en el C-terminal de la proteína para facilitar su reconocimiento en western blot. Así también Lara Romero, en 2015, expresó la proteína HN en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli*, la cual se purificó por cromatografía de afinidad en forma soluble, obteniendo una proteína que pudo ser identificada mediante western blot, sin actividad de neuraminidasa y que fue detectada por sueros de cerdos infectados con PorPV, abriendo la posibilidad de evaluar la proteína como inmunógeno potencial para incorporarlo en sistemas de detección de la enfermedad o como componente de una vacuna.

#### 2.16. Pichia pastoris como sistema de expresión

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se ha convertido en un organismo para expresión de proteínas de gran importancia por sus altos niveles de producción. Puede crecer en altas densidades celulares, posee un eficiente sistema secretorio y existen muchas herramientas para su manipulación en laboratorio. Además, se ha convertido en una interesante e importante alternativa respecto a los sistemas de expresión bacterianos como *E. coli*, en especial, cuando se requiere la producción de proteínas complejas que requieren modificaciones postraduccionales típicas de los organismos eucariontes o la formación de puentes disulfuro (Cereghino et al., 2002) (figura 16).



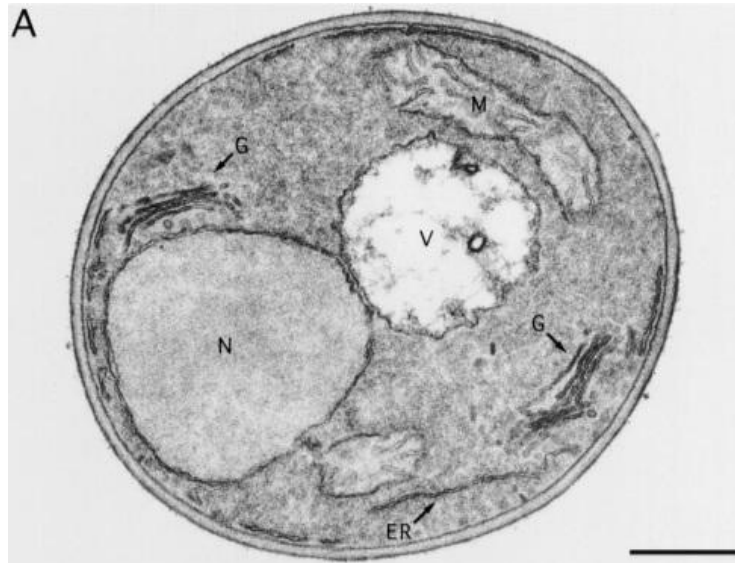


Figura 16. **Levadura *P. pastoris***. Corte delgado de una célula de *P. pastoris* observado por microscopía electrónica. (G) aparato de Golgi, (ER) retículo endoplasmático, (N) núcleo, (M) mitocondria, (V) vacuola; tomado de Rossanese et al., 1999.

La capacidad de la levadura para utilizar el metanol como única fuente de carbono es un aspecto crucial en su metabolismo. La enzima alcohol oxidasa (AOX, EC. 1.1.3.13) cataliza el primer paso en la ruta de utilización del metanol (Hartner y Glieder, 2006). El genoma de *P. pastoris* contiene dos genes, AOX1 y AOX2, que codifican para dos enzimas con actividad de alcohol oxidasa (Cereghino y Cregg, 2000). AOX1 comprende arriba del 30% del total de la proteína soluble en los extractos de la levadura cuando se crece con metanol como única fuente de carbono (Couderc y Baratti, 1980), razón por la cual se utiliza el promotor de AOX1 como estrategia en la expresión de proteínas foráneas. Por otro lado la segunda alcohol oxidasa AOX2 es controlada por un promotor mucho más débil, aportando solamente el 15% del total de la actividad alcohol oxidasa en la célula (Cregg et al., 1989).

Se han observado tres fenotipos en la levadura en cuanto a la utilización del metanol, las cuales se encuentran disponibles de manera comercial: Mut<sup>+</sup> (capaces de degradar el metanol) donde ambos genes AOX están intactos e inactivos, Mut<sup>S</sup> (baja degradación del metanol) donde el gen de AOX1 se encuentra interrumpido, Mut<sup>-</sup> (mínima

degradación del metanol), la cual es incapaz de sobrevivir en presencia del metanol por interrupción de ambos genes de AOX (Cereghino y Cregg, 2000).

En las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>S</sup> la transcripción de los genes de AOX se reprime cuando se cultiva a la levadura en concentraciones altas de glicerol o glucosa como fuente de carbono y la expresión de la proteína alcanza niveles altos cuando se cambia la fuente por metanol debido a la falta de estas fuentes de carbono (Cregg et al., 1989). La represión a bajas concentraciones de glucosa o glicerol puede ser usada para una fuerte inducción si se usan diferentes variantes del promotor de AOX1 (Hartner et al., 2008).

Los vectores de expresión para *P. pastoris* contienen un origen de replicación para su mantenimiento y propagación en *E. coli* y marcadores de selección funcionales en ambos organismos. Muchos de estos vectores contienen un casete de expresión compuesto por un fragmento de 0.9 kb del promotor de AOX1, el cual contiene la región 5' del promotor y una pequeña secuencia deriva de un fragmento derivado de AOX1 necesario para terminar la transcripción (Koutz et al., 1989). Entre el promotor y el terminador se encuentra el sitio de clonación múltiple para la inserción del gen foráneo. Generalmente, los mejores resultados de expresión del gen foráneo se logra cuando el ATG de este se coloca lo más cerca posible del ATG de la alcohol oxidasa. Además, para la secreción de las proteínas existen vectores donde el marco de lectura de la proteína se encuentra en fase con el de la señal de secreción de *P. pastoris* de la ácido fosfatasa (PHO1) o la señal del factor alfa ( $\alpha$ -MF) de *S. cerevisiae* (Cereghino y Cregg, 2000).

*P. pastoris* es capaz de realizar tanto O- como N-glicosilación en las proteínas secretadas (Goochee et al., 1991). Algunas proteínas foráneas secretadas en *P. pastoris* parecen estar hiperglicosiladas, de forma similar a lo observado en *S. cerevisiae*. La adición de N-oligosacáridos ricos en manosas a las proteínas, por el sistema secretorio de la levadura puede llegar a ser un grave problema para su uso farmacéutico. Usando diversas técnicas para elucidar el perfil de los oligosacáridos adicionados en las proteínas secretadas por la levadura, se ha observado que las cadenas típicamente contienen Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> o Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Montesino et al., 1998). Otra característica es la presencia de las manosas

con enlace  $\alpha$ 1-6 reportadas para varias proteínas secretadas por la levadura (Trimble et al., 1991; Miele et al., 1997). Finalmente parece ser que los oligosacáridos de la levadura no presentan el enlace  $\alpha$ 1-3 en las cadenas de manosas (Trimble et al., 1991).

Debido a estas ventajas, la expresión del eHN del PorPV en *P. pastoris* con características similares a la proteína nativa podría generar potenciales herramientas en la prevención de la enfermedad y con la producción de la proteína eHN en sistemas de expresión heterólogos, existe la probabilidad de generar una posible vacuna de nueva generación que ofrece múltiples ventajas respecto a las vacunas de virus inactivados, como lo son los costos menores, la disponibilidad, seguridad, entre otros.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad del ojo azul de los cerdos en la industria pecuaria en México, existe la necesidad de generar nuevas herramientas que permitan obtener opciones preventivas de bajo costo, seguras y adaptables a las variantes antigénicas del PorPV. Estudios recientes muestran que la región centro-oeste de México posee una prevalencia serológica importante del PorPV, en la que circulan cepas antigénicamente diferentes, lo que sugiere que el uso de una vacuna con un solo tipo de antígeno puede no ser eficaz para el control de la enfermedad. Las proteínas recombinantes provenientes de sistemas de expresión como las levaduras pueden generar los mejores resultados gracias a su fácil manipulación para producir diversas variantes de las proteínas y siendo la HN la proteína más inmunogénica del virión, su producción en sistemas de expresión heterólogos y caracterización antigénica podría dar origen al diseño de un posible recurso preventivo de nueva generación.

### 4. HIPÓTESIS

El ectodominio de la proteína HN del *Rubulavirus porcino* expresado en el sistema de la levadura *P. pastoris* es una proteína enzimáticamente activa e inmunogénica, capaz de inducir anticuerpos con propiedades inhibitoras de la replicación del virus en cultivo celular.

## 5. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

Producir el ectodominio de la proteína HN (eHN) del *Rubulavirus porcino* en el sistema de expresión *P. pastoris* y evaluar su capacidad para inducir anticuerpos inhibidores de la replicación del virus en infecciones en cultivo celular.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cepas de *P. pastoris* productoras de la proteína eHN del *Rubulavirus porcino*.
- Evaluar la actividad enzimática de la proteína eHN proveniente de la levadura.
- Evaluar la antigenicidad de la proteína eHN recombinante.
- Producir anticuerpos policlonales anti-eHN en un modelo murino.
- Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-eHN contra la replicación del *Rubulavirus porcino*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Predicción del ectodominio de la HN y de sus regiones antigénicas

La secuencia nucleotídica de la HN de la cepa de PAC1 se tomó de GenBank (número de acceso: [KP229773](#)), el marco de lectura (ORF) se encontró mediante el programa PROTEAN (DNASTAR), ubicando la porción hidrofóbica mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). Las regiones antigénicas se predijeron mediante el algoritmo de Jameson-Wolf (1988), los sitios de glicosilación con el programa en línea NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al., 2004) y las regiones transmembranales con el programa en línea TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al., 2001).

### 7.2. Amplificación por PCR del segmento codificante de eHN

La secuencia del eHN se amplificó por PCR usando como plantilla el vector pJET-HN, que contiene todo el marco de lectura de la HN-PorPV de PAC1 (Santos-López et al., en prensa). Para la PCR se usó el iniciador delantero HNRppS (5'-CAC CGA ATT CTT GGT AAC CTG CAG AGT ACA-3') y el iniciador reverso HNRppA (5'-CGC GTC TAG ATA GCG TGA TTG AAT CT-3'), que contienen los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* (subrayados en la secuencia) respectivamente e hibridan en la posición 182 al 1728 del ORF del gen de HN. La PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 50 µl, con 25 µl de PCR Master Mix 2X (Fermentas), 1 µM de cada iniciador y 1 µg de ADN plasmídico como molde. El programa de amplificación se estableció como 95 °C por 2 min de pre-desnaturalización, seguido de 30 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 6 min de extensión final. El producto de PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (w/v).

### 7.3. Clonación del marco de lectura del eHN en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt

El fragmento amplificado (1567 pb con los sitios de restricción incluidos) se extrajo y purificó de gel usando el sistema comercial GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas) y a continuación se insertó en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt (Fermentas). Brevemente, la concentración del producto de PCR se cuantificó en el gel de electroforesis, respecto a la concentración conocida en el marcador de peso molecular. El inserto se agregó en una

relación molar aproximada 1:3 (vector/inserto) a 10 µl del amortiguador de reacción 2X, 1 µl de la enzima *blunting DNA* y se completó con agua para un total de 18 µl de mezcla. Se incubó a 70 °C 5 min y se llevó a choque térmico en hielo. Se agregó el vector pJET1.2/Blunt (50 ng/µl) en la relación molar requerida y 1 µl de ligasa para un volumen final de mezcla de ligación de 20 µl. Se incubó a 22 °C 2 h y posteriormente 4 °C por 16 h. Esta mezcla se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*.

#### 7.4. Preparación de células competentes de *E. coli* y transformación

El producto de ligación (vector + inserto) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* One Shot Top 10 (Invitrogen). Las células competentes prepararon acorde al método de Cohen et al. (1972). Brevemente, 5 ml de un precultivo de medio LB de células de *E. coli* One Shot Top 10, crecido 37 °C por 16 h, se usó 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 pasó a un tubo de 50 ml y se colocó en hielo por 10 min. Las células se recuperaron por centrifugación a 4100 rpm 10 min 4 °C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y el tubo se colocó en posición invertida para eliminar trazas del medio. El paquete celular se re-suspendió en 15 ml de una solución fría de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>). Las células se recuperaron por centrifugación, se eliminaron las trazas de solución del paquete celular y se resuspendieron en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío. Las células se dejaron en reposo a 4 °C por 12 h.

Posteriormente, 200 µl de células competentes se utilizaron para cada transformación. Se les adicionó el vector en un volumen no mayor a 10 µl y menos de 50 ng de ADN de transformación. La mezcla se colocó en hielo por 30 min y se llevó a choque térmico a 42 °C por 90 segundos exactamente, después se colocó en hielo de 1 a 2 min. Se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubó a 37 °C por 5 min con agitación moderada. Se transfirieron 200 µl de medio a cajas de agar LB + antibiótico y se crecieron a 37 °C por 16 h.

Las transformantes positivas que aceptaron el vector fueron seleccionadas picando 1 sola colonia que fue inoculada en 5 ml de medio LB con antibiótico (100 µg/ml) e incubada toda la noche a 37 °C.

### 7.5. Extracción de ADN plasmídico (*maxipreps*)

Se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). La cepa transformada se creció en 5 ml de medio LB + antibiótico a 37 °C 16 h. Todo el pre cultivo se usó para inocular 50 ml de medio LB y se dejó en crecimiento hasta turbidez completa. Las células se recuperaron por centrifugación a 3600 rpm 5 min 4 °C. El paquete celular se re-suspendió en 5 ml de la solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA), 10 ml de la solución II (0.2 N NaOH, 1 % SDS) y 7.5 ml de la solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético, 28.5 ml de agua). Se colocó en hielo por 10 min (se forma un precipitado blanco floculante que corresponde al ADN cromosomal, proteína, ARN de alto peso molecular, membrana, SDS y potasio). La solución se mezcló mediante vórtex por varios segundos. Se centrifugó a 4000 rpm 15 min 4 °C. Se filtró con papel filtro estéril para eliminar la parte insoluble y 0.6 volúmenes de isopropanol frío se mezclaron con la solución. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 min. El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a 5000 rpm 15 min. El sedimento se dejó secar 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 500 µl de agua.

El ADN plasmídico se trató con RNasa 15 min a 37 °C. Después, se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló mediante vórtex, se centrifugó a 12000 rpm 10 min. Se recuperó la fase soluble y se adicionó 1 volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 2.5 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN a -20 °C por 1 h. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar 5 min a temperatura ambiente. El ADN se re-suspendió en agua y se cuantificó espectrofotométricamente.

### 7.6. Subclonación en el vector de expresión *pPICZaB*

El ADN plasmídico purificado se digirió con la enzima *XbaI* (Fermentas) 4 h 37 °C para identificar la orientación en la cual se clonó el producto de PCR, como estrategia importante para asegurar que el inserto quede en fase una vez clonado en el vector de expresión, debido a que el vector *pJET1.2/Blunt* presenta también el sitio de corte *XbaI*.



Una vez que se identificó la orientación del inserto en el vector, el ADN plasmídico se sometió a una doble digestión, primero con *EcoRI* (Fermentas) 16 h 37 °C. El vector linearizado se purificó a partir del gel de electroforesis, subsecuentemente se digirió con *XbaI* (Fermentas) 4 h 37 °C para liberar el fragmento de eHN y nuevamente se purificó a partir del gel. El producto de digestión se ligó en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pPICZ $\alpha$ B (Invitrogen) digerido con *EcoRI/XbaI*, usando una relación molar aproximada de 1:3 (vector/inserto) para formar el vector pPICZ $\alpha$ B-HN, quedando en fase un solo marco de lectura abierto desde el codón de inicio del vector, comenzando con la secuencia de señalización denominada factor  $\alpha$  y terminando en el codón de paro TGA después de la etiqueta de polihistidinas. Los vectores recombinantes se purificaron a partir de las cepas transformadas de *E. coli* One Shot Top 10, seleccionadas en presencia de 25  $\mu$ g/ml del antibiótico Zeocina (Invitrogen) y después del análisis de restricción se confirmaron por secuenciación. Los insertos en los vectores se secuenciaron usando los iniciadores 5' AOX y 3' AOX (Invitrogen) en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM) de Cuernavaca mediante secuenciación automatizada en un equipo Applied Biosystems.

#### 7.7. Preparación de células competentes y transformación de *P. pastoris* X33

Las células competentes de *P. pastoris* X33 se prepararon acorde a las instrucciones de la compañía Invitrogen. Brevemente, las células se cultivaron en medio YPD como precultivo. Después, se inocularon 50 ml de medio YPD y se incubó a 30 °C con agitación a 200 rpm, comenzando con una D.O. de 0.1 a hasta alcanzar una D.O. de 1 a 600 nm. Se recuperaron las células por centrifugación a 1500xg por 10 min a temperatura ambiente, el paquete celular se lavó con 25 ml de agua destilada a temperatura ambiente, se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 ml de 100 mM de LiCl. Finalmente, las células se empaquetaron a velocidad máxima por 15 s para remover el LiCl y volver a re-suspender en 400  $\mu$ l de LiCl 100 mM. Las células se alicuotaron en tubos con 50  $\mu$ l de células para cada transformación. Para la transformación, se removió el LiCl de cada alícuota por centrifugación y las células se resuspendieron en 240  $\mu$ l de PEG 50%, después se añadieron 36  $\mu$ l de LiCl 1 M, 25  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón (2 mg/ml) y el vector pPICZ $\alpha$ B-HN linearizado (~10  $\mu$ g). La mezcla se incubó a 30 °C 30 min sin agitación y

posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C 25 min. Las células se recuperaron por centrifugación a 6000 rpm 5 min y se resuspendieron en 1 ml de medio YPD, se incubaron a 30 °C por 1 h con agitación moderada. Las transformantes fueron seleccionadas en placas de agar YPD con 200 µg/ml de Zeocina después de 3 días de incubación a 30 °C.

#### 7.8. Análisis de las transformantes de *P. pastoris* X33

Las colonias se confirmaron por PCR a partir de ADN genómico purificado. El ADN se extrajo según Hoffman, en 2011, con algunas modificaciones. Brevemente, 3 ml de un cultivo de YPD+zeocina se incubó a 30 °C por 24 h, las células se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm por 2 min. El paquete celular se lavó con 500 µl de agua, se centrifugó y posteriormente se re-suspendió en 200 µl de una solución de lisis (2% de Tritón X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 0.38 mM de EDTA) y 200 µl de fenol:cloroformo:alcoholisoamilico (25:24:1), posteriormente se realizó el rompimiento con perlas de vidrio y vórtex. El lisado se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se recuperó la fase acuosa y se incubó con RNasa (37 °C por 15 min). Posteriormente se adicionó 1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 por cada 10 volúmenes de mezcla y 2.5 volúmenes de etanol frío. La mezcla se dejó precipitar 2 h a -20 °C, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm 15 min, el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 75%, se centrifugó y se dejó secar a temperatura ambiente 5 min. Finalmente el ADN se resuspendió en 50 µl de agua. La PCR se llevó a cabo usando los pares de iniciadores utilizados para obtener la secuencia de eHN y con las condiciones descritas anteriormente. El fenotipo Mut<sup>+</sup> de las colonias positivas se determinó por réplica de crecimiento en medio mínimo de metanol + histidina (MMH), medio mínimo de dextrosa + histidina (MDH) y por PCR usando los iniciadores 5'AOX y 3'AOX que amplifican el promotor nativo de AOX1 de *P. pastoris* y un fragmento del vector pPICZαB-HN (que posee el sitio de corte *EcoRI*). Posteriormente los productos se digirieron con la enzima *EcoRI* (Fermentas) y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % (w/v). Finalmente las cepas se denominaron X33-eHN<sub>62-576</sub>.

### 7.9. Caracterización del crecimiento celular de X33-eHN<sub>62-576</sub> en YPD y BMGY

El crecimiento celular se monitoreó a lo largo del tiempo en medio YPD y medio complejo de glicerol tamponado (BMGY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada de levadura, 0.00004 % de biotina y 1% de glicerol) comenzando a una D.O. de 0.2 a 600 nm.

Para calcular el peso seco de la levadura a lo largo del cultivo se realizó un gráfico de peso seco vs D.O. a 600 nm. La cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> se cultivó bajo el modelo de crecimiento expresado en la ecuación 1. El modelo se integró a su modelo logístico para obtener la ecuación 2. Mediante el uso de la herramienta “solver” de Excel se iteraron los valores experimentales partiendo de un mínimo. Para calcular el tiempo de duplicación se integró la ecuación 3 de crecimiento. Se sustituyó la igualdad  $x=2x_0$  y se despejó la variable tiempo, finalmente el tiempo se obtuvo de la ecuación 4. De esta forma se obtuvieron los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de la levadura (tabla 2).

Tabla 2. Ecuaciones del modelo de crecimiento.

1	$\mu = \mu_{\max} * (1 - X/X_{\max})$	3	$\frac{dx}{dt} = \mu x$
2	$x = \frac{x_0 \times e^{\mu_{\max} \times t}}{1 + \frac{x_0}{x_{\max}} (e^{\mu_{\max} \times t} - 1)}$	4	$t = \frac{\ln 2}{\mu}$

### 7.10. Expresión de la proteína eHN en X33-eHN<sub>62-576</sub>

La inducción de la expresión de la proteína se llevó a cabo según Cregg y Higgins (1995), con algunas modificaciones. Un precultivo de 5 ml de YPD crecido a 30 °C por 24 h con la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> se utilizó para inocular 100 ml de medio complejo de glicerol tamponado (BMGY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada de levadura, 0.00004 % de biotina y 1% de glicerol), en matraces de 250 ml a 30 °C y 250 rpm, hasta llegar a una D.O. de 8 a 600 nm.

Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 ml de medio complejo de metanol tamponado (BMMY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada de levadura, 0.00004 % de biotina y 0.5% de metanol), en matraces de 500 ml y se incubaron a 30 °C con agitación a 250 rpm para inducir la expresión. Se dejó en crecimiento alimentando con metanol a una concentración final de 0.5% cada 24 hrs durante 8 días.

### 7.11. RT-PCR

Para la extracción de ARN se tomó 1 ml de células X33-HN<sub>62-576</sub> llevadas a expresión, se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm 5 min 4 °C. El paquete celular se lavó dos veces con 1 ml de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) 0.1 %. Las células se resuspendieron en 30 µl de amortiguador de zimoliasa (50 mM ácido cítrico pH 5.6, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 5.6, 40 mM EDTA pH 8, 1.2 M sorbitol) con 0.1 mg de enzima (Zimoliasa 20T, Immuno). Se incubó a 37 °C por 30 min. Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen), se mezcló con vórtex durante 10 min y se incubó a 30 °C 5 min. Se adicionaron 200 µl de cloroformo y posteriormente se volvió a mezclar con vórtex. Se centrifugó a 12000 rpm 15 min 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 2.5 volúmenes de isopropanol. El ARN se precipitó a -20 °C por 16 h y se recuperó por centrifugación a 12000 rpm 15 min 4 °C. El sedimento se secó a temperatura ambiente 5 min, se re-suspendió en 30 µl de agua DEPC 0.1 % y se incubó a 60 °C 10 min. Finalmente la concentración se calculó en espectrofotométricamente y por electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % (w/v). Después, 1 µg de ARN se trató con DNasa 15 min a 37 °C. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo usando el sistema comercial SuperScript One-Step RT-PCR with Platimun *Taq* (Invitrogen), en una mezcla de reacción de 50 µl, con 25 µl de Mix Reaction 2X, 1 µM de cada iniciador, 1 µl de RT/Platinum *Taq* Mix y 1 µg de ARN como molde. El programa de retro transcripción se llevó a cabo por 1 ciclo a 55 °C por 30 min. El programa de amplificación se estableció como 95 °C por 2 min de pre-desnaturalización, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 15 s de desnaturalización, 60 °C por 30 s de alineamiento, 72 °C por 1.5 min de extensión y 72 °C por 6 min de extensión final. El producto de PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% (w/v).

### 7.12. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección

Se tomaron 10 ml de cultivo por cada día de expresión de la cepa X33-HN<sub>62-576</sub> y el medio de cultivo se separó por centrifugación de las células. Las proteínas del medio libre de células se concentraron 10 veces precipitando con sulfato de amonio al 80% y se tomaron 20 µl de muestra para separarse en geles de SDS-PAGE al 12% de acuerdo al método de Laemmli en 1970. Las bandas se visualizaron con una solución de teñido (0.05 % Azul de Coomassie G-250, 10% ácido acético, 50% metanol) y el exceso de colorante se eliminó con la solución de desteñido (10% ácido acético, 50% metanol). Para analizar la fracción intracelular, el paquete de células se rompió acorde a las indicaciones del material técnico provisto por la compañía Invitrogen. Brevemente; el paquete celular se re-suspendió en 100 µl de tampón de rompimiento (50 mM de fosfato de sodio pH 7.4, 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA y 5% de glicerol), se agregó 1 volumen de perlas de vidrio (0.5 mm) y se sometió a 8 ciclos de 30 segundos de agitación en vórtex seguido de 30 segundos de incubación en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se usó para la determinación de proteína total usando el ensayo de Sedmak y Grossberg en 1977, con albúmina sérica bovina como estándar; finalmente, 20 µg de proteína se analizaron en geles de PAGE-SDS. Para la inmunodetección se siguió el proceso de Burnette (1981) con algunas modificaciones. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en transferencia semi seca a 24 V por 50 min, usando un tampón de transferencia (1.515 g de Tris-base, 7.2 g de glicina, 100 ml de metanol, 0.5 g de SDS para 500 ml) y se bloqueó con 5% de leche descremada en un tampón de TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.15 M de NaCl, 0.05% de tween 20) a 4 °C durante 16 h con agitación moderada. Subsecuentemente, la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween y se incubó con diversos anticuerpos para la detección de la proteína recombinante: el anticuerpo anti-*myc* acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, Invitrogen) con una dilución 1:5000, anticuerpos provenientes de sueros de cerdos infectados con PorPV (1:2000) como primer anticuerpo e IgG de cerdo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo (1:4000). Después de los lavados, las bandas de proteínas se revelaron con su sustrato correspondiente; para HRP se usó el sustrato químico luminiscente Immobilon (Millipore) y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y azul de nitrotetrazolio (BCIP-NBT) (Promega) para fosfatasa alcalina.

### 7.13. Ensayos enzimáticos

Para determinar la actividad enzimática las proteínas del medio libre de células se concentraron 10 veces precipitándolas con sulfato de amonio al 80%, posteriormente se dializaron contra agua y para determinar actividad enzimática, las proteínas concentradas se analizaron por el método modificado del ácido tiobarbitúrico (ATB) de Santos-López et al., 2004, que se basa en la formación de un cromóforo que se lee a 550 nm en un espectro UV-vis y es obtenido por la reacción entre un producto de la oxidación del ácido siálico y el ácido tiobarbitúrico. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200  $\mu$ l, colocando 50  $\mu$ l de un amortiguador de acetatos 0.4 M pH 4, 50  $\mu$ l de fetuína (10 mg/ml) como sustrato, 50  $\mu$ l de proteína concentrada y 50  $\mu$ l de agua. Se incubó a 37 °C por 30 min, posteriormente se llevó a ebullición en baño maría por 2 min y se adicionaron 50  $\mu$ l de ácido peryódico (5.7 mg/ml de ácido peryódico disuelto en HCl 125 mM, preparado al momento de usarse), la mezcla se incubó a 37 °C por 30 min. Después se agregaron 40  $\mu$ l de arsenito de sodio (al 2% disuelto en HCl 0.5 M) y 200  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico 0.1 M pH 9 y se llevó a ebullición 10 min en baño maría para observar la aparición de un color rosa intenso. La reacción se detuvo en hielo por 2 min, posteriormente se incubó a 37 °C por 2 min, posterior a esto, se mezcló con 500  $\mu$ l de alcohol (n-butanol disuelto en HCl 0.5 M) y la fase alcohólica se separó centrifugando a 1000 g por 5 min. Finalmente, se extrajeron 250  $\mu$ l para leer su D.O. a 550 nm. El blanco de la reacción consistió en reacciones sin enzima. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y se leyeron en microplacas de 96 pozos. La concentración de ácido siálico liberado se calculó al correlacionarlo con una curva estándar de ácido 5-N-acetil-neuramínico puro (Neu5Ac, Sigma-Aldrich).

En algunos ensayos se utilizó el sustrato fluorescente 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA). Para la reacción, la mezcla se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l, conteniendo 15  $\mu$ l de agua, 50  $\mu$ l de la proteína eHN, 25  $\mu$ l de un amortiguador de acetatos (0,4 M pH 4) y 10  $\mu$ l de Munana (1 g/l). Se colocó en una microplaca de fondo de oscuro y se incubó 37 °C durante 20 min. Posteriormente se llevó a la excitación a 375 nm. Por último, la fluorescencia transmitida se leyó a 405 nm. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 7.14. Estudios cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos se siguió lo descrito por Berg y col. (2006). La cantidad de eHN usada en la determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) fue de 2.27  $\mu\text{g}$ . Para obtener los valores, los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura constante de 37 °C. La concentración del sustrato se varió desde 1-5 mg/ml de fetuína a partir de una solución madre de 10 mg/ml y los tiempos de reacción de 5 a 40 min. La cantidad de ácido neuramínico liberado (nmol) se calculó como se describe arriba. La cantidad de producto liberado por cada concentración de sustrato se graficaron respecto al tiempo y de cada curva de velocidad se obtuvo la pendiente (nmol/min). Las pendientes (velocidades) se usaron para obtener la curva de saturación y estos datos se usaron para obtener la representación de Lineweaver-Burk por medio del inverso de la velocidad y de la concentración de sustrato. Los datos de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se obtuvieron de este gráfico mediante el cálculo de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 7.15. Purificación del eHN

Las proteínas del medio libre células de X33-HN se concentraron 10 veces por precipitación con sulfato de amonio al 80%, posteriormente se resuspendieron en el tampón de unión (tampón de fosfatos 50 mM pH 8, NaCl 0.4 M) y se dializaron por 24 h contra el tampón de unión para eliminar sales remanentes. Para la purificación se usó la matriz de agarosa-NiTA (Amersham), equilibrada con 5 volúmenes de columna del tampón de unión, posteriormente dos volúmenes de columna de la muestra concentrada y dializada se cargó en la columna de purificación. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna del tampón de lavado (tampón de fosfatos 50 mM pH 8, NaCl 0.4 M, 10 mM de imidazol). Finalmente la proteína se eluyó con 3 volúmenes de columna del tampón de elución (tampón de fosfatos 50 mM pH 8, NaCl 0.4 M, 400 mM de imidazol). La presencia de la proteína se verificó mediante SDS-PAGE, Western blot y actividad. La concentración de la proteína purificada se cuantificó por el método de Sedmak y Grossberg, (1977) con BSA cristalina como estándar.

### 7.16. Inmunización de ratones

Para la inmunización de ratones se usó el adyuvante AbISCO-100 (Isconova AB, Uppsala, Sweden). El adyuvante AbISCO-100 es una formulación de saponinas de *Quillaja saponaria* con colesterol y fosfolípidos como ISCOMs (Complejos inmuno-estimulantes), actualmente llamada Matrix-Q™ (Isconova AB, Uppsala, Sweden). Para la producción de los anticuerpos anti-HN, se inmunizaron ratones macho de la cepa CD-1 de 21-28 días de nacidos, en el bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de la Ciudad de México. La dosis de inmunización (ID) para todas las pruebas con proteína recombinante fue de 5 µg/ratón. Como control negativo se inocularon ratones con PBS y como control de referencia se inocularon ratones únicamente con la proteína recombinante. Brevemente, la inmunización y el proceso de sangrado fueron de la siguiente forma: todos los grupos fueron inoculados vía intradérmica en un volumen final de 200 µl con dos dosis. La segunda dosis fue administrada 14 días después de iniciado el experimento. Durante el experimento los ratones se sangraron de la cola a los días 0, 7, 14 y 28 para recuperar el suero y evaluar la producción de IgG. Al final del día 28 los ratones se sacrificaron por inhalación con CO<sub>2</sub>. Cada procedimiento se siguió de acuerdo con la "Guía del Ciudadano para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de México" y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo con la legislación mexicana (NOM-062-ZOO-1999, laSAGARPA, <http://www.sagarpa.gob.mx/normateca/Normateca/SENASICA%20NORM%20143.pdf>), basado en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, NRC.

