

**EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA GP5
MODIFICADA DEL VIRUS DEL SÍNDROME
RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO
PORCINO EN DOS MODELOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA EN LA
ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA**

PRESENTA

**LBT. MARÍA MARCELA ROBLES
MACHUCA**

Resumen en español

El Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP) genera grandes pérdidas al sector porcino mundial y es el segundo problema sanitario para los poricultores en México. El desarrollo de vacunas subunitarias recombinantes permitiría proporcionar una alta protección contra aislados virales mexicanos. El objetivo de este trabajo fue la expresión de dos secuencias diferentes de la proteína GP5 del VSRRP en dos modelos, *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*, adicionadas con una cisteína reactiva para conjugarse a adyuvantes particulados. Una de las secuencias corresponde a la región del ectodominio del virus de un aislado mexicano y la otra codifica para la proteína madura GP5 de la cepa vacunal VR-2332 viva modificada; en ambas secuencias se adicionó un codón para cisteína en sus extremos. Asimismo, se diseñaron estrategias para la clonación de tales secuencias en plásmidos de expresión de *E. coli* (pET102/D-TOPO) y *P. pastoris* (pPICZ α B y pGAPZ α B). En *P. pastoris* se transformó la cepa X-33 y SMD1168H; se analizó el genotipo por PCR y el fenotipo mediante crecimiento en metanol; la expresión se indujo con metanol al 1%, y se analizó la presencia del transcrito. Por otro lado, en *E. coli* se indujo la expresión con IPTG, se analizó la localización de la proteína en la célula y se hizo una purificación parcial de la misma. La proteína madura se analizó por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-histidinas presentes en el extremo carboxilo. Se encontró que las transformantes de *P. pastoris* expresan la proteína GP5 madura, o bien, su ectodominio en niveles no detectables. Por el contrario, las transformantes de *E. coli* son capaces de expresar la proteína GP5 madura de la cepa vacunal después de la inducción con IPTG. La proteína GP5 adicionada con una cisteína, una vez conjugada a adyuvantes particulados, podría inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el VSRRP.

Resumen en ingles

ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) causes great losses to the pig industry worldwide and it is the second health problem for swine producers in Mexico. The development of recombinant subunit vaccines would provide high protection against mexican viral isolates. The aim of this work was the expression of two different sequences of PRRSV GP5 protein in two models, *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, both of them added with a reactive cysteine for conjugation to particulate adjuvants. One of the sequences corresponds to the ectodomain region of a mexican viral isolate and the other encodes the mature GP5 protein from the modified live vaccine strain VR-2332; in both sequences, a cysteine codon was added at their ends. Strategies were designed for cloning such sequences into *E. coli* (pET102/D-TOPO) and *P. pastoris* (pPICZ α B y pGAPZ α B) expression plasmids. In *P. pastoris*, strains X-33 and SMD1168H were transformed, genotype was analyzed by PCR and phenotype by growth on methanol; expression was induced with 1% methanol and the presence of the transcript was analyzed. On the other hand, *E. coli* expression was induced with IPTG, the location of the protein in the cell was determined and its partial purification was performed. The mature protein was analyzed by Western blot using an anti-histidine monoclonal antibody. It was found that *P. pastoris* transformants expressed mature GP5 protein or its ectodomain at undetectable levels. Otherwise, *E. coli* transformants were able to express the mature protein from the vaccine strain after induction with IPTG. GP5 protein provided with a cysteine, once conjugated to particulate adjuvants, could induce the production of neutralizing antibodies against PRRSV.

DEDICATORIAS

A mis padres: María Luisa Machuca y Antonio Robles. Gracias por todo lo que me han enseñado, por ayudarme a seguir adelante mostrándome cual es el camino correcto. Esta nueva meta en mi vida se las dedico a ustedes, que son mi ejemplo, todo un modelo a seguir. Los quiero con todo mi corazón, los amo y esto es por ustedes!

A mis hermanos Sara Patricia y Luis Fernando Robles, por ser mi inspiración y gracias por toda la motivación que me han brindado, los quiero!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mí director de tesis, el Dr. Abel Gutiérrez Ortega, por todo el apoyo que me ha brindado en los momentos buenos y malos de esta travesía, por confiar en mí y saber guiarme en el sendero del conocimiento.

Al Dr. Jorge Rodríguez, Dr. Rodolfo Hernández y Dr. Pedro Castruita, por todos esos consejos que me brindaron y por mostrarse disponibles ante mis dudas, les agradezco todo el apoyo proporcionado durante las diferentes etapas de mi proyecto.

Al M.C. José Francisco Robles González de la empresa Boheringer Vetmedica, por proporcionarnos material para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Hugo Esquivel, por mostrarse todo un ejemplo, por enseñarnos a ver más allá de nuestras propias expectativas, por hacernos mejores investigadores, gracias!!

Al equipo PTV's: Aurorita, Carlos, Paola, Ana Lilia, Olga, Chuy, así como los que ya emprendieron su camino, Apatzingan, Paula. A todos les deseo lo mejor.

Al grandioso club de la pequeña Lulú!!!!: Montse, Karely, Ivonne, Xochitl, Ivanna, Lore Ramírez y Evelyn; mil gracias por ser todo un soporte para mí y por dejarme tenerlas como amigas, chicas las quiero!!!

A mis amigos con los que compartí casa durante estos dos años: Héctor, Li, Anita, Vivi, Laura, karely también, pero en especial a Rodrigo (pachuquin se te aprecia), Sergio (el inquilino extra que se te adora) y Víctor mil mil gracias por todo lo que me has apoyado, me enseñaste a ser una mejor persona, sabes que eres el mejor de los amigos.

Al igual a mis grandes amigos que siempre tengo presente: Delmira (Comadre) eres mi chispa de alegría que me mantiene siempre de pie, te quiero muchísimo, Gaby y Citlalli que son mis mejores amigas, Alex y Rubén que siempre están ahí.

A todos y cada uno de ustedes, muchas GRACIAS!!!

De la misma manera se le agradece de la forma más atenta al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar el proyecto (No. de proyecto: 83863) “Presentación de antígenos en partículas tipo virus obtenidas de células en suspensión de tabaco para el desarrollo de vacunas” por medio del Fondo Sectorial SEP – CONACYT 2007, con material y reactivos necesarios para llevar a cabo este trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	
I. ANTECEDENTES	1
II. DEFINICIÓN DEL TEMA	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. OBJETIVOS	5
V. FUNDAMENTACIÓN	6
V.1 Síndrome respiratorio y reproductivo porcino	6
V.2 Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.	7
V.2.1 Etiología del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.	7
V.2.2 Organización del genoma y proteínas del VSRRP.	8
V.2.3 Respuesta inmune frente al VSRRP en la producción de anticuerpos neutralizantes.	11
V.3 La glicoproteína 5 como modelo antigénico.	12
V.3.1 Topología de GP5.	12
V.3.2 La naturaleza neutralizante de GP5.	13
V.3.3 GP5 como candidata a subunidad recombinante.	14
V.3.3.1 Alternativas para vacunas de nueva generación.	14
V.3.3.2 Los avances en el estudio de GP5.	16
V.4 Plataforma de presentación de antígenos.	17
V.4.1 Partículas virales como adyuvantes proteicos.	17
V.4.2 Estrategias para la presentación de antígenos.	18
V.4.3 Conjugación antígeno – adyuvante.	19
V.5 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.	21

V.5.1 Selección de un sistema de expresión.	21
V.5.2 Sistema procariótico: <i>Escherichia coli</i> .	22
V.5.2.1 Expresión basada en promotores transcripcionales.	23
V.5.2.2 Formas de expresión de proteínas heterólogas.	25
V.5.3 Sistema eucariótico: <i>Pichia pastoris</i> .	26
V.5.3.1 Regulación en la expresión génica del ADNr.	27
V.5.3.2 Promotor inducible: P _{AOX1} .	29
V.5.3.3 Promotor constitutivo: P _{GAP} .	30
VI. METODOLOGÍA	31
VI.1 MATERIALES	31
VI.1.1 Microorganismos.	31
VI.1.2 Plásmidos / Vectores.	32
VI.1.3 Reactivos.	33
VI.1.4 Equipos.	35
VI.2 MÉTODOS	35
VI.2.1 Diseño de los genes modificados de GP5 de VSRRP.	35
VI.2.1.1 Ectodominio de GP5: análisis <i>in silico</i> y diseño de los genes modificados.	35
VI.2.1.2 ORF5 del ResPRRS_MLV. Amplificación del gen <i>gp5</i> modificado.	38
VI.2.2 Sistema eucariótico: <i>Pichia pastoris</i> .	39
VI.2.2.1 Clonación del ectodominio GP5 en el vector de pPICZαB.	39
VI.2.2.2 Clonación del gen <i>gp5</i> ResPRRS_MLV modificado en pPICZα B y pGAPZα B.	40
VI.2.2.3 Líneas transformantes de <i>E. coli</i> con los vectores pPICZα B y pGAPZα B.	41
VI.2.2.4 Transformación de la levadura <i>Pichia pastoris</i> .	41
VI.2.2.5 Análisis de las transformantes de <i>Pichia pastoris</i> .	43
VI.2.2.5.1 Análisis del genotipo por PCR.	43
VI.2.2.5.2 Análisis del fenotipo AOX1.	45

VI.2.2.6 Expresión de la proteína bajo dos promotores: P _{AXO1} y P _{GAP} .	46
VI.2.2.6.1 Cinética de expresión para un medio constitutivo.	46
VI.2.2.6.2 Cinética de expresión para un medio inductor.	47
VI.2.2.6.3 Análisis de la expresión génica.	48
VI.2.2.7 Análisis de la expresión de la proteína madura.	49
VI.2.3 Sistema procariótico: <i>Escherichia coli</i> .	50
VI.2.3.1 Amplificación con <i>Pfu</i> de las secuencias ResPRRS_MLV.	50
VI.2.3.2 Clonación en un sistema de expresión pET.	51
VI.2.3.3 Expresión en células BL21(DE3) bajo un sistema pET.	52
VI.2.3.4 Análisis de la expresión de la proteína madura GP5.	53
VI.2.3.4.1 Localización celular de la proteína madura GP5.	53
VI.2.3.5 Purificación mediante cromatografía de afinidad.	54
VII. RESULTADOS	55
VII.1 Secuencias del gen <i>gp5</i> modificadas para conjugación química.	55
VII.1.1 Clonación de la región del ectodominio GP5 modificado con cisteína.	55
VII.1.2 Clonación del gen <i>gp5</i> de ResPRRS_MLV en dos modelos de expresión.	59
VII.2 Líneas transformantes en el gen <i>gp5</i> modificado del VSRRP.	65
VII.2.1 Transformación en <i>Pichia pastoris</i> bajo dos promotores de expresión.	66
VII.2.1.1 Transformación del gen <i>gp5</i> de ResPRRS_MLV en el promotor P _{GAP} .	66
VII.2.1.2 Transformación del ectodominio GP5 del aislado viral en el promotor P _{AOX1} .	67
VII.2.1.2.1 Manifestación fenotípica del gen alcohol oxidasa.	69
VII.3 Expresión de la proteína GP5 del VSRRP en dos modelos.	70
VII.3.1 Expresión en <i>Pichia pastoris</i> bajo dos promotores.	70

VII.3.1.1	Expresión del ectodominio GP5 modificado en presencia de metanol.	70
VII.3.1.2	Expresión de la proteína GP5 modificada de la cepa vacunal.	78
VII.3.2	Expresión en <i>Escherichia coli</i> de GP5 modificada de la cepa vacunal.	80
VII.3.2.1	Localización celular de la proteína GP5 modificada en <i>E. coli</i> .	82
VII.3.2.2	Purificación parcial por cromatografía de afinidad.	83
VIII.	CONCLUSIÓN	87
IX.	REFERENCIAS	89
ANEXOS.		
1.	Análisis del marco del lectura abierta de la glicoproteína GP5 del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino	
2.	Alineación de las secuencias de GP5 del VSRRP	
3.	Memorias en Extenso. 3 ^{er} Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía	
4.	Memorias en Extenso. 2 ^{do} Congreso Nacional de Biotecnología y Producción Agrícola Sustentable	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación de los ORFs entre los genotipos VR-2232 y LV.	9
2	Las proteínas de membrana del VSRRP.	10
3	Capacidades de algunas células hospederas como sistemas de expresión.	22
4	Sistemas de expresión de proteínas recombinantes para <i>E. coli</i> .	24
5	Componentes que varían en vectores de expresión de proteínas en <i>P. pastoris</i> .	29
6	Reactivos de uso general.	33
7	Medios de cultivo.	33
8	Reactivos para métodos de selección.	33
9	Reactivos de uso molecular.	34
10	Material de extracción y purificación.	34
11	Secuencias para el diseño de los plásmidos del ectodominio GP5.	36
12	Genes sintéticos del ectodominio GP5 diseñados para <i>P. pastoris</i> .	56
13	Iniciadores empleados para amplificar el gen gp5 en dos modelos de expresión.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución nacional con casos seropositivos al Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino.	6
2	Representación esquemática de una partícula del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.	9
3	Topología de la proteína GP5 en el VSRRP.	13
4	Grupos reactivos para conjugación de proteínas.	19
5	Representación esquemática de una conjugación química antígeno-partícula viral.	21
6	Región del vector de <i>P. pastoris</i> amplificada para el análisis por PCR.	44
7	ADN plasmídico de <i>E. coli</i> transformadas con el ectodominio GP5 en pUC57.	57
8	Análisis de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> transformadas con ectoGP5-pPICZ α B.	58
9	Amplificaciones de los genes <i>gp5</i> del ORF5 del ResPRRS_MLV para <i>P. pastoris</i> .	61
10	Análisis de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> transformadas con el gen <i>gp5</i> del ORF5 en pPICZ α B y pGAPZ α B.	62
11	Amplificaciones de los genes <i>gp5</i> del ORF5 del ResPRRS_MLV para <i>E. coli</i> .	63
12	Amplificaciones con <i>Pfu</i> de los genes <i>gp5</i> del ORF5 del ResPRRS_MLV para <i>E. coli</i> .	64
13	Clonación del gen <i>gp5</i> del ORF5 del ResPRRS_MLV en pET102/D-TOPO para <i>E. coli</i> .	65
14	Análisis del genotipo de las transformantes con GP5 en el promotor P _{GAP} .	66

15	Análisis del genotipo de las transformantes con el ectodominio GP5 en el promotor P _{AOX1} .	68
16	Análisis del fenotipo de las transformantes con el ectodominio GP5.	69
17	Análisis de la expresión en <i>P. pastoris</i> de ectoGP5-L-Cys en medio rico.	72
18	Cinética de crecimiento en medio rico con metanol.	73
19	Cinética de crecimiento en medio mínimo con metanol.	74
20	Análisis de la expresión génica por RT-PCR durante la cinética de expresión de la proteína recombinante.	75
21	Cuantificación de proteína en medio mínimo con metanol.	76
22	Reconocimiento de la proteína madura del ectodominio GP5 por Western blot en <i>P. pastoris</i> .	76
23	Cinética de crecimiento en medio constitutivo.	78
24	Reconocimiento de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en <i>P. pastoris</i> .	79
25	Expresión piloto de la proteína GP5 ResPRRS_MLV en <i>E. coli</i> .	81
26	Cinética de expresión de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en <i>E. coli</i> .	82
27	Localización celular de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en <i>E. coli</i> .	83
28	Purificación parcial de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por cromatografía de afinidad.	84

I. ANTECEDENTES

El presente trabajo forma parte de un proyecto que propone el desarrollo de una plataforma que permita mejorar el procesamiento y presentación de un antígeno a las células del sistema inmune, de manera que se aumente el potencial inmunogénico contra éste. En tiempos recientes, se han generado vacunas basadas en partículas virales que sirven como plataformas para exponer antígenos en su superficie, decoradas de manera repetitiva y ordenada, que inducen una respuesta análoga al de un adyuvante. Los esquemas para acoplar los antígenos a estos adyuvantes particulados pueden ser mediante fusiones traduccionales o a través de la conjugación química de los grupos reactivos de lisinas y cisteínas presentes en las proteínas nativas, o bien, incorporarlos mediante técnicas de ingeniería genética, tanto en las proteínas formadoras de partículas como en los antígenos. La característica relevante del esquema de conjugación química para presentación es que cada uno de sus componentes son sistemas modulares independientes que pueden diseñarse, obtenerse y evaluarse individualmente en diferentes sistemas de expresión, lo cual hace extensivo el uso de esta tecnología para el desarrollo de vacunas subunitarias que ayuden a la prevención de diferentes enfermedades. En la actualidad, la ingeniería genética ha permitido explorar nuevos sistemas de expresión para la producción de antígenos como proteínas subunitarias recombinantes de interés farmacéutico. Tal es el caso del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP) que genera grandes pérdidas al sector porcino mundial y es el segundo problema sanitario para los porcicultores en México. El VSRRP es un virus de ARN de cadena sencilla, polaridad positiva, perteneciente a la familia Arteriviridae y que ha sido reconocido como el agente causal de falla reproductiva en cerdas adultas y enfermedad respiratoria en lechones. Debido a su alta variabilidad genética y antigénica ha sido separado en dos genotipos, europeo y americano, lo que ha dificultado su control y erradicación por la vía de la vacunación convencional, que utiliza como inmunógenos el virus en estado atenuado o inactivo de cepas americanas o europeas, que si bien confieren una respuesta inmune, tienen como inconveniente conferir protección sólo contra cepas homólogas y no contra cepas heterólogas, lo que ha impulsado el desarrollo de propuestas para vacunas de nueva generación entre las que se encuentra el uso de proteínas recombinantes de los diferentes antígenos del VSRRP.