### 7.17. ELISA indirecto

Para la prueba de ELISA, se adsorbieron 25 ng de proteína recombinante por pozo de una microplaca de 96 pozos en un amortiguador de carbonatos (0.05 M, pH 9.6) a 4°C durante 16 h. Posteriormente, se lavó con un tampón de PBS-Tween 0.05% y se incubó con los sueros de ratón en una dilución 1:150 en tampón de PBS durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente con tampón de PBS-Tween 0.05% y se colocó el anticuerpo secundario (IgG de ratón acoplado a HRP) en una dilución 1:2000 en tampón de PBS durante 1 hora a



37°C. Después, la placa se lavó con tampón de PBS-Tween 0.05%, se reveló con el sustrato tetrametilbencidina (TMB) y finalmente la reacción se detuvo usando una solución de ácido sulfúrico 2 M. La microplaca se leyó a 450 nm en un lector de ELISA.

#### *7.18. Obtención del inóculo de trabajo del PorPV cepa PAC1*

La línea celular de riñón de cerdo (PK-15) se obtuvo por donación del Dr. José Tapia Ramírez del CINVESTAV. Se cultivó en botellas de 25 cm<sup>2</sup> hasta obtener una confluencia del 90%. El PorPV cepa PAC1 se conserva en el Laboratorio de Virología del CIBIOR a partir de la donación del Dr. Humberto Ramírez Mendoza de la UNAM. Una botella de 25 cm<sup>2</sup> de PK-15 a una confluencia aproximada del 80% se usó para infectar con 3 ml de la alícuota del PorPV de PAC1 a 37°C por una 1 h. La infección se dejó por 72 hrs con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) suplementado con 2.5% de SFB hasta observar efecto citopático (formación de sincicios) y con un porcentaje de viabilidad celular mayor al 40%, esto se consideró el primer pase del virus, ya que se desconocía el número de pases anteriores. Posteriormente, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 3000 rpm 5 min a 4 °C para eliminar los desechos celulares. El sobrenadante del primer pase se diluyó 1:10 en DMEM sin SFB y se usó para infectar una caja de PK-15 a una confluencia aproximada del 80% con 3 ml de la dilución del primer pase a 37°C 1 hr. La infección se dejó por 72 hrs con DMEM y 2.5% de SFB hasta observar el efecto citopático y la viabilidad celular esperada, esto se consideró el segundo pase del virus. Después de recuperar el sobrenadante y centrifugarlo, se usó para infectar una caja de 75 cm<sup>2</sup>, haciendo una dilución 1:100 en DMEM sin SFB. Después de 48 hrs y observar el efecto citopático y la viabilidad celular esperada, se recuperó el sobrenadante y se realizaron alícuotas de 100 µl que se congelaron a -70 °C. Esto se consideró el inóculo de trabajo para todos los ensayos posteriores.

#### *7.19. Titulación viral*

El inóculo de trabajo se tituló en cajas de cultivo de 12 pozos mediante ensayo de placas líticas sobre células PK-15 con 100% de confluencia. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-3</sup> hasta 10<sup>-5</sup> del inóculo en DMEM sin SFB. Cada pozo se infectó con 400 µl a 37 °C por 1 h. Como control negativo de infección se usó DMEM sin SFB. Después de la

infección, se retiró el sobrenadante y se colocó 1 ml de medio sólido DMEM (con 2.5 % SFB y 0.35% agarosa). La infección se dejó por 6 días, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10%, se retiró la agarosa y se tiñó con cristal violeta (solución al 0.1% en etanol al 20%). Finalmente, se contaron las placas líticas en cada dilución del virus y se eligió la dilución donde se contaron de 50 a 100 placas líticas para realizar los ensayos de sero-neutralización.

#### *7.20. Ensayos de sero-neutralización*

Para los ensayos de sero-neutralización se utilizaron placas de 12 pozos con células PK-15 a una confluencia del 100%. Se realizó una mezcla de virus con suero de ratón en medio DMEM sin SFB. Se utilizó la dilución del virus con placas líticas contables y el suero de ratón se diluyó 1:8, 1:24, 1:32 y 1:64 (suero/medio). La mezcla suero-virus se incubó 1 h a 4°C, posteriormente se usaron 400 µl para infectar cada pozo de la placa a 37 °C 1 h. Como control negativo se utilizó medio DMEM sin SFB y como control positivo de infección se utilizó la dilución del virus con placas líticas contables. Se retiró el sobrenadante y se colocó DMEM sólido. La infección se dejó por 6 días, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10%, se retiró el medio sólido y se tiñó con cristal violeta. Finalmente se contaron las placas líticas y se compararon los títulos virales de los experimentos con las diluciones de suero con respecto a la infección en ausencia de suero.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Predicción del ectodominio de la HN del PorPV

La secuencia de la proteína HN de la cepa PAC1 de PorPV de 63.3 kDa (peso estimado sólo para la secuencia aminoacídica) presenta una alta probabilidad de tener una región transmembranal en el N-terminal, correspondiente a los aminoácidos 25 al 47, donde se encuentran aminoácidos hidrofóbicos en su mayoría (alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, valina), lo que corresponde a la región de la proteína por medio de la cual se ancla a la membrana del virus. De manera sobresaliente para este estudio, los residuos del 48 al 576 corresponden a la región que se encuentra expuesta al medio exterior, conocida como el ectodominio (eHN), donde la proteína posee todos los sitios importantes para el plegamiento, actividad, etc. Los residuos de aminoácidos del 1 al 24 corresponden a la región de la proteína que hace contacto con el interior del virus (figura 17).

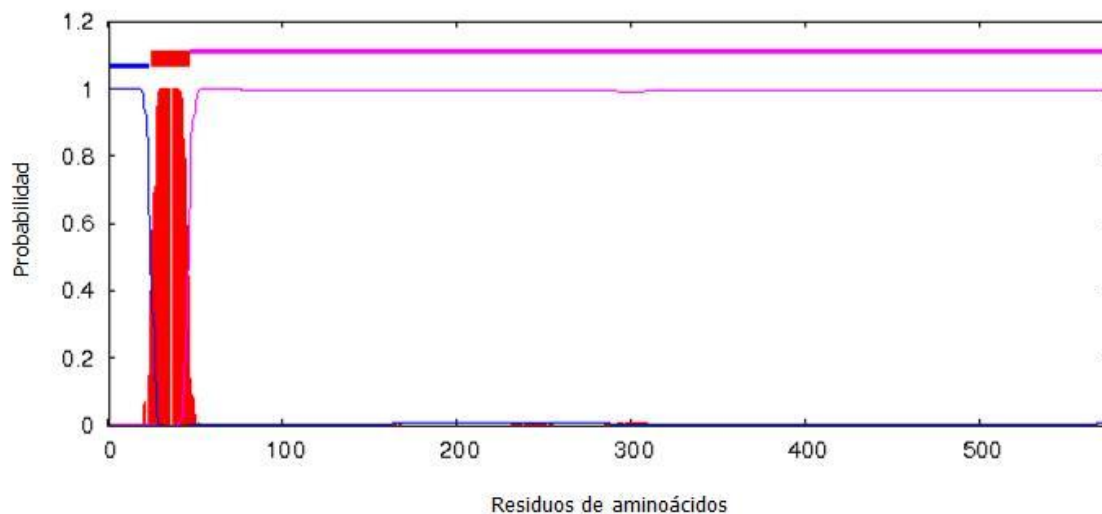


Figura 17. **Predicción de la región transmembranal.** Región transmembranal de la proteína HN de PAC1, usando el predictor TMHMM v. 2.0. (■) porción intermembranal, (■) porción transmembranal, (■) porción expuesta.

Como se puede observar en la figura 17 existe una probabilidad muy alta de que la región formada por los aminoácidos del 25 al 47 corresponda a la región de anclaje a la membrana del virus. El predictor TMHMM v. 2.0 se ha reportado por diferentes autores como

Forestan et al., en 2012, para predecir las regiones transmembranales de varias proteínas transportadoras del maíz con hasta 500 residuos de aminoácidos, las cuales poseen varias porciones intramembranales para poder realizar la función de transportadores. También Bera et al., en 2013 utilizaron esta herramienta para determinar la región intramembranal de una neuraminidasa del virus de influenza equina (H3N8) y presentan probabilidades similares a la encontrada en la HN para dichas regiones.

Por otro lado, se encontraron tres sitios potenciales de glicosilación ubicados en las posiciones 149, 277 y 338, predicho mediante el servidor NetNGlyc 1.0 (figura 18). Estos sitios poseen un valor potencial de N-glicosilación mayor a 0.5 (valor mínimo que debe alcanzar el sitio para considerarlo como glicosilado), por otro lado el residuo de aminoácido 325 presenta un sitio de glicosilación, sin embargo no sobrepasa el límite permitido por el programa para presentar la modificación, por lo que es poco probable que se presente en la naturaleza.

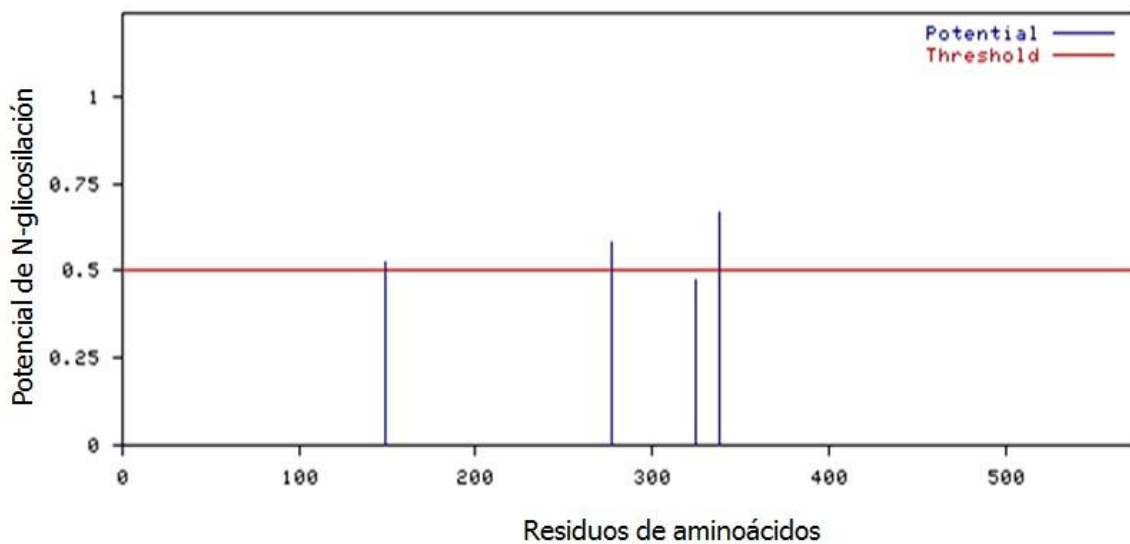


Figura 18. **Sitios potenciales de N-glicosilación.** Predicción usando el servidor NetNGlyc 1.0. (■) posición del sitio potencial de N-glicosilación, (—) límite necesario a sobrepasar para presentar el sitio.

Sundqvist et al., en 1991, predijeron la presencia de cuatro sitios potenciales de glicosilación para la HN de la cepa VLPM a partir del análisis del ADN complementario del

gen. Cabe destacar que los sitios potenciales de N-glicosilación se encuentran presentes en la región del eHN, por lo que seguramente es la región más importante y necesaria para que la proteína presente su conformación funcional, debido a que estos cambios postraduccionales están implicados en el plegamiento.

El análisis del índice antigénico de Jameson-Wolf se ha usado para encontrar epítomos en el receptor para la hormona folículo estimulante humana (Cheng et al., 2014) y se han predicho dominios transmembranales en el trabajo reportado por Palomares-Jerez et al., en 2012, al analizar la proteína NS4B del virus de la hepatitis C mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle, en 1982. Con lo anterior, se ubicó la región hidrofóbica en el N-terminal de la proteína HN de PAC1 y la región antigénica en el C-terminal (figura 19).

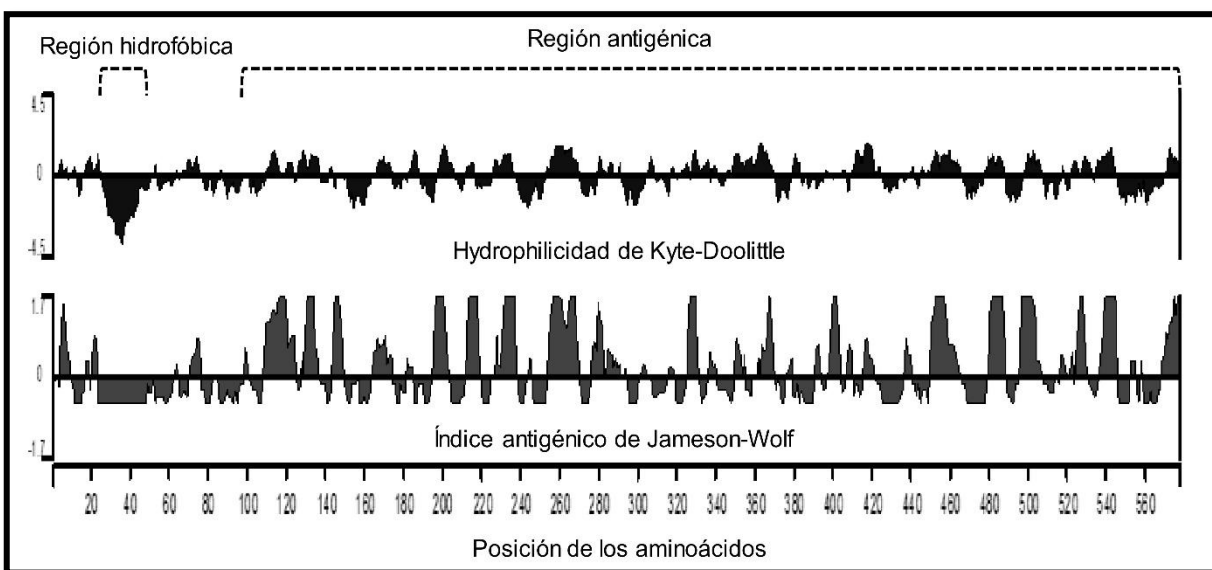


Figura 19. **Análisis bioinformático de la proteína HN del PorPV de PAC1.** El análisis de hidrofilicidad de Kyte-Doolittle muestra una región transmembranal en el N-terminal (residuos de aminoácidos 25-47), el índice antigénico de Jameson-Wolf predice los epítomos antigénicos en el ectodominio de la proteína (residuos 48-576). La región intermembranal corresponde a los residuos de aminoácidos 1-24.

Como se puede observar en la figura 19, existe una probable región transmembranal en el N-terminal de la proteína, que se muestra como un pico sobresaliente con un valor alto por debajo de cero (residuos de aminoácidos 25-47), ya que en la escala de hidrofilicidad de Kyte-

Doolittle, aquellos valores por debajo del cero hacen referencia a las regiones hidrofóbicas y por ende, son las que presentan mayor probabilidad de colocarse de manera transmembranal, al igual que el predictor TMHMM v. 2.0, el algoritmo de Kyte-Doolittle predice la misma región transmembranal en la proteína HN. Por otro lado el índice antigénico de Jameson-Wolf predice posibles determinantes antigénicos mediante la combinación de otros métodos existentes para la predicción de proteínas estructurales que involucran la determinación de los valores de hidrofobicidad, probabilidad de superficie, flexibilidad de la cadena aminoacídica, estructura secundaria e hidropatía. El algoritmo asigna valores mayores a cero a aquellas regiones potencialmente antigénicas y aquellas que alcanzan el valor máximo de la escala se les consideran como las más prometedoras. En el caso de la proteína HN se puede observar la presencia de hasta 18 epítomos potencialmente inmunogénicos, todos presentes en la región del ectodominio y podemos observar que estas regiones comienzan a aparecer aproximadamente desde el residuo 110 hasta el 576, quedando las regiones intraviral e intramembranal sin sitios potencialmente inmunogénicos.

En otros estudios Zenteno-Cuevas et al., en 2007, utilizando el paquete ANTEPROT *suite of programs versión 2.0*, predijo la presencia de 18 epítomos inmunogénicos en la región del ectodominio de la proteína HN del RPV cepa LPM, tres de los cuales fueron sintetizados y probados por ELISA, donde se pudo comprobar que anticuerpos provenientes de cerdos infectados reconocieron los péptidos sintéticos, además; generaron respuesta inmune al inocularlos en ratones y los anticuerpos provenientes de éstos inhibieron la actividad hemaglutinante del virus, demostrando la importancia de considerar estos epítomos en el desarrollo de una vacuna.

Finalmente, con estos resultados, se propuso la región de la proteína HN del aminoácido 62 al 576 como el mejor candidato para expresarse en la levadura *P. pastoris*, el cual se denominó ectodominio (eHN); éste no presenta regiones hidrofóbicas que pudieran ocasionar problemas en la recuperación de la misma y presenta los sitios de glicosilación y además contiene los epítomos potencialmente antigénicos.

### 8.2. Amplificación y clonación del eHN

Con el objetivo de obtener el marco de lectura abierto para la proteína eHN, se llevó a cabo una PCR usando los iniciadores que permiten recuperar dicho amplicón y además introducen los sitios de corte *EcoRI* y *XbaI* para su posterior clonación en el vector de expresión de la levadura. La amplificación por PCR del eHN se llevó a cabo a partir del triplete codificante para el residuo de aminoácido 62 al 576 tomando como plantilla el vector pJET-HN que contiene el ORF de la HN de PAC1, esperando una banda de 1567 pb. (figura 20).

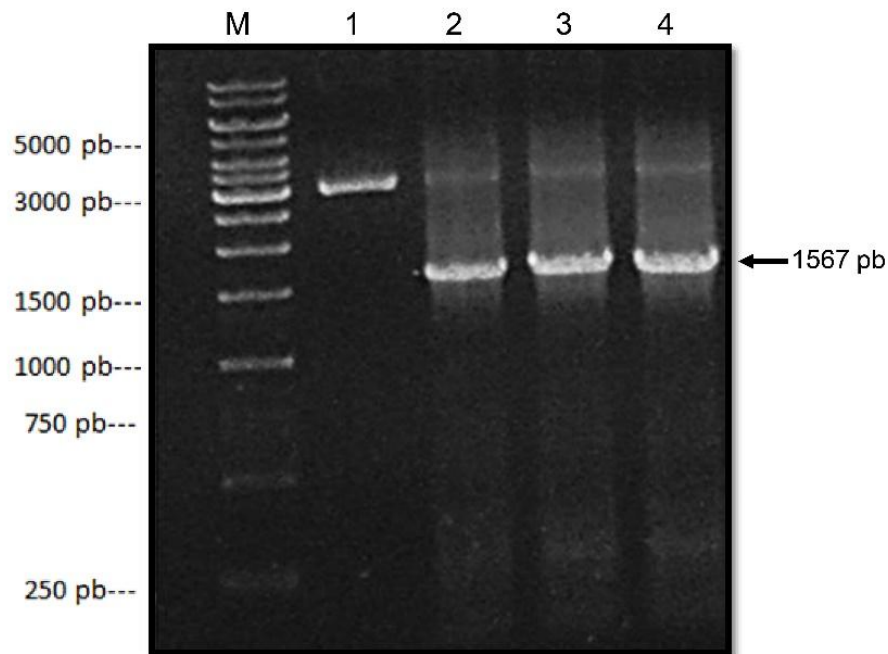


Figura 20. **Obtención del ORF del eHN.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. (M) Marcador de peso molecular, (1) vector pJET-HN, (2-4) amplificación a partir de pJET-HN.

En la figura 20 se puede apreciar la amplificación por PCR del fragmento esperado de 1567 pb (2-4) usando los iniciadores diseñados para introducir los sitios de corte *XbaI* y *EcoRI*, dicho producto está ausente en el control negativo de amplificación (pJET-HN) por tanto, la banda observada corresponde al producto esperado (ORF del eHN) y pudo ser usado en la construcción del vector de expresión. El producto de amplificación se purificó del gel de electroforesis para ser clonado en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt. Este vector presenta el sitio de clonación múltiple dentro del gen tóxico *eco471R* y gracias a esto, se obtuvieron sólo clonas de *E. coli* con el producto de amplificación, ya que es necesario interrumpir el gen por medio de la inserción del producto de PCR.

Por otro lado, debido a la presencia del sitio de corte *Xba*I en el sitio de clonación múltiple de pJET1.2/Blunt, fue posible seleccionar clonas que presentaron el inserto eHN con la orientación de 3´a 5´ mediante la digestión del ADN plasmídico con *Xba*I, dicho vector fue denominado pJET-eHN<sub>62</sub> (figura 21).

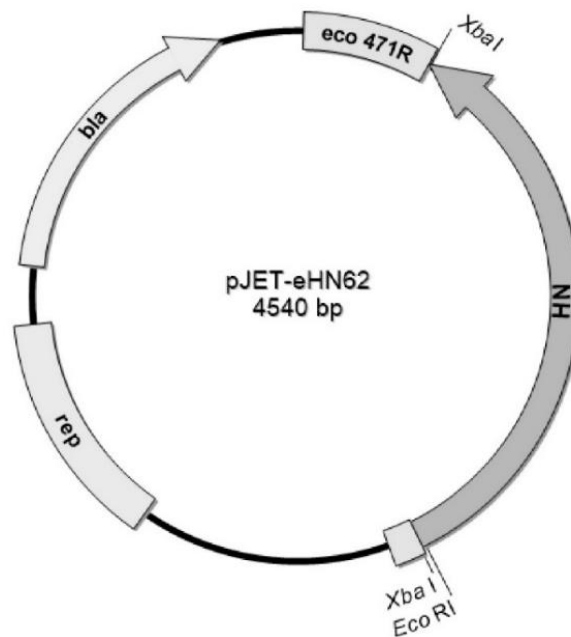


Figura 21. **Vector pJET-eHN<sub>62</sub>**. Clonación del inserto eHN en la orientación 3´a 5´ con un sitio de corte *Xba*I en cada extremo.

Como se puede apreciar en la figura 21 el ORF de eHN puede entrar en la posición 3´a 5´ en el sitio de clonación múltiple del vector pJET1.2/Blunt, esto representa una ventaja ya que se pueden seleccionar clonas que con el inserto mediante la digestión con la enzima *Xba*I, en los cuales se espera observar la liberación del fragmento clonado (figura 22).



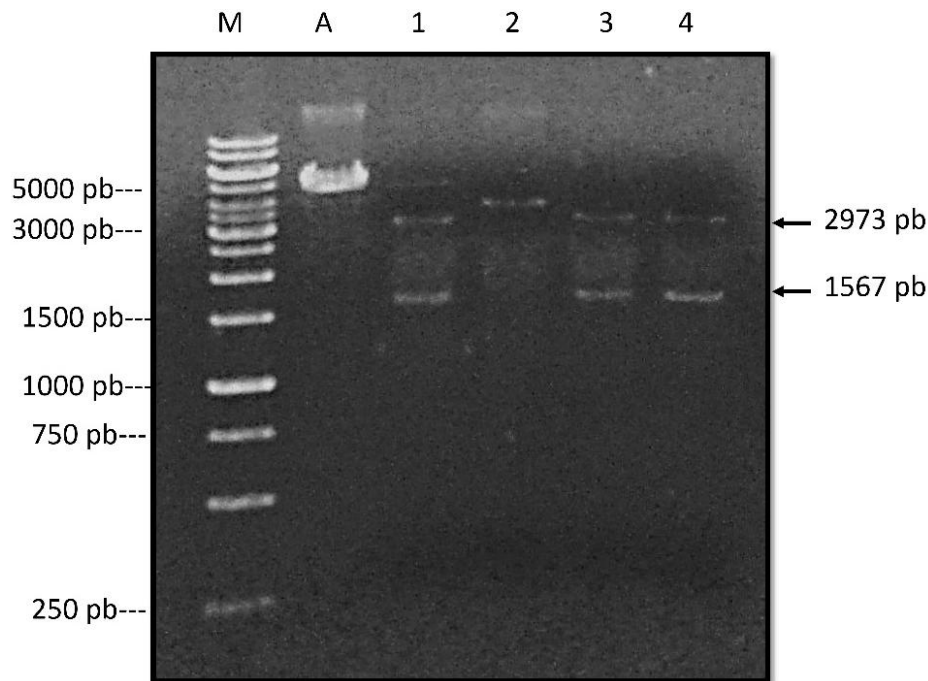


Figura 22. Análisis de pJET-eHN<sub>62</sub>. Patrones de restricción de ADN plasmídico. (M) Marcador de peso molecular, (A) pJET-HN digerido con *Xba*I, (1-4) vectores pJET-eHN<sub>62</sub> de diferentes cepas digerido con *Xba*I.

En la figura 18, (1-4) se aprecia el resultado de la digestión con *Xba*I del ADN plasmídico de 4 clonas seleccionadas, anteriormente a dichos vectores se les realizó una digestión con *Eco*RI para corroborar la presencia del sitio de corte en cada una de ellas. La digestión con *Xba*I liberó el fragmento clonado de 1567 pb en las clonas 1, 3 y 4, que suponen aquellos vectores con la orientación deseada de 3' a 5' en el producto ligado y de ellas se seleccionó finalmente la clona 3 para usarse en la subclonación en el vector de expresión pPICZαB, en la cual no se observaron productos inespecíficos después de la digestión. Como control positivo de digestión se usó el vector pJET-HN (figura 18, A) que también posee un sitio único de corte *Xba*I. Por otro lado, es importante mencionar que conocer la orientación en la cual se ligó el inserto al vector es necesario para evitar la pérdida de fase en el ORF al subclonar en el vector de expresión. Para este fin, la clona 3 que se seleccionó se sometió a una digestión primero con la enzima *Eco*RI para abrir el vector y posteriormente con *Xba*I para liberar el fragmento, de esta forma se asegura que el inserto queda debidamente digerido. Finalmente, el producto de digestión fue purificado del gel de electroforesis y usado para introducirlo en el vector de expresión de *P. pastoris*.

### 8.3. Construcción de un sistema de expresión para el eHN

El ADN plasmídico de la clona 3 se digirió primeramente con *EcoRI*, purificado del gel de electroforesis y digerido posteriormente con *XbaI* para liberar el inserto correspondiente al eHN. El fragmento se ligó en el vector de expresión pPICZαB (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) y con éste se transformaron células competentes de *E. coli* Top 10, seleccionadas por su capacidad de crecer en medio con el antibiótico Zeocina (marcador de selección). Finalmente se seleccionaron 4 transformantes, se les extrajo ADN plasmídico y se llevó a cabo una PCR para amplificar el inserto de eHN (figura 23).

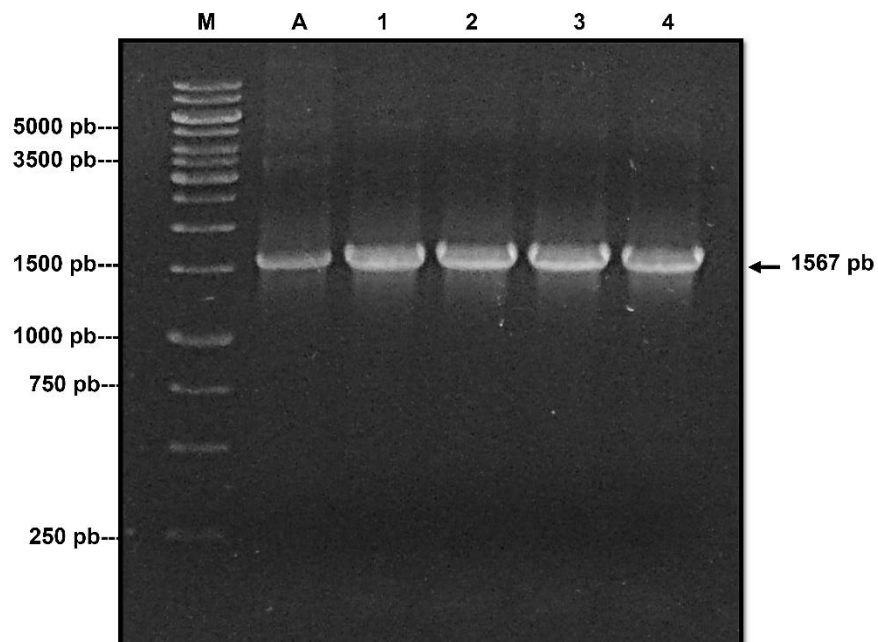


Figura 23. **Amplificación del eHN a partir de los vectores de expresión.** (M) marcador de peso molecular, (A) PCR de pJET-HN, (1-4) PCR de los vectores de expresión seleccionados.

En la figura 23 se puede observar el resultado de la PCR que se llevó a cabo a 4 colonias seleccionadas capaces de crecer en presencia del marcador de selección (zeocina) y por esto implica que adquirieron el vector de expresión. La reacción se llevó a cabo usando los oligos que permiten amplificar todo el ORF del eHN (HNRppS y HNRppA), como control positivo de amplificación se usó el vector pJET-HN (figura 23A) del cual se obtuvo el fragmento eHN. Como se puede observar las 4 clonas seleccionadas amplificaron el fragmento esperado de 1567 pb correspondiente al ORF de eHN (figura 23, 1-4), corroborando de esta

forma que todas las clonas seleccionadas de *E. coli* adquirieron el vector de expresión y dicho vector posee el inserto del eHN. Con ello se logró obtener un vector de expresión que presenta el ORF del eHN para el sistema de expresión de *P. pastoris*. Una de las colonias fue seleccionada para caracterizar el vector por patrones de restricción y secuenciación, finalmente el vector se denominó pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>.

El vector de expresión pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub> (figura 24) contiene todos los elementos necesarios para producir la proteína eHN en la levadura. Posee un gen de resistencia a zeocina para poder seleccionar las clonas en medio con el antibiótico, además tiene acción tanto en la levadura como en bacteria. Tiene el promotor AOX1 que permite la expresión de la proteína al utilizar metanol como única fuente de carbono y un sitio de corte único *PmeI* para integrar el vector al cromosoma de la levadura por recombinación homóloga en su promotor nativo de AOX1. El inicio del marco de lectura de la eHN se fusiona en fase con el factor alfa, que es un péptido señal de *S. cerevisiae* capaz de llevar la proteína al medio extracelular facilitando los procesos de purificación, obtener la proteína en forma soluble y además es funcional en *P. pastoris*. El final del ORF del eHN está fusionado a dos etiquetas, la etiqueta c-myc permite identificar la proteína en western blot utilizando anticuerpos contra la misma y la etiqueta de seis histidinas para purificarla por cromatografía de afinidad. Finalmente la proteína posee la secuencia Glu-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala del factor alfa, que contiene el sitio de reconocimiento para que la enzima Kex2 pueda liberar el péptido señal de eHN, paso importante para liberar la proteína al medio extracelular (figura 24).