Los trabajos de investigación con fines farmacéuticos se han enfocado en la secuencia del ORF5 del virus, que codifica para la glicoproteína 5 (GP5) de envoltura que se ha identificado como la más inmunogénica entre los antígenos del virus y los anticuerpos que genera son los más importantes en el proceso de neutralización de éste. Su naturaleza neutralizante ha despertado el interés en la búsqueda de un mejor sistema de presentación de la proteína GP5 al sistema inmune, que resulte en la inducción de una mayor y rápida respuesta inmune humoral y celular. La presentación de GP5 como antígeno en la superficie de partículas virales mediante conjugación química es una alternativa que aún no ha sido explorada.

El planteamiento global del proyecto que dio origen a esta investigación, contempló la generación de dos módulos para el ensamblaje molecular de antígenos proteicos a adyuvantes particulados por conjugación química a través de residuos de lisinas y cisteínas. Actualmente, ya se cuenta con un modelo de la estructura de la proteína de la cápside del virus del jaspeado del tabaco (TEV) con cinco posibles residuos de lisina reactiva disponibles en superficie. Por lo que el presente trabajo se ha enfocado en el diseño y evaluación de plásmidos para la expresión del antígeno recombinante GP5 del VSRRP, etiquetado con una cisteína, en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Para ello, se planteó un diseño *in silico* de una región del ectodominio de GP5 expresado en *P. pastoris* bajo un promotor inducible, así como un diseño de la proteína GP5 madura (sin péptido señal) de la cepa vacunal expresada en *P. pastoris* bajo un promotor constitutivo y en *E. coli* bajo un sistema de expresión pET, con fines de purificación por afinidad para que, en estudios posteriores, se evalúe la disponibilidad de residuos de cisteína, así como su inmunogenicidad.

II. DEFINICIÓN DEL TEMA

Es posible expresar la proteína GP5 del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, adicionada con una cisteína para conjugación química a adyuvantes particulados, en dos modelos de expresión: uno procarionte (*Escherichia coli*) y otro eucarionte (*Pichia pastoris*).

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la infección con el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino es controlada con vacunas convencionales que contienen el virus atenuado (MLV) o muerto (KV) que proporcionan inmunidad contra cepas homólogas pero no contra cepas heterólogas, lo que ha impulsado el desarrollo de vacunas recombinantes subunitarias utilizando los hallazgos recientes en la biología molecular del virus. Las investigaciones de los diferentes antígenos del virión han demostrado que la proteína GP5 es la más inmunogénica y de mayor interés para la producción de anticuerpos neutralizantes. GP5 como subunidad antigénica requiere de la presencia de adyuvantes para mejorar el estímulo de la respuesta inmune en el organismo. Recientemente, el uso de partículas virales se ha considerado como una plataforma de exposición de antígenos que puede funcionar como un adyuvante particulado, haciendo uso de residuos de lisinas y cisteínas reactivas disponibles que permitan conjugar el antígeno a través de un puente químico. En esta estrategia, tanto el antígeno como el adyuvante se trabajan como sistemas modulares que pueden obtenerse de manera independiente en diferentes modelos de expresión. En el presente trabajo, se propuso diseñar y expresar una proteína recombinante GP5 adicionada con una cisteína para conjugación química en dos modelos de expresión, *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. El primero ya ha sido utilizado para la expresión de GP5 mientras que el segundo aún no.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión de la proteína GP5, modificada con cisteínas para conjugación química, del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino en dos modelos: procarionte y eucarionte.

Objetivos particulares

1. Modificar el gen *gp5* del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino con una etiqueta que contiene una cisteína y clonar en vectores para expresión en *E. coli* y *P. pastoris*.
2. Generar transformantes de *E. coli* y *P. pastoris* con el gen *gp5* modificado del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.
3. Analizar la expresión de la proteína recombinante GP5 modificada en *E. coli* y *P. pastoris*.
4. Obtener los antígenos recombinantes de GP5 purificados por cromatografía de afinidad.
5. Evaluar la disponibilidad de cisteínas en los antígenos modificados de la proteína GP5 para conjugación química.

V. FUNDAMENTACIÓN

V.1. Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

La enfermedad del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (SRRP) ha afectado al ganado porcino desde 1987 en los Estados Unidos de América (EUA) y en Europa a partir de 1990; desde entonces, se ha extendido rápidamente en la mayoría de los países productores de cerdo en el mundo (Bautista y col., 1993; Mardassi y col., 1994), siendo actualmente endémico en muchos países (Dea y col., 2000). Debido a esto, se encuentra inscrita en la lista de enfermedades notificables de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), capítulo 1.2, artículo 1.2.3 (OIE, 2012; Arias y col., 2003). En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) en el 2010 reportó que el SRRP es la segunda causa de mortalidad en cerdos después del Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y su presencia en granjas productoras de cerdos se encuentra distribuido ampliamente en casi todos los estados de la república (Fig. 1).

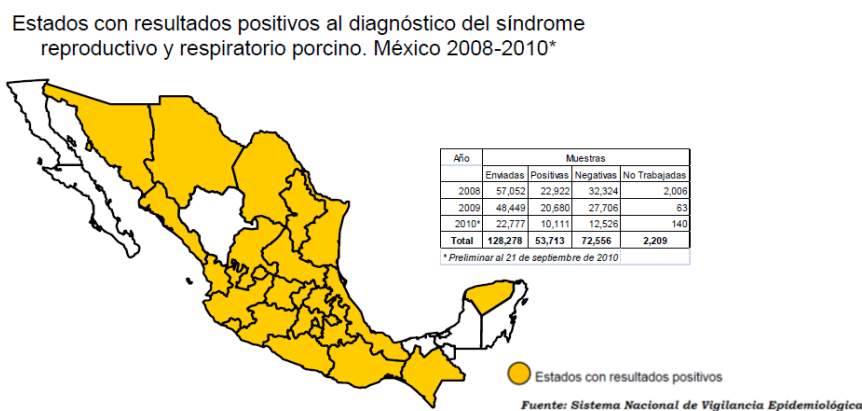


Figura 1. Distribución nacional con casos seropositivos al Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (SENASICA, 2010).

El Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP) es el agente causal de la enfermedad del SRRP. Se caracteriza principalmente por generar alteraciones reproductivas en cerdas gestantes, así como problemas respiratorios en lechones lactantes y posteriores al destete (Suarez, 1995; Arias y col., 2003; Chareerntantanakul y col., 2006). El

VSRRP penetra por vía oronasal, intramuscular, intraperitoneal, vaginal y transplacentaria (Dee y Molitor 1998; Arias y col., 2003), replicándose en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente, macrófagos alveolares y células dendríticas (Mardassi y col., 1994), para luego desencadenar una viremia prolongada a nivel sistémico, lo que conduce a las manifestaciones clínicas que originan las fallas reproductivas (abortos tardíos, muertos, lechones débiles y momificados) e inflamación pulmonar (Suarez, 1995; Dee y Molitor 1998; Dea y col., 2000). Asimismo, el virus es capaz de modular el sistema inmune porcino durante las primeras semanas postinfección (PI), (Mateu y Díaz., 2007; Campa y col., 2009), diseminarse en el organismo a través de un mecanismo dependiente de anticuerpos (Flores y col., 2009) e inhibir mecanismos de defensa innata para evitar una respuesta inflamatoria que desarrolle una respuesta adaptativa (Campa y col., 2009), lo que origina un retardo en la producción de anticuerpos neutralizantes (AN). Por esto, se han desarrollado técnicas de detección para el diagnóstico temprano de la enfermedad, donde se contemplan el estudio de signos clínicos del cerdo, la detección del ácido nucleico viral por PCR, técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-PRRS (IPMA, ELISA, IFD, etc.), así como aislamientos del virus en cultivos de macrófagos alveolares porcinos (MAP) o líneas celulares continuas (CL-2621 o MARC-145) (Bautista y col., 1993; Arias y col., 2003).

V.2 Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

V.2.1 Etiología del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.

El VSRRP pertenece a la familia Arteriviridae, género *Arterivirus*, orden *Nidovirales* (Mardassi y col., 1994; Dea y col., 2000; Arias y col., 2003). Una característica importante del este virus es su alta variabilidad genética y antigénica. En base a las diferencias genéticas encontradas en los aislados virales, el VSRRP se clasifica en dos genotipos: europeo (virus Lelystad) y americano (VR-2332). Estos genotipos presentan una similitud de nucleótidos de 55- 70% cuando se compara todo el genoma y se reporta una mayor diversidad genética entre los aislados americanos en comparación con los europeos. Esta alta variabilidad del VSRRP

complica el desarrollo de una respuesta inmune efectiva entre cepas heterólogas ante una reinfección. (Bautista y col., 1993; Flores y Hernández, 2010).

V.2.2 Organización del genoma y proteínas del VSRRP

Una imagen por microscopía electrónica muestra que la partícula del VSRRP es esférica, con una envoltura de 50-72nm de diámetro y una nucleocápside de forma icosaédrica con 25-30nm (Mardassi y col., 1994; Dea y col., 2000; Arias y col., 2003; Dokland, 2010). En la nucleocápside se engloba una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 15 kb (Dea y col., 2000). Su genoma es policistrónico, compuesto en el extremo 5' de una estructura cap-metilada (Kimman y col., 2009) y una región corta no traducida (UTR), seguida de nueve marcos de lectura abierta (ORF) llamados ORF 1a, ORF 1b, ORFs 2 al 7 y en el extremo 3' una región UTR seguida de una cola de poli A con un máximo de 20 adeninas (Suarez, 1995; Charentantanakul y col., 2006; Phani y col., 2010).

La síntesis de los ORFs se procesa a partir de una secuencia líder que contiene siete ARNm subgenómicos anidados en el extremo 3' terminal donde se superponen unos a otros en los extremos (Kimman y col., 2009; Dea y col., 2000). Conforme a datos de la secuencia, el ORF 1 subdividido en ORF 1a y ORF 1b representa casi el 75% del genoma viral y codifica para poliproteínas no estructurales con aparente actividad replicativa y de polimerasa; los ORFs del 2 al 4 (GP2, GP3 y GP4, respectivamente) codifican para glicoproteínas menores asociadas a membrana y los ORFs del 5 al 7 (GP5, M y N, respectivamente) codifican para tres proteínas estructurales. (Dea y col., 2000; Ostrowski M. y col., 2002).

La expresión de estos genes ha mostrado variabilidad entre las cepas de los genotipos LV y VR-2332 (Cuadro 1), identificando a los ORF3, ORF4 y ORF5 como los más variables, mientras que, los ORF2, ORF6 y ORF7 son los más conservados (Dokland, 2010; Flores y Hernández, 2010, Cruz y col., 2010).

Cuadro 1. Comparación de los ORFs entre los genotipos VR-2332 y LV.

ORF	Aminoácidos		pI		N-glicosilaciones	
	VR-2332	LV	VR-2332	LV	VR-2332	LV
2	256	249	11	10.2	2	2
3	254	265	8.1	9.4	7	7
4	178	183	7.9	6.1	4	4
5	200	201	8.3	8.2	3	2
6	174	173	11.3	11.9	1	2
7	123	128	13.8	11.2	1	1

Murtaugh y col., 1995

En la Figura 2 se esquematiza la organización de los genes en el genoma del VSRRP y la subsecuente localización de cada uno de sus componentes en el virus. La función de las proteínas asociadas a membrana se describe en el Cuadro 2.

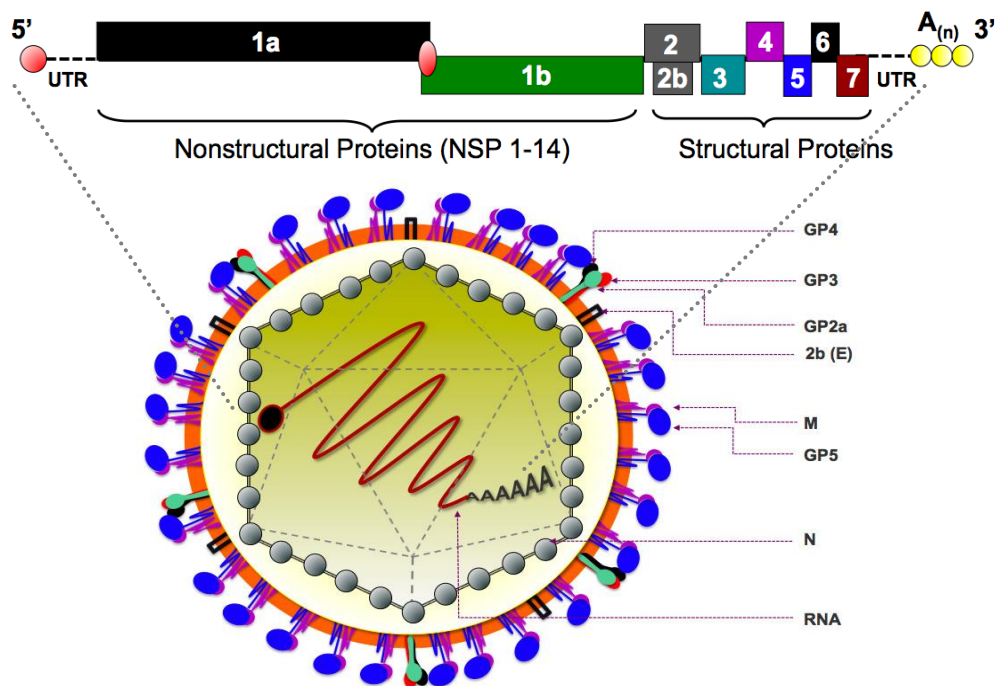


Figura 2. Representación esquemática de una partícula del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. La partícula del virión requiere de homodímeros de la nucleocápside (N) que encapsulen el ARNm y la envoltura se conforma de complejos formados entre GP2-GP3-GP4 que interactúan con el complejo formado por GP5-M (Dokland, 2010).

Cuadro 2. Las proteínas de membrana del VSRRP.