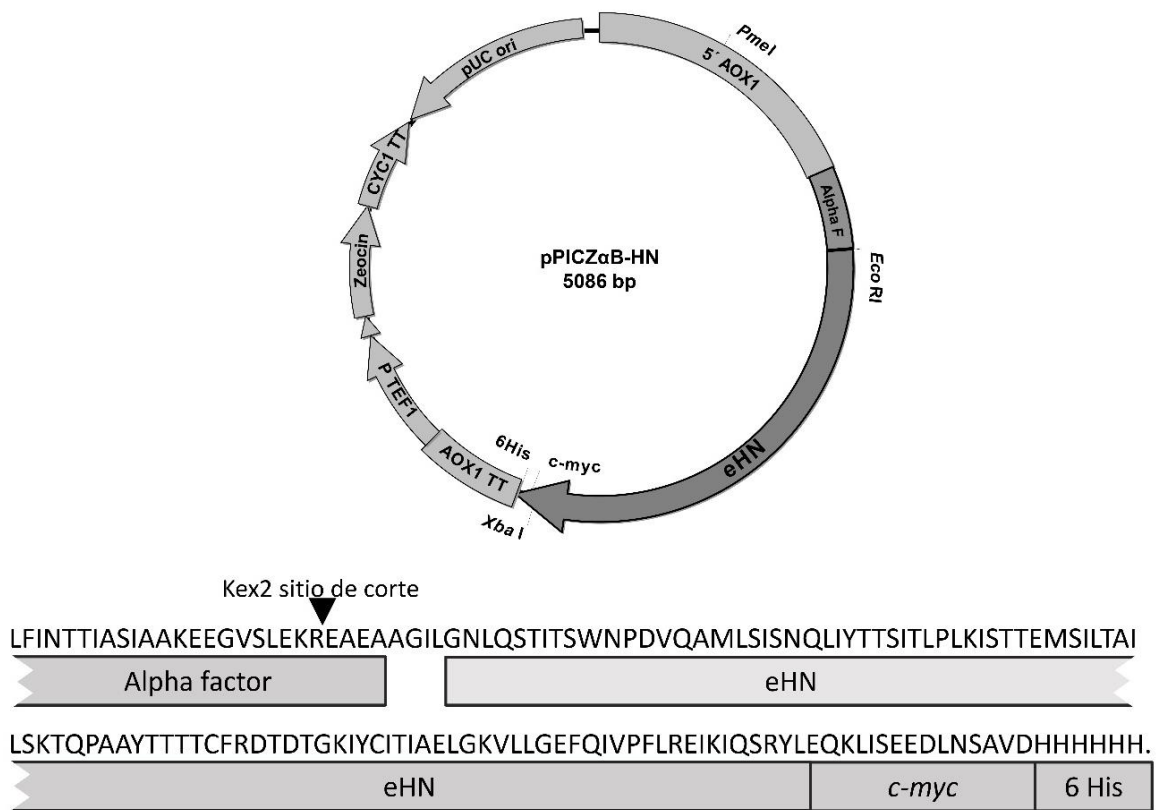


Figura 24. **Vector de expresión pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub>**. Representación esquemática del vector y la proteína eHN. Se utilizó el vector pPICZαB (3597 pb) para insertar la región de codificación de eHN fusionado con las etiquetas c-myc, 6 His (1614 pb) y la señal secretora del factor alfa (1893 pb), la proteína fusionada contiene el sitio Kex2 una señal para eliminar el factor alfa y liberar el eHN al medio extracelular.

El vector de expresión pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub> se sometió a restricciones para corroborar la fidelidad del sistema obtenido. El vector fue sometido a una digestión con la enzima de sitio único de corte *PmeI* y una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* (figura 25).

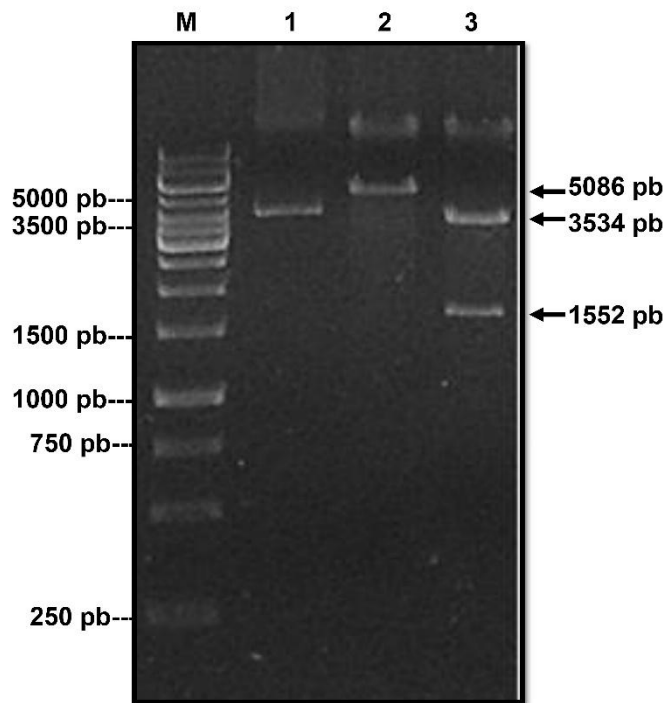


Figura 25. Análisis del vector de expresión pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub>. (M) Marcador de peso molecular, (1) vector sin digerir, (2) digestión con *Pme*I, (3) doble digestión con *Eco*RI y *Xba*I.

Como se puede apreciar en la figura 25 el vector de expresión se linearizó con la enzima *Pme*I mostrando el tamaño esperado de 5086 pb (figura 25, 2), demostrando que el vector posee el sitio de corte necesario para integrarse al cromosoma de la levadura, por otro lado, la doble digestión con las enzimas *Eco*RI y *Xba*I permitió corroborar que el vector posee el inserto eHN con el tamaño esperado de 1552 pb ya que fueron los sitios usados durante la subclonación y se observa la liberación de este fragmento en el gel. Finalmente como control negativo de digestión se utilizó el vector sin digerir, con el objetivo de confirmar la presencia de reacción de digestión por parte de las enzimas y descartar falsos resultados. El vector se secuenció para confirmar finalmente que se obtuvo el producto deseado.

El vector pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub> se secuenció con los iniciadores 3'AOX y 5'AOX que hibridan fuera del inserto eHN y permiten observar los sitios de ligación en el electroferograma para corroborar que el ORF de la proteína quedó en fase con el factor alfa (figura 26).

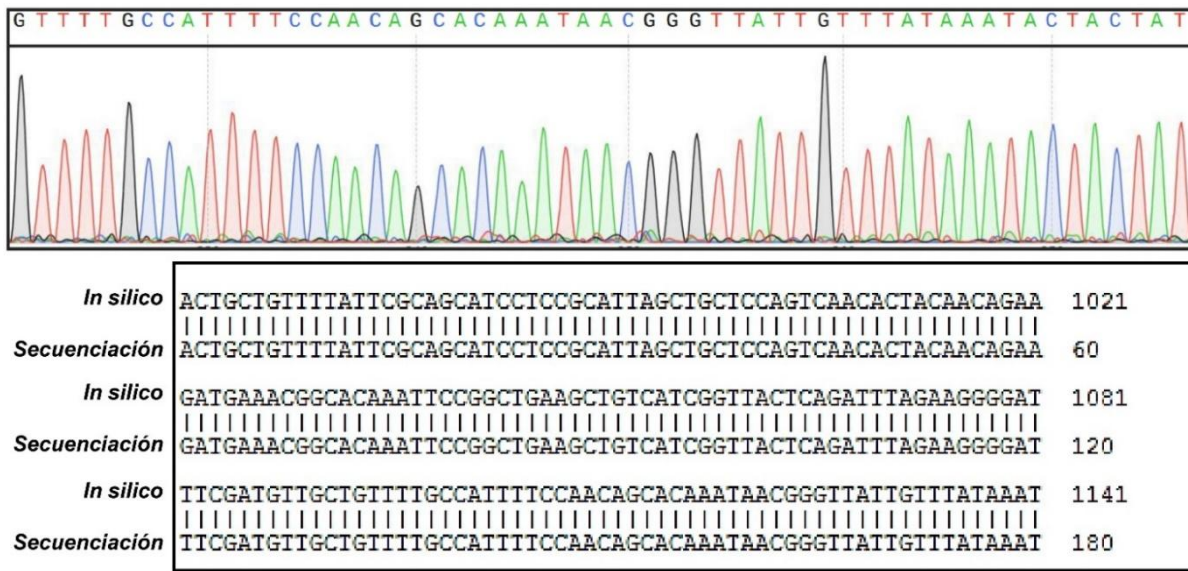


Figura 26. **Secuenciación del vector pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub>**. Parte del electroferograma obtenido al secuenciar el vector y alineamiento realizado con lo predicho *in silico* y el electroferograma. Los números indican la posición de los nucleótidos.

Al llevar a cabo la secuenciación se obtuvo un electroferograma confiable, ya que se observaron picos únicos y bien definidos por cada nucleótido del vector, por lo que los datos recuperados del mismo se consideraron representativos de lo obtenido experimentalmente. Se pudo corroborar que se obtuvo un 100% de similitud con lo predicho *in silico* ya que no se observaron cambios entre los nucleótidos observados en el electroferograma y lo que se tenía de manera teórica (figura 26). De esta forma se comprobó la obtención de un vector de expresión que posee todos los elementos necesarios para producir la proteína en la levadura con todas las características mencionadas anteriormente, el cual se debe integrar al cromosoma de la levadura e inducirse al utilizar el metanol como fuente de carbono.

#### 8.4. Obtención de cepas de *P. pastoris* productoras del eHN

El vector pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub> fue linearizado con *PmeI* para integrarlo por recombinación homóloga al genoma de *P. pastoris* en su promotor nativo de AOX1. El vector linearizado se incorporó por transformación de la cepa X33 de *P. pastoris*, para ello se llevó a cabo por choque térmico usando el método del cloruro de litio y después de transcurridos los días necesarios, se observó el crecimiento de colonias en medio Agar YPD + Zeocina (figura 27).

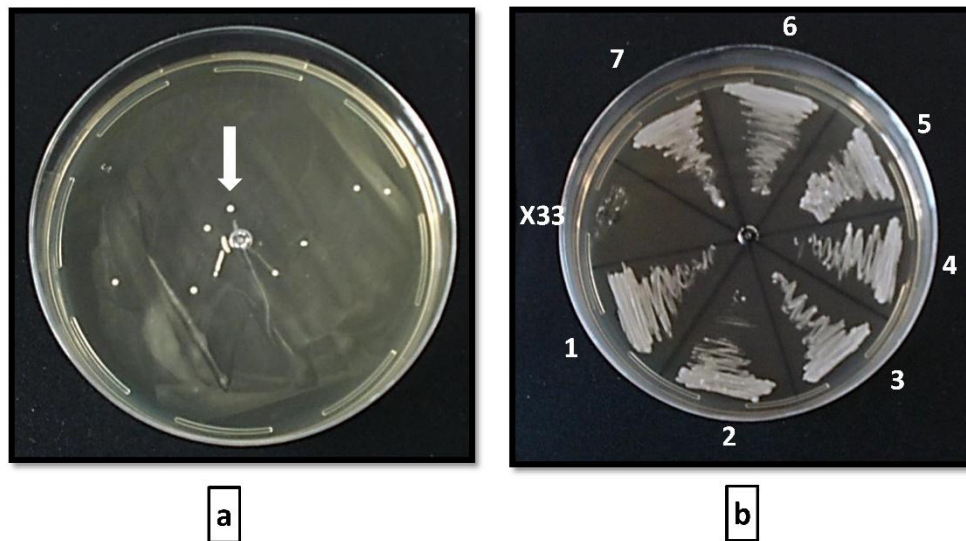


Figura 27. **Transformación de *P. pastoris* con el vector pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub>.** (a) crecimiento de colonias transformadas en medio Agar YPD + zeocina, (b) Resiembra de las colonias transformadas en medio Agar YPD + zeocina, (X33) cepa sin transformar, (1-7) cepas transformadas. La flecha indica la presencia de una colonia.

Como se muestra en la figura 27a, se obtuvieron algunas colonias positivas para crecimiento en presencia del marcador de selección (zeocina) lo que indica la capacidad de degradar el antibiótico debido a la incorporación del vector de expresión; cabe mencionar que bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, no fue posible obtener elevadas cantidades de colonias transformadas y se pudo observar una baja tasa de transformación, debido probablemente a que el vector se tiene que integrar al cromosoma. Por otro lado, se corroboró que las colonias obtenidas conservaran la capacidad de seguir creciendo en presencia del antibiótico al resembrarlas en medio YPD + zeocina (figura 27b) debido a que a lo largo del trabajo experimental se obtuvieron varios falsos positivos, colonias que aparecieron durante la transformación posteriormente fueron incapaces de continuar creciendo en presencia del antibiótico, esto puede ser causa de la concentración de zeocina, la cual es recomendable mantener a 200 µg/ml para evitar este problema. Por último, se seleccionaron 4 cepas para extraer ADN cromosómico y realizar una PCR para amplificar el inserto correspondiente al eHN, usando los iniciadores HNRppS y HNRppA, con esto finalmente corroborar la incorporación del vector al cromosoma de la levadura, estas cepas fueron denominadas X33-eHN<sub>62-576</sub> (figura 28).

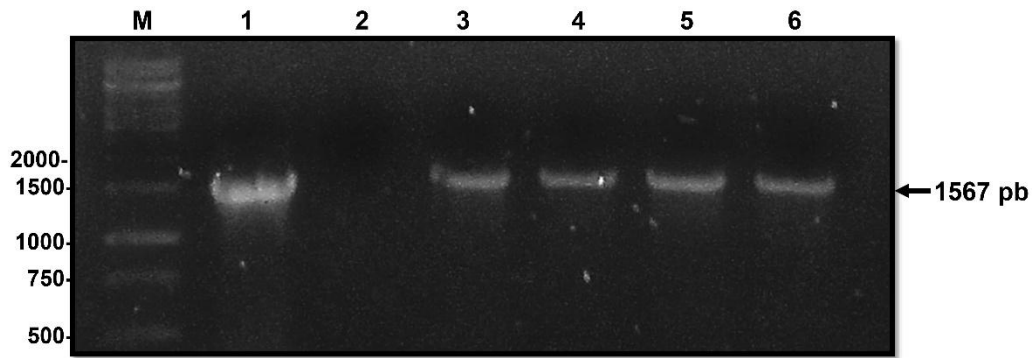


Figura 28. **Amplificación de eHN en las cepas X33-eHN<sub>62-576</sub>.** (M) Marcador de peso molecular, (1) PCR a partir del vector pPICZαB-eHN<sub>62-576</sub>, (2) PCR a partir de ADN cromosomal de la cepa X33, (3-6) PCR a partir de ADN cromosomal de la cepas X33-eHN<sub>62-576</sub>.

En la figura 28 se muestra el resultado de la amplificación del ORF del eHN en las cepas transformadas de *P. pastoris*, como control positivo se usó el vector de expresión, el cual contiene el inserto a amplificar y arrojó el tamaño esperado de 1567 pb correspondiente al eHN, por otro lado el control negativo usado fue ADN cromosomal de la cepa X33, una cepa sin transformar, que no amplificó ningún fragmente asegurando que los oligos son específicos para el inserto eHN y también que la cepa utilizada no presenta ningún falso positivo que nos pueda llevar a errores experimentales. Las cuatro cepas seleccionadas amplificaron el fragmento esperado perteneciente al gen eHN sin amplificaciones inespecíficas, por tanto podemos asegurar que las cepas han incorporado a su cromosoma el vector de expresión y son posibles productoras de la proteína viral.

### 8.5. Determinación del fenotipo Mut

La integración de ADN foráneo al cromosoma de la levadura por recombinación homóloga en su región promotora de AOX1 puede llevarse a cabo por desplazamiento o por interrupción de su promotor nativo (figura 29). Este hecho puede tener efecto significativo sobre la expresión de la proteína, por ello es necesario la caracterización de este evento. La incorporación del vector de expresión se describe en el manual de Invitrogen, sin embargo el proceso de la recombinación no se conoce con exactitud.



El fenotipo Mut se refiere a la capacidad de la levadura de poder crecer o no utilizando como fuente de carbono el metanol, aquellas cepas que han perdido el promotor nativo de la alcohol oxidasa (AOX1) se dominan Mut<sup>S</sup> y por tanto pierden casi en su totalidad la capacidad de degradar el metanol, ya que la alcohol oxidasa es responsable en un 80% de la degradación del metanol. Por otra parte, las cepas que conservan su promotor nativo de AOX1 a pesar de la incorporación del vector al cromosoma, continúan degradando el metanol sin problemas, estas cepas son denominadas Mut<sup>+</sup>. Conocer estos eventos es de vital importancia debido a que el metanol es el inductor para la producción de la proteína viral y será usado durante todos los ensayos de expresión.

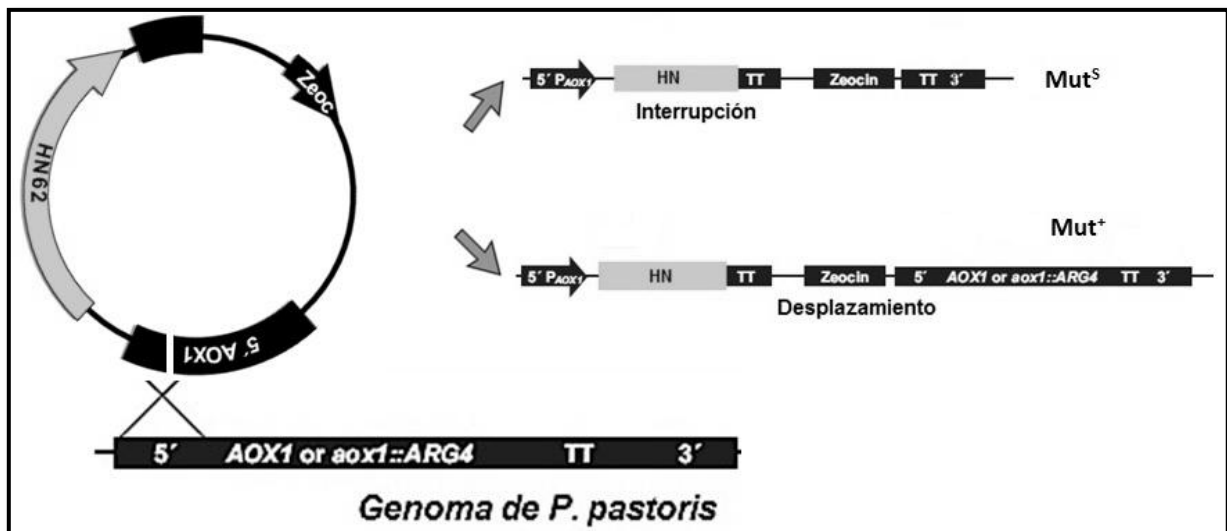


Figura 29. **Integración del vector recombinante al genoma de *P. pastoris*.** Fenotipo Mut<sup>S</sup> (el vector se integra al genoma interrumpiendo el promotor de AOX1), Mut<sup>+</sup> (el vector se incorpora por desplazamiento sin interrumpir el promotor de AOX1); modificado del Manual de Invitrogen.

Como se observa en la figura 29 el vector de expresión se recombina en su región promotora de AOX1 con la región promotora nativa de *P. pastoris*, el vector tiene un sitio de corte único *PmeI* para poder abrirlo y la recombinación ocurre en la región 5' del promotor nativo de AOX1. La integración del vector por desplazamiento no interrumpe el gen AOX1 y la levadura continua degradando el metanol, mientras que el ADN foráneo se acomoda antes del comienzo del promotor nativo. Usando los iniciadores 3'AOX y 5'AOX es posible

elucidar este evento de recombinación, debido a que hibridan en la región promotora de AOX1 y por ende en el vector de expresión, generando amplicones de pesos moleculares similares (~2000 pb) (figura 30).

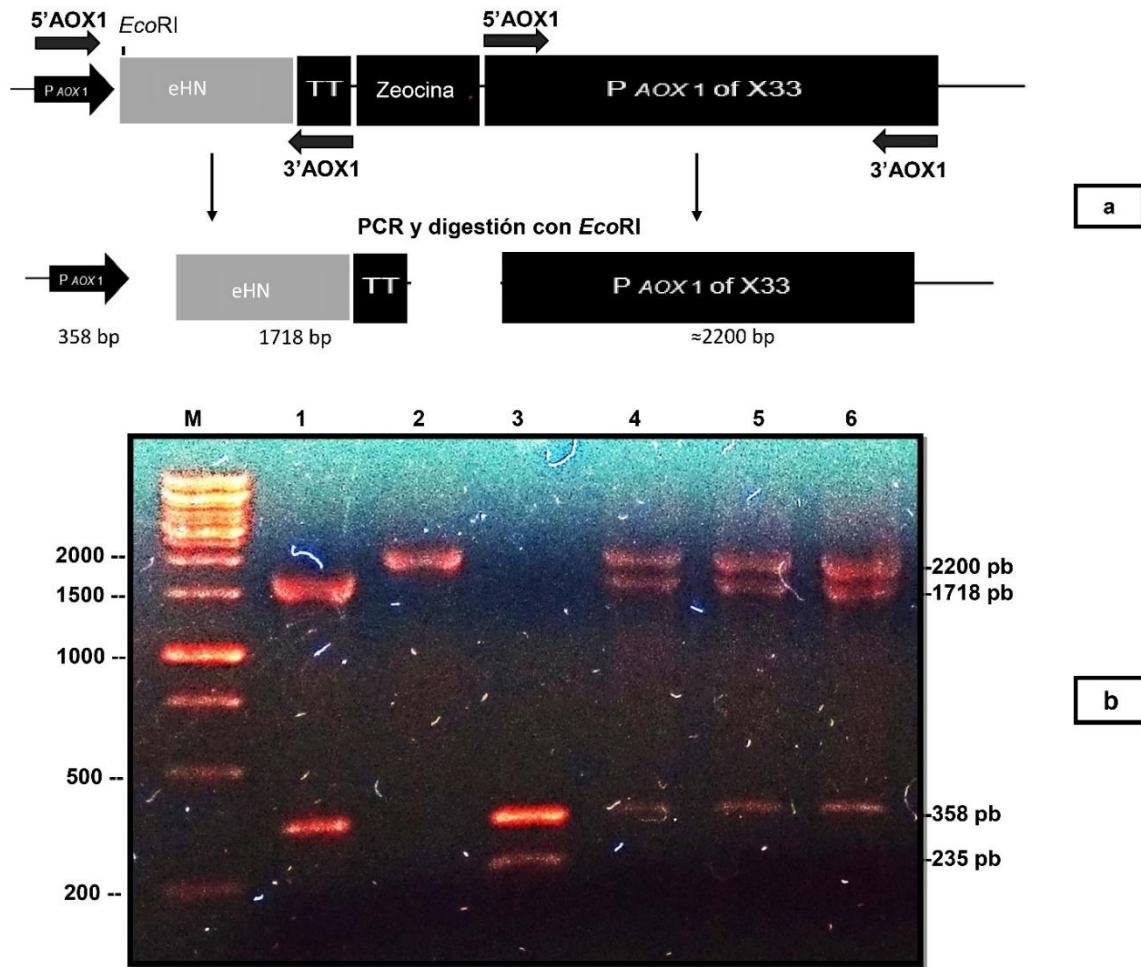


Figura 30. **Determinación del fenotipo Mut.** (a) Representación esquemática de la determinación del fenotipo Mut<sup>+</sup> mediante PCR utilizando los cebadores de AOX1 (flechas negras) con la posterior digestión de los productos utilizando *EcoRI* y (b) análisis de las cepas transformadas en gel de agarosa: (1) control vector pPICZαB-HN, (2) cepa X33, (3) pPICZαB vector sin inserto, (4-6) cepas transformadas X33-eHN<sub>62-576</sub>, (M) marcador de peso molecular.

Como se aprecia en la figura 30a cuando el vector de expresión se integra al cromosoma de la levadura por desplazamiento, los iniciadores 3'AOX y 5'AOX (cuya posición se señala en flechas) hibridan tanto en el vector de expresión como en el promotor nativo generando amplicones de pesos moleculares similares (~2000 pb), por ello para poder

diferenciarlos con exactitud, se buscó una enzima que tuviera sitio de corte en el vector pero no en el promotor nativo, de esta forma los fragmentos correspondientes al vector podrían ser fácilmente distinguibles por diferencias de pesos moleculares al comparar su perfil de corrimiento en el gel. La enzima elegida fue *EcoRI* que parte el producto de PCR del vector integrado en dos fragmentos de 1718 y 358 pb, a diferencia del promotor nativo de AOX1 que no tiene corte y se mantiene con su peso de aproximadamente 2200 pb (según el manual de Invitrogen). En la electroforesis (figura 30b) el vector pPICZ $\alpha$ B-eHN<sub>62-576</sub> y ADN cromosomal de la cepa X33 se usaron como controles positivos de amplificación. Como se demuestra en la figura 30b en el carril 1 el vector de expresión generó los dos productos esperados, mientras que en el carril 2 el ADN cromosómico de X33 generó sólo un fragmento, corroborando lo descrito anteriormente. Por todo esto, las cepas transformadas que presenten el fenotipo Mut<sup>+</sup> se espera presenten estos tres fragmentos correspondientes al vector de expresión y el promotor nativo de AOX1. Este resultado se puede apreciar en la figura 30b carriles 4, 5, y 6 en donde en las tres cepas seleccionadas se puede observar la presencia de los tres fragmentos esperados, por tanto, estas cepas integraron el vector de expresión por recombinación homóloga sin interrumpir su promotor nativo de AOX1, confirmando el fenotipo Mut<sup>+</sup> y son capaces de crecer en presencia de metanol gracias a su capacidad de continuar produciendo la alcohol oxidasa.

La estrategia de caracterizar el fenotipo Mut por medio de PCR usando los cebadores 3'AOX y 5'AOX y el vector recombinante, fue también descrito por Zhou y col., 2006, al obtener cepas productoras de la glicoproteína NS1 del virus del dengue. Mediante PCR los autores logran identificar cepas Mut<sup>+</sup> debido a la presencia del fragmento correspondiente al vector de expresión y al promotor de AOX1.

Posteriormente, las cepas caracterizadas en su fenotipo mediante PCR, también se probaron por crecimiento en medio diferencial usando medio mínimo con metanol + histidina (MMH), donde se espera crecimiento similar a la cepa X33 (figura 31).



Figura 31. **Crecimiento en medio MMH.** (X33) *P. pastoris* sin transformar, (1-3) cepas X33-eHN<sub>62-576</sub>.

Como se aprecia en la figura 31, todas las cepas X33-eHN<sub>62-576</sub> caracterizadas mediante PCR como Mut<sup>+</sup> fueron capaces de crecer en medio mínimo utilizando como fuente de carbono el metanol, presentando un crecimiento similar a la cepa X33, la cual presenta un fenotipo Mut<sup>+</sup>. Esto confirma que las cepas X33-eHN<sub>62-576</sub> no solo incorporaron el vector de expresión a su cromosoma por desplazamiento de su promotor nativo de AOX1, sino que además son capaces de continuar creciendo en presencia de metanol con un crecimiento similar a la cepa no transformada de modo que el proceso de transformación no tuvo efecto significativo en la viabilidad celular. Por ello la prueba de expresión se llevó a cabo considerando el proceso de inducción para una cepa Mut<sup>+</sup>.

Pla et al., en 2006, compararon la producción en biorreactor de la cepa Mut<sup>+</sup> vs Mut<sup>S</sup> durante la expresión extracelular del anticuerpo A33 scFv y hallaron diferencias significativas en el crecimiento y el rendimiento, donde la cepa Mut<sup>S</sup> tuvo rendimientos mayores que la positiva. Daly y Hearn, en 2005, describen el impacto que tiene la ruta de la alcohol oxidasa en cuanto a la expresión de proteínas recombinantes, describiendo diferencias importantes en las cepas Mut<sup>+</sup> vs Mut<sup>S</sup>. Cereghino y Cregg, en 2000, describen el uso de cepas Mut<sup>S</sup> como la cepa KM71 o la cepa MC100-3 que presentan eliminación del promotor nativo de AOX1

teniendo ventajas durante la expresión debido a las cantidades menores de metanol y los tiempos requeridos para lograr y mantener la inducción de la expresión. También Krainer et al., en 2012, produjeron tanto la cepa Mut<sup>+</sup> y la cepa Mut<sup>S</sup> para producir la peroxidasa del rábano y mediante la alimentación por pulsos de metanol encontraron una producción tres veces mayor de la enzima en la cepa Mut<sup>S</sup> comparado con la producción de la otra mutante, por ello se demuestra que diversos factores pueden influir en la producción de proteínas recombinantes en la levadura y uno de los más importantes es conocer el fenotipo Mut de la cepa obtenida.

Cuando se usa la cepa X33 y el vector pPICZαB, que es nuestro caso, la mayoría de las mutantes deben presentar el fenotipo Mut<sup>+</sup>, habiendo una pequeña posibilidad de obtener la otra cepa. En nuestro caso más del 90% de nuestras transformantes fueron Mut<sup>+</sup>, se logró observar una cepa Mut<sup>S</sup>, en la cual no se obtuvo crecimiento en los medios de expresión. Finalmente una de las clonas X33-eHN<sub>62-576</sub> Mut<sup>+</sup> se seleccionó para caracterizar su crecimiento celular en los diferentes medios de propagación y expresión.

#### 8.6. Caracterización del crecimiento celular de X33-eHN<sub>62-576</sub>

Debido a que es la primera vez que se trabaja el sistema de expresión de *P. pastoris* en el laboratorio, se tuvieron que obtener todos los parámetros óptimos de crecimiento celular. Un punto importante en la expresión de la proteína fue conocer las fases de la curva de crecimiento celular en el medio de propagación cuya fuente de carbono es el glicerol (BMGY), en este medio la cepa genera la biomasa suficiente para después poder re-dirigir la maquinaria celular hacia la producción de la proteína eHN al cambiar la fuente de carbono por el metanol.

A lo largo del trabajo experimental se buscaron las condiciones óptimas para lograr la producción de la proteína, tomando como referencia lo realizado por otros autores y un factor clave para incrementar la producción fue llevar la cepa a expresión a altas densidades celulares en medio con glicerol (BMGY) pero tomando a las células en la fase de des aceleración, fase en la cual las células aún tienen un porcentaje de viabilidad alto y buen metabolismo. Por ello, el crecimiento de la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> se caracterizó en medio BMGY con el objetivo de

conocer el comportamiento de la cepa a lo largo del tiempo, determinando los aumentos de la biomasa en la que el cultivo abarca todas las fases de la curva de crecimiento. En primera instancia fue necesario conocer el peso seco de la levadura en g/l en diferentes valores de D.O. y construir un gráfico de peso seco vs D.O. Para esto, la cepa se cultivó en medio líquido (BMGY) hasta saturación tomando muestras a diferentes valores de D.O. Las células se recuperaron por centrifugación, se eliminó el sobrenadante, el paquete se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó para finalmente cuantificar el peso seco que le corresponde a cada muestra (figura 32).

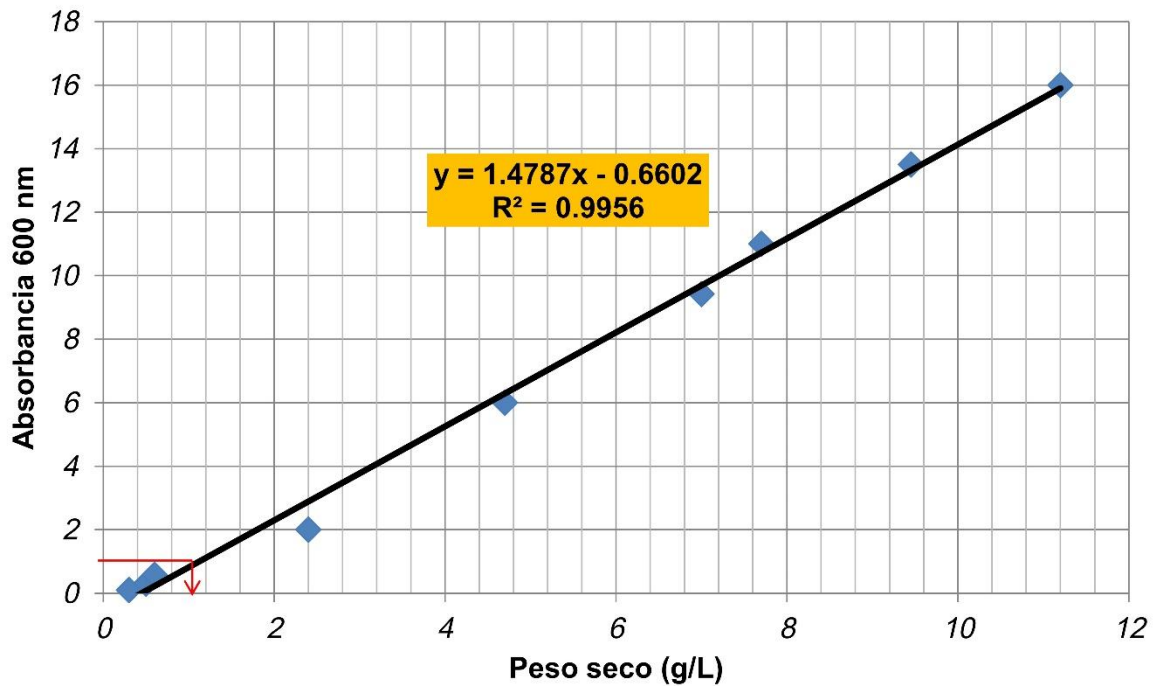
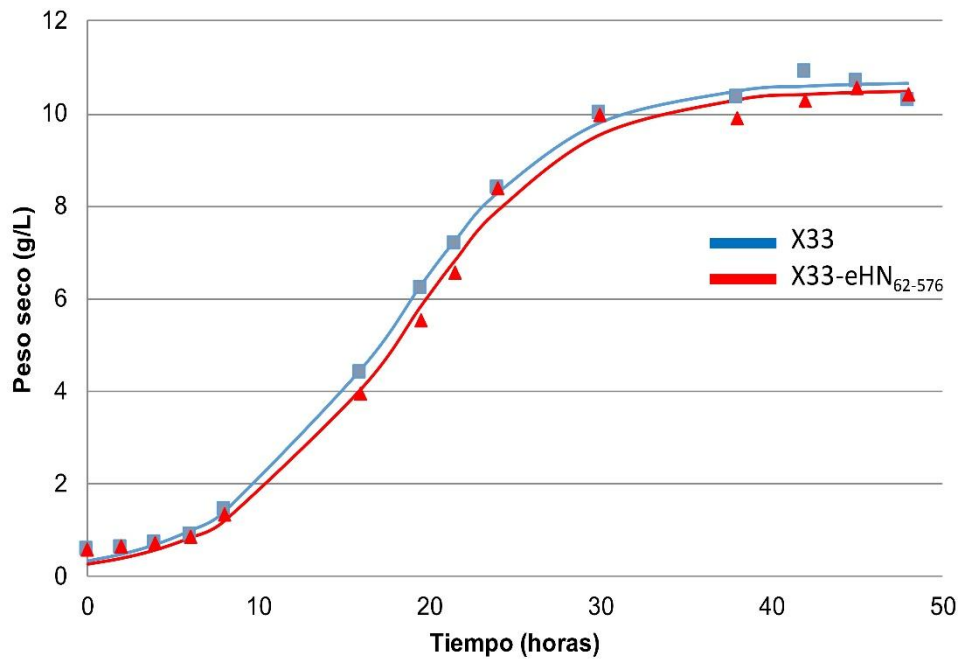


Figura 32. **Peso seco de *P. pastoris***. Peso seco en g/l correspondiente a diferentes unidades de absorbancia en medio de cultivo BMGY, la flecha en rojo señala el peso seco para 1 unidad de absorbancia que corresponde a 1.12 g/l.

Como se puede ver en la figura 32, los datos experimentales se ajustan a una línea recta con un valor de  $R^2$  de 0.99, adecuada para realizar los cálculos. Al utilizar la ecuación de la recta se calcula que 1 unidad de D.O. a 600 nm corresponde con 1.12 g/l de peso seco.

Conociendo el peso seco de la levadura en el medio de cultivo BMGY, se obtuvieron los datos experimentales para construir la curva de crecimiento celular a lo largo del tiempo. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de crecimiento celular, del cual se obtuvieron los parámetros cinéticos de la levadura (figura 33).



a

	X33	X33-eHN <sub>62-576</sub>
X máx (g/L)	10.692	10.512
$\mu$ máx	0.1960	0.197
T duplicación (horas)	3.536	3.521

b

Figura 33. **Crecimiento de *P. pastoris* en medio BMGY.** (a) Curva de crecimiento celular ajustado al modelo de crecimiento celular de la cepa X33 (en azul) y la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> (rojo), los puntos representan los datos experimentales, (b) parámetros cinéticos de las cepas durante su crecimiento en el medio.

En la figura 33a se puede observar la curva de crecimiento celular de la cepa X33 y de la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> a lo largo del tiempo. No existen diferencias significativas entre ambas curvas al utilizar como fuente de carbono el glicerol. Ambas cepas tienen un comportamiento típico de crecimiento con sustrato limitado y experimentalmente se comportan como la

relación propuesta por Monod (ecuación de crecimiento celular). Ambas cepas tardan aproximadamente 6 h en salir de la fase de latencia, a partir de las 10 h las cepas entran a la fase exponencial y se mantienen en esta fase hasta 24 h después de iniciar el crecimiento del cultivo, la fase de desaceleración corresponde a aproximadamente a las 24 h hasta las 30 h del cultivo, por último las cepas entran en la fase estacionaria a partir de las 30 h del cultivo, donde ya no se observan incrementos significativos de biomasa, indicando que el cultivo agotó los nutrientes, en la figura 33b se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos durante el ajuste al modelo de crecimiento celular. Las cepas llegan a tener como máximo entre 10-11 g/l de biomasa ( $X_{\text{máx}}$ ) una vez que se agotaron los nutrientes y corresponde a la mayor cantidad de biomasa que se obtendrá de cualquier cultivo en BMGY. La velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para ambas cepas es de 0.19, lo que indica que ambas cepas tienen constantes de consumo de nutrientes iguales. Finalmente ambas cepas tienen tiempos de duplicación de 3.5 h, lo que indica que necesitan de este tiempo para duplicarse cuando están a su máximo metabolismo. Estos parámetros indican que en la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> donde se encuentra incorporado el ORF del gen eHN, no hubo cambios significativos en sus parámetros cinéticos, por tanto la viabilidad celular no se alteró y la incorporación de ADN foráneo no altera la capacidad de crecimiento de la levadura.

Tiempos de duplicación prolongados, así como valores altos de biomasa han sido reportados por Chang et al., en 2006, al optimizar los parámetros cinéticos de *P. pastoris* en medio rico utilizando como fuente de carbono la glucosa, donde reportan valores de biomasa máximos de 14.3 g/l y tiempos de duplicación de 4.2 h, por ello se puede decir que es típico de esta levadura alcanzar valores de biomasa muy altos y tiempos de duplicación prolongados. Por otro lado, podemos observar que la fase exponencial, donde podemos tomar las células a su máximo metabolismo para inducir la expresión, es una fase amplia desde las 10 h hasta las 24 h de haber iniciado el cultivo. Por tanto se puede tomar el cultivo hasta antes de 8 g/l en donde la mayoría de la biomasa todavía no entra a la fase de desaceleración.



### 8.7. Expresión del eHN

Una vez conocida la curva de crecimiento de la levadura en medio BMGY se eligió 6 g/l de peso seco como la mejor muestra para tomar el cultivo e inducirlo a expresión, este dato corresponde a 20 h de crecimiento y 8 unidades de D.O. a 600 nm. En este tiempo las células se encuentran a su máximo metabolismo ya que están en fase media exponencial y antes de la fase de desaceleración, además es una cantidad de biomasa significativamente alta para inducir la expresión y aumentar la producción de proteína.

En primera instancia se monitoreó la expresión intracelular del ORF del gen eHN por medio de RT-PCR y la presencia de la proteína por western blot, durante 4 días de expresión con metanol. Esto como primer indicativo de que bajo las condiciones experimentales recomendadas por el manual de Invitrogen, fuesen las adecuadas para inducir la transcripción. En la figura 34a se observa el producto de RT-PCR del mensajero de la proteína eHN, el mensajero de la proteína está presente desde el día uno de expresión con metanol y se mantiene a lo largo de los cuatro días de expresión sin cambios significativos, este amplicón está ausente en el control negativo correspondiente a la cepa X33, por ello el fragmento observado corresponde al mensajero de eHN.

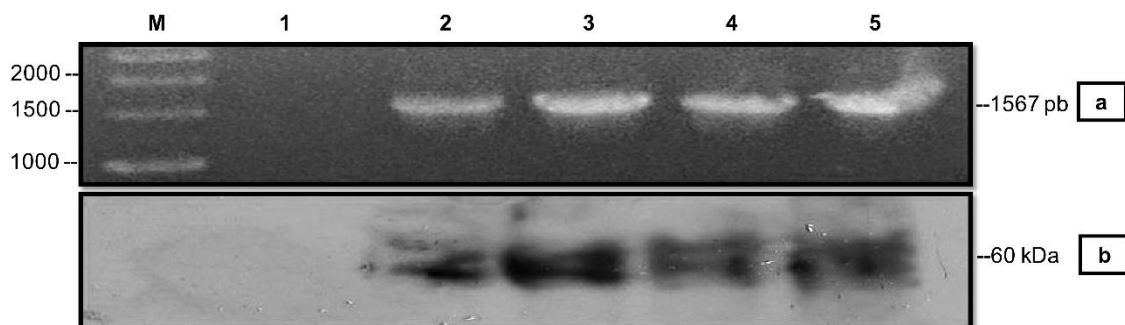


Figura 34. **Producción intracelular de eHN en X33-eHN<sub>62-576</sub>**. (a) RT-PCR amplificando el mensajero de eHN, (b) western blot de la fracción intracelular usando el anticuerpo c-myc, (M) marcador de peso molecular, (1) cepa X33, (2-5) uno a 4 días de expresión en X33-eHN<sub>62-576</sub>.

Por otra parte, en el Western blot podemos visualizar la presencia de la proteína eHN intracelularmente (figura 34b). La proteína eHN se produce también desde el día 1 y se puede observar un incremento de producción por intensidad en el día 2, a partir de ahí la producción

se mantiene, esto puede ser a consecuencia de la salida de la proteína al medio extracelular, ya que una parte de la misma se produce y otra llega al medio extracelular. En el control negativo de la cepa X33 no se observa señal, lo que nos asegura que la presencia de la señal es específica para la proteína eHN ya que posee la etiqueta c-myc y los anticuerpos monoclonales están dirigidos hacia esta etiqueta.

Por medio de este ensayo se puede concluir que la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> es capaz de expresar el ORF del eHN y producir la proteína intracelularmente y su producción comienza desde el primer día de haber inducido la expresión con metanol y dicha expresión se mantiene en los 4 días que se sondeó el experimento. Por otro lado, en el Western blot se observa la presencia no sólo de una señal, si no de varias señales juntas correspondiente a proteínas con pesos moleculares cercanos, esto puede deberse a la presencia de proteína en diferentes estadios de procesamiento, parte puede tener aún el factor alfa, otra parte puede tener diferentes patrones o formas inmaduras de glicosilación, formas de proteína listas para llegar al medio extracelular.

La producción intracelular que implica la pérdida del factor alfa y el proceso de glicosilación ha sido descrito por Alessio et al., en 2010, durante la producción de saporinas en la levadura. Describiendo que una vez producida la proteína recombinante es transportada al lumen del retículo endoplasmático donde comienza el proceso de glicosilación, posteriormente es fuertemente procesada en el aparato de Golgi por la peptidasa KEX2 para perder la señal del factor alfa y quedar con su N-terminal nativo, finalmente puede ser secretada al medio extracelular o al sistema vacuolar para su degradación.

Autores como Xia et al., en 2012, recuperaron el cultivo 24 h después de crecerlo en BMGY y aumentaron a 6 días de alimentación con metanol para incrementar la producción de la angiogenina humana en *P. pastoris*, así como también cuidaron los parámetros más importantes del cultivo como la temperatura y la agitación. Por otro lado, Fan et al., en 2012, incrementaron la producción de una xilanasas proveniente del hongo *Paecilomyces thermophile* en *P. pastoris* al inocular el medio de expresión con hasta 6 unidades de D.O. y alimentando con metanol por 5 días. De esta manera, aumentar la biomasa del cultivo antes de inducirlo y

prolongar los días de alimentación con metanol tiene mayores rendimientos de producción de proteína que lo recomendado por el manual de Invitrogen.

Para la producción extracelular del eHN, la presencia de la proteína fue sondeada por western blot tomando una muestra concentrada del medio libre de células por cada uno de los días de expresión con el objetivo no sólo de corroborar la producción manteniendo con metanol hasta por 8 días, sino que además, para poder determinar el día de mayor producción de eHN en el medio libre de células (figura 35).

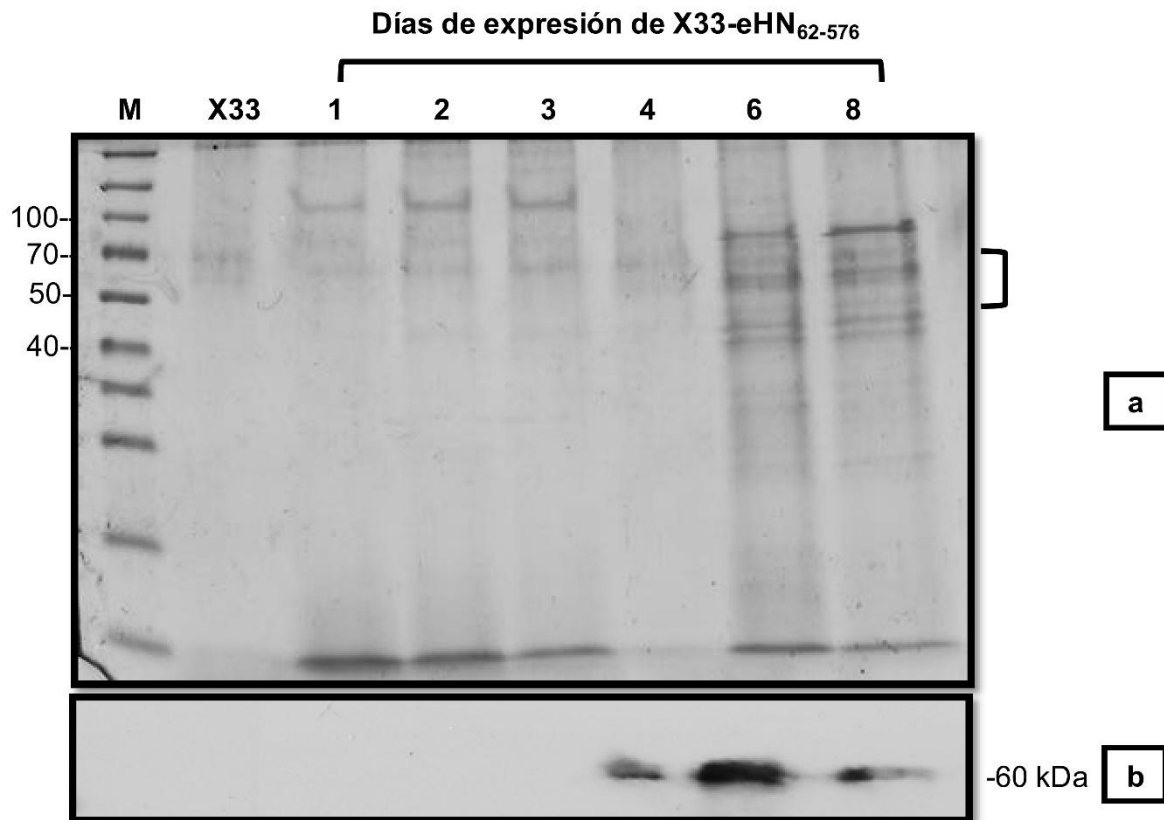


Figura 35. **Producción extracelular de eHN.** (a) PAGE-SDS de las proteínas del medio libre de células durante la expresión de X33-eHN<sub>62-576</sub>, (b) western blot con anticuerpos anti c-myc de las proteínas del medio libre de células, (M) marcador de peso molecular.

Como se observa en la figura 35a, X33-eHN<sub>62-576</sub> produce proteínas extracelulares a partir del primer día de alimentación con metanol, esta producción aumenta conforme

aumentan los días de expresión, sobre todo a pesos moleculares mayores a 40 kDa. A la altura del peso molecular esperado para la proteína eHN (60 kDa) se observa una concentración mayor de proteínas sobre todo a los días 6 y 8 de expresión (delimitado en corchete en la figura), por lo que son los días en los cuales la levadura secreta más proteínas extracelulares. En comparación con el control negativo (proteínas de la cepa X33) no se observa gran cantidad de proteínas extracelulares, por lo que estas proteínas pueden ser diferentes formas procesadas de la proteína eHN con diferentes patrones de glicosilación, por ello fue necesario el western blot.

Mediante el Western blot (figura 35b) se confirmó la presencia de la proteína eHN en el medio libre de células, donde se observa una señal específica ausente en el control negativo, lo que indica que la proteína llega al medio extracelular gracias al factor alfa con un peso molecular esperado. Por otra parte, la proteína se detectó a partir del día 4 hasta el día 8, siendo el día 6 el de mayor producción. La falta de señal en los días anteriores puede deberse a que la proteína requiere de varios días para abandonar la célula o también puede deberse a que las cantidades que la levadura secreta en los primeros días de expresión son indetectables bajo las condiciones experimentales a las cuales se realizaron los experimentos. Sin embargo, se puede concluir que la proteína eHN es detectable a partir de 4 días de expresión y que son los días mínimos necesarios para producir cantidades significativas del eHN en el medio libre de células.

En los experimentos realizados por Yongkiettrakul et al., en 2009, al expresar el ectodominio de una neuraminidasa de influenza aviar A/H5N1 en *P. pastoris* encontraron un comportamiento similar en cuanto a la producción de proteínas extracelulares, por lo que la levadura secreta bajas cantidades de proteínas a su medio extracelular, esto también está citado en el manual de Invitrogen.

Las cantidades de proteína producida y la biomasa total bajo estas condiciones experimentales (comenzando a 8 unidades de D.O. y alimentando por 8 días con metanol) se compararon con las condiciones estándares propuestas por el manual de Invitrogen, las cuales

son comenzando a una D.O. de 1 el medio de expresión y alimentando con metanol por 4 días (figura 36).

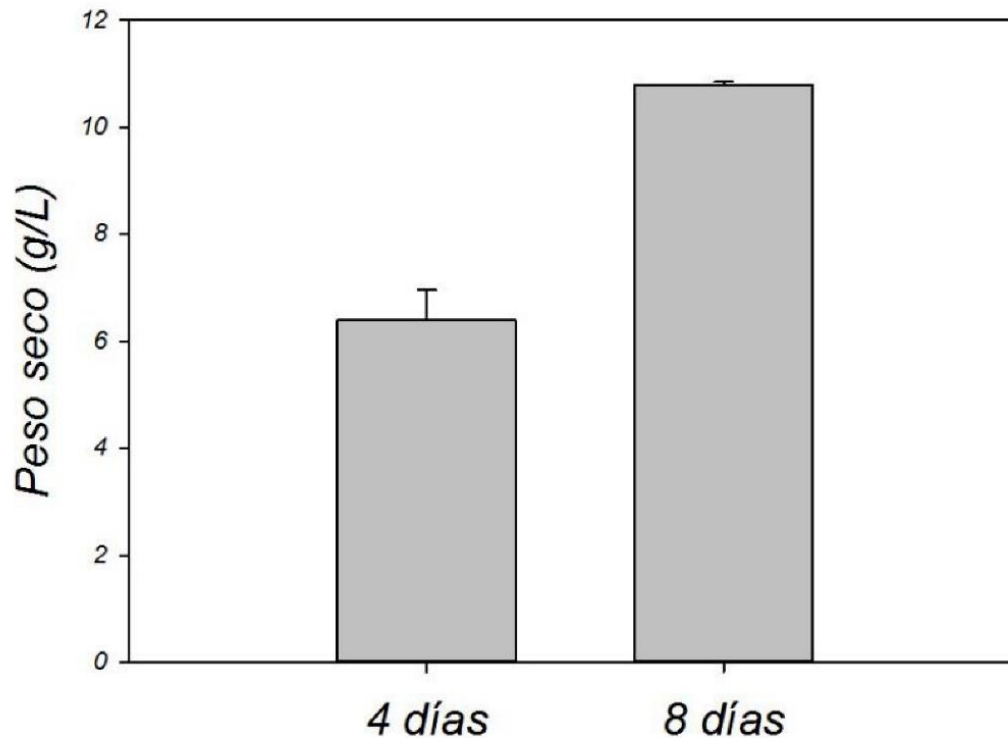


Figura 36. **Biomasa producida por X33-eHN<sub>62-576</sub>**. Peso seco recuperado durante expresión alimentando con metanol por cuatro y ocho días.

Como se puede ver en la figura 36, hubo un incremento significativo de la cantidad de biomasa recuperada después de someter a expresión 4 días y ocho días la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub>, después de 4 días de expresión la levadura produjo alrededor de 6 g/l de peso seco, mientras que con ocho días se recuperaron más de 10 g/l de peso seco, esto significó un aumento del 40.64% al comparar ambos procedimientos; por lo que se puede concluir que bajo las condiciones experimentales bajo las cuales finalmente se llevó a cabo la expresión del eHN tuvo un mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de células presentes en el medio de cultivo y esto está relacionado con la cantidad de proteínas extracelulares que se producen en el medio (figura 37).

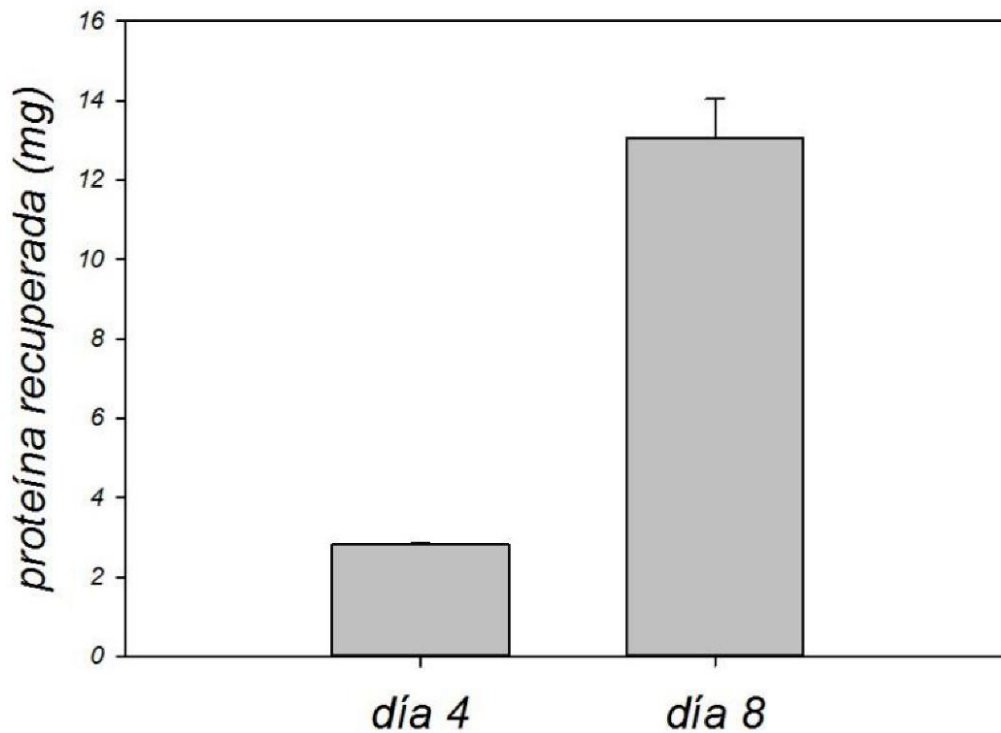


Figura 37. **Cantidad de proteína extracelular.** Proteína recuperada por 100 ml de cultivo en X33-eHN<sub>62-576</sub> durante expresión alimentando con metanol por cuatro y ocho días.

La cantidad de proteína extracelular recuperada al llevar a expresión la cepa X33-eHN<sub>61-576</sub> por 4 y 8 días de expresión también aumentó significativamente, como se observa en la figura 37. Por 4 días de expresión se pudieron recuperar casi 3 mg por 100 ml de cultivo mientras que por 8 días de expresión se recuperaron más de 13 mg por los 100 ml de cultivo, esto significa un aumento del 78.34% al comparar ambos procedimientos. Se puede concluir que llevar a expresión con metanol por 8 días y comenzar la inducción a altas densidades celulares (D.O.=8) tiene aumentos significativos en cuanto a la producción de proteína extracelular y esto está relacionado con el incremento de la cantidad de la proteína recombinante recuperada (eHN), esto es importante ya que facilita el trabajo experimental, como lo son la purificación y la caracterización de la enzima.

#### 8.8. Actividad enzimática del eHN

La actividad enzimática del eHN se analizó con la proteína sialilada fetuina como sustrato, en el medio libre de células de X33-eHN<sub>62-576</sub> durante los días de la expresión. Fue

posible detectar la actividad enzimática de la proteína desde el primer día con una actividad específica de 10 nmol/min/mg. El aumento de la actividad fue progresivo a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo de 67 nmol/min/mg después de 6 días de expresión. Desde este día en adelante, la actividad fue constante, demostrando que no son necesarios más días de expresión para recuperar mayores cantidades de proteína recombinante (figura 38).

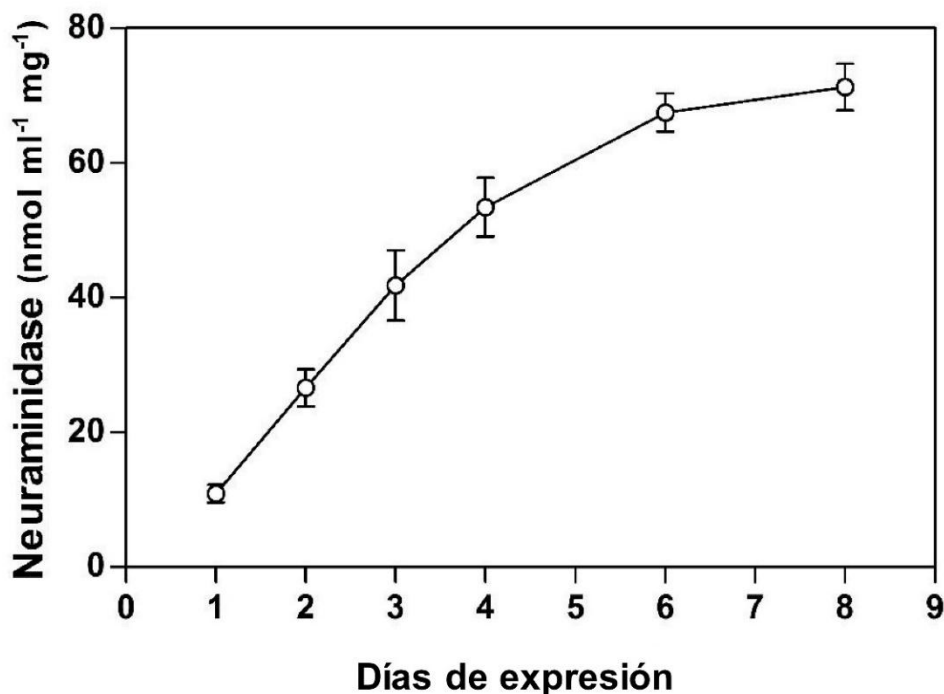


Figura 38. **Actividad neuraminidasa en el medio libre de células.** Actividad de la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> a lo largo de los días de expresión.

Como control negativo se utilizó el extracto de proteína a partir de medio libre de células de la cepa X33, el cual no mostró actividad neuraminidasa, demostrando que la actividad presentada pertenece al eHN. Un sobrenadante de cultivo de virus se utilizó como control positivo, y mostró una actividad específica de 5.34 nmol/min/mg.

La actividad de la neuraminidasa también se probó usando MUNANA como sustrato, que es un sustrato que tiene más sensibilidad. Para este ensayo se utilizó medio libre de células concentrado obtenido de X33-eHN<sub>62-576</sub> a partir de 6 días de la expresión, el cual presentó 49,385 unidades de fluorescencia relativa (RFU) en comparación con el extracto proveniente

de la cepa X33 (control negativo), que mostró 1577 RFU, este valor se consideró como el fondo de la prueba de la neuraminidasa con este sustrato.

Mediante estos ensayos se demostró que la levadura es capaz de producir una proteína enzimáticamente activa sobre dos sustratos específicos para neuraminidasas y la cual tiene todos los elementos necesarios para ser funcional enzimáticamente hablando, por tanto la levadura es capaz de realizar ciertos cambios postraduccionales favorables para la proteína eHN, dentro de los que se pueden encontrar el plegamiento y la glicosilación.

La producción de proteínas enzimáticamente activas provenientes de humanos, hongos y plantas en *P. pastoris* ha sido reportado por muchos autores en los últimos años. Wang et al., en 2014, reportaron la expresión de la proteína MAP30 de *Momordica charantia*, funcionalmente activa, la cual ha tenido interés significativo al poseer actividad antitumoral y antiviral. Fazlalipour et al., en 2015, expresaron las proteínas E1 y E2 del virus de la hepatitis C funcionalmente activas en *P. pastoris*, consideradas buenas candidatas para una vacuna. Kaewthai et al., en 2010, expresaron varias hidrolasas provenientes de los genes XTH, funcionales en la levadura proveniente de la cebada, demostrando su utilidad para estudiar el sistema proteolítico de la herbácea. Shi et al., en 2007, expresaron una catalasa humana funcionalmente activa en la levadura, la cual tiene importancia en el desarrollo de algunas enfermedades. Kang et al., en 2012, también tuvieron éxito al expresar una quitina desacetilasa proveniente de *Colletotrichum lindemuthianum* y Salah et al., en 2009, también lograron obtener una lipasa proveniente de *Rhizopus oryzae*.

#### 8.9. Estudios cinéticos de la eHN

La proteína eHN procedente de los medios libres de células fue utilizada para realizar estudios cinéticos, conocer si mantenía su actividad enzimática y datos importantes como sus parámetros cinéticos. Para este fin, una concentración estándar de enzima cuantificada (2.27 µg) fue utilizada en todos los ensayos. Se realizaron primero las cinéticas a diferentes concentraciones del sustrato fetuína (desde 1 hasta 5 mg/ml) provenientes de un solo stock concentrado de 10 mg/ml y se variaron los tiempos de reacción desde cinco hasta 40 min,



punto en el cual se observó que las curvas tendieron a la asíntota, finalmente los nmoles de ácido neuramínico liberados fueron graficados respecto al tiempo (figura 39).

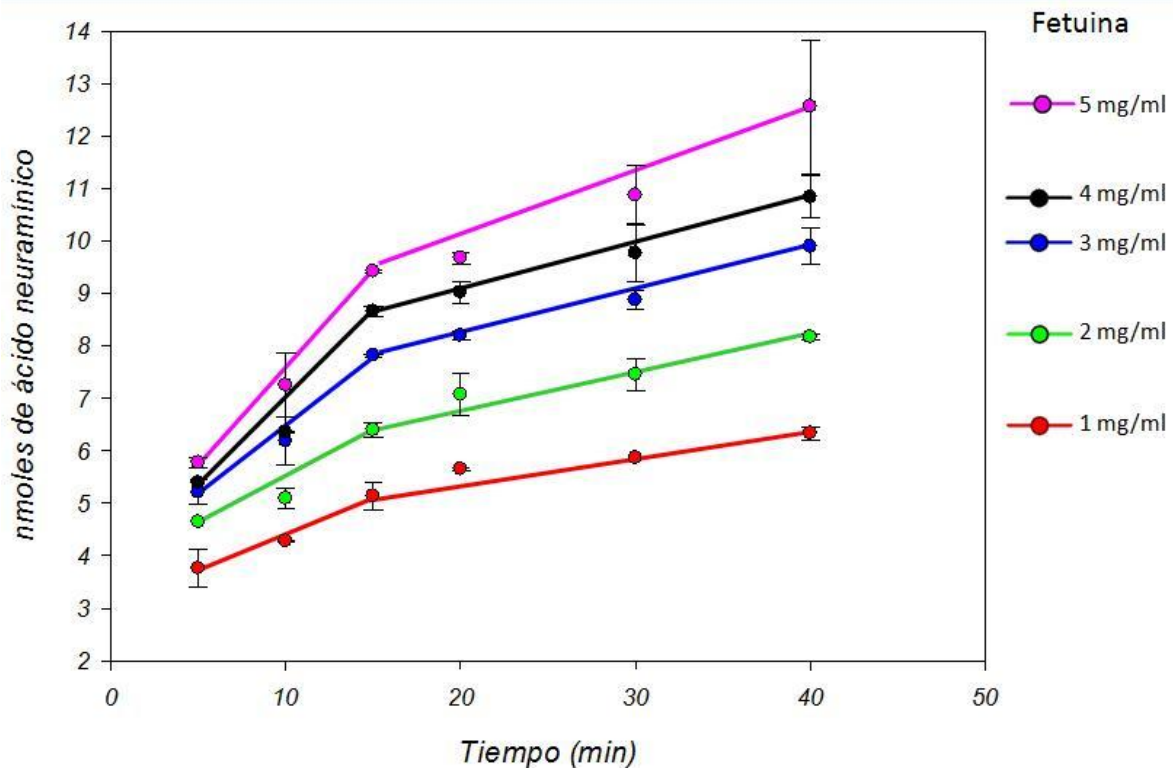


Figura 39. **Cinéticas de reacción enzimática.** Liberación de los nmoles de ácido neuramínico en función del tiempo de reacción a diferentes concentraciones del sustrato fetuina variando el tiempo de reacción a una concentración estándar de la proteína eHN. Los ensayos fueron realizados por duplicado y en dos corridas completas diferentes.