Proteína	Características	Función
Glicoproteína 2 (30KDa)	Es expresada a través de un ARN bicistrónico (ORF2a y ORF2b).	Esencial en la replicación del virus ^b . Se ha encontrado una pequeña participación en la fusión y/o internalización viral ^a .
Glicoproteína 3 (42-45KDa)	Es la segunda proteína más heterogénea del virus. Tiene una débil asociación a la membrana viral y es capaz de ser secretada extracelularmente ^b .	La forma secretada se asocia a cerdos infectados con alto grado de inmunogenicidad, pero no se relaciona con el inicio de la infección viral ^b .
Glicoproteína 4 (29-35KDa)	Proteína de menor inmunogenicidad con epítopes neutralizantes no conservados.	Interactúa con el receptor del macrófago CD163 ^c . Induce la producción de anticuerpos neutralizantes.
Glicoproteína 5 (25-26KDa)	Es la glicoproteína más abundante en la superficie del virion y la más variable en el genoma.	Induce apoptosis y la internalización del virus a la célula. Además, es la más inmunogénica en la producción de anticuerpos neutralizantes ^b .
Matriz (18-19KDa)	Proteína no glicosilada y más conservada del virus ^c .	Involucrada en el inicio de ensamblaje del virón. Forma un heterodímero con la proteína GP5 ^a .
Nucleocápside (14-15KDa)	Es la más abundante (de 20-40% del virion) ^a . Da la forma icosaédrica a la cápside del virus ^b . Forma homodímeros a través de enlaces disulfuro ^c .	Interactúa con el ARN del genoma ^b . En células infectadas, regula la transcripción ^a al unirse al ARN ribosomal ^c . Es la más inmunogénica en la producción de anticuerpos no-neutralizantes ^{b,c} .

^a Dokland, 2010

^b Dea y col., 2000

^c Phani y col., 2010

V.2.3 Respuesta inmune frente al VSRRP en la producción de anticuerpos neutralizantes

La característica del VSRRP de ser multigénico hace que su virulencia resida tanto en proteínas estructurales como no-estructurales (Kimman y col., 2009). La respuesta inmune durante la infección del virus induce la producción de anticuerpos neutralizantes (AN) y no-neutralizantes (ANN), donde la respuesta humoral mediada por células T se dirige contra GP2a, GP3, GP4, GP5, M y N (Bautista y col, 1999, Kimman y col., 2009). Los primeros y más abundantes anticuerpos circulantes contra el VSRRP aparecen a los 5 días post-infección (PI) contra la proteína N y a las dos semanas PI contra la proteína M, pero estos anticuerpos no contienen la viremia al ser de naturaleza no-neutralizante (Dea y col., 2000; Kimman y col., 2009).

Los epítopes para la producción de AN están presentes en GP3, GP4 y GP5, y son detectados hasta cuatro semanas PI (Ansari y col., 2006; Kimman y col., 2009; Plagemann, 2006), siendo los AN contra la proteína GP5 los más importantes en la neutralización del virus (Ostrowski y col., 2002; Ansari y col., 2006; Mateu y Díaz., 2007).

Se han asociado diferentes mecanismos de evasión del virus para explicar esta respuesta tardía en la producción de AN: 1) El virus suprime la respuesta inmune al alterar la producción de citocinas proinflamatorias (IFN- α , IL-12, IL-10, TNF- α) en macrófagos y células dendríticas, lo que aumenta la supervivencia del virus en animales infectados (Bautista y col, 1999; Mateu y Díaz., 2007; Kimman y col., 2009; Phani y col., 2009); 2) El virus modifica la expresión de moléculas involucradas en la presentación del antígeno (MHC-I/-II) (Mateu y Díaz., 2007), lo que disminuye la presentación a células T (Flores-Mendoza y col., 2008; Kimman 2009); 3) Existe un retraso en el reconocimiento de epítopes neutralizantes debido a que el virus escapa a los AN anti-VSRRP internalizándose en la célula vía endocitosis por el receptor Fc de anticuerpos a través de las proteínas N y GP5 del virus (Dokland, 2010); 4) La presencia de epítopes señuelos inmunodominantes adyacentes a epítopes neutralizantes en GP5 provocan una respuesta temprana y robusta de anticuerpos no-neutralizantes, enmascarando el reconocimiento de epítopes neutralizantes (Bautista y col., 1993; Ostrowski y col., 2002; Fang y col., 2006); 5) La presencia de *N*-glicanos de las glicoproteínas actúan

como escudo de manera que los anticuerpos no se unen a los epítopes neutralizantes (Ansari y col., 2006; Phani y col., 2010). Sin embargo, la viremia es controlada al producirse AN anti-GP5, siendo éstos lo más efectivos contra el VSRRP; lo que sugiere que esta proteína es la principal determinante de la protección inmunitaria en el cerdo (Dokland, 2010).

V.3 La glicoproteína 5 como modelo antigénico

V.3.1 Topología de GP5

La glicoproteína 5 del VSRRP, de aproximadamente 26KDa (200 aminoácidos), es la proteína de mayor interés inmunogénico en la producción de AN. Se encuentra asociada a la membrana en forma de heterodímeros con la proteína Matriz a través de un enlace disulfuro entre la Cys 9 de la proteína M y la Cys 48 de GP5 en una región corta del ectodominio (Dea y col., 2000; Ansari y col., 2006; Kimman y col., 2009; Dokland, 2010).

En la estructura de GP5, se tiene un péptido señal *N*-terminal putativo seguido de dos dominios de importancia antigénica, uno localizado dentro del ectodominio *N*-terminal (27-41 aminoácidos) y el otro en el dominio *C*-terminal (130 a 200 aminoácidos) (Dea y col., 2000). En la Figura 3 se esquematiza la proteína GP5 en la membrana del virión, donde se ha identificado en la región del ectodominio un epítipo no-neutralizante (27-31 aminoácidos) seguido de un epítipo neutralizante (37-41 aminoácidos) (Ostrowski y col., 2002) flanqueados por sitios de *N*-glicosilación de alta manosa (Plagemann, 2006; Ansari y col., 2006).

Se ha propuesto que la región hipervariable corresponde del aminoácido 27 al 41 más dos regiones expuestas (57-70 y 121-130 aminoácidos), seguida de tres regiones hidrofóbicas conservadas que atraviesan la membrana del virus y que terminan con un dominio citoplasmático (42-56, 71-120 y 131-200 aminoácidos) (Plagemann, 2006; Kimman y col., 2009; Dokland, 2010).

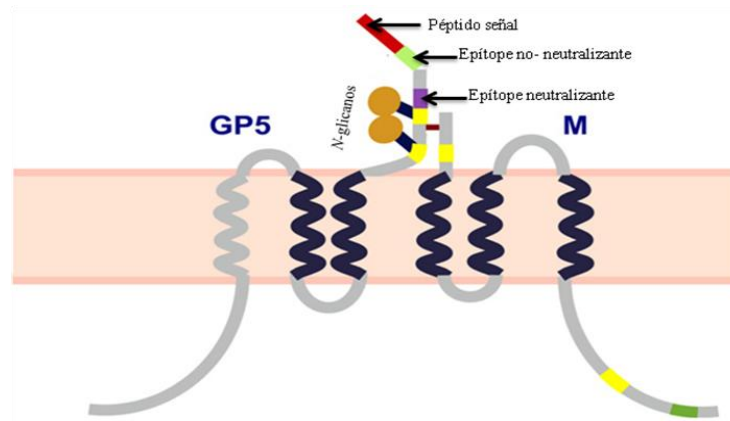


Figura 3. Topología de la proteína GP5 en el VSRRP (Cruz y col., 2010)

V.3.2 La naturaleza neutralizante de GP5

La capacidad de la proteína GP5 del VSRRP de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes radica en epítipes que pueden ser reconocidos en el ectodominio de la proteína (Ostrowski y col., 2002; Mateu y Díaz., 2007). Ostrowski y col. en el 2002 identificaron dos epítipes lineales (Fig. 3), que se localizan en la región expuesta (ectodominio) *N*-terminal de la proteína madura, involucrados en montar una respuesta humoral en el cerdo de manera independiente ya que pueden ser reconocidos simultáneamente por diferentes poblaciones de anticuerpos durante toda la respuesta inmune (Ostrowski y col., 2002; López y Osorio., 2004).

Durante la viremia, los primeros anticuerpos que reconocen el ectodominio de GP5 se dirigen contra un sitio altamente inmunogénico, denominado epítipo A, que corresponde del aminoácido 27 al 30 (VLVN) de la proteína. Este epítipo se caracteriza por ser inmunodominante, hipervariable entre los aislados del virus e inducir una producción temprana pero fuerte de anticuerpos no-neutralizantes, por lo que se ha propuesto que es un epítipo que funciona como señuelo del virus, distraendo momentáneamente el reconocimiento del principal epítipo neutralizante (Ostrowski y col., 2002; López y Osorio., 2004; Mateu y Díaz., 2007; Flores y Hernández, 2010).

El epítoto principal que le confiere la naturaleza neutralizante a la proteína GP5, se localiza en tan solo siete residuos del epítoto A, entre los aminoácidos 37 al 44 (HFQSIYN) y se denomina epítoto B. Diferentes estudios han demostrado que este epítoto se encuentra conservado entre los diferentes aislados del virus y se caracteriza por ser reconocido 28 días PI e inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que permiten contener la viremia contra VSRRP (Ostrowski y col., 2002; López y Osorio., 2004; Mateu y Díaz., 2007).

Por otra parte, existe una correlación entre el incremento en los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-epítoto B y un decremento en los niveles de anticuerpos anti-epítoto A (Ostrowski, 2002), lo que sugiere que la proximidad del epítoto A al epítoto B suprime el reconocimiento de éste último (Mateu y Díaz., 2007), retrasando la producción de anticuerpos neutralizantes anti-VSRRP; sin embargo, la respuesta neutralizante contra el epítoto B no sólo se ve afectada por la cercanía del epítoto A, sino también por ser una región altamente glicosilada (Cuadro 1), donde dos a tres sitios de *N*-glicosilación flanquean al epítoto B (Ostrowski y col., 2002; Mateu y Díaz., 2007).

Independientemente de los mecanismos de evasión que tiene el virus para no ser neutralizado, la respuesta inmune contra el epítoto B, aún cuando sea tardía y/o débil, confiere un efecto protector ante una reinfección con el VSRRP mediante una respuesta rápida y fuerte de anticuerpos neutralizantes (López y Osorio., 2004). En consecuencia, se ha planteado que la proteína GP5 es el antígeno del VSRRP de mayor interés vacunal.

V.3.3 GP5 como candidata a subunidad recombinante

V.3.3.1 Alternativas para vacunas de nueva generación

En la actualidad se cuenta con métodos comerciales de vacunación contra el VSRRP que utilizan como inmunógenos el virus en estado atenuado o inactivo de cepas americanas (VR-2332) o europeas (LV), que si bien confieren una respuesta inmune celular y/o humoral en el cerdo, tienen como inconveniente sólo conferir protección contra cepas homólogas y no contra cepas heterólogas. Por esta razón, se ha inclinado la investigación en buscar el aumento en la respuesta celular, la producción de anticuerpos neutralizantes y fomentar una

respuesta entre cepas heterólogas. Una de las estrategias consiste en probar diferentes adyuvantes para mejorar la respuesta celular como citocinas recombinantes (IL-12 o IFN- α) (Flores y Hernández, 2010), usar agentes que inducen una respuesta inflamatoria en el cerdo, como la toxina del cólera probada por Foss y col. en el 2002 o utilizar oligodeoxinucleótidos como inmunoestimuladores (Linghua y col., 2006), con resultados aún inconsistentes. Otras alternativas consisten en desarrollar vacunas de ADN, utilizar virus como vectores o el uso de proteínas recombinantes de los diferentes antígenos del VSRRP (Chareerntananakul, 2009), como posibles propuestas para vacunas de nueva generación.

Para el desarrollo de vacunas de ADN, prácticamente se han evaluado todos los ORFs del VSRRP en distintos plásmidos. No obstante, diferentes autores reportan que ante la inoculación con estos ORFs solo se ha encontrado una respuesta de anticuerpos contra la proteína N (ORF7) (Flores y Hernández, 2010).

También se ha evaluado el uso de virus como vectores para expresar diferentes inmunógenos del VSRRP en cerdos. Tal es el caso del trabajo de Tian y col. en el 2006 con el virus de la pseudorrabia (PRV, por sus siglas en inglés, causante de la enfermedad de Aujeszky), al cual se insertó la secuencia de GP5 y aunque mostró una protección en los daños en pulmón de cerdos infectados con el VSRRP no se detectaron niveles de AN, a diferencia de lo obtenido por Wang y col. en 2007, los cuales utilizaron un pseudotipo de baculovirus que coexpresó el heterodímero GP5-M; la evaluación de la inmunogenicidad en ratones mostró altos títulos de AN anti-GP5 pero no de INF- γ específico contra VSRRP. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Zheng y col. en 2007, que trabajaron con el virus Ankara (rMVA, virus recombinante de viruela modificado) que contenía el heterodímero GP5-M; de igual manera, se obtuvo en ratones un aumento de AN anti-GP5 pero hasta la séptima semana PI, y a diferencia de Wang y col. Se obtuvo una ligera pero tardía producción de INF- γ a los 30 días PI. El modelo del virus de la viruela aviar (FPV, por sus siglas en inglés) también fue trabajado por Shen y col. en 2007, conteniendo el heterodímero GP3-GP5 más IL-18 como adyuvante en el plásmido y se observó en cerdos una reducción de la carga viral en pulmones y ganglios, los títulos de AN fueron aumentando conforme a los días, hubo un aumento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ más un aumento de INF- γ . Finalmente, en cuanto a adenovirus, que

son sistemas de expresión ampliamente usados en el desarrollo de vacunas (Jinshun y col., 2010), Jiang y col. en 2008 usaron adenovirus recombinantes como vectores para examinar la inmunogenicidad de GP3, GP4 y GP5 en ratones, demostrando que la expresión conjunta de GP3-GP5, GP4-GP5 o GP3-GP4-GP5 fusionadas es más inmunogénica que su expresión de forma individual; incluso, observaron que la respuesta de linfocitos citotóxicos (CTL) es mayor cuando están fusionadas GP3-GP5 o GP3-GP4-GP5. Asimismo, Jiang y col. en 2006 evaluaron la respuesta inmune con adenovirus recombinantes que expresaron GP5, M o GP5-M, observando que la expresión de GP5-M induce un título mayor de AN.

En las alternativas de uso de proteínas recombinantes se han utilizado bacterias como *Salmonella typhimurium* y el bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* como vectores para la expresión de GP5 y la proteína M del VSRRP. Bastos y col. en el 2003 expresaron las proteínas GP5 troncada (carece de los primeros 30 residuos) y M en la membrana de *Mycobacterium*, detectaron anticuerpos anti-GP5 y anti-M a los 30 días posteriores a la inoculación en cerdos y demostraron una protección parcial contra el virus. Además, Jiang y col. en el 2004 utilizaron la cepa atenuada de *S. typhimurium* para evaluar la respuesta inmune a GP5 vía oral, utilizando para ello un plásmido que codificaba a GP5 (pcDNA3-GP5) contenido en *S. typhimurium*; sin embargo, observaron que utilizar *S. typhimurium* como vector de expresión no marcó ninguna diferencia respecto a la utilización de ADN del ORF5 desnudo, resultando en ambos casos en una respuesta humoral y celular prácticamente nula.

V.3.3.2 Los avances en el estudio de GP5

En modelos de expresión virales como los adenovirus, la respuesta inmunológica en la producción de AN ha sido débil y tardía (Jiang y col., 2002), mientras que la reportada en co-expresión con la proteína M induce un título mayor de AN pero aún en periodos largos (Jiang y col., 2006; Zheng y col., 2007); la forma heterodimérica de GP5-M pudiera no exponer el epítotope B de GP5 responsable de inducir la producción de AN.

Algunos trabajos han utilizado líneas celulares como BHK-21 y MARC-145 para expresar la proteína GP5 nativa o sintética, realizar análisis de inmunogenicidad y

antigenicidad de esta proteína, así como medir los niveles de producción de AN (Ansari y col. en 2006; Bin Li y col. en 2009; Ren y col., 2011). A su vez, el sistema de expresión bacteriano más ampliamente utilizado en la producción de la proteína GP5 nativa o sintética ha sido *Escherichia coli*, aunque también se cuenta con trabajos como los de Chia y col. en 2010 y 2011 donde se evalúa la inmunogenicidad de la proteína GP5 expresada en plantas de tabaco que son suministradas vía oral a los cerdos.