Como se puede observar en la figura 39, la liberación de ácido neuramínico a lo largo del tiempo generó curvas que mantienen pendientes prolongadas desde los 5 min hasta aproximadamente 15 min, a partir de las cuales las curvas tienden a la asíntota. Las pendientes aumentan conforme la concentración del sustrato se incrementa, en las concentraciones más altas de 4 y 5 mg/ml, las pendientes tienden a transponerse, lo que indica que la reacción comienza a llegar al punto de saturación. Se construyó la curva de saturación de la enzima por el sustrato tomando la velocidad de reacción de cada una de las diferentes cinéticas (figura 40).

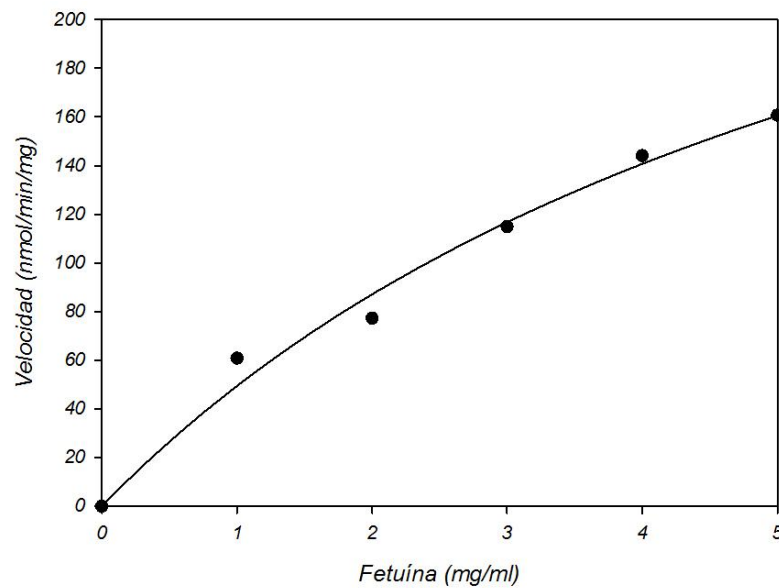


Figura 40. Curva de saturación de la proteína eHN por el sustrato fetuína.

Como se puede observar en la figura 40, se obtiene la curva de saturación del eHN para la fetuína, teniendo que a 5 mg/ml de fetuína la enzima se encuentra saturada. El tipo de gráfico corresponde a una cinética típica de Michaelis-Menten

Los parámetros cinéticos se determinaron con la representación de Lineweaver-Burk (figura 41).

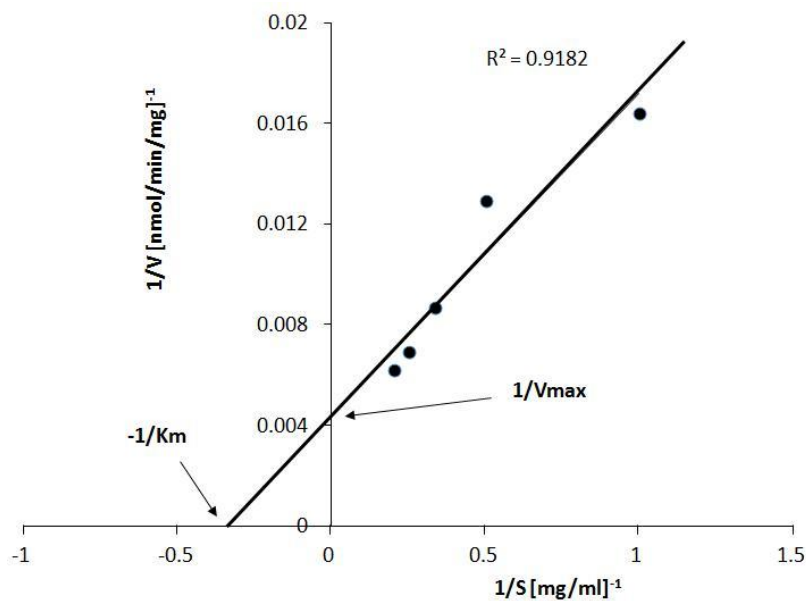


Figura 41. Representación de Lineweaver-Burk. Recíproco de los valores de la curva de saturación del eHN por la fetuína como sustrato.

Como se puede observar en la figura 41, los puntos se ajustan en una línea recta, calculando en las intersecciones de los ejes la  $V_{max}$  con un valor de 227.3 nmol/min/mg y la  $K_m$  de 2.86 mg/ml.

En un trabajo precedente de Santos-López en 2000, purificó parcialmente por cromatografía de filtración en gel, la proteína HN de la cepa PAC1 y al utilizar el sustrato fetuína, obtuvo una  $V_{max}$  de 581 nmol/min/mg y una  $K_m$  de 1.4 mg/ml. Al comparar los valores, la proteína recombinante eHN posee una  $V_{max}$  menor que la HN de PAC1 y una  $K_m$  parecida, siendo del mismo orden de magnitud. Esto indica que la eHN posee propiedades cinéticas similares en cuanto a la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ), teniendo una velocidad de catálisis un poco menor. Esto último, puede deberse a las características de la proteína expresada en levadura, ya que no sólo fue expresada en un sistema heterólogo, sino que además no es la proteína completa, ya que se expresó únicamente el ectodominio, aunado al hecho de que la proteína tiene las etiquetas c-myc y 6 His.

Será interesante posteriormente, realizar las cinéticas con el eHN purificado y utilizando tanto fetuína como otros sustratos más específicos como Sialil( $\alpha$ 2,3)lactosa o MUNANA (sustrato fluorescente) y comparar los parámetros cinéticos obtenidos de la HN nativa.

#### *8.10. La proteína eHN es reconocida por sueros de cerdos infectados con PorPV*

Dado que el objetivo principal del trabajo fue producir el eHN con propiedades inmunogénicas, en una primera instancia se avaluó la antigenicidad de la proteína eHN con una colección de sueros de cerdos infectados con PorPV proporcionados por la Dra. Sandra Cuevas del INIFAP. Estos sueros pertenecen a animales de granjas del Bajío Mexicano, donde actualmente circula el virus. La prueba se basa en un reconocimiento por western blot, donde la proteína eHN de la levadura se incubó con los sueros. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la figura 42.

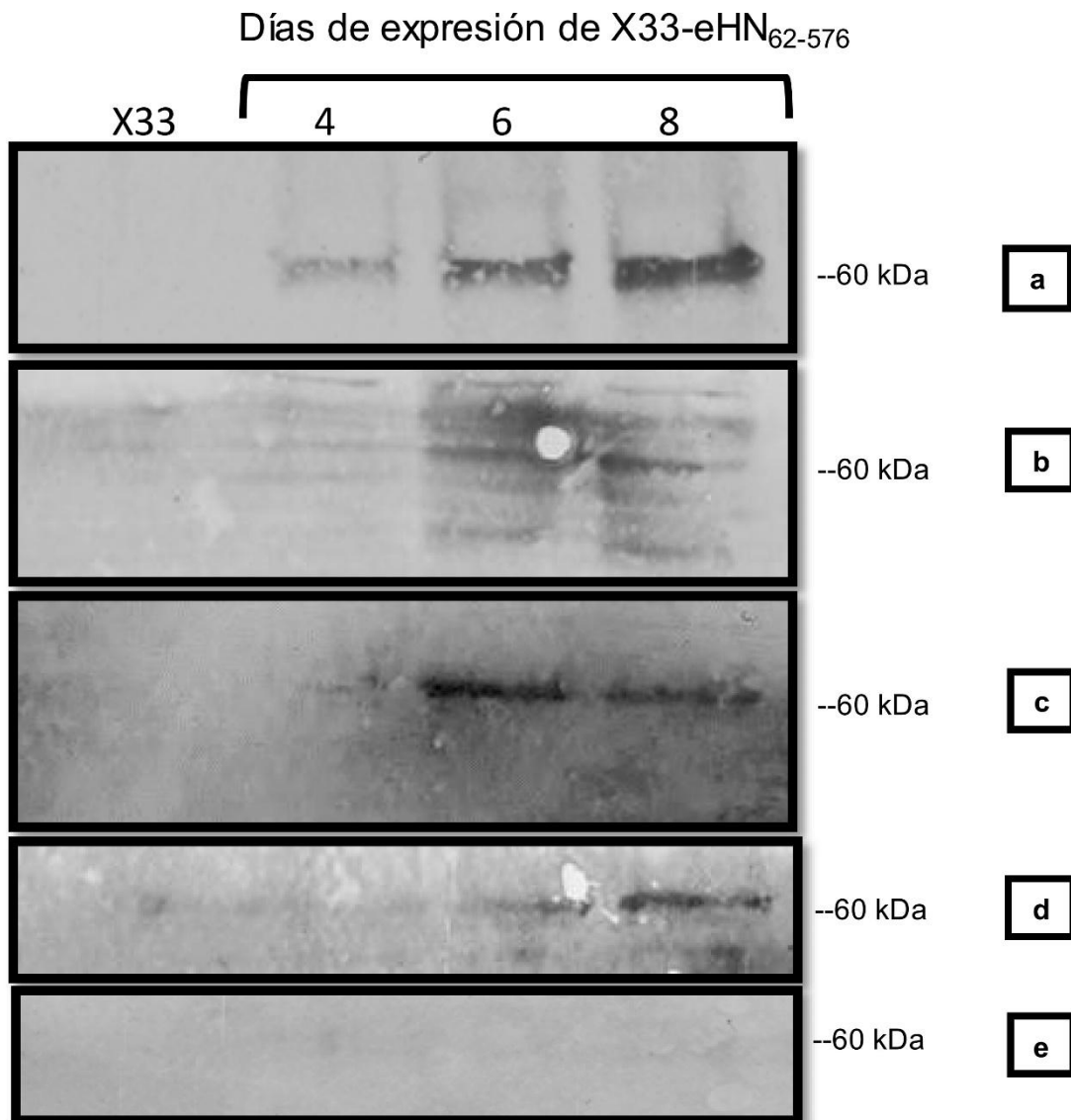


Figura 42. **Antigenicidad de la proteína eHN.** Reconocimiento con sueros de cerdos infectados con PorPV en western blot. (a) Suero de cerdo infectado experimentalmente con PorPV-PAC3 (UNAM, México, DF), (b) hembra infectada del Estado de México, (c) Guanajuato, (d) Palo Alto-INIFAP, México, DF, (e) suero de cerdo libre de infección.

En la figura anterior se puede observar que una muestra de suero de cerdo infectado experimentalmente con la cepa PAC3 reconoció el eHN recombinante a partir de 4 días a 8 días de expresión (figura 42a), esta muestra corresponde a un cerdo con altos títulos de anticuerpos contra PorPV y con signos clínicos evidentes de infección (datos proporcionados por la Dra. Sandra Julieta Cuevas Romero). Las muestras de suero de cerdos infectados con

cepas que circulan actualmente en las granjas en el norte-centro de México, la llamada región del Bajío (estados de Guanajuato, Querétaro, Aguascalientes y Jalisco), se utilizaron con el mismo objetivo. Todos los sueros probados reconocen la proteína eHN, con diferente afinidad y especificidad. Una muestra de hembras de reemplazo convaleciente de una granja persistentemente infectada de Zumpango (Estado de México) mostró baja de reacción para la proteína eHN (figura 42b). Una muestra de una hembra de reemplazo infectada de Guanajuato reconoció el eHN a los 6 y 8 días de expresión (figura 42c) y una muestra de una hembra de reemplazo infectada experimentalmente en el INIFAP reconoció la proteína en el día 8 de expresión (Figura 42d). Una muestra de cerdo sano se utilizó como control negativo (figura 42e), lo que indica que las proteínas nativas de la levadura no tienen ninguna reactividad contra los anticuerpos de los cerdos y el resultado es concluyente para afirmar que los sueros infectados con PorPV son capaces de reconocer la proteína eHN.

Mediante estos ensayos se puede decir que la proteína eHN de la levadura tiene elementos estructurales muy similares a la proteína HN nativa del PorPV ya que los anticuerpos anti HN son capaces de reconocer la proteína de la levadura a pesar de provenir de cepas diferentes a la de PAC1 (cepa de la cual proviene el eHN), por ello la proteína recombinante sería un buen antígeno para considerarlo en pruebas de diagnóstico como el ELISA. Por otro lado, también se probaron otros sueros positivos a PorPV de la colección del INIFAP, los cuales tenían altos títulos de anticuerpos contra la proteína HN, mediante el ensayo de ELISA indirecto, el cual es un ensayo de detección más rápida y de preferencia a la hora de analizar muchas muestras presuntivas debido a su fácil elaboración y bajo costo.

Como se observa en la figura 43, dos muestras de sueros de cerdos infectados tuvieron una D.O. de más del doble respecto al control negativo (suero de cerdo libre de infección) en el ensayo de ELISA.

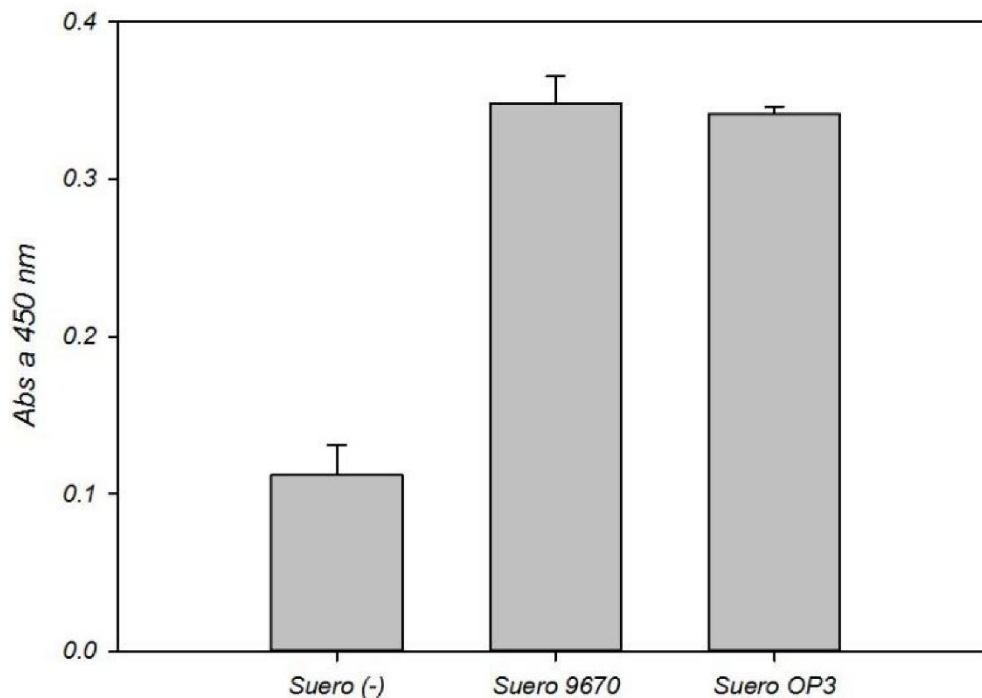


Figura 43. **Reconocimiento de eHN por sueros de cerdos infectados.** Reconocimiento mediante ensayos de ELISA indirecto, Suero (-) libre de infección, Suero 9670 perteneciente a cerdo infectado en la UNAM, Suero OP3 perteneciente a un cerdo infectado de Guanajuato.

Este resultado es útil para diseñar un método de diagnóstico de la EOA por ELISA. No obstante, será necesario realizar un estudio con un mayor número de muestras de cerdos infectados y no infectados para determinar la línea de corte para establecer la especificidad y sensibilidad de la prueba.

Mediante estos ensayos de antigenicidad se puede confirmar que el antígeno eHN posee características antigénicas muy similares a la proteína nativa del virus, además; las muestras usadas en estos ensayos corresponden a animales del pie de cría, que son hembras destinadas a la reproducción y que tienen mayor valor para el granjero, dichas hembras son animales jóvenes con no más de tres partos estando en la edad óptima para la reproducción.

Por todo esto, el poder detectar, mediante este antígeno, animales infectados con PorPV a tiempo para evitar la propagación de la enfermedad es de primordial importancia para la industria porcícola del Bajío y sobre todo en lo que se refiere a las hembras del pie de cría,

en las crías y en los sementales, los cuales tienen mayor valor económico, así como en los animales convalecientes de los cuales se desconoce su capacidad de ser infectivos.

La estrategia de determinar la antigenicidad de las proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* mediante western blot usando sueros infectados ha sido usada en las proteínas de tipo inmunoglobulina leptospiral y la lipoproteína inmunodominante (LipL32) producidas por Hartwig et al., en 2010 y evaluadas con sueros de pacientes infectados con leptospirosis, los cuales lograron observar un reconocimiento específico para dichas proteínas en western blot, demostrando la importancia de utilizar estos antígenos para la detección oportuna de la enfermedad.

#### 8.11. Purificación del eHN

La cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados se basa en la afinidad que tienen las histidinas por el níquel, aprovechando esta característica, la proteína eHN se purificó en un solo paso gracias a la presencia de la etiqueta de 6 his en el C-terminal. Por ello, el eHN del medio libre de células concentrado por precipitación con sulfato de amonio, se purificó mediante cromatografía de afinidad y la proteína se recuperó en un proceso de purificación de un solo paso desde este medio y se eluyó usando imidazol, que tiene una estructura muy similar a las histidinas. Todo el proceso de purificación se siguió midiendo la D.O. de todas las fracciones de elución de la columna de cromatografía y construyendo un cromatograma de D.O. vs volumen de elución, lo cual ayuda a entender el proceso de purificación y arroja datos importantes acerca del proceso, como lo son la calidad del empaquetamiento de la columna, perfil de elución de las proteínas, tiempo, etc. (figura 44).

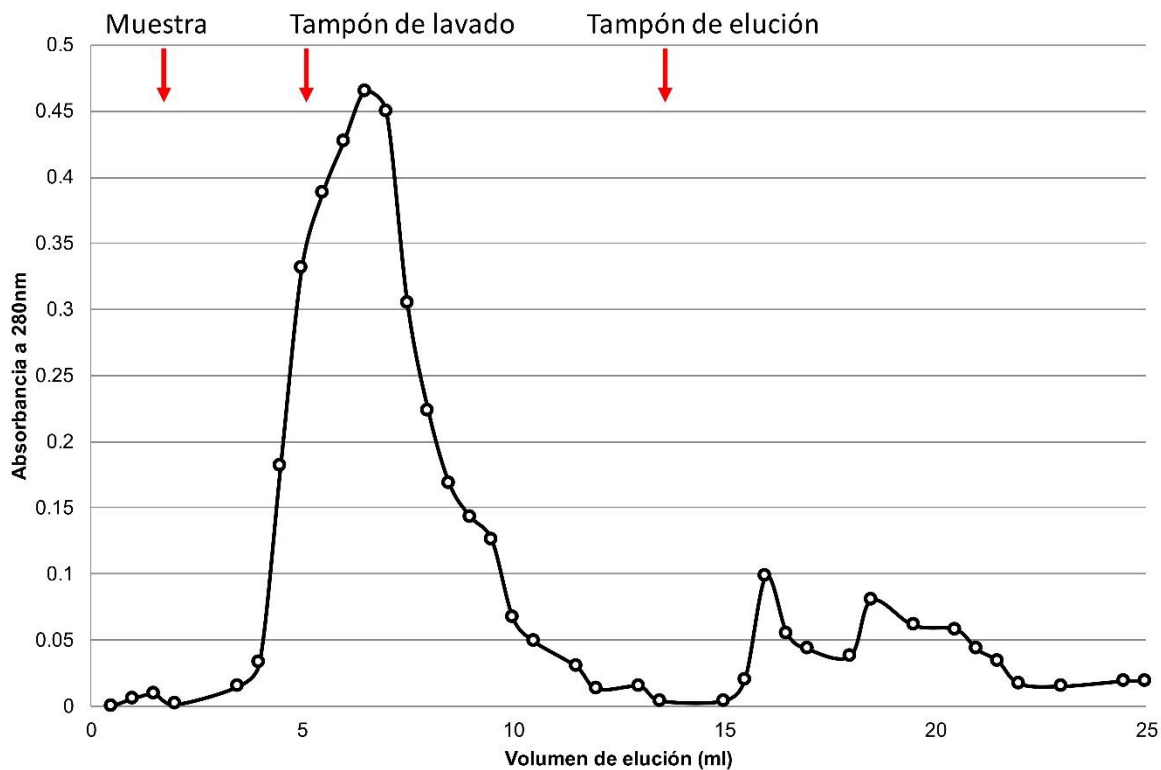


Figura 44. **Perfil de elución del proceso de purificación.** Purificación por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados del eHN. Columna con 1.5 ml de resina y 3 ml de proteínas del medio libre de células concentrado con el eHN.

En la figura 44, se muestra el perfil de elución de la cromatografía, en los primeros 3 ml que eluyen de la columna no hay proteínas, es el volumen muerto necesario para que la muestra de proteína entre en contacto con toda la resina, posteriormente con el tampón de lavado eluye un gran volumen (4 a 11 ml), este pico corresponde a la fracción del “no pegado” que son todas las proteínas contaminantes que no han tenido afinidad por la columna, las cuales llegaron hasta 0.45 D.O. a 280 nm. Después del pico del “no pegado” la columna regresa al equilibrio, llegando la absorbancia a cero, por tanto, se han logrado eliminar todas las proteínas contaminantes mediante los lavados. Posteriormente se eluye el eHN con el tampón de elución que tiene altas concentraciones de imidazol, se observan dos picos continuos en el volumen de 16 a 22 ml. La presencia de dos picos juntos puede deberse a proteínas con pequeñas diferencias en cuanto a peso molecular o también pueden ser dímeros de la misma proteína. Finalmente la columna regresa al equilibrio al regresar la absorbancia a cero, por ello se logra eluir toda la proteína de interés que estaba pegada en la columna. Con



esto, se puede decir que el proceso de purificación siguió un comportamiento típico de una purificación por cromatografía de afinidad y que logra recuperar una fracción de proteína que tuvo afinidad por la columna durante la elución, sin embargo; el análisis de las fracciones fue necesario para corroborar la presencia de la misma (figura 45).

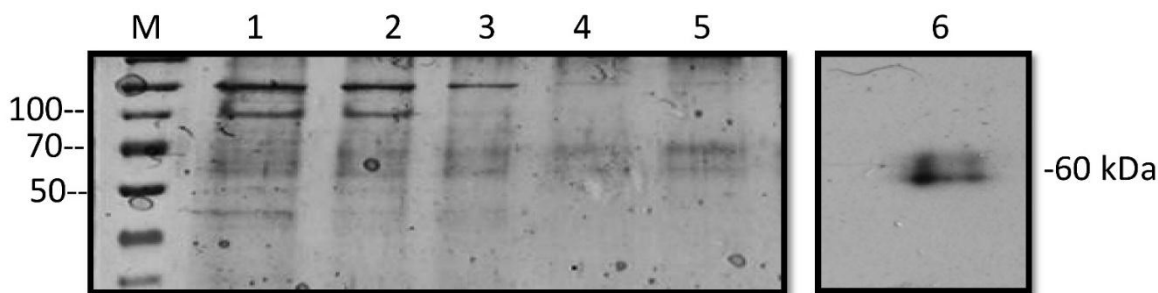


Figura 45. **Proteínas del proceso de purificación del eHN.** SDS-PAGE: (M) Marcador de peso molecular, (1) muestra antes de purificación, (2 y 3) fracción del no pegado, (4 y 5) eluciones, (6) western blot de la elución.

Como se muestra en la figura 45, existen algunas proteínas contaminantes en la muestra que entra a la columna de purificación, sobre todo de pesos moleculares mayores a 50 kDa, que corresponden a proteínas secretadas por la levadura (figura 45, 1), estas proteínas contaminantes se logran eliminar durante los lavados (figura 45, 2 y 3) estando presentes todas las proteínas de pesos moleculares altos, finalmente en las eluciones se observa la presencia de dos bandas con peso molecular muy similar y cercanas al peso molecular del eHN esperado de 60 kDa (figura 45, 4 y 5). Estas dos bandas se analizaron por western blot para confirmar que se trataran del eHN (figura 45, 6) donde se obtuvo la señal esperada para la proteína eHN, donde se aprecia señal para ambas bandas, por lo que se puede decir que en el proceso de purificación se obtuvo la proteína de interés y estas dos bandas corresponden al eHN, que pueden ser proteínas con patrones de glicosilación ligeramente diferentes o proteína procesada de diferente forma en el sistema de membranas, sin embargo el objetivo de eliminar las proteínas contaminantes se logró, conservando la fracción que tuvo afinidad por la columna y que corresponde a proteína con peso molecular similar al esperado, además de que da señal en western blot y posee actividad neuraminidasa, por tanto corresponde al eHN producido por la levadura. El rendimiento de este proceso de purificación para 100 ml de medio libre de células

concentrado (correspondiente a 1000 ml de medio libre de células) fue de 92%, lo que representa 1.2 mg del eHN puro (tabla 3). La actividad específica se incrementó 5.3 veces, lo que indica que se eliminaron las proteínas contaminantes y se recuperó la mayor parte de la actividad total. Con un factor de purificación de 5, la cepa X33-eHN<sub>62-576</sub> produce pocas proteínas contaminantes en el medio libre de células, lo que facilita el proceso de purificación. Estas cantidades fueron suficientes para inmunizar a los ratones, para lo cual se usaron 5 µg de proteína por cada animal.

Tabla 3. **Rendimiento del proceso de purificación.** Purificación del eHN a partir de un l del medio libre de células.

Paso de purificación	Actividad total (nmol/min)	Proteína total (mg)	Actividad específica (nmol/min/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Medio libre de células concentrado (10X)	298.1	6.9	43.2	100	1
Elución (Ni-NTA agarose)	276	1.2	230	92.58	5.32

Como se observa en la tabla 3, para 1 L de medio libre de células se recuperaron 1.2 mg de proteína de interés con un rendimiento del 92%. Este valor se puede comparar con lo obtenido por otros autores que han expresado proteínas en *P. pastoris*, como Weiss et al., en 1995, que recuperaron 1 mg/l del receptor de serotonina del ratón al recuperarla del medio libre de células de una cepa Mut<sup>+</sup>, también Brankamp et al., en 1995, recuperaron 10 mg del medio libre de células de la proteína ghilanten de una cepa Mut<sup>+</sup>, mientras que Vozza et al., en 1996 recuperaron 21 mg de una enterocinasa secretada por una cepa Mut<sup>+</sup>. Por ello, los rendimientos de los procesos de expresión en la levadura varían ampliamente dependiendo de la proteína que se esté expresando, pero la cantidad de proteína recuperada del medio libre de células siempre son cantidades bajas que rondan los mg/l.

### 8.12. Producción de anticuerpos anti eHN

Después de confirmar la presencia de la proteína eHN por Western blot y la actividad enzimática en las eluciones del proceso de purificación, estas muestras se dializaron contra agua y se conservaron por liofilización. Posteriormente, 5  $\mu\text{g}$  de la proteína pura se resuspendió en un amortiguador de PBS con 5  $\mu\text{g}$  del adyuvante ISCOMS. El adyuvante AbISCO-100 (Isconova AB, Uppsala, Sweden) es una formulación de saponinas de *Quillaja saponaria* con colesterol y fosfolípidos como ISCOMs (Complejos inmune-estimulantes), actualmente llamada Matrix-Q (Isconova AB, Uppsala, Sweden) y ha tenido buenos resultados para estimular el sistema inmune. Esta mezcla se utilizó para inmunizar ratones de la cepa CD-1 vía subcutánea y se monitoreó la producción de anticuerpos específicos contra eHN mediante ELISA indirecto tomando muestras por punción de la cola y finalmente los animales fueron sangrados vía intracardiaca recuperando aproximadamente 1 ml de suero por animal. La producción de los anticuerpos se siguió a lo largo de los 28 días que duró la inmunización y fue comparado con los animales que fueron inmunizados únicamente con la proteína y aquellos inmunizados con PBS (control negativo) (figura 46).

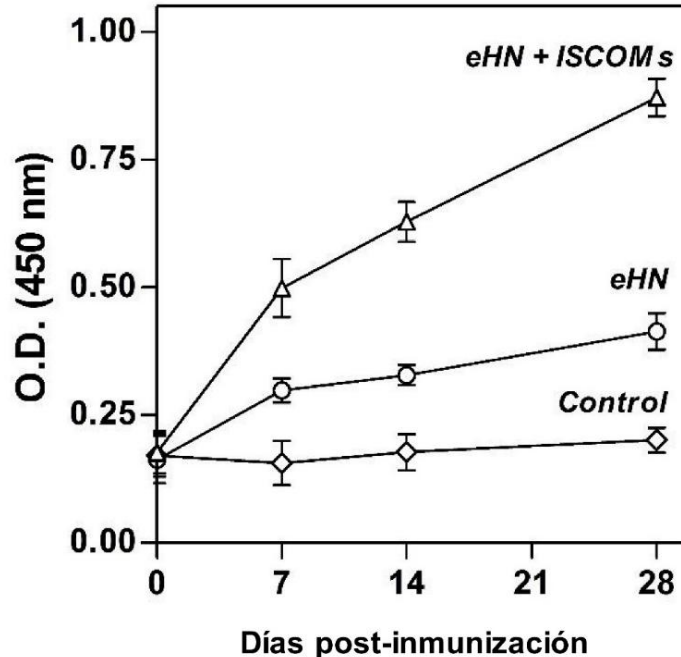


Figura 46. **Producción de anticuerpos anti-eHN por ELISA.** Los sueros de los ratones inoculados se valoraron por ELISA indirecto. (eHN+ISCOMs) ratones inmunizados con la mezcla adyuvante proteína eHN, (eHN) ratones inmunizados sólo con la proteína eHN, (control) ratones inmunizados sólo con PBS.

Como se muestra en la figura 46, los anticuerpos obtenidos reconocen la proteína durante los días de inmunización y aumenta con el tiempo en los ratones inmunizados con la mezcla de proteína-adyuvante, la producción de anticuerpos anti-eHN fue significativamente mayor que en los animales inmunizados únicamente con la proteína, lo que sugiere que la mezcla proteína-adyuvante potencia la respuesta inmune para generar anticuerpos. Sin embargo la proteína por sí sola es capaz de generar respuesta inmune en los animales. Esto confirma que la proteína recombinante producida en la levadura tiene los elementos necesarios para generar una respuesta inmune en ratones, incluso sin adyuvante, en comparación con los ratones de control negativos (inoculados con PBS). Las diferencias en la densidad óptica que van desde 2 a 8 veces de aumento se obtuvieron en el grupo proteína-adyuvante en comparación con controles negativos a lo largo del tiempo. El suero de los animales control inoculados con PBS no mostraron aumentos significativos de D.O. durante todo el experimento y estos niveles se consideran como el fondo de prueba. Con estos sueros se llevaron a cabo los ensayos de sero-neutralización para determinar si pueden inhibir la replicación del PorPV en cultivo celular.

Sjölander et al., en 1998, escribió una revisión acerca del uso de los ISCOMs como adyuvante, dando varios ejemplos de la utilidad de este adyuvante. En el caso de la producción de anticuerpos anti influenza, la administración subcutánea en ratones de 0.01  $\mu\text{g}$  de antígeno con el adyuvante ISCOM indujo buena respuesta inmune y con las proteínas gp340 y HSV-1, de las cuales se necesitó de 1-5  $\mu\text{g}$  para generar respuesta. Estos resultados fundamentan el uso de ISCOMS en la producción de anticuerpos y respaldan la estrategia seguida por nosotros para generar anticuerpos anti eHN en ratones.

### *8.13. Creación de un inóculo de trabajo del PorPV cepa PAC1*

Para propagar el virus PAC1 se utilizó la línea celular PK-15 (células de riñón de cerdo). El concentrado del virus se utilizó para infectar una placa de 25  $\text{cm}^2$  con un porcentaje de confluencia del 90% dejando la infección por 72 h, tiempo durante el cual se monitoreó el efecto citopático para observar el progreso de la infección y detenerla cuando se tuviera un porcentaje de células viables poco mayor al 50%. El segundo pase del virus se realizó tomando el sobrenadante del primer pase para infectar una segunda caja de células de PK-15

al 90% de confluencia y se monitoreó el progreso de la infección por efecto citopático (figura 47).

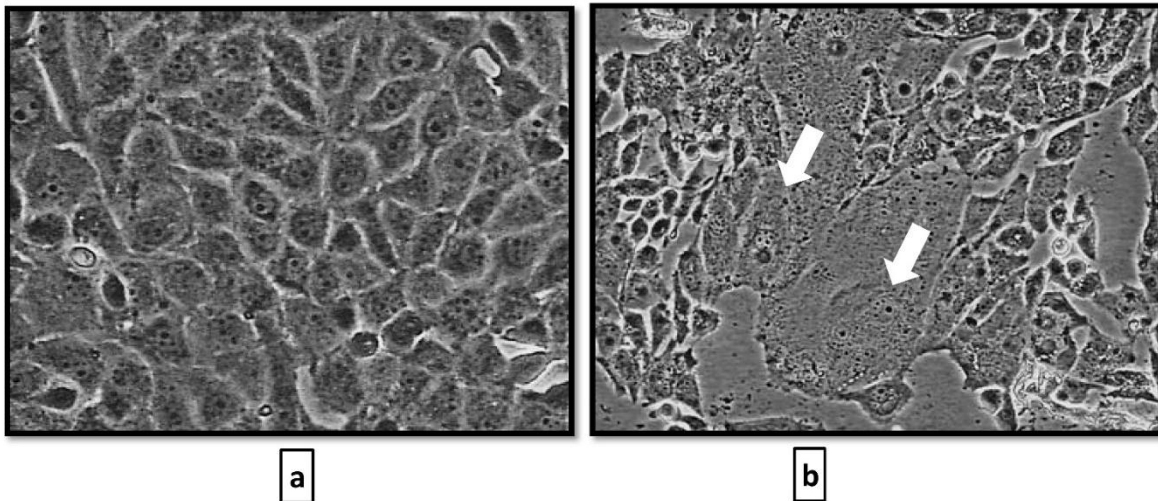


Figura 47. **Propagación del PorPV cepa PAC1 en la línea celular PK-15.** (a) células PK-15 libres de infección con un porcentaje de confluencia del 90%, (b) células PK-15 infectadas con PorPV con presencia de sincicios. Las flechas indican el lugar donde se observan varios núcleos provenientes de varias células en el sincicio. Vista al microscopio óptico 40X.

Como se puede observar en la figura 47a que las células PK-15 crecen formando una monocapa uniforme cuando llegan a confluencia, se puede observar el límite de la membrana celular de cada célula con su núcleo bien delimitado. En el caso de la línea de riñón de cerdo se observan núcleos grandes y una gran cantidad de partículas sólidas en el citoplasma y el núcleo celular, así como también en los sobrenadantes si no se tiene cuidado de cambiar constantemente el medio, por otra parte, después de la infección con PorPV (figura 47b) se puede observar el efecto citopático del PorPV durante su replicación en la línea celular, gracias a la proteína de fusión F y a la HN, el virus puede fusionar membranas celulares generando células gigantes multinucleadas conocidos como sincicios (señaladas por medio de flechas) lo que nos indica que el virus se encuentra replicándose activamente. Del segundo pase se realizó una dilución para infectar una caja de 75 cm<sup>2</sup> y generar el inóculo con lo cual se trabajaron los ensayos de sero-neutralización. El inóculo de trabajo consistió en alícuotas de 100 µl del concentrado viral del tercer pase. Las alícuotas del virus se almacenaron en congelación a -70°C y cada alícuota se utilizó únicamente para un solo ensayo. Los virus en el inóculo de trabajo se titularon por placas líticas. Se requiere un número de placas contables

entre 50 a 100 placas por pozo para realizar los ensayos de sero-neutralización. Para este propósito el concentrado viral se diluyó  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$  para observar en que dilución se obtenía este número de placas esperado (figura 48).

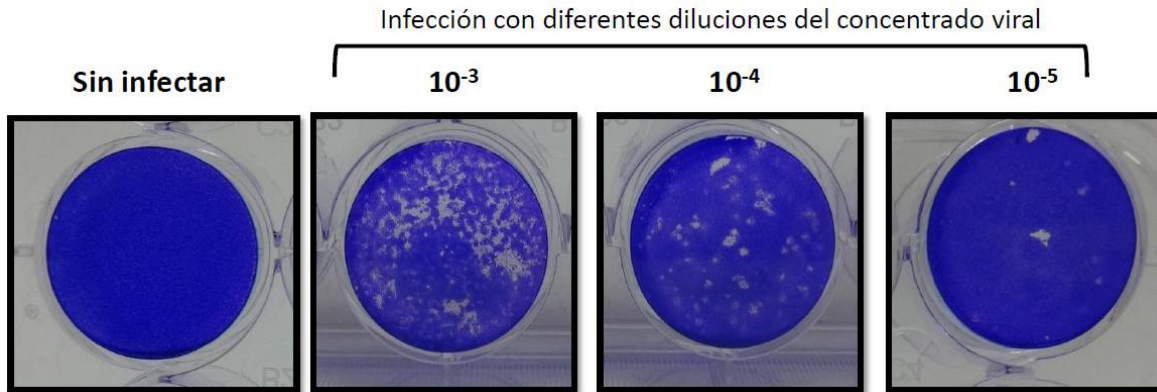


Figura 48. Titulación del PorPV PAC1 en la línea celular PK-15.

Como se observa en la figura 48, el control negativo no generó placas líticas corroborando que la viabilidad celular no se afecta a pesar del tiempo que se dejó la infección (6 días) y también de la concentración de suero fetal bovino a la que se mantuvo el cultivo. Por otro lado, todas las diluciones del virus generaron placas líticas, sin embargo la dilución más baja generó un número incontable, por tanto fue imposible hacer uso de esta dilución, mientras que las diluciones más altas generaron pocas placas como para determinar el título. La dilución  $10^{-4}$  generó un número de placas contables con un número aproximado de 70 UFP por pozo y fue la dilución que se decidió elegir para los ensayos de sero-neutralización ya que es el número en donde se puede observar la inhibición de la replicación viral. Esta dilución del virus se incubó con diferentes diluciones del suero de ratón a  $4^{\circ}\text{C}$  para observar si los anticuerpos anti eHN son capaces de inhibir el virus.

#### 8.14. Ensayos de sero-neutralización

Para los ensayos se utilizó la dilución del concentrado viral  $10^{-4}$  y se utilizaron varios controles que nos ayudaron a validar el experimento. Un control consistió en células sin virus y sin suero, otro control consistió en células con suero de ratón sin inmunizar para corroborar que el complemento del suero se inactivó completamente y no afecta en la viabilidad celular; otro control consistió en células infectadas con la mezcla virus y suero no inmunizado, para

comprobar que los animales no poseen anticuerpos ni otra sustancia que pudiese inhibir la infección viral, generando falsos positivos y el último control en este ensayo fueron células infectadas con virus solamente, para corroborar que las partículas no pierden su capacidad infecciosa, a pesar de la incubación de 1 h a 4 °C (figura 49).

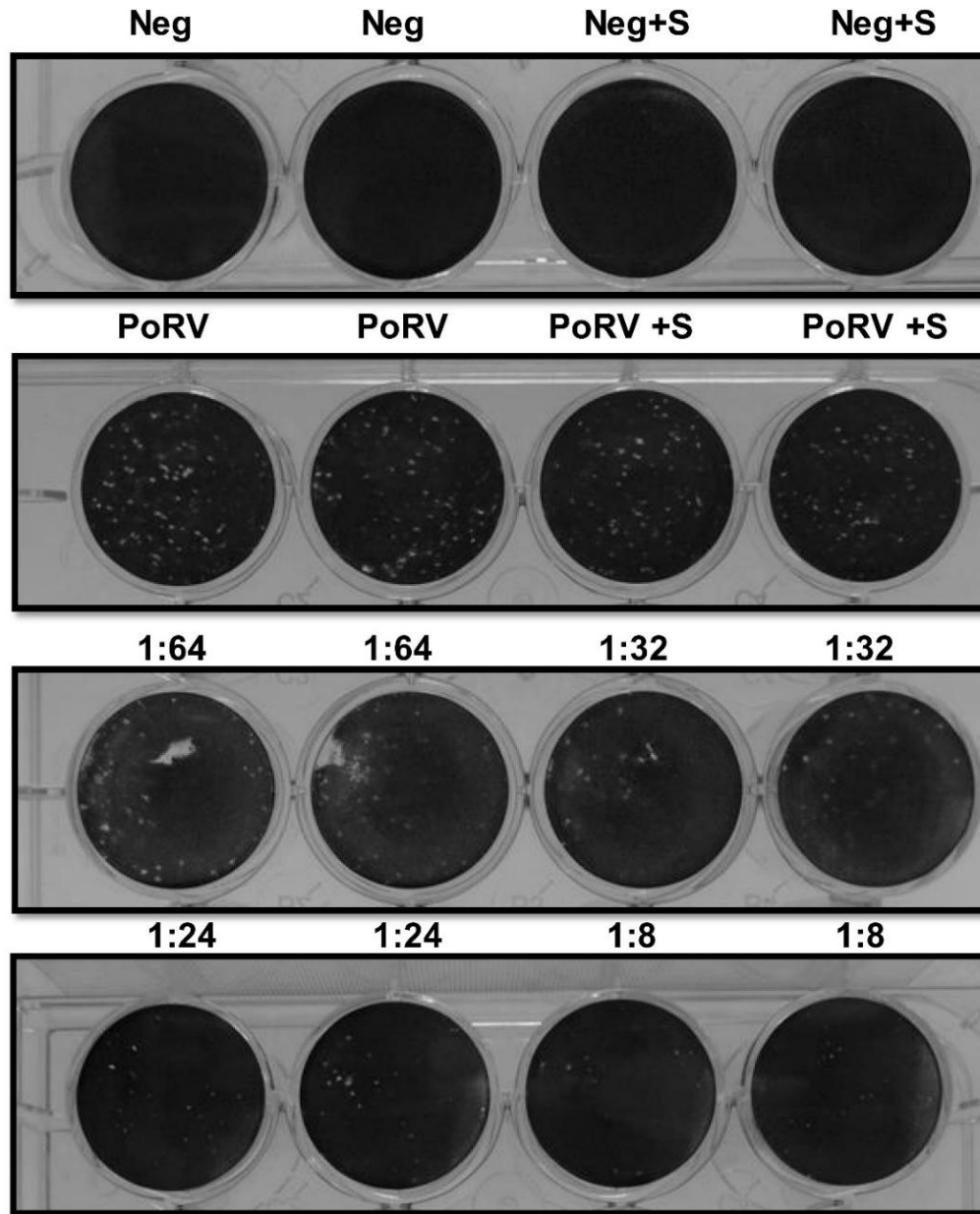


Figura 49. **Ensayo de sero-neutralización.** (Neg) células sin suero y sin virus, (Neg+S) células tratadas con suero no inmunizado, (PoRV) células infectadas con virus, (PoRV+S) células infectadas con virus y suero no inmunizado con una dilución 1:8, (1:64 a 1:8) células infectadas con virus y suero inmunizado con las diluciones 1:64 hasta 1:8.

En los ensayos de sero-neutralización se observó una reducción del número de placas líticas cuando se disminuyó la dilución de suero inmunizado, en comparación con los controles positivos a la misma dilución (figura 43, c y d). El suero no inmunizado no mostró disminución del número de placas líticas con dilución 1:8, lo que indica que el suero de ratones no tiene anticuerpos neutralizantes contra el virus. Las diluciones en serie del suero de animales inmunizados fueron desafiadas con ~ 70 UFP (unidades formadoras de placa) y se observó una disminución en el porcentaje de infección mayor al 50% en la dilución 1:32 del suero. Este porcentaje de infección disminuyó hasta que el porcentaje de infección fue inferior al 20%, correspondiente a la dilución 1:8 de suero, esto se corroboró al construir un gráfico del porcentaje de infección contra la dilución del suero (figura 50).

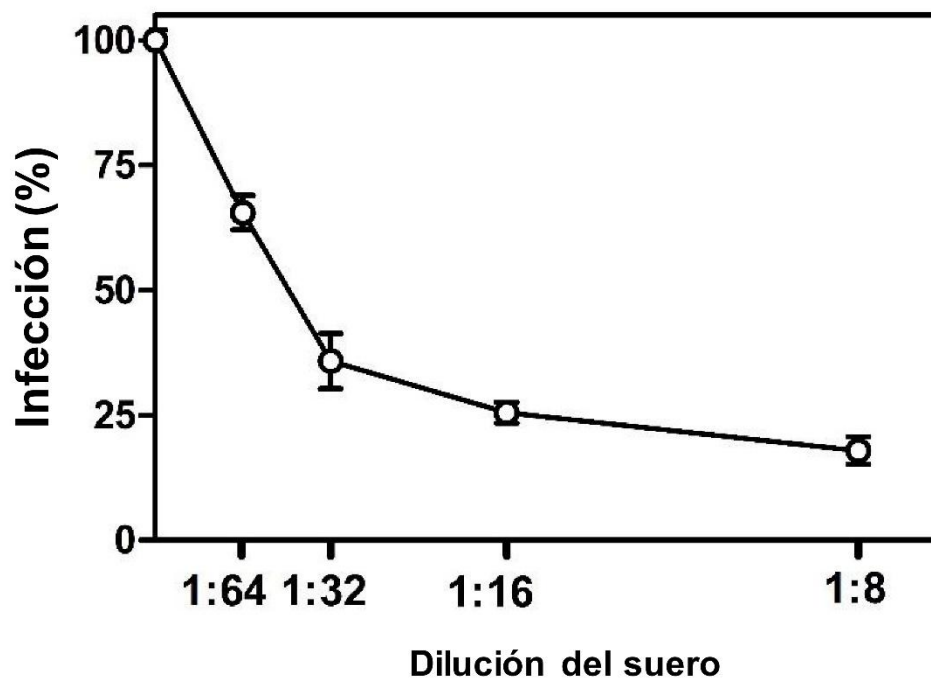


Figura 50. **Disminución del porcentaje de infección.** Porcentaje de infección respecto a la dilución del suero de ratón inmunizado con la proteína eHN.

Como se puede apreciar en el gráfico anterior conforme la dilución del suero disminuye el porcentaje de infección disminuye hasta la dilución menor 1:8 donde podemos ver que el porcentaje de infección llega a ser del 18%, corroborando que los sueros de los ratones poseen anticuerpos neutralizantes de la replicación del PorPV en líneas celulares. Por



último, los anticuerpos de sueros inmunizados fueron capaces de inhibir la replicación viral en el 82% respecto a los controles positivos y, por tanto, la proteína recombinante eHN es capaz de inducir la generación de anticuerpos neutralizantes contra el PorPV. Esto es una evidencia de que el sistema de *Pichia pastoris* puede producir una proteína inmunogénica del PorPV con características similares a las proteínas virales nativas y tiene el potencial para ser usado como componente principal en una vacuna.

La importancia de generar anticuerpos contra las proteínas recombinantes se ha demostrado por otros autores que utilizaron ratones inmunizados con el ectodominio de la neuraminidasa de la influenza expresada en *P. pastoris* para desafiar a los animales contra la infección. Estos autores informaron que se obtuvo un 50% de protección, lo que demuestra la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Martinet et al., 1997). Otros autores desarrollaron anticuerpos contra la neuraminidasa expresada en la levadura en modelos animales, que son neutralizantes contra el virus durante la replicación viral. Los resultados han sido alentadores en el desarrollo de vacunas (Martinet et al., 1998). En el caso de Athmaram et al. en 2011 a partir de la expresión de la hemaglutinina del virus de influenza H1N1 en el sistema de *P. pastoris* se produjeron anticuerpos contra la en conejos y se realizaron ensayos de sero-neutralización, demostrando que los sueros de los animales produjeron anticuerpos neutralizantes contra la replicación del virus en líneas celulares, proponiendo esta proteína recombinante como un componente importante para el desarrollo de una vacuna.

## 9. CONCLUSIONES

- Mediante este trabajo fue posible la obtención de un sistema de expresión del ectodominio de la hemaglutinina neuraminidasa en *P. pastoris*, obteniéndose una cepa Mut<sup>+</sup> la cual es capaz de crecer en presencia del metanol.
- Se logró incrementar en un 78% la producción de proteína extracelular mediante la inducción de la expresión a altas densidades celulares y mediante la alimentación con el inductor metanol hasta por 8 días.
- El eHN recombinante fue producido en forma soluble en el medio libre de células y mediante western blot se logró determinar la presencia de la proteína los días 4, 6 y 8 de expresión.
- El eHN presentó actividad neuraminidasa de hasta 67 nmol/min/mg en los sobrenadantes libres de células después de 6 días de expresión y a partir de la curva de saturación al medir la velocidad de la actividad enzimática se obtuvo una Km de 11.11 mg/ml y una V<sub>máx</sub> de 200 nmol/min/mg.
- El eHN fue reconocido por sueros de cerdos infectados con PorPV de cepas virales actualmente circulantes en el Bajío por western blot y ELISA.
- La proteína logró ser purificada por cromatografía de afinidad en un solo paso de purificación con un rendimiento del 92% y recuperándose 1.2 mg de proteína pura por cada l de cultivo.
- La proteína eHN indujo la producción de anticuerpos al ser inoculada en ratones después de 28 días de inmunización, los cuales fueron neutralizantes contra la replicación del virus durante la infección en líneas celulares, bajando el porcentaje de infección en más del 80%.

↗ Con estos resultados se puede decir que la proteína eHN de levadura tiene propiedades similares a la nativa y puede ser considerado un buen antígeno para incorporarlo en sistemas de detección o como componente principal en una vacuna.

## 10. REFERENCIAS

Alessio Lombardi, Sara Bursomanno, Teresa Lopardo, Roberta Traini, Marco Colombatti, Rodolfo Ippoliti, David J. Flavell, Sopsamorn U. Flavell, Aldo Ceriotti, Maria Serena Fabbrini. 2010. *Pichia pastoris* as a host for secretion of toxic saporin chimeras. *FASEB J.* **24**: 253-265.

Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest.* **8(4)**:405-13.

Aguilar Martínez Elisa María del Carmen. 2001. Expresión del gen HN del virus del síndrome del ojo azul en sistemas heterólogos. Tesis de maestría. CINVESTAV, IPN, México D.F.

Arreola Ledesma Juana. 2005. Caracterización molecular de aislamientos del Rubulavirus porcino mediante RFLP. Tesis de licenciatura. UNAM, México D.F.

Athmaram T. N., Saraswat S., Santhosh S. R., Singh A. K., Suryanarayana V. V. S., Priya R., Gopalan N., Parida M., Rao P. V. L. and Vijayaraghavan R. 2011. Yeast expressed recombinant hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralizing antibodies in rabbits and mice. *Virol J.* **8**, 524.

Bera BC, Virmani N, Shanmugasundaram K, Vaid RK, Singh BK, Gulati BR, Anand T, Barua S, Malik P, Singh RK. 2013. Genetic Analysis of the Neuraminidase (NA) Gene of Equine Influenza Virus (H3N8) from Epizootic of 2008-2009 in India. *Indian J Virol.* **24(2)**:256-64.

Berg, Jeremy Mark, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. 2006. Biochemistry. 6th. New York: W H Freeman & Co. Print.

Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. 1997. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes*. **14(1)**:55-61.

Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J Gen Virol*. **72 (5)**:1045-50.

Brankamp RG, Sreekrishna K, Smith PL, Blankenship DT, Cardin AD. 1995. Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghlanten by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. **6**: 813-820.

Bose S, Zokarkar A, Welch BD, Leser GP, Jardetzky TS, Lamb RA. 2012. Fusion activation by a headless parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase stalk suggests a modular mechanism for triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109 (39)**: E2625-34.

Borraz-Argüello María del Tránsito, Santos-López Gerardo, Vallejo-Ruiz Verónica, Herrera-Camacho Irma, Reyes-Leyva Julio. 2008. Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del *Rubulavirus porcino* (México). *Rev. Biol. Trop*. **56(2)**: 487-499.

Burnette WN. 1981. 'Western Blotting' electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem*. **112**, 195-203.

Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*. **13**:329-332.

Cereghino J. L. and Cregg J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. **24**, 45-66.

Chang S. W., Shieh C. J., Lee G. C., Akoh C. C., Shaw J. F. 2006. Optimized Growth Kinetics of *Pichia pastoris* and Recombinant *Candida rugosa* LIP1 Production by RSM. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **11**: 28-40.

Cheng Xu, Ying-Chun Li, Hua Yang, Yan Long, Min-Jian Chen, Yu-Feng Qin, Yan-Kai Xia, Ling Song, Ai-Hua Gu, Xin-Ru Wang. 2014. The preparation and application of N-terminal 57 amino acid protein of the follicle-stimulating hormone receptor as a candidate male contraceptive vaccine. *Asian J Androl.* **16**: 623-630.

Cregg JM, Higgins Dr. 1995. Production of foreign protein in yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot. (Suppl.)*. **73**: 5981-5987.

Cregg J. M., Madden K. R., Barringer K. J., Thill G. P. and Stillman C. A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *P. pastoris*. *Moll Cell Biol.* **9**: 1316-1323.

Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR. 1989. High-Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis-B Surface-Antigen in the Methylotrophic Yeast, *Pichia-Pastoris*. *Bio-Technology.* **5**:479-485.

Cohen Stanley N., Chang Annie C. Y., Hsu Leslie. 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *PNAS.* **69**: 2110–2114.

Correa GP, Martínez, LA, Solís, HM, Pérez, SJ, Coba, AMA, Aguirre F, Aguilar OP. 2001. Antigenicidad de diferentes dosis de la vacuna del INIFAP vs la enfermedad del ojo azul (EOA) en condiciones de campo: I) en lechones. En memorias de la AMVEC, Querétaro, Querétaro, México.

Couderc R, Baratti J. 1980. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia-Pastoris* - Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agric Biol Chem.* **44**:2279-2289.

Cuevas RS, Ramírez C, Alvarado I, Baule C, Berg M, Ramirez H, Rivera F, Vega MA. 2011. Detección de anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul en cerdos lactantes procedentes de cerdas vacunadas con un antígeno recombinante del *Rubulavirus porcino*. En memorias de la AMVEC, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Cuevas Romero Sandra Julieta. 2000. Análisis inmunopatológico de la infección crónica en cerdos infectados naturalmente por Rubulavirus porcino (LPMV). Tesis de maestría. UNAM. México D.F.

Cuevas-Romero Julieta Sandra, Anne-Lie Blomström, Mikael Berg. 2015. Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection – an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* **5**: 10.3402.

Cuevas-Romero S, Blomström AL, Alvarado A, Hernández-Jauregui P, Rivera-Benitez F, Ramírez-Mendoza H, Berg M. 2013. Development of a real-time RT-PCR method for detection of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV). *J Virol Methods.* **189**: 1-6.

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

Cuevas-Romero S, Rivera-Benítez JF, Blomström AL, Ramliden M, Hernández-Baumgarten E, Hernández-Jáuregui P, Ramírez-Mendoza H, Berg M. 2016. Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico. *Virus Genes.* **52(1)**:81-90.

Cuevas JS, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. 2009. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph

nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* **127(1-2):**148-52.

Daly R. and Hearn M. T. W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.* **18:** 119–138.

Deng, R., Z. Wang, P.J. Mahon, M. Marinello, A.M. Mirza, R.M. Iorio. 1995. Mutations in the NDV HN protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion. *Virology.* **253:** 43-54.

Escobar-López A. C., Rivera-Benitez J. F., Castillo-Juárez H., Ramírez-Mendoza H., Trujillo-Ortega M. E., Sánchez-Betancourt J. I. 2011. “Identification of antigenic Variants of the porcine rubulavirus in sera of field swine and their seroprevalence”. *Transboundary and Emerging Diseases.* **59:** 416-420.

Estrada Barrón Silvia Guadalupe. 2008. Efecto del virus de ojo azul asociado a leucospermia sobre la calidad y viabilidad espermática en verracos. Tesis de maestría. UAM. México D.F.

Fazlalipour M., Keyvani H., Monavari S. H., Mollaie H. R. 2015. Expression, Purification and Immunogenic Description of a Hepatitis C Virus Recombinant Core E1E2 Protein Expressed by Yeast *Pichia pastoris*. *Jundishapur J Microbiol.* **8:** e17157.

Fan Guangsen, Priti Katrolia, Huiyong Jia, Shaoqing Yang, Qiaojuan Yan, Zhengqiang Jiang. 2012. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophile* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* **34:** 2043–2048.

Flores González Juan Adrián. 2015. Sobreproducción de la proteína viral HN-RVP en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de licenciatura. BUAP, Puebla, México.



Flores-Ocelotl María del Rosario, Nora Hilda Rosas-Murrieta, Verónica Vallejo-Ruiz, Julio Reyes-Leyva, Irma Herrera-Camacho, Gerardo Santos-López. 2011. Transcription of interferon stimulated genes in response to *porcine rubulavirus* infection *in vitro*. *Braz. J. Microbiol.* **42**: 1167-1175.

Forestan Cristian, Farinati Silvia y Varotto Serena. 2012. The maize *PIN* gene family of auxin transporters. *Front Plant Sci.* **3**: 1-23.

Fuentes J. M. R., Gay M. J. G., Herradora M. A. L., Rentana A. R. 1994. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Vet. Méx.* **25**: 243-246.

Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. and Rasmussen, J.R. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology (NY)*. **9**: 1347-1355.

Gupta R., Jung E. and Brunak. S. 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. **En preparación.**

Hartner FS, Glieder A. 2006. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories.* **5**:39.

Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, Johnson SN, Hyka P, Lin-Cereghino GP, Lin-Cereghino J, Kovar K, Cregg JM, Glieder A. 2008. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **36**:e76.

Hartwig D. D, Oliveira T. L., Seixas F. K., Forster K. M., Rizzi C., Hartleben C. P., McBride A. J. A., Dellagostin O. A. 2010. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* **98**: 1-9.

Henderson GW, Laird C, Dermott E, Rima BK. 1995. Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. *J Gen Virol.* **76(10)**:2509-18.

Hernández J., Reyes-Leyva J., Zenteno R., Ramírez H., Hernández-Jauregui P., Zenteno E. 1998. "Immunity to porcine rubulavirus infection in adult porcine". *Vet Immunol Immunopathol.* **64**: 367–381.

Hernández-Jáuregui P, Ramírez Mendoza H, Mercado García C, Moreno-López J, Kennedy S. 2004. Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant gilts. *J Comp Pathol.* **130(1)**: 1-6.

Hernández-Jáuregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J. 2001. Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. *Arch Med Res.* **32(5)**: 400-9.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet Immunol Immunopathol.* **64(4)**: 367-81.

Hirano Akiko, Andy H. Wang, Adrian F. Gombart, Timothy C. Wong. 1992. The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc. Nati. Acad. Sci.* **89**: 8745-8749.

Hoffman C.S. 2001. Preparation of yeast DNA. *Current Protocols in Molecular Biologist.* Chapter 13 Unit 13.11.

Invitrogen, User manual for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ $\alpha$  in *Pichia pastoris*. 2010. Catalogue No. K1740-01.

Jameson B. A. and Wolf H. 1988. The antigenic index: A novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* **4**: 181-6.

Kaewthai N., Harvey A. J., Hrmova M., Brumer H., Ezcurra I., Teeri T. T., Fincher G. B. 2010. Heterologous expression of diverse barley XTH genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Plant Biotech J.* **27**: 251–258.

Kang L., Chen X., Zhai C., Ma L. 2012. Synthesis and High Expression of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris* GS115. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1202–1207.

Koutz, P., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., Thill, G. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast.* **5**: 167-177.

Krainer Florian W, Christian Dietzsch, Tanja Hajek, Christoph Herwig, Oliver Spadiut, Anton Glieder. 2012. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact.* **11**: 22.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.

Kyte J. and Doolittle R. F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Lamb RA, Kolakofsky D. 1995. In *Virology*. 3rd edition (Fields BN, Knipe DM, Howly PM, eds) pp 1177–204. Philadelphia: Lip-pincott-Raven Publishers.

Lamb R. A. and Kolakofsky D. 1996. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., et al. (Eds), Fields Virology. 3rd Ed. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. pp. 1177–1204.

Lamb R. A. and Kolakofsky D. 2001. “*Paramyxoviridae: the viruses and their replication*”. In: Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E, Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., and Straus S. E. (Eds), Fields Virology. 4th Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 1305–1340.

Lamb R. A., Collins P. L., Kolakofsky D., Melero J. A., Nagai Y., Oldstone M., Pringle C. R. and Rima B. K. 2005. Family Paramyxoviridae. In: Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J, Desselberger U. and Ball L. A. (Eds), Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, San Diego. pp 655–668.

Lara Romero Rocío. 2013. Detección de cerdos persistentemente infectados por la enfermedad del ojo azul (*Rubulavirus porcino*) mediante la prueba de PCR tiempo real en leucocitos de sangre periférica. Tesis de licenciatura. UNAM, México D.F.

Lara Romero Rocío. 2015. Producción y purificación de la proteína recombinante HN del *Rubulavirus porcino* como candidata para un inmunógeno en cerdos. Tesis de maestría. UNAM, México D.F.

Leguizamo Ramírez Alejandro. 2000. Determinación de los títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de ojo azul en animales para abasto procedentes del Bajío de la República Mexicana. Tesis de licenciatura. UNAM. México D.F.

Martinet W., Deroo T., Saelens X., Beirnaert E., Vanlandschoot P., Contreras R., Fiers W., Min W. J. 1998. Evaluation of recombinant A/Victoria/3/75 (H3N2) influenza neuraminidase mutants as potential broad-spectrum subunit vaccines against influenza A. *Arch Virol.* **143**: 2011–2019.

Martinet W., Saelens X., Deroo T., Neiryck S., Contreras R., Jou W. M., Fiers W. 1997. Protection of mice against a lethal influenza challenge by immunization with yeast-derived recombinant influenza neuraminidase. *Eur. J. Biochem.* **247**: 332-338.

Martínez Bautista Nancy Rebeca. 2010. Identificación y cuantificación de IgA, IgG e IgM anti-Rubulavirus porcino (RVP) en semen de cerdos infectados experimentalmente. Tesis de maestría. UNAM, México D.F.

Martínez, LA., Solís, HM., Pérez, SJ., Coba, AMA., Aguilar, O P., Correa GP, Aguirre F, Córdova, LD. 2001. Control de brotes de la enfermedad del ojo azul (EOA) utilizando la vacuna-EOA del INIFAP. En memorias de la AMVEC, Querétaro, Querétaro, México.

Marx, P. A., Portner, A., Kingsbury, D. W. 1974. Sendai virion transcriptase complex: polypeptide composition and inhibition by virion envelope proteins. *Journal of Virology.* **13**: 107-112.

Markwell, M.A., C.F. Fox. 1980. Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *J. Virol.* **33**: 152-166.

Mendoza-Magaña ML, Godoy-Martinez DV, Guerrero-Cazares H, Rodriguez-Peredo A, Dueñas-Jimenez JM, Dueñas-Jiménez SH, Ramírez-Herrera MA. 2007. Blue eye disease porcine rubulavirus (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialo-glycoprotein as receptor. *Vet J.* **173(2)**: 428-36.

Mendoza-Magaña ML, Ramírez-Herrera MA, Dueñas-Jiménez JM, Dueñas-Jiménez SH. 2001. Pig paramyxovirus of the blue eye disease binding to a 116 kDa glycoprotein expressed in pig neuronal membranes. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **48(7)**: 489-99.

Miele, R.G., Castellino, F.J. and Bretthauer, R.K. 1997. Characterization of the acidic oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**: 79-83.

Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O. and Cremata, J.A. 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **14**: 197-207.

Moreno-López J., Correa-Girón P., Martínez A., Ericsson A. 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of piglet in México. *Arch Virol.* **91**: 221-231.