Algunos trabajos se han enfocado en mejorar el procesamiento y presentación de la proteína GP5 en la célula. Hou y col. en 2008 determinaron la respuesta inmune de cerdos vacunados con un plásmido que co-expresaba GP5 y una ubiquitina porcina y la respuesta de anticuerpos fue nula por la rápida degradación intracelular de la proteína ubiquitina-GP5, sin dejar nivel de interacción con linfocitos B; por su parte, Pyo y col. en 2010 sintetizaron péptidos de diferentes dominios de la proteína GP5 con una cisteína adicional en el *N*-terminal para conjugarla a una proteína inmunogénica, hemocianina de lapa californiana KLH (por sus siglas en inglés); al igual, se ha propuesto que la inserción de una secuencia PADRE (Pan DR helper T cell epitope) entre los epítopes A y B de una proteína sintética de GP5 aumenta la producción de AN en un corto periodo en ratones (Fang y col. en 2006; Wang y col. 2007; Bin Li y col. en 2009; Flores y Hernández, 2010). Sin embargo, aún se continúan los avances en el mejoramiento de la exposición de la proteína GP5 de forma individual al sistema inmune.

V.4 Plataforma de presentación de antígenos.

V.4.1 Partículas virales como adyuvantes proteicos

Existen subunidades de proteínas, como GP5, que por sí solas en estado soluble son pobremente inmunogénicas a pesar de su naturaleza nativa y requieren de adyuvantes para mejorar la estimulación en el sistema inmune (Jegerlehner y col., 2002; Ludwing y Wagner, 2007); desafortunadamente, muchos adyuvantes causan efectos tóxicos o de inflamación (Lechner y col., 2002). Una alternativa que se ha considerado en los últimos años, es el uso de virus o partículas tipo virus como plataformas proteicas que exponen en la superficie de su envoltura los antígenos al sistema inmune (Schöll y col., 2005).

Las partículas tipo virus (PTV's), a diferencia de los virus, se caracterizan por ser complejos de proteínas virales, sólomente estructurales, que conservan la habilidad de auto-ensamblarse sin requerir la presencia del genoma viral (Peralta y col., 2009); además, su estructura semeja la de un virus inmaduro en su cápside o envoltura, pero carece de material replicativo como ADN o ARN, lo que significa que no son infecciosas (Roy y Noad, 2008). Tanto las PTV's como las partículas virales sirven como plataformas de exposición de antígenos y permiten presentarlos tanto en su forma nativa, con un orden y orientación para que sean ampliamente reconocidos por los receptores de las células B (BCR, por sus siglas en inglés) (Lechner y col., 2002; Ludwing y Wagner, 2007).

Ambas estructuras virales son de naturaleza proteica, ordenada y altamente repetitiva que muestran una alta densidad de epítopes expuestos (Peralta y col., 2009). Tales características hacen posible que estas estructuras virales sean fácilmente capturadas por células presentadoras de antígenos (CPA) y que haya un aumento en la estimulación de la respuesta por el complejo de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, además de activar la respuesta de la inmunidad innata a través del reconocimiento y estimulación de las células B y la proliferación de células CD4⁺ y CD8⁺ (Schöll y col., 2005; Ludwing y Wagner, 2007; Roy y Noad, 2008); por último, estas partículas son capaces de romper la tolerancia causada por la fuerte activación de células B (Jegerlehner y col., 2002; Lechner y col., 2002).

V.4.2 Estrategias para la presentación de antígenos

Actualmente, existen dos estrategias para la presentación de antígenos en la superficie de las partículas virales: mediante fusiones traduccionales o a través de la conjugación química. En el primer caso, se incorporan, mediante manipulación del ADN, secuencias del antígeno dentro de la secuencia de la proteína que forma partículas, en su extremo amino, carboxilo o en las regiones expuestas, de manera que, cada subunidad presente en la partícula está provista con una parte del antígeno (Grasso y Santi, 2010). La desventaja de las fusiones traduccionales es el tamaño de las secuencias aminoacídicas que se pueden incorporar sin comprometer la capacidad de las proteínas de auto-ensamblarse y formar la partícula. Con excepción de la proteína verde fluorescente (Kratz y col., 1999), por lo general, las secuencias no deben

exceder de 20 aminoácidos (Jegerlehner y col., 2002). Debido a ello, esta estrategia impide presentar proteínas más complejas que en ocasiones están involucradas en la inducción de una respuesta inmune adecuada (Werner y col., 2006).

Por el contrario, en la estrategia de conjugación química, no existe limitación aparente en cuanto al tamaño del antígeno que se desea presentar. La conjugación química consiste en acoplar químicamente las partículas a los antígenos a través de los grupos reactivos de lisinas y cisteínas presentes en las proteínas formadoras de partículas y los antígenos (Fig. 4) (Jegerlehner y col., 2002). Se pueden utilizar los grupos reactivos ya presentes en las proteínas, o bien, incorporarlos mediante técnicas de ingeniería genética para lograr una conjugación más eficiente. Por lo tanto, la conjugación química partícula-antígeno permite la presentación de una cantidad mayor de determinantes antigénicos de una proteína al sistema inmune, con lo que, probablemente, se aumente la respuesta inmune y se mejoren los niveles de protección en el individuo vacunado (Lechner y col., 2002; Smith y col., 2006).

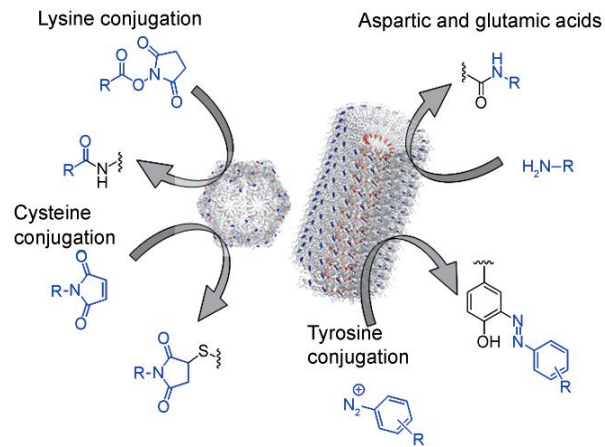


Figura 4. Grupos reactivos para conjugación de proteínas (Lee y col., 2009).

V.4.3 Conjugación química antígeno-adyuvante

Muchos de los esquemas de conjugación proteína-proteína subyacen en el estudio de la química fundamental de los aminoácidos como lisina, ácido glutámico o ácido aspártico, cisteína y los menos usados tirosina y residuos con anillos fenólicos, tal como se muestra en la

Figura 4 (Lee y col., 2009), así como en el estudio de sus interacciones químicas en un estado reactivo que permitan que la reacción entre dos moléculas de la misma naturaleza se lleve a cabo de manera controlada (Díaz y Finn. 2007; Grasso y Santi, 2010). Dichas reacciones se realizan haciendo uso de los residuos aminoacídicos reactivos naturalmente expuestos o incorporados mediante ingeniería genética para lograr una conjugación más eficiente (Grasso y Santi, 2010).

En la reacción de conjugación química se utiliza comúnmente el grupo amino funcional de los residuos de lisina y cisteína para conjugar ambas proteínas (Lechner y col., 2002). Esta unión se consigue a través de un reactivo que funciona como entrecruzador o puente químico, por ejemplo, el entrecruzador Sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester) usado para unir covalentemente haptenos a proteínas acarreadoras. Este puente es de tipo heterobifuncional, ya que en cada uno de sus extremos tiene un grupo químicamente afín con la lisina o cisteína; por un lado, se encuentra un grupo *N*-hidroxisulfosuccinamida- ester que reacciona con el grupo amino de la lisina y por el otro un grupo maleimida (o en su caso bromoacetamida) que reacciona con el grupo tiol de la cisteína. Se ha propuesto que se requieren varios sitios de unión de lisinas y un solo residuo de cisteína para que se lleve a cabo la conjugación, en tanto que, el entrecruzador asegura que las proteínas se encuentren en su adecuada orientación. (Lechner y col., 2002; Lee y col., 2009; Grasso y Santi, 2010).

Actualmente, se cuenta con un modelo *in silico* de la estructura de la proteína de la cápside del virus del jaspeado del tabaco (TEV) con cinco posibles residuos de lisina reactiva disponibles en la superficie (Cabrera, 2012) para que a través de la estrategia de conjugación química se le acople, al menos a una lisina, una proteína GP5 (antígeno) con cisteína reactiva, tal como se muestra en la Fig. 5. La mayor ventaja que ofrece la conjugación química es que cada uno de sus conjugados es un sistema modular independiente que puede trabajarse y obtenerse individualmente en sistemas de expresión completamente diferentes (Lechner y col., 2002).

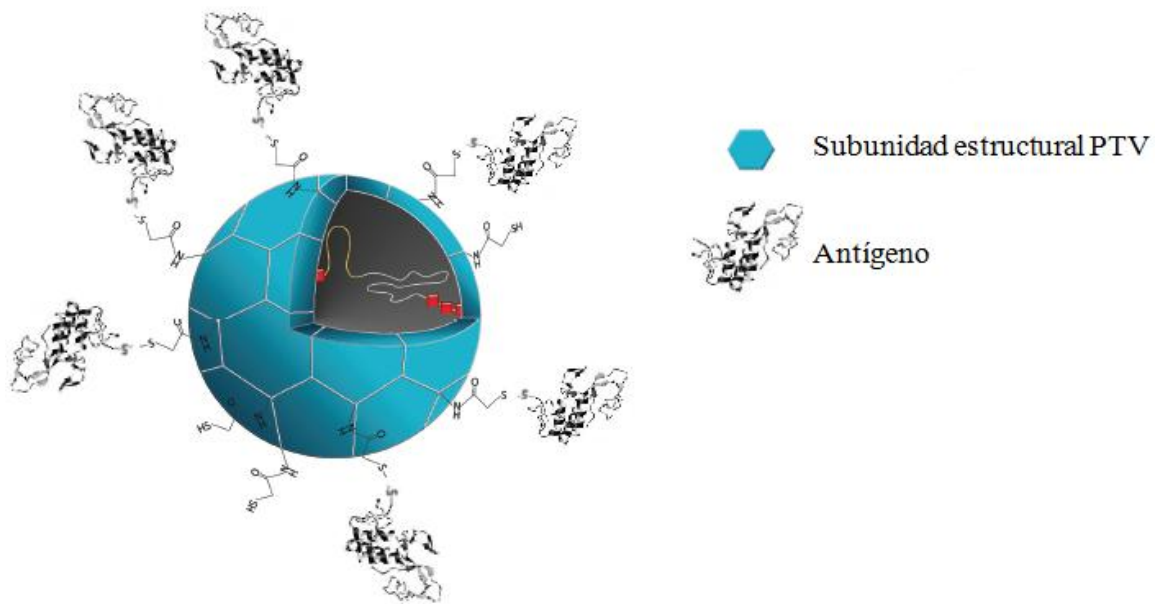
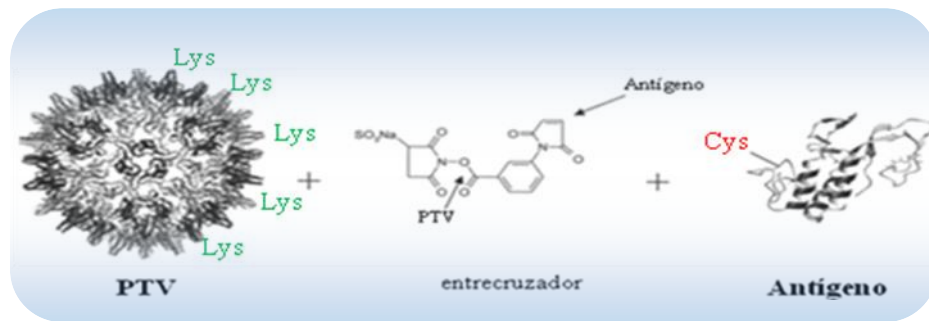


Figura 5. Representación esquemática de una conjugación química antígeno-partícula viral (Lechner y col., 2002; Grasso y Santi, 2010)

V.5 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

V.5.1 Selección de un sistema de expresión.

La expresión de genes heterólogos se puede efectuar en sistemas procarióticos o eucarióticos (Yin y col., 2007). En la industria farmacéutica, suelen emplearse como hospederos del ADN recombinante (ADNr) a la bacteria *Escherichia coli*, la levadura

Sacharomices cerevisiae y células de mamíferos, como las líneas celulares CHO y BHK (Drago y Sainz, 2006). Las técnicas de ingeniería genética y la selección de un sistema de expresión determinan en gran parte la característica de la proteína a sintetizar (Aliahmadi y col., 2006). Existen diversos factores que deben considerarse en la estrategia de selección del sistema hospedero: el método de transformación con el ADNr (diseño de vectores), el plegamiento correcto de la proteína, el requerimiento de modificaciones postraduccionales, el proceso de purificación, rendimiento y escalamiento que mantenga la actividad biológica de la proteína recombinante intacta y funcional (Aliahmadi y col., 2006; Serrano y Sainz, 2006). En el Cuadro 3 se resumen las características de los modelos más utilizados en la expresión de proteínas recombinantes (Greene, 2004).

Cuadro 3. Capacidades de algunas células hospederas como sistemas de expresión

Célula hospedera	Crecimiento eficiente	Expresión eficiente	Procesamiento proteolítico	Fosforilación	Glicosilación	Modificación de aminoácidos.
Bacteria	Muy alto	Muy alto	No	Posible	No	No
Levadura / Hongo	Alto	Moderado - Alto	Un poco	Un poco	Sí	Un poco
Insecto	Moderado	Moderado	Un poco	Un poco	Moderado	Un poco
Plantas	Alto	Alto	Moderado	Un poco	Moderado	Un poco
Células de plantas	Moderado	Alto	Moderado	Un poco	Moderado	Un poco
Animales	Moderado	Moderado	Alto	Alto	Alto	Moderado
Células animales	Alto	Bajo	Alto	Alto	Alto	Completo
Mamíferos	Bajo	Bajo	Sí	Completo	Completo	Completo

V.5.2 Sistema procariótico: *Escherichia coli*

Esta bacteria ha sido el huésped procarionte más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes. Las razones por las que *E. coli* ha sido considerado como el modelo de

expresión por excelencia, se deben a que su genética molecular, fisiología y sistema de expresión han sido ampliamente caracterizados. Además, presenta grandes ventajas, entre las que destacan la alta velocidad de crecimiento y duplicación (Yin 2007), así como la facilidad de obtener cultivos con una alta densidad celular, en tiempos cortos y a bajos costos de producción (Córdoba, 2003). Su limitante principal está relacionada con su imposibilidad, como organismo procarionte, de realizar modificaciones postraduccionales (N- y O-glicosilaciones, fosforilaciones, formación de puentes disulfuro, entre otras) que son necesarias para un adecuado plegamiento de algunas proteínas que les permita adquirir así la conformación necesaria para mantener su actividad, estructura y estabilidad (Drago y Sainz, 2005).

La expresión de proteínas recombinantes mediante este sistema requiere de vectores específicos (plásmidos), de los cuales existe para *E. coli* una gran variedad con una gran diversidad genética que facilitan la localización y purificación de la proteína heteróloga. En términos generales, los vectores de expresión contienen: el gen que codifica para la proteína de interés, un origen de replicación, un marcador de selección que confiera resistencia a un antibiótico, un promotor que regula la transcripción del gen exógeno y un terminador de la transcripción (Córdoba y col., 2003).

V.5.2.1 Expresión basada en promotores transcripcionales

Para la expresión de proteínas heterólogas en este sistema, *E. coli* requiere que el vector presente un promotor transcripcional fuerte e inducible para un control más efectivo de la expresión del gen. El promotor transcripcional más utilizado es el operón *lac* que consta de tres genes *lacZ* (β -galactosidasa), *lacY* (permeasa) y *lacA* (transacetilasa) que le permiten a la bacteria metabolizar la lactosa. Cuando las células crecen en un medio mínimo en presencia de glucosa, la transcripción se bloquea por el represor *lac* (producto del gen *lacI*) cuando éste se une a un sitio único corriente arriba del gen *lacZ* y evita que la ARN polimerasa transcriba los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, necesarios para el crecimiento en presencia de lactosa (Hanning y Makrides, 1998). Este mecanismo de regulación se emplea en la expresión de proteínas recombinantes, donde se utilizan inductores químicos o térmicos para regular la expresión,

siendo el más común el Isopropil- β -D tiogalactopiranosido (IPTG) que interacciona con el represor LacI evitando que se inhiba la transcripción de genes que se encuentran bajo el control de este promotor (Moreno, 2010).

Otro sistema ampliamente usado para expresar proteínas recombinantes se basa en el promotor T7, denominado sistema pET (Yin 2007). El sistema pET es una familia de vectores derivados del plásmido pBR322, que poseen una secuencia consenso con alta afinidad a la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y muy baja afinidad a la ARN polimerasa de *E. coli*, por lo que el gen de interés está clonado después de esta región promotora. Este sistema pET, cuando se introduce a una cepa como BL21, se tiene un mejor control sobre la expresión de la proteína de interés debido a que la proteína se induce solamente cuando se añade un inductor del operón *lac*, como el IPTG (Badillo y col., 2009).

También existen sistemas de expresión de *E. coli* basados en otros promotores, como el promotor Trc, que es un híbrido entre los promotores de los operones de la lactosa y del triptófano y el sistema de expresión basado en el promotor Tac, que es un híbrido entre los promotores de los operones de la lactosa y el promotor T5. En el Cuadro 4 se resumen los sistemas de expresión comerciales comúnmente utilizados para *E. coli*.

Cuadro 4. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes para *E. coli*

Vector de expresión	Promotor de transcripción	Origen de replicación.	Cepa (<i>E. coli</i>)
pET	T7	pBR322	BL21(DE3)
pRSET	T7	ColE ₁	BL21(DE3)
pGEX	tac	pBR322	BL21
pBAD	araBAD	pUC	TOP10
pTrc	Trc/lac	pUC	BL21
pQE	T5/lac	ColE ₁	M15[pREP ₄]

Santos-Etxepare, 2010.

Otro factor fundamental que se debe tener en cuenta para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es la selección del huésped. La cepa de *E. coli* que se utiliza

generalmente en estos protocolo es la cepa BL21(DE3), la cual se caracteriza por alcanzar una densidad óptica alta, no es patogénica y es deficiente en la expresión de ompT y Lon, dos proteasas extracelular e intracelular, respectivamente, que pueden degradar la proteína de interés. Adicionalmente, esta cepa presenta la secuencia que codifica la ARN polimerasa T7 que depende del promotor *lacUV5* y la expresión del represor LacI; por esta razón, los vectores de expresión utilizados con esta cepa deben presentar el promotor con la secuencia de reconocimiento para la ARN polimerasa, como en los sistemas pET (Santos-Etxepare, 2010.)

Algunos vectores generan la proteína recombinante en forma de fusión o de proteínas ligadas a péptidos (His6, GST y Trx) de características conocidas, que proporcionan un marcador de reconocimiento, que simplifica el proceso de purificación y el re-plegamiento de la proteína desnaturalizada mediante cromatografía de afinidad (Hanning y Makrides, 1998).

V.5.2.2 Formas de expresión de proteínas heterólogas

En general, hay tres formas de expresar una proteína exógena en *E. coli* (Yin, 2007):

a) Proteínas fusionadas al gen de interés: Son secuencias que codifican para un epítope que es fusionado a la proteína exógena, con fines de facilitar el aumento en la producción, mejorar la purificación y utilizarse como blanco de detección por anticuerpos (Hanning y Makrides, 1998). Dentro de las ventajas que presentan las proteínas fusionadas se encuentran la de prevenir la formación de cuerpos de inclusión, favorecer un mejor plegamiento, tener una proteólisis limitada y un esquema de purificación basado en afinidad. Algunos de los péptidos más empleados en este sistema son: His6X, GST, GFP, FLAG, Trx, o en co-expresión con chaperonas (Hanning y Makrides, 1998; Yin, 2007).

b) Periplasma o medio extracelular: Para que una proteína recombinante se dirija al espacio periplásmico debe contener una secuencia señal (Hanning y Makrides, 1998). Las proteínas secretadas pueden acumularse tanto en el periplasma como en el medio extracelular, este proceso puede reducir el potencial de degradación por proteasas intracelulares, contribuye a la correcta formación de estructuras y simplifica la purificación de la proteína recombinante debido al contenido menor de proteínas contaminantes. Además, el ambiente oxidativo del

periplasma facilita el plegamiento propio de la proteína y la formación de puentes disulfuro (Depuydt y col., 2009). Si la expresión de proteínas recombinantes se desea dirigir al medio extracelular se deben emplear cepas de *E. coli* que carezcan de pared bacteriana o bacterias Gram – positivas; además, este mecanismo permite mantener la proteína recombinante en estado soluble; sin embargo, su concentración en el medio puede verse afectada ya sea porque la concentración excretada es muy baja o no se excreta, se aumenta la lisis celular o la proteína recombinante que se obtiene se encuentra muy diluida (Moreno, 2010).

c) Cuerpos de inclusión: Cuando la proteína recombinante expresada está destinada al citoplasma y no se mantiene soluble, frecuentemente se da la formación de cuerpos de inclusión, los cuales contienen la proteína recombinante con plegamientos intermedios y no nativos o desnaturalizada (Carrio y Villaverde, 2001). Cabe mencionar que la expresión de proteínas en cuerpos de inclusión tiene una serie de ventajas, como la acumulación en el citoplasma con una alta concentración (aproximadamente el 25% de la proteína total) (Singh y Panda, 2005), su purificación y concentración por simple centrifugación, su falta de actividad biológica, facilitando la producción de proteínas que pueden ser tóxicas para las bacterias y, por último, la resistencia a proteólisis. Sin embargo, para obtener la proteína activa se requieren procesos adicionales de solubilización y replegamiento que no garantizan el 100 % de eficiencia. Otro problema que debe tenerse en cuenta es que la proteína final puede presentar una metionina formilada en el N-terminal (Carrio y Villaverde, 2001; Singh y Panda, 2005).

V.5.3 Sistema eucariótico: *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica facultativa perteneciente al grupo de los ascomicetes, su reproducción es por gemación, el genoma contiene cuatro cromosomas y se mantiene haploide. En la actualidad, *P. pastoris* es uno de los sistemas heterólogos ampliamente aplicado para la producción comercial de proteínas exógenas. Se han expresado al menos 400 proteínas recombinantes que provienen de virus, bacterias, hongos, animales, plantas y humanos (Cereghino y Cregg, 2000).

Debido a su capacidad de crecer a elevadas densidades celulares en medio mínimo de metanol, como única fuente de carbono, se han desarrollado vectores, cepas y protocolos de manipulación genética para utilizar a esta levadura como sistema de expresión en la producción de proteínas exógenas. Como un organismo eucarionte, *P. pastoris* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión eucarióticos superiores, especialmente aquéllas relacionadas con modificaciones post-traduccionales, tales como el procesamiento de proteínas, su plegamiento, proteólisis, formación de enlaces disulfuro, glicosilación y secreción en el medio extracelular, lo que facilita la posterior purificación; además de que se manipulan tan fácil como *E. coli* o *S. cerevisiae* (Higgins y Cregg, 1998; Yin y col., 2007). Este sistema es rápido, fácil, de bajo costo y con mayor nivel de expresión, en comparación con otros sistemas de expresión como el baculovirus o sistema de mamíferos (Balamurugan y col., 2007).

Entre las particularidades que confieren ventaja a esta levadura como sistema de expresión de proteínas recombinantes, se pueden citar la ausencia de subproductos fermentativos indeseables, al ser un microorganismo aeróbico, niveles elevados de biomasa, la cual está asociada con la expresión de la proteína recombinante, las modificaciones postraduccionales se asemejan más a las de los organismos eucariotas superiores que las realizadas por *S. cerevisiae*, la escasa secreción de proteínas nativas al medio extracelular, facilitando la recuperación y purificación, la mutación genética se presenta de manera fenotípica, por tratarse de un organismo haploide, y, lo más destacable, la transformación estable está dirigida a un promotor de elevado nivel de transcripción y altamente regulable: el promotor del alcohol oxidasa (P_{AOX1}) (Cereghino y Cregg, 2000).

V.5.3.1 Regulación molecular en la expresión génica del ADNr.

El sistema de expresión de proteínas heterólogas de *P. pastoris* se ha diseñado para que la proteína recombinante pueda ser expresada intracelularmente o secretada al medio extracelular (Cereghino y Cregg, 2000). Para que la proteína recombinante pueda ser secretada al medio, se requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína exógena que indique la ruta de secreción. Para este proceso se pueden considerar secuencias de señal nativa de la

proteína de interés o utilizar vectores diseñados que contienen la secuencia señal de mayor éxito en este sistema, la secuencia pre-pro factor- α de *S. cerevisiae*, α -MF (Higgins y Cregg, 1998; Cereghino y Cregg, 2000).

Bajo estos dos esquemas de producción se han expresado proteínas de diferentes orígenes. Para una consulta más extensa y actualizada de aquellas proteínas expresadas por *P. pastoris*, se puede consultar la dirección electrónica http://www.kgi.edu/documents/faculty/James_Cregg/heterologous_proteins_expressed_in_pichia_pastoris.pdf.

No obstante, los niveles de expresión frecuentemente se encuentran modulados por la proteína a expresar. Se han diseñado vectores integrativos basados en secuencias de ADN homólogas a promotores de *P. pastoris* con elevado nivel transcripcional y/o altamente regulables; ejemplos de ellos son los fragmentos del promotor *AOX1* y *GAP*, que poseen un sitio único de restricción en donde el vector es digerido, de manera que, se lineariza en dirección 5' y dicho extremo liberado se utiliza para dirigir la transformación por recombinación homóloga, que resulta en la integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura, específicamente en el locus del promotor (Higgins y Cregg, 1998; Daly y Milton, 2005).

Existe una amplia variedad de vectores de expresión para *P. pastoris* que varían en algunos componentes, tal como se describe en el Cuadro 5. De manera general, tales vectores se componen de un origen de replicación para el mantenimiento del plásmido en *E. coli* y del gen marcador que confiere resistencia a un antibiótico para ambos organismos, un fragmento de la secuencia de un promotor en 5', una secuencia señal de secreción, si se desea que la proteína sea secretada, un sitio múltiple de clonación (MCS, por sus siglas en inglés) donde se clona el gen exógeno, una secuencia del epítotope *c-myc*, una secuencia que codifica para seis histidinas consecutivas para la detección y purificación de la proteína recombinante y un segundo fragmento corto del promotor en 3' con las secuencias requeridas para la terminación de la transcripción.

Cuadro 5. Componentes que varían en vectores de expresión de proteínas en *P. pastoris*.

Señal de secreción	Ninguna, nativa, PHO1, α -MF, SUC2, PHA-E
Marcador de selección	ADE1, ARG4, G418, HIS4, URA2, Zeo ^r
Promotor	AOX1, GAP, FLD1, PEX8, YPT1

Cereghino y Cregg, 2000

V.5.3.2 Promotor inducible: P_{AOX1}

P. pastoris es metilotrófica, es decir, que en presencia de metanol expresa la enzima alcohol oxidasa (AOX) para oxidar el metanol y utilizarlo como única fuente de carbono y energía (Gellissen, 2000); su síntesis es altamente regulada por el promotor P_{AOX1} (Cregg y col., 1989). La expresión del gen *aox1* es reprimida por catabolitos (como glucosa o glicerol) e inducido por sustrato, específicamente, por metanol, llegando a codificar el 90% de esta enzima y representar el 35% de la proteína total producida en la célula (Ellis y col., 1985; Cregg y col., 1989; Gellissen, 2000).

El sitio del gen *aox1* en el genoma de *P. pastoris* se ha utilizado frecuentemente para insertar, por homología o entrecruzamiento, la secuencia de un gen que codifique para una proteína recombinante (Cregg y col., 1987). Tal es el caso del vector de integración pPICZ α versión, de la empresa Invitrogen, el cual se compone de un fragmento de 0.9 kb de la secuencia promotor 5' del gen *aox1*, una secuencia señal de secreción (α -MF), el gen *sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus ble*) que le confiere resistencia al antibiótico zeocina, así como los demás componentes del vector mencionados anteriormente.

Es importante mencionar, que la mutagénesis dirigida al promotor inducible P_{AOX1} se manifiesta en el fenotipo de la levadura, debido a que *P. pastoris* es un organismo haploide. Durante la linearización, si se origina un solo extremo homólogo al gen *aox1*, se produce una recombinación simple y la inserción del gen exógeno se realiza sin afectar al gen *aox1* cromosómico, lo que resulta en un fenotipo Mut⁺; pero si se originan dos extremos homólogos se produce una recombinación cruzada o doble, incorporando el gen exógeno mediante sustitución y consecuente pérdida del gen *aox1* cromosómico, dando como resultado un fenotipo Mut^S. (Daly y Milton, 2005).

V.5.3.3 Constitutivo: P_{GAP}

Otro promotor en gran auge en los últimos años, es el gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (P_{GAP}). A diferencia del promotor P_{AOX1}, éste es un promotor constitutivo, por consiguiente, la levadura no necesita de metanol como fuente de carbono inductora, pudiendo utilizar fuentes de carbono comunes como glicerol o glucosa (Higgins y Cregg, 1998). No obstante, este tipo de promotor no es una buena opción para la producción de productos heterólogos que presenten cierta toxicidad celular (Cereghino y Cregg, 2000). De las comparaciones realizadas entre los niveles de producción obtenidos para la misma proteína con ambos promotores, P_{AOX1} y P_{GAP}, los resultados son similares; por ello, y en base a las características del P_{GAP}, se puede desarrollar un método menos costoso en la producción de proteínas recombinantes heterólogas a gran escala (Cos, 2006).

Al igual que en el promotor P_{AOX1}, el vector de integración pGAPZ α versión de Invitrogen, está compuesto de un fragmento de 0.5 kb de la secuencia promotor 5' del gen *gap*, una secuencia señal de secreción (α -MF) y el gen *sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus ble*) que confiere resistencia al antibiótico zeocina, así como los demás componentes del vector mencionados con anterioridad.

VI. METODOLOGÍA

La metodología experimental que se utilizó en el presente trabajo se describe a continuación. A grandes rasgos, se modificaron dos secuencias del gen *gp5* del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino con una etiqueta que contiene una cisteína para fines de conjugación química y se diseñaron estrategias de clonación en vectores de *E. coli* (pET102/D-TOPO) y *P. pastoris* (pPICZ α B y pGAPZ α B) como modelos de expresión. La proteína recombinante GP5 expresada en *E. coli* se trabajó bajo un sistema pET utilizando IPTG como inductor, mientras que las proteínas expresadas en *P. pastoris* se realizaron bajo un promotor inducible, P_{AOX1}, y uno constitutivo, P_{GAP}. La presencia de la proteína madura se verificó a través del reconocimiento por anticuerpos de la etiqueta de histidinas, contenida en el extremo carboxilo de la proteína madura.

VI.1 MATERIALES

VI.1.1 Microorganismos

Escherichia coli:

- TOP10 (Invitrogen): Cepa utilizada para la manipulación del ADN.
- BL21 (DE3) (Invitrogen): Cepa de expresión para genes heterólogos en vectores del sistema pET que porten el promotor del fago T7. La cepa contiene el fago λ DE3 integrado en el genoma y posee el gen *lacI* y el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*.

Pichia pastoris:

- X-33: Cepa silvestre utilizada como hospedero para la expresión de proteínas recombinantes. Fenotipo Mut⁺.
- SMD1168H: Cepa deficiente en la actividad de la proteasa A, utilizada para la expresión de proteínas recombinantes. Fenotipo Mut⁺.

V I.1.2 Plásmidos / Vectores

Escherichia coli:

- pUC57 (7.1 kb): GenScript (No. Cat. SD1176)

Plásmido estándar para síntesis de genes, utilizado para clonar el ectodominio de GP5.

- pET102/D-TOPO (6.3 kb): Invitrogen (No. Cat. K102-01)

Vector de expresión que contiene una Tiorredoxina como proteína de fusión (Tiorredoxina His-Patch), un sitio de clonación direccional TOPO[®] mediado por una topoisomerasa. Contiene el gen *lacI* que codifica el represor lac que reduce la transcripción basal del promotor T7lac en el vector y del promotor *lacUV5* en el cromosoma de BL21(DE3); un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección; y un origen de replicación del pBR322 para un bajo número de copias.