Palomares-Jerez F., Henrique Nemesio, José Villalaín. 2012. The membrane spanning domains of protein NS4B from hepatitis C virus. *BBA Biomembranes.* **1818**: 2958–2966.

Paniagua Buelnas Norma Angélica. 2011. Estudio de la variación genética y antigenética del virus del síndrome del ojo azul (VSOA). Tesis de doctorado. CINVESTAV, IPN, México D.F.

Pérez Ponce Francisco. 2008. Interacción de *Herpesvirus suis* Tipo I y *Rubulavirus porcino* en cerdos. Tesis de maestría. UNAM, México D.F.

Pisanelli G, Laurent-Rolle M, Manicassamy B, Belicha-Villanueva A, Morrison J, Lozano-Dubernard B, Castro-Peralta F, Iovane G, García-Sastre A. 2016. La Piedad Michoacán Mexico Virus V protein antagonizes type I interferon response by binding STAT2 protein and preventing STATs nuclear translocation. *Virus Res.* **213**:11-22.

Pla I. A., Damasceno L. M., Vannelli T., Ritter G., Batt C. A., Shuler M. L. 2006. Evaluation of *Mut<sup>+</sup>* and *Mut<sup>S</sup>* *Pichia pastoris* Phenotypes for High Level Extracellular scFv Expression under Feedback Control of the Methanol Concentration. *Biotechnol. Prog.* **22**: 881-888.

Quezada M. F., Verde R. E., Echeveste G. R., Lozano D. B., Sarfati M. D., Soto P. E., Lara P. J. H. 2008. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación utilizando diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*. En memorias de la AMVEC. Morelia, Michoacán, México. Pp. 65.

Ramírez-Mendoza H., Hernández-Jáuregui P., Reyes-Leyva J., Zenteno E., Moreno-Lopez J., Kennedy S. 1997. Lesions in the reproductive tract of the boars experimental infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Pathol.* **117**: 237-252.

Reyes-Leyva Julio, Blanca Espinosa, Jesus Hernandez, Roberto Zenteno, Verónica Vallejo, Pablo Hernández-Jáuregui, Edgar Zenteno. 1997. NeuAc $\alpha$ 2,3Gal-Glycoconjugate Expression Determines Cell Susceptibility to the Porcine Rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol.* **118(2)**: 327–332.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, Zenteno E. 1999. Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J.* **16(9)**: 517-22.

Reyes-Leyva J., García-Morales O., Santos-López G., Vallejo V., Ramírez-Mendoza H., Hernández J. 2004. Detección de viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* **36 (1)**: 1-11.

Reyes-Leyva J., Hernández-Jáuregui P., Montaña L.F., Zenteno E. 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (alpha 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* **133**: 195-200.

Reyes-Leyva J., Santos G., Hernández J., Espinosa B., Del Tránsito-Borraz M., Ramírez H., Vallejo V., and Zenteno E. 2002. “Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*”. In: Mensaje Bioquímico. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mexico, UNAM. **26**: 99-127.

Riaño Cruz Verónica Prudencia. 2011. Identificación de variación antigénica del Rubulavirus porcino mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. Tesis de licenciatura. UNAM, México D.F.

Rivera Benítez José Francisco. 2009. Persistencia del *Rubulavirus porcino* en semen de verracos infectados experimentalmente. Tesis de maestría. UNAM, México D.F.

Rivera-Benitez JF, De la Luz-Armendáriz J, Saavedra-Montañez M, Jasso-Escutia MÁ, Sánchez-Betancourt I, Pérez-Torres A, Reyes-Leyva J, Hernández J, Martínez-Lara A, Ramírez-Mendoza H. 2016. Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus. *Vet Microbiol.* **29 (184)**: 31-9.

Rivera-Benítez JF, García-Contreras Adel C, Reyes-Leyva J, Hernández J, Sánchez-Betancourt JI, Ramírez-Mendoza H. 2013. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Arch Virol.* **9**: 1849-1856 (a).

Rivera-Benítez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, García-Contreras Adel C, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez-Mendoza H. 2013. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Vet Microbiol.* **(2-4)**: 491-8.

Rossanese OW, Soderholm J, Bevis BJ, Sears IB, O'Connor J, Williamson EK, Glick BS. 1999. Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **145(1)**: 69-81.

Salah R. B., Gargouri A., Verger R., Gargouri Y., Mejdoub H. 2009. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of Rhizopusoryzae and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. *World J. Microb. Biot.* **25**: 1375–1384.

Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Md Mde L, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setién A. 2004. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in



non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **98(10)**: 577-84.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, cold spring Harbor, N.Y.

Sánchez Betancourt J. Ivan, Mendoza Elvira Susana, Reyes Leyva Julio, Doporto Díaz José Miguel, Trujillo Ortega Ma. Elena. 2008. Situación actual de la enfermedad del ojo azul en México. En memorias de la AMVEC, Morelia, Michoacán, México. (a).

Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza S, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME. 2008. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res Vet Sci.* **2**: 359-67.

Sánchez-Betancourt JI, Trujillo ME, Mendoza SE, Reyes-Leyva J, Alonso RA. 2012. Genetic and antigenic changes in porcine rubulavirus. *Can J Vet Res.* **76(1)**: 33-7.

Santos López Gerardo. 2000. Purificación parcial y estudio de las actividades de hemaglutinación y de neuraminidasa de la proteína HN de cepas del Rubulavirus porcino de virulencia variante. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla.

Santos-Lopez G., J. Hernandez, M. T. Borraz-Argüello, H. Ramirez-Mendoza, V. Vallejo, J. Reyes-Leyva. 2004. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. *Arch. Med. Vet.* **36(2)**: 119-136.

Santos-López G, Flores E, Baños R, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. 2004. Purification of the Porcine rubulavirus attachment protein by liquid isoelectric focusing. *Protein Expr Purif.* 2004. **35(1)**: 120-5.

Sedmak JJ, Grossberg SE. 1977. A rapid sensitive and versatile for protein using coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **79**: 544–552.

Shi X. L., Feng M. Q., Shi J., Shi Z. H., Zhong J., Zhou P. 2007. High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **54**: 24–29.

Sjölander A, Cox JC, Barr IG. 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol.* **6**: 713-723.

Solís M, Ramírez-Mendoza H, Mercado C, Espinosa S, Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J. 2007. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Res Vet Sci.* **83(3)**: 403-9.

Stephano A. 2000. “La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones”. In: Memorias del Symposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo. Irapuato, Gto., México. pp. 1-10.

Stephano A. 2000. “La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones”. In: Memorias del Symposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo. Irapuato, Gto., México. pp. 1-10.

Stephano H. A., Gay G. M., Ramírez T. C. 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. *Vet Rec.* **122**: 6-10.

Sundqvist, A., M. Berg, P. Hernandez-Jauregui, T. Linne, J. Moreno-Lopez. 1991. The haemagglutinin-neuraminidase gene of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* **122**: 331-340.

Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol.* **71 (3)**: 609-13.

Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. 1992. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol.* **122(3-4)**: 331-40.

Torres Pérez Martina Ericka. 2005. Efecto del *Rubulavirus porcino* en la presentación de la pleuroneumonía porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* tipo I. Tesis de maestría. UNAM, México D.F.

Trimble, R.B., Atkinson, P.H., Tschopp, J.F., Townsend, R.R. Maley, F. 1991. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **266**: 22807-22817.

Vallejo V., J. Reyes-Leyva, J. Hernandez, H. Ramirez, P. Delannoy, E. Zenteno. 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol. Part. B* **126**: 415-424.

Vozza LA, Wittwer L, Higgins DR, Purcell TJ, Bergseid M, Collins-Racie LA, LaVallie ER, Hoeffler JP. 1996. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)*. **1**: 77-81.

Wang LF1, Hansson E, Yu M, Chua KB, Mathe N, Cramer G, Rima BK, Moreno-López J, Eaton BT. 2007. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Arch Virol.* **152(7)**:1259-71.

Wang F., Chi C., Wang L., Qiao Y., Jin X., Ding G. 2014. Gene cloning and expression of MAP30 in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **28**, 136–139.

Weiss HM, Haase W, Michel H, Reiländer H. 1995. Expression of functional mouse 5-HT5A serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett.* **3**: 451-456.

Wiman, AC, B. Hjertner, T. Linne, G. Allan, F. Mcneilly, J. Moreno-Lopez, M. Berg. 1998. Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J.Neurovirol.* **4**: 545-552.

Xia Wen-Rong, Wen-Liang Fu, Ling Cai, Xin Cai, Yuan-Yuan Wang, Min-Ji Zou, Dong-Gang Xu. 2012. Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human Angiogenin in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 1384-1388.

Yongkiettrakul S., Boonyapakron K., Jongkaewwattana A., Wanitchang A., Leartsakulpanich U., Chitnumsub P., Eurwilaichitr L., Yuthavong Y. 2009. Avian influenza A/H5N1 neuraminidase expressed in yeast with a functional head domain. *J. Virol. Methods.* **156**, 44-51.

Zenteno-Cuevas R, Hernández J, Espinosa B, Reyes J, Zenteno E. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch Virol.* **143(2)**: 333-52.

Zenteno-Cuevas R., Huerta-Yepey S., Reyes-Leyva J., Hernández-Jáuregui P., González-Bonilla C., Ramírez-Mendoza H., Agundis C., Zenteno E. 2007. Identification of Potential B Cell Epitope Determinants by Computer Techniques, in Hemagglutinin-Neuraminidase from the Porcine Rubulavirus La Piedad Michoacan. *Viral Immunol.* **20**: 250–260.

Zhou J. M., Tang Y. X., Fang D. Y., Zhou J. J., Liang Y., Guo H. Y., Jiang L. F. 2006. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes.* **33**: 27-32.



## 11. TRABAJOS PRESENTADOS EN LA TESIS

BENEMÉRITA  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS  
FÍSICO MATEMÁTICAS

LA FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS  
DE LA  
BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*J. L. Cerriteño-Sánchez\**, a *J. Herrera-Camacho*,  
*N. & Rosas-Murrieta*, & *G. Santos-López*

Por su participación con el Cartel:

“Obtención de cepas de levadura p. PASTORIS y s. POMBE productoras de hemaglutinina-neuraminidasa del rubulavirus porcino”

En el “III Encuentro Nacional de Ciencias Luis Rivera Terrazas”, llevada a cabo en las instalaciones de esta Facultad del 26 al 28 de septiembre del año en curso.

“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”  
H. Puebla de Z., a 26 de septiembre de 2012

DR. CUPATITZIO RAMIREZ ROMERO  
DIRECTOR



Av. San Claudio y 18 Sur, Col. San Manuel, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. C.P. 72570  
Tels.: (01222) 229 55 00 Ext.: 7550, 229 56 37 Fax: 229 56 36 www.fcm.buap.mx direccion@fcm.buap.mx



**Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESSES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC,  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F. (CASA TLALFAN)  
APARTADO POSTAL 70-600  
TEL. Y FAX. 5622-5742  
TEL. 5622-5603  
http://smbo.org.mx  
Correo electrónico: smboq@ic.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2011 - 2013

PRESIDENTE  
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

VICE-PRESIDENTE  
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

SECRETARIO TESORERO  
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

SUB-SECRETARIO TESORERO  
DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT  
BONAPARTE

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarin Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*José Luis Cerriteño Sánchez*

Quien asistió y presentó el trabajo

**Construcción de un sistema de expresión para el  
ectodominio de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) del  
*Rubulavirus porcino* en las levaduras *S. pombe* y *P. pastoris***

Por:

José Luis Cerriteño Sánchez, Enrique Rojas Martínez, Gerardo Santos López, Nora Rosas Murrieta, Julio Reyes Leyva, Irma Herrera Camacho.

En la modalidad de cartel durante el XXIX Congreso Nacional de Bioquímica del 11 al 17 de Noviembre de 2012 en Oaxaca, Oax.

**Atentamente  
Por el Comité Organizador**

**Dr. Jesús Aguirre Linares**



Congreso Internacional  
**Biología, Química  
y Agronomía**

La Universidad Autónoma de Guadalajara  
a través de la  
Facultad de Ciencias Químicas y de la  
Escuela de Ciencias Biológico-Agropecuarias  
otorga el presente

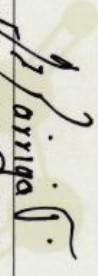
# Reconocimiento

a José Luis Cerriteno Sánchez, Nora Rosas Murrieta, Julio Reyes Leyva, Gerardo Santos López, Irma Herrera Camacho

*por su trabajo titulado: Construcción de un sistema de expresión para el ectodominio de la hemaglutinina neuraminidasa (HN) del Rubulavirus porcino (RVP) en la levadura Pichia pastoris.*

40. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía  
“Innovación para el Desarrollo Sustentable”, celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Zapopan, Jalisco, México, septiembre de 2013.

  
Ing. José Antonio Borriga de la Torre  
Decanode la Unidad Académica de  
Diseño, Ciencia y Tecnología

  
Ing. Tomás Ornelas Salas  
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

Trasciende  
con VALORES®







## Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESSES S/N CDL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC,  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F. (CASA TLALPAN)  
APARTADO POSTAL 70-606  
TEL. Y FAX: 5622-5742  
<http://smb.org.mx>  
Correo electrónico: [smbq@ifc.unam.mx](mailto:smbq@ifc.unam.mx)

### MESA DIRECTIVA 2013 - 2015

PRESIDENTE  
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

VICE-PRESIDENTE  
DR. MIGUEL LARA FLORES

SECRETARIO TESORERO  
DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT  
BONAPARTE

SUB-SECRETARIO TESORERO  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

### CONSTANCIA a:

*José Luis Cerriteño Sánchez*

### SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Expression of the hemagglutinin-neuraminidase's  
ectodomain from Rubulavirus porcine in the yeast *Pichia  
pastoris***

Por:

José Luis Cerriteño-Sánchez, Gerardo Santos-López, Nora Hilda  
Rosas-Murrieta, Julio Reyes-Leyva, Irma Herrera-Camacho

En la modalidad de cartel durante el XXX Congreso Nacional de  
Bioquímica del 2 al 8 de noviembre de 2014 en Guadalajara, Jal.

Atentamente

**Dra. Alicia González Manjarrez**  
Presidente



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of *Porcine rubulavirus* hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*



José Luis Cerriteño-Sánchez<sup>a,b,c</sup>, Gerardo Santos-López<sup>c</sup>, Nora Hilda Rosas-Murrieta<sup>a</sup>, Julio Reyes-Leyva<sup>c</sup>, Sandra Cuevas-Romero<sup>d</sup>, Irma Herrera-Camacho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química del Instituto de Ciencias (ICUAP), Edificio 103F, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Químicas, Edificio FCQ10, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital General de Zona No. 5, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Metepec, Puebla, Mexico

<sup>d</sup> Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, Distrito Federal, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 October 2015

Received in revised form

23 December 2015

Accepted 26 February 2016

Available online 3 March 2016

#### Keywords:

Hemagglutinin-neuraminidase

eHN

PoRV

Blue eye disease

### ABSTRACT

Blue-eye disease (BED) of swine is a viral disease endemic in Mexico. The etiological agent is a paramyxovirus classified as *Porcine rubulavirus* (PoRV-LPMV), which exhibits in its envelope the hemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein, the most immunogenic and a major target for vaccine development. We report in this study the obtaining of ectodomain of PoRV HN (eHN) through the *Pichia pastoris* expression system. The expression vector (pPICZαB-HN) was integrated by displacement into the yeast chromosome and resulted in a Mut<sup>r</sup> phenotype. Expressed eHN in the *P. pastoris* X33 strain was recovered from cell-free medium, featuring up to 67 nmol/min/mg after 6 days of expression. eHN was recognized by the serum of infected pigs with strains currently circulating in the Mexican Bajío region. eHN induces antibodies in mice after 28 days of immunization with specific recognition in ELISA test. These antibodies were able to inhibit >80% replication by viral neutralization assays in cell culture. These studies show the obtaining of a protein with similar characteristics to the native HN and which may be a candidate to propose a vaccine or to use the antigen in a serologic diagnostic test.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Blue eye disease (BED) of swine was detected in farms from La Piedad, Michoacan, Mexico in 1980 and spread to other Mexican states such as Guanajuato and Jalisco (Stephano et al., 1988; Stephano, 2000). The etiological agent is a paramyxovirus initially called La Piedad Michoacan Virus (LPMV) and subsequently classified as *Porcine rubulavirus* (PoRV) (Lamb et al., 2005), which causes a neurological, respiratory and reproductive syndrome accompanied by corneal opacity in 1–10% of cases (Moreno-López et al., 1986;

Stephano et al., 1988). BED generates economic losses caused by the high grade of neonatal mortality and infertility in adults.

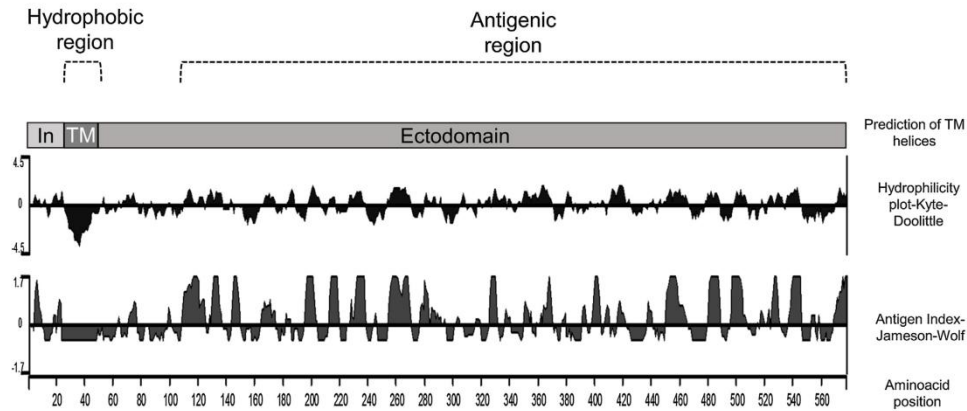
Ramírez-Mendoza et al. (1997) conducted the virus isolation from several outbreaks with different pathological and clinical data. These isolates were referred to as Produccion Animal Cerdos 1 (PAC1), PAC2, PAC3, PAC4 and PAC5 (Ramírez-Mendoza et al., 1997; Reyes-Leyva et al., 2002). Recent studies indicate that, in the mid-western region of Mexico, one of the most important in the swine industry with a serological prevalence of PoRV between 9 and 23.7%, current circulating strains are antigenically different, suggesting that use of a vaccine with only one antigenic source may not be sufficient for disease control (Escobar-López et al., 2011). The presence of the virus in convalescent pigs that survived a natural infection was recently corroborated, which induces a durable humoral immune response. Transmission is possible to healthy pigs, demonstrating the importance of disease control and prevention (Cuevas-Romero et al., 2014).

\* Corresponding author at: Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química del Instituto de Ciencias (ICUAP), Edificio 103F, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico.

E-mail addresses: [irma.herrera@correo.buap.mx](mailto:irma.herrera@correo.buap.mx), [nora.rosas@correo.buap.mx](mailto:nora.rosas@correo.buap.mx) (I. Herrera-Camacho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.035>

0168-1656/© 2016 Published by Elsevier B.V.



**Fig. 1.** Bioinformatic analysis of PoRV-PAC1HN protein. The Kyte-Doolittle hydrophilicity plot shows the predicted hydrophobic transmembranal (TM) region in the N-terminal (amino acids 25–47) and the antigenic index Jameson-Wolf analysis shows the predicted antigenic sites at the ectodomain (amino acids 48–576). The internal segment of HN is represented as In (amino acids 1–24).

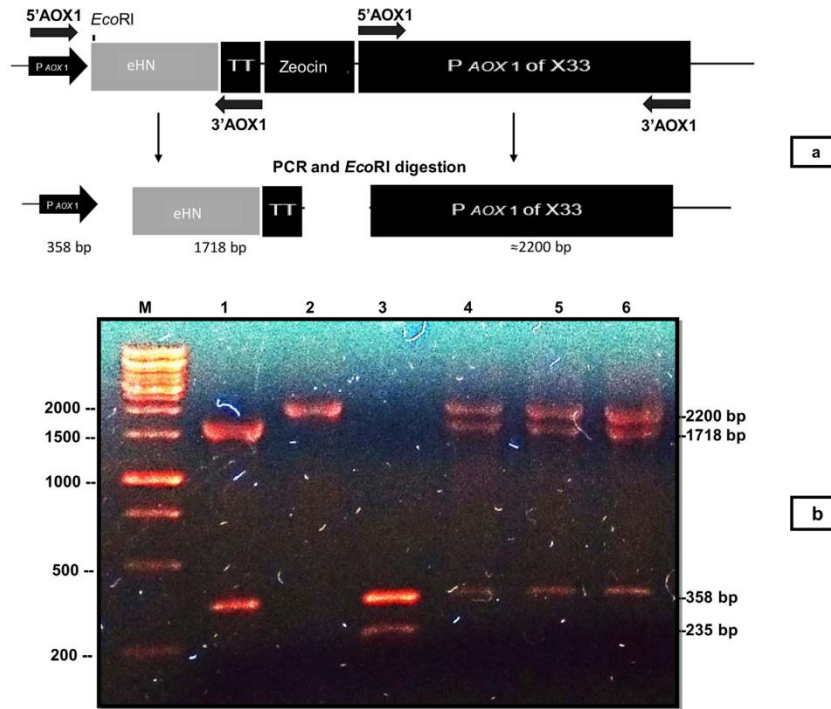


**Fig. 2.** Schematic representation of the expression vector pPICZαB-HN and eHN protein. (a) pPICZαB vector (3597 bp) was used to insert in the coding region of eHN fused to c-myc epitope, 6His tag (1614 bp) and the secretory alpha factor signal (1893 bp). (b) Fused protein contains the Kex2 signal cleavage for removing the alpha factor and obtaining the eHN with c-myc and 6His tag.

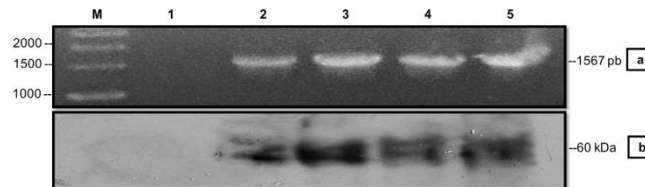
PoRV is a pleomorphic virus of the *Paramyxoviridae* family and possesses two glycoproteins inserted in its envelope: hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion protein (F), responsible for binding to the host cell and fusion (Moreno-López et al., 1986). HN has an important role in the replicative cycle. The viral particle is adsorbed to the cell membrane through the HN protein, which recognizes a specific receptor, a glycoconjugate with terminal sialic acid (Reyes-Leyva et al., 1993). A conformational change of HN activates F protein, which exposes a highly hydrophobic domain. Viral and cell membranes can then be fused and contents

of the virion are internalized into the cell (Lamb and Kolakofsky, 1996).

HN is the most immunogenic protein of PoRV. Using Western blot assays, recognition of HN in 85% of sera from experimentally infected pigs was observed during the second week post-infection (PI) and 100% during the third week PI (Hernández et al., 1998). HN is a type II membrane protein. Within its ectodomain (eHN) are recognition, catalytic, glycosylation and antigenic sites. HN is associated in tetramers constituted by dimers formed by non-covalent bonds in the viral envelope and presents hemagglutinating and



**Fig. 3.** Identification of transformed yeast cells by PCR using AOX primers (black arrows) and subsequent digestion with *EcoRI*. (a) Schematic representation of the integration and posterior digestion of PCR products of the expression vector into the *P. pastoris* chromosome (b) agarose gel electrophoresis of *EcoRI* digested pPICZαB-HN vector (1), chromosomal X33 DNA (2), pPICZαB vector (3), chromosomal DNA of X33-HN transformants (4–6); M: 1 kb DNA Marker (Fermentas).



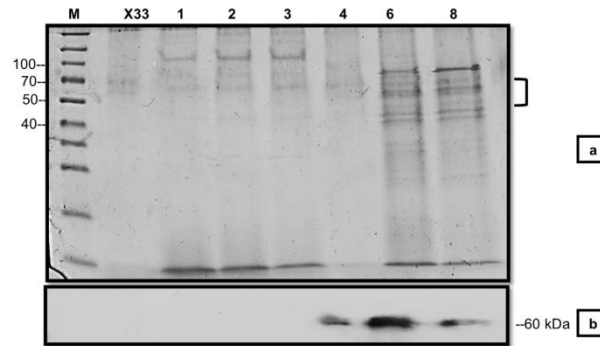
**Fig. 4.** Intracellular expression of eHN protein in *P. pastoris*. RT-PCR (a) and Western blotting (b) of intracellular contents in induced X33-eHN<sub>62-576</sub>. M: DNA marker; 1) negative wild-type control X33, 2–5: 1–4 days after induction of X33-eHN<sub>62-576</sub>.

neuraminidase activity. The latter consists of the removal of acid sialic residues from glycoconjugates in the host cell, which allows the release of viral progeny and prevents aggregation, facilitating viral dissemination (Lamb and Kolakofsky, 2001). Previous studies based on bioinformatics predicted 18 peptides in the eHN as potential antigens, demonstrating the importance of this region in the immune response (Zenteno-Cuevas et al., 2007).

The yeast *Pichia pastoris* is a common expression system used in the production of properly folding and functional recombinant proteins as a result of its glycosylation ability, similar to higher organisms (Cregg et al., 1989). It is a secure system due to the absence of oncogenes and toxins, in addition to its easy handling, rapid growth and simplicity of mediums. *P. pastoris* was used in the expression of glycosidases such as the neu-

raminidase ectodomain of influenza virus A/H3N2, generating 50% protection in infected mice immunized with recombinant protein (Martinet et al., 1998). Expression of the avian influenza virus A/H5N1 neuraminidase ectodomain presented enzymatic activity (Yongkiettrakul et al., 2009). Expression of influenza virus A/H1N1 hemagglutinin induced antibodies in mice and was able to reduce the number of lytic plaques during *in vitro* infection (Athmaram et al., 2011).

Because HN is the most exposed and immunogenic protein of PoRV, we consider it an excellent candidate to develop a new tool for diagnosis and prevention of BED. In the present study we obtained an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of PoRV HN in the yeast *P. pastoris*.



**Fig. 5.** Expression of eHN protein in *P. pastoris* X33-eHN<sub>62-576</sub> cell-free medium. SDS-PAGE (a) and Western blotting (b) of cell-free medium from induced X33-eHN<sub>62-576</sub>. (M) protein marker, (1) negative control X33, (2–8) 1–8 days of induction of X33-eHN<sub>62-576</sub>.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Structural and antigenic prediction of HN

The nucleotide and amino acid sequence of PAC1HN was obtained from GeneBank (Accession no.: KP229773). Kyte and Doolittle (1982) and Jameson and Wolf (1988) algorithms were used to predict the anchor region to the membrane and antigenic potential sites.

### 2.2. PCR amplification and cloning of eHN gene

The eHN sequence was amplified using as a template the vector pJET-HN, which contains the complete open reading frame of PAC1HN (unpublished data). For PCR, HNRppS (5'-CACCGAATTCCTGTGTAACCTGCAGAGTACA-3') and HNRppA (5'-CGCGTCTAGATAGCGTGATTGAATCT-3') primers were used, which hybridize from 182 to 1728 of the open reading frame of the HN gene. Primers contain the restriction sites *EcoRI* and *XbaI* (underlined), respectively. PCR was conducted in a reaction mixture of 50  $\mu$ l containing 25  $\mu$ l of PCR Master Mix 2X (Fermentas), 1  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ g of plasmid DNA as template. The thermal cycling program was 95 °C for 2 min of pre-denaturation followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s of denaturation, 60 °C for 30 s of hybridization, 72 °C for 1.5 min of extension and 72 °C for 6 min of final extension. PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.7% agarose gels (w/v). The amplified fragment (1567 bp, including the restriction sites) was purified from gel using GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas) and was inserted into the expression vector pPICZ $\alpha$ B (3597 bp) in *EcoRI/XbaI* sites to obtain the plasmid pPICZ $\alpha$ B-eHN (5086 bp). *Escherichia coli* strains Top10 (Invitrogen) containing the recombinant vectors were selected in LB medium containing 25  $\mu$ g/ml of Zeocin (Invitrogen). The sequence was confirmed by automated sequencing.

### 2.3. Transformation of *P. pastoris* X33 and Determination of Mut phenotype

*P. pastoris* X33 (Invitrogen) competent cells were prepared according to the manufacturer's instructions. Briefly, the pPICZ $\alpha$ B-HN vector was linearized (~10  $\mu$ g) with *PmeI* enzyme (Fermentas) to incorporate into the chromosome of *P. pastoris* X33. Transformants were selected in YPD agar plates containing 200  $\mu$ g/ml zeocin and confirmed by PCR from purified genomic DNA. DNA was extracted according to Hoffman (2001) with some

modifications. PCR was performed with HNRppS and HNRppA primers as described above. Mut<sup>+</sup> phenotype was determined by growing the cells in minimum medium of methanol + histidine (MMH), minimum medium of dextrose + histidine (MDH) and by PCR using 5' AOX and 3' AOX (Invitrogen) primers. Selected strains were named X33-eHN<sub>62-576</sub>.

### 2.4. Expression of eHN

Induction of protein expression was conducted according to Cregg and Higgins (1995) and Invitrogen (2010) with some modifications. A 5 ml pre-culture tube of X33-eHN<sub>62-576</sub> strain (YPD 30 °C/24 h) was used to inoculate 100 ml of glycerol complex medium (BMGY: 1% extract yeast, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6, 1.34% yeast nitrogen base, 0.00004% biotin, 1% glycerol) in 250 ml flasks at 220 rpm until reaching 8 OD units at 600 nm. Cells were recovered by centrifugation and resuspended in 100 ml of methanol complex medium (BMMY: 1% extract yeast, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate pH 6, 1.34% yeast nitrogen base, 0.00004% biotin, 0.5% methanol) in 500-ml flasks at 220 rpm 30 °C to induce eHN expression. Cells were cultured at 30 °C and pure methanol was added at a final concentration of 0.5% every 24 h for 8 days.

### 2.5. RT-PCR

The pellet cell was recovered by centrifugation (8000 rpm, 5 min 4 °C) from 1 ml of cell-free medium from each expression day of X33-eHN for RNA extraction. Briefly, the pellet was washed two times with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and then incubated with 30  $\mu$ l of zymolyase buffer (50 mM citric acid, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM EDTA, 1.2 M sorbitol pH 5.6, 0.1 mg zymolyase) at 37 °C for 30 min. Cells were recovered by centrifugation (3000 rpm, 5 min, 4 °C) and resuspended by vortexing in 1 ml of Trizol and 200  $\mu$ l chloroform. The aqueous phase was then recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C. RNA was precipitated with 500  $\mu$ l of isopropanol at -20 °C for 6 h and centrifuged at 12,000 rpm at 4 °C for 10 min. Finally, RNA was resuspended in DEPC water and 1  $\mu$ g was treated with DNase. RT-PCR was carried out using SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) in a 50- $\mu$ l reaction mixture containing 25  $\mu$ l of 2X Reaction Mix, 1  $\mu$ M of each primer, 1  $\mu$ l of RT/Platinum Taq Mix and 1  $\mu$ g of RNA as template. Thermal cycling program was 1 cycle at 55 °C for 30 min, 95 °C for 2 min of pre-denaturation followed by 30 cycles of 95 °C for 15 s of denaturation, 60 °C for 30 s

of hybridization, 72 °C for 1.5 min of extension and 72 °C for 6 min of final extension. PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.7% agarose gels (w/v).

#### 2.6. Electrophoresis and immunodetection

Ten ml of medium was taken each day from X33-eHN<sub>62-576</sub> culture and cells were separated by centrifugation. Proteins of cell-free medium were concentrated ten times by 80% ammonium sulfate precipitation and 20 µl of protein sample was separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Protein bands were visualized by Coomassie Brilliant Blue G-250 staining (Sigma Aldrich). To analyze the intracellular content, the pellet was disrupted according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and protein concentration was determined according to Sedmak and Grossberg (1977). Finally, 20 µg of protein was analyzed by SDS-PAGE. Proteins separated by SDS-PAGE were transferred to polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) and blocked with 5% non-fat milk in TBS-Tween buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) at 4 °C for 16 h with moderate agitation. Membrane was washed with TBS-Tween buffer and incubated with different primary antibodies for recombinant protein detection: anti-c-myc conjugated with horseradish peroxidase (HRP, Invitrogen) diluted 1:5000, sera of PoRV-infected pigs diluted 1:2000 and anti-pig IgG alkaline phosphatase (ALP) as secondary antibody diluted 1:4000. Protein bands were visualized with appropriate chemiluminescent substrate (Immobilon, Millipore) for HRP and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) with nitroblue tetrazolium (NBT) (Promega) for ALP.