Requiere IPTG como inductor.

Pichia pastoris:

- pPICZ α B (3.5kb): Invitrogen (No. Cat.V195-20)

Vector de expresión inducible regulado por metanol. Induce la expresión de genes controlados por el promotor P_{AOX1}. Contiene el gen de resistencia a zeocina como marcador de selección en *E. coli* y *P. pastoris*, la secuencia señal α -factor-MF para secretar la proteína al medio y una etiqueta de seis histidinas.

Requiere metanol como inductor.

- pGAPZ α B (3.1kb): Invitrogen (No. Cat.V205-20)

Vector de expresión constitutivo. Expresa los genes controlados por el promotor P_{GAP}. Contiene el gen de resistencia a zeocina como marcador de selección en *E. coli* y *P. pastoris*, la secuencia señal α -factor-MF para secretar la proteína al medio y una etiqueta de seis histidinas.

V I.1.3 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos, los cuales fueron clasificados en los Cuadros 6, 7, 8, 9 y 10 según el tipo de uso en el laboratorio.

Cuadro 6. Reactivos de uso general.

Reactivos	
Agua bidestilada	Nitrógeno líquido
Agua desionizada	Sorbitol 1M
Agua miliQ	

Cuadro 7. Medios de cultivo.

<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	
Medio SOC	Medio YPD	Medio MMY
Medio LB	Medio BMGY	Medio MD
Medio LB bajo en sales	Medio BMMY	Medio MM
Manual Easy Select™ <i>Pichia</i> Expression Kit		

Cuadro 8. Reactivos para métodos de selección.

Reactivos	Concentración	Marca
Ampicilina	100 µg / mL	Comercial de farmacia (en polvo). Invitrogen
Zeocina	25 µg / mL	
	100 - 150 µg / mL	

Cuadro 9. Reactivos de uso molecular.

	Reactivo	Marca	Reactivo	Marca
Enzimas de restricción y sus amortiguadores	PstI, XbaI	Invitrogen	Syber safe	Invitrogen
	SacI	Fermentas	Tabletas PBS	Invitrogen
	BspHI		Inhibidor de proteasas	
	Ligasa T4	Invitrogen		
	DNAseI	Fermentas		
Marcador de peso molecular	1Kb PLUS ladder	Invitrogen		
	2Log			
	Broad Range	Bio-rad		
	See blue			
	Kaleidoscopio	Bio-rad		

Cuadro 10. Material de extracción y purificación.

Equipo	Función	Marca
QIAprep Spin Miniprep Kit	Extracción ADN plasmídico a pequeña escala	QIAGEN
MinElute Gel Extraction Kit	Purificación de ADN	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	Purificación de fragmentos de AND	QIAGEN
Plasmid Midiprep kit	Extracción de AND plasmídico a mediana escala	QUIAGEN
MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit	Extracción de ADN genómico para levaduras	EPICENTRE

V I.1.4 Equipos

Equipo	
Orbital (incubadora y agitador)	CLC sequence [®]
Centrifuga de mesa	Secador de vacío
Incubadoras a 30°C y 37°C	Liofilizadora de secado en frío
Termoblock	Lector de microplacas
Vortex	Sonicador
Refrigerador 4°C, -20°C y -70°C	Analizador de imágenes
Espectrofotómetro (NANO-DROP)	Campana de extracción / flujo
Espectrofotómetro Visible	laminar
Transiluminador	

VI.2 MÉTODOS

VI.2.1 Diseño de los genes modificados de GP5 de VSRRP

VI.2.1.1 Ectodominio de GP5: análisis *in silico* y diseño de los genes modificados.

Con la participación del M.C. MZV José Francisco Robles González de la empresa Boehringer Ingelheim[®] Vetmedica, ubicada en la ciudad de Guadalajara, se obtuvo un banco de secuencias nucleotídicas del marco de lectura abierta (ORF) de la glicoproteína GP5 del VSRRP de aislados virales mexicanos correspondientes a diferentes regiones del Estado de Jalisco. A dichas secuencias se les realizó un alineamiento utilizando el programa informático CLC sequence[®], se compararon entre sí y contra la cepa vacunal RespPRRS_MLV (Boehringer) y se identificó el aislado viral.

En base al trabajo publicado por Han y col. en el 2006 (Anexo 1) se referenció el isotipo americano (VR-2332) para identificar la región hipervariable del ectodominio de la

glicoproteína GP5 en el ORF5 del aislado viral. Para el diseño de los genes, se consideró la parte expuesta de la proteína como el ectodominio de GP5.

La estrategia para la construcción de los plásmidos consistió en el etiquetado de la región del ectodominio de GP5 con una secuencia que contiene una cisteína que permita su conjugación química a adyuvantes particulados. El diseño de los genes, como estrategia de trabajo, se observa en el Cuadro 11. La secuencia aminoacídica considerada como ectodominio se modificó, añadiendo de manera adyacente una etiqueta de cisteína separada por una secuencia de unión repetitiva denominada Linker.

Cuadro 11. Secuencias para el diseño de los plásmidos del ectodominio GP5.

Genes	Plásmido	Secuencias para los plásmidos de GP5	
Cys-Linker-GP5	pCys-L-GP ₅	Linker (Gly ₄ Ser) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS
GP5-Linker-Cys	pGP ₅ -L-Cys	Etiqueta de cisteínas (Cys)	GSGGCGG
GP5-Cys	pGP ₅ -Cys	Enzimas	PstI: ctgca ↓ g
GP5	pGP ₅		XbaI: t ↓ ctaga

Estos genes se optimizaron con el uso de codones para *Pichia pastoris*, sistema de expresión seleccionado para expresar el ectodominio, y se flanquearon con sitios de reconocimiento para las enzimas PstI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente, que permitieron la movilización al sitio de clonación del vector pPICZα B (Invitrogen) de *P. pastoris*; además, se les adicionó residuos de guanina para mantener el ORF del gen producto del corte enzimático. Finalmente, los genes se mandaron sintetizar a la compañía GenScript Corporation y fueron entregados de manera individual en un plásmido pUC57, con una estrategia de clonación en el sitio EcoRV. Éstos fueron re-suspendidos en 200µL de agua desionizada, se centrifugaron a máxima velocidad por 10min a 4°C y el plásmido se almacenó a -20°C.

Los genes contenidos en el plásmido pUC57 se transfirieron individualmente a *E. coli* mediante choque térmico, siguiendo el protocolo de Invitrogen para las células One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli*, donde:

- Se utilizaron 50µL de células de *E. coli* TOP 10 (One Shot®, Invitrogen) químicamente competentes y 3µL del plásmido pUC57-ectoGP5.
- Las células se recuperaron en 500µL de medio S.O.C.
- Se seleccionaron colonias con 100µg/ml de ampicilina como antibiótico de selección para pUC57 en medio LB a 37°C por 18 horas en una incubadora.

Posteriormente:

- Las colonias obtenidas se aislaron en campana de extracción con un palillo estéril, rayándolas primeramente en caja de LB semisólido con ampicilina (100µg/ml) para su conservación y posteriormente colocando el palillo en 3ml de medio LB líquido con ampicilina (100µg/ml) para su análisis.
- Se incubó la caja a 37°C en una incubadora y el cultivo líquido se creció a 37°C / 250 rpm en un orbital toda la noche.
- A las colonias aisladas en medio líquido, se les extrajo el ADN plasmídico (ADNp) con QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN y se cuantificó en un espectrofotómetro (NADO-DROP) a 260nm.
- El análisis se llevó a cabo con una reacción de digestión usando las enzimas EcoRI (5') y Hind III (3'), que flanquean el gen de interés en el vector pUC57:

Reactivos	Cantidad	
Buffer #2	2µl	37°C
EcoRI	1µl	
Hind III	1µl	1h
ADNp	15µl	
Vol. Final	20µl	

- La reacción de digestión se separó en una electroforesis en gel de agarosa y el resultado se observó en un fotodocumentador.
- El ADNp se almacenó a -20°C.

VI.2.1.2 ORF5 del ResPRRS_MLV. Amplificación del gen *gp5* modificado.

Se buscó amplificar la región del ORF5 de la proteína GP5 de la cepa vacunal, a partir de la secuencia de ADN de la retrotranscripción del ARN viral de la cepa vacunal ResPRRS_MLV proporcionada por Boehringer Ingelheim® Vetmedica, obtenida por Lobato, 2011. En el diseño estratégico se consideró amplificar la secuencia sin péptido señal y sin codón de paro, al cual se le denominó *gp5* truncado.

La estrategia en el diseño de los plásmidos consistió en el etiquetado del gen truncado *gp5* con una cisteína que igualmente permita su conjugación química a un adyuvante particulado. Se diseñaron tres genes para *E. coli* y *P. pastoris*, dos con una etiqueta de cisteína (GGCGG) adyacente al gen *gp5* en uno o en otro extremo de la proteína hipotética y un gen control *gp5* sin cisteína. Para ello, se diseñaron cebadores específicos para *E. coli* y *P. pastoris*; todos los cebadores reconocen en dirección 5' una región del ADN del ORF5 que parte del aminoácido 27 y en dirección 3' una región del aminoácido 199, descartando el péptido señal y el codón de paro para ambos modelos. La secuencia de la etiqueta de cisteína (GGCGG) fue integrada en el cebador en dirección 5' o 3'. En el caso de *E. coli*, en dirección 5' se añadió al iniciador un codón de inicio ATG y cuatro pares de bases *cacc* necesarios para direccionar la clonación en el vector pET102/D-TOPO. Mientras, los iniciadores de *P. pastoris* se flanquearon con sitios de reconocimiento para las enzimas PstI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente, que permiten la movilización a los vectores pPICZ α B y pGAPZ α B (Invitrogen); además, se les adicionó residuos de guanina para mantener el ORF del gen producto del corte enzimático y finalmente se adicionó una secuencia palindrómica (tatata) para aumentar la eficiencia de corte enzimático.

A continuación se describen las condiciones de reacción para amplificar el gen *gp5* modificado del ResPRRS_MLV por PCR punto final haciendo uso del juego de iniciadores para cada gen en los modelos de *E. coli* y *P. pastoris*. El producto amplificado y sometido a electroforesis en un gel de agarosa se observó con un fotodocumentador.

Reacción de PCR	Condiciones del PCR		Testigos
5 µl Buffer PCR 10X	Calentamiento	95°C / 5min	Agua pPICZαB**
1 µl dNTP's (10mM)	Desnaturalización	94°C / 30seg	
1.5 µl MgCl ₂ (50mM)	Alineamiento	60°C / 50seg	
2 µl Forward/Reverse (10µM)*	Extensión	72°C / 40seg	
2.5 µl ADN RespPRRS	Extensión final	72°C / 7min	
0.25 µl <i>Taq pol.</i>		4°C / α	
Vol. Final 50µl			

*Mezcla de cebadores

**ADNp del vector pPICZαB (AOX1 F/R)

VI.2.2 Sistema eucariótico: *Pichia pastoris*

VI.2.2.1 Clonación del ectodominio GP5 en el vector de pPICZα B.

La genes del ectodominio GP5 contenidos en el vector pUC57 se movilizaron al vector pPICZα B para *P. pastoris*, por digestión con las enzimas PstI (5') y XbaI (3') incorporadas en el diseño del gen sintético; de igual manera, se digirió el vector pPICZα B (300ng/µl) con las mismas enzimas a 37°C por una hora. El producto de las digestiones se separó en una electroforesis en gel de agarosa para identificar las bandas que corresponden al peso molecular de cada uno de los genes, así como del vector.

ectoGP5-pUC57		Vector pPICZα B		Ligación	
Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Buffer #2	2µl	Buffer #2	2µl	Buffer ligasa	3µl
PstI	1µl	PstI	1µl	pPICZα B	3µl
XbaI	1µl	XbaI	1µl	ectoGP5	8µl
ADNp	15µl	pPICZα B	4µl	ADN Ligasa T4	1µl
Vol. Final	20µl	Vol. Final	20µl	Vol. Final	15µl

Las bandas en el gel correspondientes al peso molecular deseado, se cortaron físicamente con una navaja y se purificaron con MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN. Las secuencias purificadas de los genes se ligaron al vector pPICZ α B por separado con la enzima ADN ligasa T4 (Invitrogen) a 16°C toda la noche; posteriormente, la ligación se almacenó a -20°C.

VI.2.2.2 Clonación del gen *gp5* ResPRRS_MLV modificado en pPICZ α B y pGAPZ α B.

Los genes de *gp5* modificados de la cepa vacunal ResPRRS_MLV y amplificados con los cebadores específicos para *P. pastoris* se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, así como el producto de digestión con las enzimas PstI (5') y XbaI (3') de los vectores pPICZ α B y pGAPZ α B a 37°C por tres horas. Se identificaron las bandas en el gel correspondientes al peso molecular y se cortaron físicamente; el ADN se purificó con MinElute Gel Extraction Kit y se cuantificó con espectrofotómetro (NANO-DROP) a 260nm.

Genes de <i>gp5</i>		Vector pPICZ α B / pGAPZ α B		Ligación	
Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Buffer #2	3 μ l	Buffer #2	3 μ l	Buffer ligasa	3 μ l
PstI	1.5 μ l	PstI	1.5 μ l	Vector	7 μ l
XbaI	1.5 μ l	XbaI	1.5 μ l	<i>gp5</i>	4 μ l
Amplicón	16 μ l	Vector	15 μ l	ADN Ligasa T4	1 μ l
Vol. Final	30 μ l	Vol. Final	30 μ l	Vol. Final	15 μ l

El ADN de *gp5* modificado fue tratado con las enzimas PstI (5') y XbaI (3') a 37°C por tres hora liberando los extremos de los sitios enzimáticos. Nuevamente, los fragmentos se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN para eliminar las enzimas presentes y se cuantificaron a 230nm. Las secuencias purificadas tanto de los genes *gp5* como del vector se ligaron con la enzima ADN ligasa T4 (Invitrogen) a 16°C toda la noche; posteriormente, el producto de ligación se almacenó a -20°C.

VI.2.2.3 Líneas transformantes de *E. coli* con los vectores pPICZ α B y pGAPZ α B.

El producto de ligación se introdujo por el método de electroporación siguiendo el protocolo de Invitrogen para las células One Shot® TOP10 competent cell, donde:

- Se mezcló 2 μ l de producto de ligación en 50 μ l de células de *E. coli* One Shot® TOP10.
- Las condiciones de electroporación fueron: celda 0.1cm, 1500V, 25 μ F y 200 Ω .
- Se recuperaron las células con 500 μ l de medio S.O.C.
- Las colonias se seleccionaron con 25 μ g/ml de zeocina, como antibiótico de selección, en medio LB bajo en sales (50% menos de NaCl) a 37°C por 18 horas en una incubadora.

De igual manera, para el análisis de las colonias transformadas:

- Se aislaron colonias en 3ml de medio LB bajo en sales con 25 μ g/ml de zeocina a 37°C / 250 rpm en un orbital toda la noche.
- A estas colonias se les extrajo el ADNp con QIAprep Spin Miniprep Kit y se cuantificó en un espectrofotómetro (NADO-DROP) a 260nm.
- Asimismo, el análisis se llevó a cabo con una reacción de digestión con las enzimas PstI (5') y XbaI (3').

Reactivos	Cantidad	
Buffer #2	2 μ l	
PstI	1 μ l	37°C
XbaI	1 μ l	1h
ADNp	~ 500ng	

- La reacción de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y el resultado se observó en un fotodocumentador.
- El ADNp se almacenó a -20°C.