#### 2.7. Enzymatic assays

Neuraminidase activity in cell-free medium or purified eHN was quantified by a modification of the thiobarbituric acid method (Santos-López et al., 2004). Two hundred µl of the reaction mixture (enzyme, substrate, and acetate buffer pH 4.5) was incubated for 30 min at 37 °C and then treated with 50 µl of periodic acid (25 mM in 125 mM HCl) for 30 min at 37 °C. Periodic acid excess was inactivated with 40 µl of sodium *meta*-arsenite (2% in 500 mM HCl). When the resulting yellow-brownish color disappeared, 200 µl of thiobarbituric acid pH 9 was added and the reaction tubes were incubated in a boiling water bath for 10 min. The tubes were incubated in an ice-water bath for 2 min followed by a 2 min incubation at 37 °C in a water bath. The colorful complex was extracted by adding 500 µl of acid butanol solution (*n*-butanol containing 5.7% of 10.5 M HCl) with vigorous agitation. The two phases were separated by centrifugation at 1000 g for 5 min. Two hundred and fifty microliters of the upper phase was placed into a 96-well flat-bottomed microtiter plate and absorbance was determined at 550 nm in a microplate spectrophotometer. The negative control consisted of a reaction mixture without viral or purified neuraminidase. Free neuraminic acid concentration was calculated correlating to a standard curve of pure 5-*N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac, Sigma-Aldrich). Fluorescent 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) was also used as substrate in some assays. Briefly, the reaction mixture was made in a final volume of 100 µl using black wall microplates (50 µl) of concentrate proteins, 25 µl of acetate buffer, pH 4 and 10 µl of MUNANA (1 µg/µl). Reaction tubes were incubated at 37 °C for 20 min and fluorescence intensity was determined using excitation at 375 nm. Finally, the emitted fluorescence was read at 405 nm. All reactions were carried out in triplicate in 96-well microplates.

#### 2.8. Purification of eHN

eHN were purified using an Ni-NTA agarose column (Amersham), and 1.5 ml of resin was packed into a vertical column. Cell-free medium concentrated with 80% ammonium sulfate was resuspended and dialyzed against binding buffer (phosphate buffer 50 mM, pH 8, NaCl 0.4 M). Briefly, the column was sanitized with three column volumes (CV) of water, 0.5CV of EDTA 0.2 M, 2CV of NaCl 0.4 M and 3CV of NaOH 0.2 M. It was then activated with 3CV of water, 1CV of NiSO<sub>4</sub> 0.2 M, 5CV of water and 2CV of NaCl 0.4 M and equilibrated with 5CV of binding buffer; 2CV of concentrated proteins were loaded. Non-specific content was eliminated with 5CV of wash buffer (phosphate buffer 50 mM pH 8, NaCl 0.4 M, 10 mM imidazole) and eHN was recovered using 4CV of elution buffer (phosphate buffer 50 mM pH 8, NaCl 0.4 M, 400 mM imidazole). Presence of protein was corroborated by SDS-PAGE, Western blot and enzymatic activity.

#### 2.9. Immunization of mice and indirect ELISA

For immunization of mice, adjuvant AbISCO-100 (Isconova AB, Uppsala, Sweden) was used. To obtain anti-eHN antibodies, 21- to 28-day-old male CD-1 mice were immunized. Immunization dose for all mice was 5 µg/animal. Mice were inoculated with PBS as negative control and the control group was immunized with eHN protein alone as reference. Briefly, immunization and bleeding of mice were as follows: all groups (eight animals each) were inoculated at a final volume of 200 µl with two doses. The second dose was administered 14 days after the first dose. Blood samples were obtained by tail puncture of mice at 0, 7, 14 and 28 days to recover serum and determine the production of IgG. At day 28, mice were slaughtered using CO<sub>2</sub>. Each procedure was carried out according to the "Guide for Care and Use of Laboratory Animals of Mexico" and approved by the Institutional Committee for Care and Use of Animals. All procedures were in accordance with Mexican legislation (NOM-062-ZOO-1999) based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council.

#### 2.10. ELISA test

Twenty-five ng of purified eHN was absorbed per well into a microplate and subsequently incubated with mice serum (1:150). Secondary antibody was used (anti-mouse IgG-HRP) at a dilution of 1:2000. Afterwards, the microplate was revealed with tetramethylbenzidine (TMB) and finally measured at 450 nm in a microplate reader.

#### 2.11. Sero-neutralization test

Serum samples were heat-inactivated at 56 °C for 30 min. The serum/virus mixture was prepared with serum serial dilutions 1:8–1:64 in DMEM medium without serum or antibiotic/antimycotic solution. Serially diluted serum was challenged with an equal volume of PoRV-PAC1 virus for each serum dilution, previously titrated to yield ~70 pfu (plaque-forming units) in 400 µl of serum/virus dilution. Negative controls consisted of serial dilutions of non-immunized serum in DMEM medium and DMEM medium alone. Positive controls consisted of serial dilution of non-immunized serum with an equal volume of PoRV-PAC1 virus for each serum dilution and PoRV-PAC1 virus alone. Serum/virus mixture was incubated at 4 °C for 1 h. PK-15 cell monolayers prepared in 12-well plates were infected with 400 µl/well of the serum/virus mixture. Plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. The supernatants were completely aspirated from the wells and the wells were overlaid with 0.35% agarose in DMEM containing 2.5% of fetal bovine serum. Plates were incubated for plaque forming at

37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 6 days and the wells were fixed with 10% trichloroacetic acid and stained with 0.2% crystal violet solution (in 20% ethyl alcohol). The formed plaques were counted and neutralization activity of the immune sera was assessed by comparing the plaque numbers obtained from PoRV-infected and treated with negative control serum.

### 3. Results

#### 3.1. Prediction of PoRV HN ectodomain (eHN)

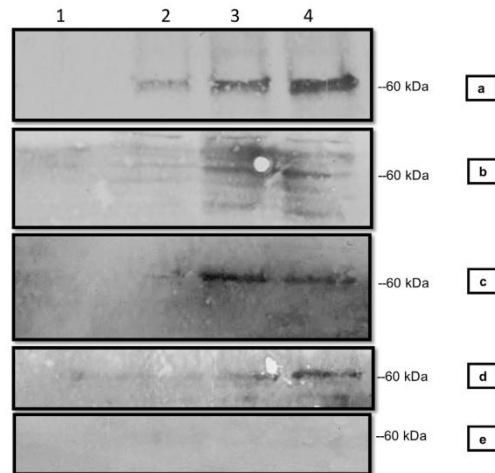
The prediction of the HN protein domains shows an inter-membrane region corresponding to amino acids 1–24; this region connects the protein with the virus within. The transmembrane region corresponds to amino acids 25–47 and anchors the protein to the virus membrane. Finally, the ectodomain (amino acids 48–576) corresponds to the exposed region where the immunogenic epitopes were found. Thus, the best candidate for protein expression in the yeast *P. pastoris* was the region corresponding to amino acids 62–576 due to lack of hydrophobic transmembrane region, which may cause problems in the recovery of the recombinant protein. It is important to note that the main antigenic sites are present in this protein segment (Fig. 1).

#### 3.2. Construction of eHN expression system

The coding region of eHN was inserted into the pPICZαB expression vector to obtain the pPICZαB-HN vector (Fig. 2a). This vector is designed to produce a protein secreted into the extracellular medium due to the *Saccharomyces cerevisiae* alpha secretory signal at the N-terminus. In addition, the protein has the Kex2 signal cleavage for removing the secretory alpha factor signal and has a 6His tag in the C-terminal for purification and the c-myc epitope for immunodetection (Fig. 2b). The linearized vector was integrated into the chromosome of *P. pastoris* X33 to obtain the producing strains (X33-eHN<sub>62-576</sub>). This was confirmed by PCR from chromosomal DNA and subsequent digestion with *EcoRI* enzyme (Fig. 3a) and is due to the ~2200-bp fragment corresponding to the native promoter AOX1. This indicates that the yeast maintains the integrity of the alcohol oxidase gene and can continue using methanol as a carbon source. Fragments of 1718 and 358 bp are present, which corresponds to the digestion products of the pPICZαB-HN vector and indicates the incorporation of the vector into the yeast (Fig. 3b). In these strains the plasmid was incorporated into the chromosome by displacement (retaining its native promoter AOX1); therefore, strains can continue growing in the presence of methanol, presenting the Mut<sup>+</sup> phenotype. Subsequently, the Mut<sup>+</sup> phenotype was corroborated by observing similar growth as strain X33 in solid minimal medium of methanol (data not shown).

#### 3.3. Expression and detection of eHN

The clone X33-eHN<sub>62-576</sub> was selected to express the eHN protein using absolute methanol as inductor. After 8 days of expression, cell-free medium was collected for analysis. As shown in Fig. 4a, RT-PCR reveals the presence of eHN messenger during 4 days of expression and, in the Western blot of intracellular extract, the presence of eHN (Fig. 4b) was also observed, confirming that eHN was present intracellularly from the first day of expression. On the other hand, the protein begins to be excreted into the external medium after several days as observed in SDS-PAGE of cell-free medium. Heterologous proteins were observed at 50–60 kDa because *Pichia* secretes few native proteins (Fig. 5a) and by Western blot analysis using antibodies against c-myc, which confirmed



**Fig. 6.** Ectodomain of HN is recognized by serum samples of PoRV-infected pigs. Western blotting of serum samples of PoRV-PAC3 (UNAM, Mexico, D.F.) experimentally infected swine (a), infected female swine from the State of México (b), Guanajuato (c), Palo Alto-INIFAP, México, D.F. (d) and a non-infected control swine (e). Numbers above denote the following: *P. pastoris* wild-type X33 (1) and four (2), six (3) or eight (4) days of the induction of expression.

the presence of eHN protein (Fig. 5b) with an expected molecular weight of 60 kDa.

#### 3.4. Antigenicity of recombinant eHN

Ectodomain of HN antigenicity was evaluated using sera of PoRV-infected pigs. One serum sample of experimentally PAC3-infected pig recognized the recombinant eHN from day 4–day 8 of expression (Fig. 6a). Serum samples of infected pigs with currently circulating strains at farms in north-central Mexico, the so-called Bajío region (states of Guanajuato, Querétaro, Aguascalientes and Jalisco), were used with the same objective. All tested sera recognized the eHN protein. One sample from convalescent replacement females of a persistently infected farm from Zumpango (State of Mexico) showed low reaction for the protein (Fig. 6b). One sample from an infected replacement female from Guanajuato recognized the protein at 6 and 8 days of expression (Fig. 6c) and one sample from a replacement female experimentally infected at INIFAP recognized the protein at day 8 of expression (Fig. 6d). One sample of healthy pigs was used as negative control (Fig. 6e). All showed reaction against the protein extract of the X33-eHN<sub>62-576</sub>.

#### 3.5. Neuraminidase activity of eHN

Enzymatic activity of eHN in cell-free medium from X33-eHN<sub>62-576</sub> was analyzed during the days of expression. It was possible to detect protein from the first day with a specific activity of 10 nmol/min/mg. Increasing activity was progressive, reaching a maximum of 67 nmol/min/mg after 6 days of expression. From this day on, the activity was constant (Fig. 7). Protein extract from cell-free medium of X33 strain was used as negative control. A supernatant of PoRV PAC1 virus culture was used as positive control, which showed a specific activity of 5.34 nmol/min/mg. Neuraminidase activity was also tested using MUNANA as substrate, concentrated cell-free medium obtained from X33-eHN<sub>62-576</sub> from 6 days of expression showed 49,385

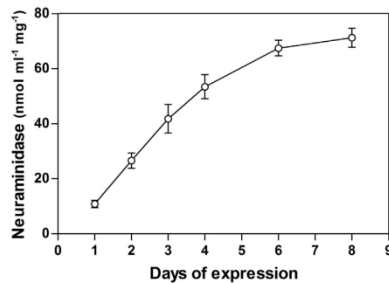


Fig. 7. Neuraminidase activity of eHN protein in cell-free medium of *P. pastoris* X33-eHN<sub>62-576</sub>. Specific activity was determined in *P. pastoris* X33-eHN<sub>62-576</sub> for 1–8 days of expression.

relative fluorescence units (RFU) compared to the negative control X33 extract, which showed 1577 RFU and was considered as the neuraminidase test background (data not shown).

### 3.6. Purification of eHN and production of antibodies against the recombinant protein

Secreted eHN in the cell-free medium was purified by affinity chromatography and the protein was recovered in a single-step purification process from the cell-free medium. The 6His tag in the c-terminal allowed recovery of the protein from the cell-free medium in a single affinity purification step. From 100 ml of concentrated cell-free medium, 1.2 mg of pure eHN was recovered (corresponding to 1000 ml of cell-free medium) with a yield of 92% (Table 1). The specific activity was increased 5.3 times, indicating that all contaminant proteins were eliminated and almost all the total units of activity were recovered. With a purification factor of 5, the X33-eHN<sub>62-576</sub> clone produced few contaminant proteins in the cell-free medium, facilitating the purification process. These amounts were sufficient to immunize mice, requiring 5 µg of protein for each animal. After confirming the presence of eHN by Western blot and enzymatic activity (data not shown), it was used to immunize CD-1 mice and the presence of specific antibodies was monitored by ELISA. As shown in Fig. 8, the obtained antibodies recognized the protein during the days of immunization and increased with time in mice immunized with adjuvant-protein mixture. It was significantly greater than in animals immunized with protein only, suggesting that adjuvant-protein mix potentiates the immune response to generate antibodies. This confirms that recombinant protein produced in yeast has the necessary elements to generate an immune response in mice, even without adjuvant, when compared to the negative control mice (inoculated with PBS). Differences in OD ranging from 2–8 times were obtained in adjuvant-protein group compared to negative controls over time. Serum of PBS control animals did not show significant OD increases in absorbance during the entire experiment and these OD levels were considered as the test background.

### 3.7. Sero-neutralization

Sero-neutralization assays showed a reduction of the number of lytic plaques when the dilution of immunized serum was decreased, compared with the positive controls at the same dilution (Fig. 9). Non-immunized serum did not show a decrease of the number of lytic plaques with 1:8 dilution, indicating that mice serum does not have neutralizing antibodies against PoRV-PAC1 virus. Serial dilutions of immunized serum were challenged against ~70 pfu (plaque forming units) and a decrease was observed in

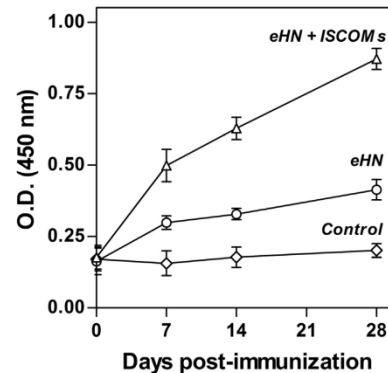


Fig. 8. Production of antibodies against eHN in mice. Antibody levels in serum samples of immunized mice were determined by ELISA from 0–28 days. Curves represent the O.D. values during the following immunization process in three cases: mice inoculated with PBS only (Control), with purified protein alone (eHN) or with purified protein plus adjuvant (eHN+ISCOMs). Error bars represent the standard deviation in replicated (8) assays.

the percentage of infection >50% with 1:32 serum dilution. This percentage of infection decreased until the percentage was <20%, corresponding to the 1:8 serum dilution (Fig. 10). Finally, antibodies of immunized sera were able to inhibit viral replication in 82% with respect to the positive controls. Therefore, the eHN recombinant protein has the necessary elements for production of neutralizing antibodies against PoRV-PAC1 virus. This is evidence that the *P. pastoris* system can produce an immunogenic protein from PoRV-PAC1 virus with similar characteristics to the native viral proteins and with the possible use as a favorable antigen.

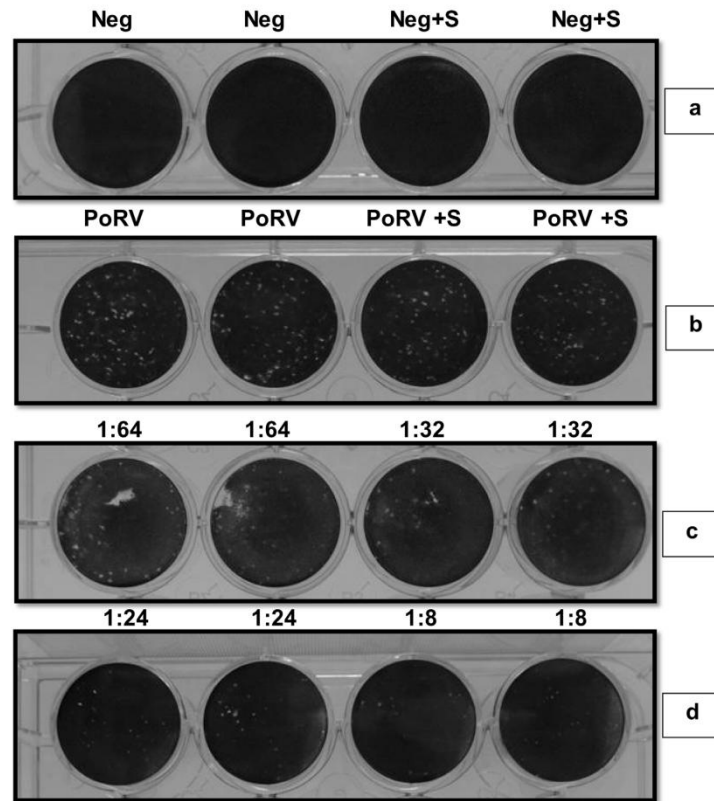
## 4. Discussion

Since BED appeared in Mexico in 1980, few studies have been reported about disease prevention. Fuentes et al. (1994) reported 71.4% protection when evaluating an experimental vaccine against disease in pigs by testing immunogenicity, safety, potency and measurement of passive immunity. Currently, there are two vaccines on the market offering preventive protection against PoRV and indicated for replacement animals whose production may reach high costs. Recombinant proteins provide a resource for development of vaccines and diagnostic tools; however, for these purposes there are no reports about the expression of recombinant proteins of PoRV. Therefore, the possibility of expressing the immunogenic PoRV HN protein was attractive to our group. The *P. pastoris* expression system has been recently successfully used to express glycosylated viral proteins (Martinet et al., 1998; Yongkiettrakul et al., 2009; Athmaram et al., 2011) and even to produce whole virus-like particles (Yun et al., 2014; Tomé-Amat et al., 2014). The coding sequence of eHN under the control of the AOX1 promoter was successfully integrated into the yeast genome, which produced Mut<sup>+</sup> clones capable of growing in the presence of methanol. This is a very important step for the proper design of the expression tests. Various authors note and describe important advantages in expression when comparing yields of Mut<sup>+</sup> and Mut<sup>S</sup> strains (Pla et al., 2006; Daly and Hearn, 2005; Cereghino and Cregg, 2000). Obtaining Mut<sup>+</sup> strains by PCR amplification of fragments belonging to the AOX1 promoter and the recombinant vector has also been described by Zhou et al. (2006) to obtain producing strains of dengue virus NS1 glycoprotein. *P. pastoris* has been an excellent model in the production of functionally active proteins and



**Table 1**  
Yield of purification process of eHN from 1000 ml of cell-free medium.

Purification step	Total activity (nmol/min)	Total protein(mg)	Specificactivity(nmol/min/mg)	Yield(%)	Purification factor
Cell-free medium concentrated	298.1	6.9	43.2	100	1
Elution (Ni-NTA agarose)	276	1.2	230	92.58	5.32

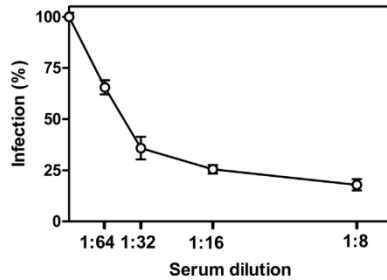


**Fig. 9.** Inhibiting the formation of lytic plaques using serum of immunized mouse. Negative controls of infection corresponding to non-immunized serum 1:8 (Neg+S) and cell medium only (Neg) (a), positive controls of infection with virus + non-immunized serum 1:8 dilution (PoRV+S) and virus alone (PoRV) (b), Mixture of virus + immunized serum 1:64 to 1:8 dilutions (c and d).

enzymes from higher organisms such as fungi, plants and humans (Wang et al., 2014; Fazlalipour et al., 2015; Kaewthai et al., 2010; Shi et al., 2007; Kang et al., 2012; Salah et al., 2009).

eHN was recovered from cell-free medium due to the presence of the alpha factor as part of the recombinant protein and presented detectable activity from day 1, which gradually increased, reaching the maximum at day 6. After that, the activity was constant until day 8. Sustaining feeding with methanol has been used by Xia et al. (2012) to produce human angiogenin and also by Fan et al. (2012) to produce a xylanase from *Paecilomyces thermophila* in *P. pastoris*. The enzyme also showed activity on both tested substrates (fetuin and MUNANA), confirming the presence of a protein with neuraminidase activity. Therefore, yeast is capable of producing a protein with similar characteristics as the native enzyme. Furthermore, in antigenicity assays, sera of PoRV-infected pigs from the Bajío region recognized the recombinant protein, demonstrating

that eHN retains antigenic determinants from the original virus protein. In addition, sera used in this study correspond to replacement animals during optimal age for reproduction. These animals have more economic value to the industry and are positive for PoRV but the nature of the particular virus variant is unknown. Results are promising in the development of a vaccine or for diagnostic tests because these sera recognized the recombinant protein eHN, despite coming from different strains of PAC1. Sera from infected organisms have been used to evaluate the antigenicity of proteins expressed in *P. pastoris*. As an example, we have the leptospiral immunoglobulin-like proteins and immunodominant lipoprotein (LipL32) produced by Hartwig et al. (2010) and evaluated with sera from patients infected with leptospirosis. eHN showed the ability to generate immune response in mice, producing antibodies against the protein detected by ELISA. The importance of generating antibodies against the recombinant protein has been demonstrated by



**Fig. 10.** Viral serum neutralization curve. Reduction of lytic plaques in infected cells due to pre-incubation of sera from immunized mice is presented. The value of 100% corresponds to ~70 pfu (plaque-forming units). Error bars represent the standard deviation in assays performed in triplicate.

Other authors who used mice immunized with the ectodomain of the influenza neuraminidase expressed in *P. pastoris* to challenge the animals against infection. These authors reported 50% protection, demonstrating the production of neutralizing antibodies against the virus (Martinet et al., 1997). Other authors developed antibodies against neuraminidase in animal models expressed in yeast, which are neutralized against viruses during viral replication. Results have been encouraging in the development of vaccines (Martinet et al., 1998; Athmaram et al., 2011). In our case, with the sero-neutralization test we observed a decrease in the percentage of infection >50% from 1:32 dilution of immunized serum when the number of lytic plaques were compared with positive controls. The immunized serum was able to inhibit the replication virus in 82%. With these results we confirmed that the eHN protein generates neutralizing antibodies against PoRV-PAC1 virus and the protein from yeast has all the immunogenic sites for providing disease protection. These tests show that eHN contains the necessary elements to produce an active and antigenic protein. Due to the activity assay, it has been concluded that >6 days of expression is not required to recover significant amounts of eHN.

Compared to cell culture infection, production in the *P. pastoris* system allows recovering greater amounts of the protein of interest, which otherwise would be difficult to obtain, thus generating a useful tool for developing rapid testing of the disease. This can incorporate the recombinant eHN as an antigen in ELISA or Western blot, among others.

Finally, the present results allow the proposal of eHN as a major component for the development of a new vaccine to prevent BED. For this purpose, it is necessary to determine the neutralizing ability of specific antibodies generated by eHN to inhibit the replication of the virus *in vivo*, evaluating the protection level induced in pigs. As part of our research initiative, our group is involved in the study of several applications such as preventive (i.e., vaccines) and diagnostic (i.e., ELISA) resources. It is important to resolve the negative effects of BED in Mexican farms.

#### Acknowledgments

This work was supported by Redes Temáticas-SEP 2012–2014 México, ICUAP and VIEP to Benemérita Universidad Autónoma de Puebla and Funds for Scientific Infrastructure from the Instituto Mexicano del Seguro Social (CTFIS/10RD/12/2011). JLC-S received a scholarship from CONACYT-México (231269).

#### References

- Athmaram, T.N., Saraswat, S., Santhosh, S.R., Singh, A.K., Suryanarayana, V.V.S., Priya, R., Gopalan, N., Parida, M., Rao, P.V.L., Vijayaraghavan, R., 2011. Yeast expressed recombinant hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralizing antibodies in rabbits and mice. *Virology* 424, 524–534.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66.
- Cregg, J.M., Higgins, D.R., 1995. Production of foreign protein in yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot.* 73, 5981–5987 (Suppl.).
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., Stillman, C.A., 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *P. pastoris*. *Mol. Cell Biol.* 9, 1316–1323.
- Cuevas-Romero, S., Hernández-Baumgarten, E., Kennedy, S., Hernández-Jáuregui, P., Berg, M., Moreno-López, J., 2014. Long-term RNA persistence of *Porcine rubulavirus* (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: the detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Res.* 188, 155–161.
- Daly, R., Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18, 119–138.
- Escobar-López, A.C., Rivera-Benitez, J.F., Castillo-Juárez, H., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo-Ortega, M.E., Sánchez-Betancourt, J.L., 2011. Identification of antigenic variants of the *Porcine rubulavirus* in sera of field swine and their seroprevalence. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 416–420.
- Fan, G., Katrolija, P., Jia, H., Yang, S., Yan, Q., Jiang, Z., 2012. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus: *Paecilomyces thermophilus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 34, 2043–2048.
- Fazlalipour, M., Keyvani, H., Monavari, S.H., Mollaie, H.R., 2015. Expression, purification and immunogenic description of a hepatitis C virus recombinant core E1E2 protein expressed by yeast *Pichia pastoris*. *Jundishapur J. Microbiol.* 8, e17157.
- Fuentes, J.M.R., Gay, M.J.G., Herradora, M.A.L., Rentana, A.R., 1994. Evaluación de una vacuna experimental contra el virus de la peste porcina clásica en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Vet. Méx.* 25, 243–246.
- Hartwig, D.D., Oliveira, T.L., Seixas, F.K., Forster, K.M., Rizzi, C., Hartleben, C.P., McBride, A.J.A., Dellagostin, O.A., 2010. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 9, 1–9.
- Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández-Jauregui, P., Zenteno, E., 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult porcine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 367–381.
- Hoffman, C.S., 2001. Preparation of Yeast DNA Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc New Jersey (Chapter 13, Unit 13.11. 39.IV:13.11:13.11. 1–13.11.4).
- Invitrogen, User manual for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. 2010. Catalogue No. K1740–01.
- Jameson, B.A., Wolf, H., 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4, 181–186.
- Kaewthai, N., Harvey, A.J., Hirnova, M., Bruner, H., Ezcurra, I., Teeri, T.T., Fincher, G.B., 2010. Heterologous expression of diverse barley XTH genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Plant Biotech. J.* 27, 251–258.
- Kang, L., Chen, X., Zhai, C., Ma, L., 2012. Synthesis and high expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris* GS115. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1202–1207.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamb, R.A., Collins, P.L., Kolakofsky, D., Melero, J.A., Nagai, Y., Oldstone, M., Pringle, C.R., Rima, B.K., 2005. Family paramyxoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy, VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 655–668.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D., et al., 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1177–1204.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D., 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1305–1340.
- Martinet, W., Deroo, T., Saelens, X., Beirnaert, E., Vanlandschoot, P., Contreras, R., Fiers, W., Min, W.J., 1998. Evaluation of recombinant A/Victoria/3/75 (H3N2) influenza neuraminidase mutants as potential broad-spectrum subunit vaccines against influenza A. *Arch. Virol.* 143, 2011–2019.
- Martinet, W., Saelens, X., Deroo, T., Neiryck, S., Contreras, R., Jou, W.M., Fiers, W., 1997. Protection of mice against a lethal influenza challenge by immunization with yeast-derived recombinant influenza neuraminidase. *Eur. J. Biochem.* 247, 332–338.
- Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A., Ericsson, A., 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of piglet in México. *Arch. Virol.* 91, 221–231.
- Pla, I.A., Damasceno, L.M., Vannelli, T., Ritter, G., Batt, C.A., Shuler, M.L., 2006. Evaluation of mut<sup>+</sup> and Mut<sup>0</sup> *Pichia pastoris* phenotypes for high level

- extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnol. Prog.* 22, 881–888.
- Ramírez-Mendoza, H., Hernández-Jáuregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-Lopez, J., Kennedy, S., 1997. Lesions in the reproductive tract of the boars experimental infected with *Porcine rubulavirus*. *J. Comp. Pathol.* 117, 237–252.
- Reyes-Leyva, J., Hernández-Jáuregui, P., Montaño, L.F., Zenteno, E., 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (alpha 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133, 195–200.
- Reyes-Leyva, J., Santos G., Hernández J., Espinosa B., Del Tránsito-Borraz M., Ramírez H., Vallejo V., and Zenteno E. 2002. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el Rubulavirus porcino. In: Mensaje Bioquímico. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mexico. UNAM. 26, 99–127.
- Salah, R.B., Gargouri, A., Verger, R., Gargouri, Y., Mejdoub, H., 2009. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134His: purification and characterization. *World J. Microb. Biot.* 25, 1375–1384.
- Santos-López, G., Flores, E., Baños, R., Herrera-Camacho, I., Reyes-Leyva, J., 2004. Purification of the *Porcine rubulavirus* attachment protein by liquid isoelectric focusing. *Protein Expr. Purif.* 35, 120–125.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., 1977. A rapid sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* 79, 544–552.
- Shi, X.L., Feng, M.Q., Shi, J., Shi, Z.H., Zhong, J., Zhou, P., 2007. High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 54, 24–29.
- Stephano H.A. 2000. La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones. In: Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo. Irapuato, Gto., México. pp. 1–10.
- Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramirez, T.C., 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122, 6–10.
- Tomé-Amat, J., Fleischer, L., Parker, S.A., Bardliving, C.L., Batt, C.A., 2014. Secreted production of assembled norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 13, 134.
- Wang, F., Chi, C., Wang, L., Qiao, Y., Jin, X., Ding, G., 2014. Gene cloning and expression of MAP30 in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 136–139.
- Xia, W.R., Fu, W.L., Cai, L., Cai, X., Wang, Y.Y., Zou, M.J., Xu, D.G., 2012. Expression, purification and characterization of recombinant human angiogenin in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1384–1388.
- Yongkiettrakul, S., Boonyapakron, K., Jongkaewwattana, A., Wanitchang, A., Leartsakulpanich, U., Chitnumsub, P., Eurwilaichitr, L., Yuthavong, Y., 2009. Avian influenza A/H5N1 neuraminidase expressed in yeast with a functional head domain. *J. Virol. Methods* 156, 44–51.
- Yun, S.M., Jeong, Y.E., Wang, E., Lee, Y.J., Han, M.G., Park, C., Lee, W.J., Choi, W.Y., 2014. Cloning and expression of recombinant tick-borne encephalitis virus-like particles in *Pichia pastoris*. *Osong Public Health Res. Perspect.* 5, 274–278.
- Zenteno-Cuevas, R., Huerta-Verpe, S., Reyes-Leyva, J., Hernández-Jáuregui, P., González-Bonilla, C., Ramírez-Mendoza, H., Agundis, C., Zenteno, E., 2007. Identification of potential B cell epitope determinants by Computer techniques, in hemagglutinin-neuraminidase from the *Porcine rubulavirus* La Piedad Michoacan. *Viral Immunol.* 20, 250–260.
- Zhou, J.M., Tang, Y.X., Fang, D.Y., Zhou, J.J., Liang, Y., Guo, H.Y., Jiang, L.F., 2006. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 33, 27–32.