VI.2.2.4 Transformación de la levadura *Pichia pastoris*

Para fines de expresión de la proteína GP5 y sus variantes, se utilizó la cepa X-33 (tipo silvestre) y SMD1169H (deficiente en proteasas) de *P. pastoris*. Dichas cepas recibieron un

tratamiento para conferirles la capacidad de ser células electrocompetentes. De igual manera, se determinó que 120µg/ml de Zeocina es la concentración de antibiótico necesaria al cual las cepas X-33 y SMD1168H no pueden crecer. El método de transformación de *Pichia pastoris* requirió de una concentración de 10µg de ADNp para cada una de las variantes de los plásmidos ectoGP5- pPICZα B y gp5- pGAPZα B. Para ello, se utilizó el Plasmid Midiprep kit de QIAGEN con algunas modificaciones en la técnica:

- Primeramente, se crece la colonia de *E. coli* en un pre-inóculo de 3ml de LB bajo en sales con 25 µg/ml de zeocina a 37°C, 250rpm, toda la noche.
- Se inoculan 100µl del pre-inóculo en 100ml de LB bajo en sales con igual concentración de zeocina y se incuba por 8h bajo las mismas condiciones
- El procedimiento de extracción de ADNp se realizó con base en el manual de Plasmid Midiprep kit.
- Después del lavado con Etanol al 70% la pastilla de ADNp se secó con nitrógeno gaseoso y se resuspendió en 25µl de agua miliQ.
- El ADNp se cuantificó en un espectrofotómetro (NADO-DROP) a 260nm.

Linearización. El siguiente paso, fue linearizar el plásmido por digestión, esto libera el extremo 5' del vector en la región del promotor AOX1/GAP para la integración del gen al genoma de *P. pastoris* por recombinación homóloga en una región del promotor del gen *aox1/gap*. Dicha linearización se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

Linearización

Promotor P _{AOX1} (pPICZα B)		Promotor P _{GAP} (pGAPZα B)	
Reactivos	Reactivos	Cantidad	Cantidad
Buffer J	1µl	Buffer O	1µl
SacI	1µl	BspHI	1µl
ADNp	~9µg	ADNp	~9µg
Vol. Final	10µl	Vol. Final	10µl

La enzima se retiró utilizando el QIAquick PCR Purification Kit, pero debido a que la columna sólo es capaz de retener hasta 10µg de ADNp, la digestión y purificación se realizó por duplicado para cada plásmido; al final del procedimiento, se colectaron en un solo tubo Eppendorf el purificado de ambas columnas y se concentraron en un secador de vacío (Speedvac) para Eppendorf a 45°C hasta una concentración de ADNp $\geq 10\mu\text{g}$; la concentración se determinó en un espectrofotómetro (NADO-DROP) a 260nm. El ADNp se almacenó a -20°C.

Transformación. La transformación de las células de *P. pastoris* electrocompetentes por el método de electroporación, consistió en:

- Transformar con ~10µg ADNp 80µl de la cepa X-33 / SMD1168H de *P. pastoris* para cada plásmido; asimismo, para análisis posteriores se transformó la levadura con el vector vacío linearizado.
- Como control, se transformó la levadura con 10µl de agua miliQ y de manera opcional con el vector vacío no linearizado.
- Las condiciones de electroporación fueron: celda 0.2cm, 1500V, 50µF y 200Ω.
- Se recuperaron las células con 1ml de sorbitol 1M frío estéril y se transfirieron a un tubo falcón de 15ml.
- Se dejaron reposar a 30°C en una incubadora sin agitación durante 1h.
- Se adicionó 1ml de YPD estéril y se dejó a 30°C / 200rpm durante 1h más.
- Se tomó una alícuota de 200µl (dilución más alta) y se extendió por superficie en caja con medio YPD sólido con zeocina (120µg/ml) como antibiótico de selección y se incubó a 30°C en una incubadora por 2 – 5 días.
- De las colonias obtenidas se seleccionaron de 5-10 clonas por cada construcción y se aislaron en 4ml YPD líquido con zeocina (100µg/ml) en condiciones de 30°C / 250rpm hasta una $OD_{600} \geq 4$. Para fines de éste trabajo, las transformantes aisladas en medio de cultivo fueron llamadas “cultivo madre” y se almacenaron a 4°C.

VI.2.2.5 Análisis de las transformantes de *Pichia pastoris*

El análisis de las colonias transformadas de *Pichia pastoris* consistió en determinar la inserción del gen GP5 en el genoma de la levadura y verificar la capacidad de la colonia de crecer y metabolizar el metanol como inductor en el caso del promotor P_{AOX1} (pPICZ α B); además, durante la inducción de la expresión de la proteína GP5 en presencia de metanol se monitoreó la expresión del transcrito a diferentes tiempos de inducción, así como la medición de las cinéticas de crecimiento de la levadura durante la expresión. Por lo que a continuación se describen los procedimientos utilizados para los análisis de expresión de la proteína en *P. pastoris*.

VI.2.2.5.1 Análisis del genotipo por PCR

La inserción del gen modificado de GP5 en el genoma de *P. pastoris* por recombinación homóloga se comprobó mediante la técnica de PCR punto final. Para la transformación con el vector pPICZ α B, se utilizaron como cebadores secuencias del sitio 5' y 3' AOX1 propias del vector que flanquean al gen de interés (Figura 7), propuestos en el manual de Easy selection *Pichia* Expression (Invitrogen); ambos iniciadores tienen una temperatura de desnaturalización (T_m) de 55°C. En el caso de las transformaciones con el vector pGAPZ α B, se utilizaron como cebadores la secuencia en 5' empleada para la amplificación del gen *gp5* (apartado VI.2.1.2) y el 3' AOX1 propia del vector (Figura 7), ambas secuencias se trabajaron a una T_m promedio de 55°C.

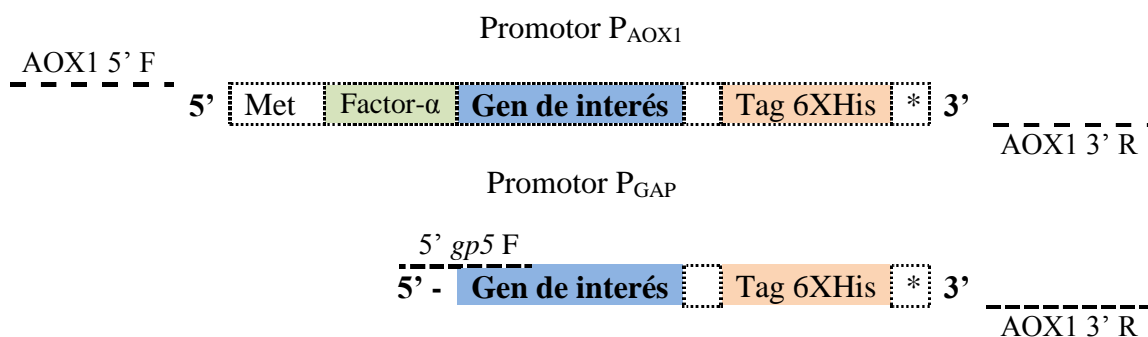


Figura 6. Región del vector de *P. pastoris* amplificada para el análisis por PCR.

El ADN genómico (ADNg) de las colonias transformantes se extrajo usando el protocolo de MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit de EPICENTRE. Para esto, se creció 10 colonias aisladas en 3ml YPD y zeocina (100µg/ml) con un inóculo de 100µl del cultivo madre a 30°C / 250rpm / 24h. La cuantificación del ADNg mostró un rendimiento en la concentración entre 1.5 – 4 µg/µl. Las condiciones de reacción para el análisis de las transformantes por PCR se muestran a continuación:

Reacción de PCR	Condiciones del PCR		Testigos
5 µl Buffer PCR 10X	Calentamiento	95°C / 5min	Agua
1 µl dNTP's (10mM)	Desnaturalización	94°C / 30seg	X-33**
1.5 µl MgCl ₂ (50mM)	Alineamiento	55°C / 50seg	pPICZαB***
4 µl AOX1 F/R* (5µM)	Extensión	72°C / 40seg	
2 µl gp5F/AOX1R* (10µM)	Extensión final	72°C / 7min	
~4 µg DNA genómico			
0.5 µl <i>Taq pol.</i>			
Vol. Final 50µl			

* Mezcla de cebadores

** ADNg de la levadura X-33

*** ADNp del vector pPICZαB

El producto de amplificación se observó mediante electroforesis de gel de agarosa y como controles se consideraron el ADNp del vector pPICZαB vacío y la cepa X-33 sin transformar.

VI.2.2.5.2 Análisis del fenotipo AOX1

La determinación del fenotipo de las transformantes se basó en la capacidad de la colonia de metabolizar y crecer en presencia de metanol. Debido a que se usó como hospedero a la cepa silvestre X-33, el fenotipo esperado fue Mut⁺, lo que indicó que la levadura fue capaz de metabolizar y crecer en medio con metanol; a la colonia que fue incapaz de crecer en dicho

medio, se le identificó con el fenotipo Mut^S. Para ello, a las colonias que resultaron positivas al análisis del genotipo, en las cuatro construcciones de GP5 así como del vector pPICZαB vacío, se les determinó su fenotipo AOX1 en base al manual EasySelect *Pichia* Expression kit y se utilizó como control positivo la cepa X-33 de fenotipo Mut⁺. Las clonas se sembraron al paralelo en medio sólido con glucosa (MDH) y con metanol (MMH) durante 48h a 30°C.

VI.2.2.6 Expresión de la proteína bajo dos promotores: P_{AOX1} y P_{GAP}.

La inducción en la expresión de la proteína con el ectodominio GP5 modificado en *Pichia pastoris* bajo un promotor inducible, P_{AOX1}, en presencia de metanol se llevó a cabo en base al manual EasySelect *Pichia* Expression kit para el fenotipo Mut⁺. El diseño de la experimentación se basó en utilizar un par de clonas de fenotipo Mut⁺ para cada uno de los genes y el vector pPICZαB vacío y la levadura X-33 sin transformar como controles negativos,. Las inducciones se realizaron tanto en medio rico (BMMY) como en medio mínimo (MMY), para determinar el tiempo óptimo de expresión de la proteína; paralelamente, se realizó el análisis del transcrito por RT-PCR. La inducción en la expresión de la proteína del gen modificado de *gp5* ResPRRS_MLV bajo un promotor constitutivo, P_{GAP}, se llevó a cabo en base al manual *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins de Invitrogen.

VI.2.2.6.1 Cinética de expresión para un medio constitutivo

- Primeramente, se inoculó 100μl del cultivo madre en 3ml de YPD líquido con zeocina (100μg/ml) y se incubó a 30°C / 250rpm/ 24h.
- La cinética de expresión inició inoculando 100μl del pre-inóculo en 50ml de YPD con una incubación a 30°C / 250rpm.
- No se consideró muestra de tiempo 0h.
- La toma de muestra fue de 1ml y se realizó cada 24h hasta las 96h.
- Se separó la fracción del medio de la fracción celular por centrifugación a 3,000g, 10min, 4°C. Ambas fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

- Al mismo tiempo, se midió la OD₆₀₀ en un espectrofotómetro de luz visible usando celdas de plástico a un FD_{1:10}, para observar la cinética de crecimiento.
- La fracción celular fue lisada por método físico con perlas de vidrio de 0.5mm (30seg/vortex, 30seg/hielo, por 10 ciclos). El sobrenadante se recuperó por centrifugación a máxima velocidad, 10min, 4°C.
- Ambas fracciones se analizaron con la técnica de Western blot.

VI.2.2.6.2 Cinética de expresión para un medio inductor

- Primeramente, se inoculó 100µl del cultivo madre en 3ml de YPD líquido con zeocina (100µg/ml) y se incubó a 30°C / 250rpm/ 24h.
- Posteriormente, se inoculó 100µl del pre-inóculo en 25ml de medio rico BMGY (medio represor) a 30°C / 250rpm/ 16h o hasta una OD₆₀₀ = 4, la cual es medida en un espectrofotómetro de luz visible usando celdas de plástico a un FD_{1:10}.
- Para el tiempo 0h (sin inducción), se tomó una alícuota de 5ml de cultivo y se separó la fracción del medio de la fracción celular por centrifugación a 3,000g, 10min, 4°C. Ambas fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.
- Posteriormente, el cultivo celular se centrifugó a 3,000g, 10min, a temperatura ambiente para retirar el medio represivo con glicerol y se lavó con agua destilada estéril, recuperando la pastilla celular por centrifugación a las mismas condiciones.
- La pastilla celular se resuspendió en medio rico BMMY ó MMY (medio inductor) que contiene metanol al 1%, con el que se inició la inducción. El cultivo se incubó a 30°C / 250rpm.
- La toma de muestra de 5ml se realizó cada 24h hasta las 96h posterior a la inducción (pi); adicionando 1% v/v de metanol cada 24h para mantener la inducción.
- Se midió la OD₆₀₀ en un espectrofotómetro de luz visible usando celdas de plástico a un FD_{1:10}, para observar la cinética de crecimiento.
- Las fracciones fueron separadas y almacenadas, como se realizó con el tiempo de 0h.
- En la fracción celular se analizó la expresión del transcrito por RT-PCR.
- La fracción del medio se liofilizó para el análisis de la proteína por Western blot.

- Para el caso de la cinética en medio mínimo se midió la concentración de proteína total en la fracción del medio por el método de Bradford a 595nm.

VI.2.2.6.3 Análisis de la expresión génica

El análisis de la presencia del transcrito sólo se realizó para las cinéticas de expresión bajo un promotor inducible, P_{AOX1}, que expresan el gen con el ectodominio GP5. Esto fue durante el tiempo de inducción con metanol y se llevó a cabo por el método de RT-PCR punto final. Para ello, se diseñó en el CLC[®] sequence, un cebador en dirección 5' que reconoce una secuencia interna en el ectodominio de GP5 y como cebador en 3' se usó la secuencia 3' AOX1 del vector pPICZαB, que reconoce una secuencia corriente abajo del transcrito.

Se tomaron en cuenta los tiempos de inducción de 0, 24 y 48h pi, a los cuales:

- De la fracción celular, se extrajo primeramente los ácidos nucleicos totales (ANt) con el Yeast DNA Purification Kit, sin tratamiento con la RNAsa que indica el procedimiento. Éstos se cuantificaron en un espectrofotómetro a 260nm.
- Las muestras se trataron con DNAsaI para eliminar el material genómico.
- El ADN complementario (cADN) se sintetizó usando como iniciador específico la secuencia 3'AOX1 para la transcripción reversa. Las condiciones de reacción para la digestión con DNAsaI y la síntesis del ADN complementario por RT-PCR se describen a continuación:

Digestión con DNAsaI		Síntesis del cADN (RT-PCR)				
Buffer 10X	1µl	ARN	1.5µl	Buffer 5X RT	4µl	25°C / 5min
DNAsaI	1 µl	3' AOX1	1 µl	dNTP's (10mM)	1 µl	55°C / 60min
ANt	~1µg	Vol. Final	5µl	MgCl ₂ (25mM)	2.4µl	70°C / 15min
Vol. Final	10µl	70°C / 5min		RNAsin	0.05µl	4°C / ∞
	37°C / 30min	4°C / 5min		Transcriptasa reversa	1µl	
Sol. Stop	1 µl			Vol. Final	15µl	
	65°C / 10min					

- Finalmente, se amplificó el cDNA por PCR punto final usando los iniciadores 5'GP5 / 3'AOX1 anteriormente mencionados. El producto amplificado se observó en un gel de agarosa.

Las condiciones para el análisis del cADN del transcrito por PCR punto final se describen a continuación:

Reacción de PCR	Condiciones del PCR	Testigos
5 µl Buffer PCR 10X	Calentamiento 95°C / 5min	Agua
1 µl dNTP's (10mM)	Desnaturalización 94°C / 30seg	ADNp*
1.5 µl MgCl ₂ (50mM)	Alineamiento 55°C / 1min	25 ciclos
2 µl 5'GP5/3'AOX1 (10µM)	Extensión 72°C / 40seg	
2.5 µl cADN	Extensión final 72°C / 7min	
0.2 µl <i>Taq pol.</i>	4°C / α	
Vol. Final 50µl		

*Se usó el ADNp de cada construcción como control

VI.2.2.7 Análisis de la expresión de la proteína madura.

El análisis de la cantidad de proteína total presente en la fracción del medio extracelular durante la inducción con metanol, bajo condiciones de nutrientes mínimos, a los diferentes tiempos, se llevó a cabo por el método de Bradford. La curva estándar utilizada contempló las cantidades de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5mg/ml de albúmina sérica y como testigo el medio de cultivo. El método consistió en utilizar una microplaca de 96 pozos, donde en pozos individuales se mezclaron 10µl de muestra más 200µl del reactivo de Bradford, se dejó reposar a temperatura ambiente por 5min y la lectura se realizó a 595nm en un lector de microplaca.

Se analizó la presencia de la proteína madura que fuese secretada al medio extracelular durante la inducción con metanol o en medio constitutivo, así como la expresada

intracelularmente (pastilla celular). Primeramente, se analizó en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) con tinción con azul de Coomasie, el patrón de bandeo de las proteínas presentes en el medio. Posteriormente, se determinó su presencia mediante la técnica de Western blot usando como primer un anticuerpo monoclonal que reconoce la etiqueta de seis histidinas presentes en el extremo carboxilo terminal de la proteína recombinante. Para ello, las muestras tomadas durante las cinéticas se resuspendieron en buffer de muestra con 2-β-mercaptoetanol, en una relación 1:1 y se desnaturalizaron a 96°C / 10min. La detección de la proteína madura por Western blot, tanto del ectodominio GP5 como la proteína truncada de GP5 ResPPRS_MLV, se realizó a través de un reconocimiento primario con un anticuerpo monoclonal anti-His₆ y un segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa.

VI.2.3 Sistema procariótico: *Escherichia coli*

VI.2.3.1 Amplificación con *Pfu* de las secuencias ResPPRSV_MLV

Antes de llevar a cabo la clonación de los genes *gp5* de la secuencia ResPPRS_MLV en los vectores para *E. coli*, fue necesario reamplificar la secuencia del gen con la enzima *Pfu*. A continuación se describen las condiciones de reacción de PCR punto final con la enzima *Pfu*. El producto amplificado fue verificado por electroforesis en un gel de agarosa.

Reacción de PCR	Condiciones del PCR	
5 µl Buffer <i>Pfu</i> c/MgSO ₄	Calentamiento	95°C / 3min
1 µl dNTP's (10mM)	Desnaturalización	95°C / 30seg
1 µl <i>gp5</i> F/R* (10µM)	Alineamiento	55°C / 30seg
1 µl ADN <i>gp5</i>	Extensión	72°C / 1.20min
amplificado (F _D 1:100)		35 ciclos
1 µl <i>Pfu pol.</i>	Extensión final	72°C / 7min
Vol. Final 50µl		4°C / α

*Mezcla de cebadores

VI.2.3.2 Clonación en un sistema de expresión pET

La expresión de la proteína GP5 de la secuencia ResPRRS_MLV en *E. coli* se llevó a cabo en un sistema pET, con un vector pET102/D-TOPO, el cual direcciona la clonación en base a una secuencia *cacc* que fue añadida a los cebadores específicos para *E. coli* y que reconoce una secuencia *gtgg* del vector en dirección 5'. El vector pET102/D-TOPO se caracteriza por contener una HP-tiorredoxina, corriente arriba del sitio de clonación del gen, para incrementar la eficiencia de expresión. La reacción para la clonación del gen *gp5* en el vector pET102/D-TOPO se muestra a continuación:

Reactivos	Cantidad
ADN amplificado	4µl
Sol. Salina (dil. 1:4)	1µl 20min
pET102/D-TOPO	1µl T° amb
Vol. Final	6µl

Ya clonada la secuencia de GP5 en el vector pET102/D-TOPO, se prosiguió a transformar primeramente en la cepa de *E. coli* TOP10 por electroporación. El protocolo realizado fue:

- Se mezcló 1.5µl de producto de ligación con 50µl de células de *E. coli* TOP10 electrocompetentes.
- Las condiciones de electroporación fueron: celda 0.1cm, 1500V, 25µF y 200Ω.
- Se recuperaron las células con 250µl de medio S.O.C. estéril.
- Las colonias se seleccionaron con 100µg/ml de ampicilina en medio LB a 37°C por 18 horas en una incubadora.

El análisis de las colonias transformadas se realizó por PCR punto final. Para ello, se utilizaron cebadores del vector pET102/D-TOPO de Invitrogen que reconocen en 5' una secuencia interna en la tiorredoxina, corriente arriba del sitio de clonación del gen, y en dirección 3' una secuencia T7 corriente posterior al codón de paro. Las condiciones de

reacción del PCR punto final se describen a continuación; asimismo, el producto de la amplificación fue verificado por electroforesis en un gel de agarosa

Reacción de PCR	Condiciones del PCR		Testigos
5 µl Buffer PCR 10X	Calentamiento	95°C / 5min	Agua
1 µl dNTP's (10mM)	Desnaturalización	95°C / 30seg	
1.5 µl MgCl ₂ (50mM)	Alineamiento	55°C / 1min	
0.5 µl Trx <i>F</i>	Extensión	72°C / 1min	
0.5 µl T7 <i>R</i>	Extensión final	72°C / 7min	
1 µl ADNp		4°C / α	
0.25 µl <i>Taq pol.</i>			
Vol. Final 50µl			

*Mezcla de cebadores

VI.2.3.3 Expresión en células BL21(DE3) bajo un sistema pET

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) como sistema de expresión proporciona un mecanismo controlado de la expresión de la proteína, al fomentar la sobreexpresión de la ARN polimerasa T7 que transcribe el gen *gp5* en presencia de IPTG como inductor. La cepa BL21 (DE3) se transformó con el vector pET102/D-TOPO clonado con GP5 mediante choque térmico, siguiendo el método físicoquímico descrito en el apartado VI.2.1 .1 para células One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli*.

El protocolo de expresión que se utilizó, a fin de obtener la proteína modificada de GP5, se basó en el manual Champion™ pET directional TOPO® expression kit, donde:

- Se inocula una colonia previamente seleccionada con ampicilina en 10ml LB y ampicilina (100µg/ml) como marcador de selección y se incuba a 37°C, 250rpm, toda la noche.
- Del pre-cultivo anterior se toman 500µl y se inoculan en 10ml de LB + ampicilina (100µg/ml). Se incuba a 37°C y 250rpm durante 2h o hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.5-0.8.
- Posteriormente, el cultivo se separa en dos fracciones de 5ml cada una.

- Uno de los cultivos se utiliza como control (sin inductor).
- Al otro cultivo se le añade IPTG como inductor a una concentración final de 1mM.
- Ambos cultivos, con y sin inductor, se incuban a 37°C y 250rpm.
- Se realizan tomas de muestra de 400µl, en ambos cultivos, cada hora hasta las 6h.
- Las muestras tomadas se centrifugan a máxima velocidad por un minuto y se separan las fracciones en dos tubos. éstos se almacenan a -20°C.
- Las muestras se analizan por SDS-PAGE y Western blot.

VI.2.3.4 Análisis de la expresión de la proteína madura GP5

El análisis en la detección de la proteína recombinante expresada en *E. coli* BL21(DE3) bajo el sistema pET, se llevó a cabo a través del reconocimiento por anticuerpos de la etiqueta de seis histidinas presente en el extremo carboxilo de la proteína madura con la técnica de Western blot, tal como se describió en el apartado VI.2.2.7. Para ello, se utilizó como reconocimiento primario un anticuerpo monoclonal anti-His₆ y un segundo anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa.

VI.2.3.4 .1 Localización celular de la proteína madura GP5

Después del análisis de la expresión de la proteína bajo condiciones de inducción, fue necesario determinar la localización de la proteína en las células de *E. coli*. Por lo que para determinar la solubilidad de la proteína expresada se realizó lo siguiente:

- Se llevó a cabo la inducción de la expresión de la proteína con IPTG y se recolectaron las células a diferentes tiempos de inducción.
- La pastilla celular obtenida se resuspendió en buffer PBS, tritón x-100 al 0.1% e inhibidor de proteasas a una concentración de 1X.
- Las células fueron lisadas con un sonicador a una intensidad de 10 (I=10) por un lapso de 10 y 30 segundos en hielo, esto se repitió hasta aclarar el cultivo.
- Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por un minuto para separar las fracciones solubles e insolubles.

- La fracción soluble se precipitó con acetona, con una relación 1:4, toda la noche a -20°C. Las proteínas precipitadas se concentraron en una pastilla por centrifugación a 10,000rpm, 10min, 4°C.
- Las pastillas de la fracción insoluble y el precipitado con acetona de la fracción soluble se disolvieron en buffer de muestra con 2-β-mercaptoetanol para SDS-PAGE y se desnaturalizaron a 96°C por 5min.
- La detección de la proteína se realizó por anticuerpos con la técnica de Western blot, descrita en el apartado VI.2.2.7.

VI.2.3.5 Purificación mediante cromatografía de afinidad

Primeramente, la proteína debe ser expresada bajo la inducción en IPTG:

- Se inoculó una colonia positiva a la expresión en 3ml de LB+ampicilina (100μg/ml) y se incubó a 37°C, 250rpm, toda la noche.
- Del pre-cultivo anterior se tomó 1ml por cada 100ml de cultivo a inocular de LB + ampicilina (100μg/ml) y se incubó a 37°C y 250rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6-0.8
- Se le añadió IPTG como inductor a una concentración final de 1mM.
- El cultivo se dejó crecer bajo inducción a 37°C y 250rpm por un periodo de 4h.
- Una vez finalizado el periodo de inducción se recolectaron las células por centrifugación a máxima velocidad, 10min, 4°C. Las células fueron almacenadas a -20°C.

La purificación por cromatografía de afinidad de la proteína GP5 se realizó utilizando una columna de afinidad de Niquel 2⁺, HisTrap™ High purification de 1ml (GE HealthCare), que interacciona con la etiqueta de histidinas presentes en el carboxilo terminal de la proteína. Para el tratamiento y purificación de proteínas contenidas en cuerpos de inclusión, se utilizó el protocolo descrito en el manual Recombinant Protein Purification de la empresa GE Healthcare con las siguientes modificaciones: se sustituyó la urea por guanidina, se aumentaron las concentraciones de imidazol en el buffer de unión a 20mM y de lavado a 50mM y se sustituyó la concentración de 20mM Tris-HCl por una solución salina de buffer de fosfatos (PBS).

VII. RESULTADOS

VII.1 Secuencias del gen *gp5* modificadas para conjugación química.

El análisis del gen *gp5* del VSRRP y su modificación con una cisteína que pueda estar disponible para conjugación química se realizó en dos secuencias del gen *gp5* de diferente procedencia. Por una parte, se buscó trabajar con la región del ectodominio de un aislado viral mexicano y, por la otra, con una versión truncada del ORF5 de la secuencia vacunal, ResPRRS_MLV. Estos genes se diseñaron con las secuencias necesarias para ser clonados en vectores de dos modelos de expresión, *E. coli* y *P. pastoris*. Con los resultados que se obtuvieron, se verificaron los procedimientos que se llevaron a cabo durante la clonación de las secuencias de GP5 a los vectores de expresión correspondientes.

VII.1.1 Clonación de la región del ectodominio de GP5 modificado con cisteína.

El primer paso en esta estrategia consistió en analizar y seleccionar una secuencia del gen *gp5* del VSRRP a partir de un alineamiento (Anexo 2) de secuencias nucleotídicas del ORF5 de la proteína GP5 de aislados virales mexicanos del estado de Jalisco proporcionado por la empresa Boehringer Ingelheim® Vetmedica. Se seleccionó la secuencia con rotulación PRRS_2005/sitio 27-1 debido a que fue la secuencia más variable con respecto a la cepa vacunal (ResPRRS_MLV). Para identificar en esta secuencia la región del ectodominio de GP5, se comparó su secuencia aminoacídica con lo reportado por Han y col. en el 2006 (Anexo 1) y se consideró como ectodominio una secuencia que abarcó las regiones expuestas de la proteína y que correspondieron del aminoácido 27 al 115 del ORF5.

La distribución topológica del ectodominio GP5 de la secuencia PRRS_2005/sitio 27-1 se despliega a continuación:

Ectodominio PRRS_2005/sitio 27-1

27-**VLVN**ANSSSS**YSQLIYN**LTL**C**ELNGTDWLKNRFDWAV**ET**FVIFPVLTHIVS
YGALTTSHFLDTAALVT**V**STAGFV**H**ERYV**L**SS**I**YAVV-115

En base a lo reportado por Han y col. en el 2006 (Anexo 1), se identificó en la secuencia del ectodominio, con color amarillo y verde la primera y segunda región hipervariable, respectivamente; en color azul se enmarcó la presencia del epítotope A y en morado el epítotope B, separados por sus siete residuos de aminoácidos; esto coincide con lo reportado por Ostrowsky y col. en el 2002; en la segunda región del extravirión (en verde) se enmarcó en rojo la única cisteína nativa presente en esta región, asociada por Dea y col., 2000 con el enlace disulfuro que se genera entre la proteína GP5 y M; en color gris se enmarcó la región de la proteína que atraviesa la membrana.

Cuadro 12. Genes sintéticos del ectodominio GP5 diseñados para *P. pastoris*.

Ectodominio de GP5

5'gttttggttaacgtaactcttcttcttcttactctcaattgatttacaacttgactttgtgtgaattgaacggtactgattggtgaagaaca
gatttgattgggctggtgaaactttgtattttccagtttgactcatattgttcttacggtgctttgactacttctcatttttggatactgctgctttg
gttactgttctactgctggtttgttcatgaaagatacgtttgtcttctatttacgctgtgtt 3'

1. GP5-Cys (294nt, 98aa)	ctgca↓ggggttttggttaacgtaactcttcttcttcttactctcaattgatttacaacttga ctttgtgtgaattgaacggtactgattggtgaagaacagatttgattgggctggtgaaactttt gtattttccagtttgactcatattgttcttacggtgctttgactacttctcatttttggatactg ctgctttggttactgtttctactgctggtttgttcatgaaagatacgtttgtcttctatttacgctg ttgttggttctgggtggtggtggtggt↓ctaga
2. GP5 (273nt, 91aa)	ctgca↓ggggttttggttaacgtaactcttcttcttcttactctcaattgatttacaacttga ctttgtgtgaattgaacggtactgattggtgaagaacagatttgattgggctggtgaaactttt gtattttccagtttgactcatattgttcttacggtgctttgactacttctcatttttggatactg ctgctttggttactgtttctactgctggtttgttcatgaaagatacgtttgtcttctatttacgctg ttgttggt↓ctaga
3. GP5-Linker-Cys (339nt, 113aa)	ctgca↓ggggttttggttaacgtaactcttcttcttcttactctcaattgatttacaacttga ctttgtgtgaattgaacggtactgattggtgaagaacagatttgattgggctggtgaaactttt gtattttccagtttgactcatattgttcttacggtgctttgactacttctcatttttggatactg ctgctttggttactgtttctactgctggtttgttcatgaaagatacgtttgtcttctatttacgctg ttgttggtggtggtggtctggtggtggtggtctggtggtggtggtctgggtctgggtggtggtg ggtggtggt↓ctaga
4. Cys-Linker-GP5 (339nt, 113aa)	ctgca↓gggggttctgggtggtggtggtggtggtggtggtggtctggtggtggtggttctggt ggtggtggtctggtttggttaacgtaactcttcttcttcttactctcaattgatttacaacttga actttgtgtgaattgaacggtactgattggtgaagaacagatttgattgggctggtgaaacttt gttattttccagtttgactcatattgttcttacggtgctttgactacttctcatttttggatactg ctgctttggttactgtttctactgctggtttgttcatgaaagatacgtttgtcttctatttacgctg ttgttggt↓ctaga

El siguiente paso consistió en diseñar genes sintéticos modificados con una cisteína adyacente y sitios de clonación PstI/XbaI para el vector inducible pPICZαB de *P. pastoris*. Para fines prácticos, en el Cuadro 12 se muestran los genes que fueron diseñados para la región del ectodominio GP5. Con color morado se señaló el sitio para PstI, en color rojo el sitio para XbaI y con una flecha los sitios de corte que generan la movilización al vector de clonación; en color amarillo se indicó la etiqueta de cisteína adicionada; en color verde la secuencia linker; y los residuos de guanina que mantienen el marco de lectura del gen se encuentran en color gris

Los genes optimizados para *P. pastoris* se mandaron sintetizar a la compañía GenScript Corporation y fueron entregados en el plásmido pUC57 por separado; para fines de manipulación, se transformaron células de *E. coli* TOP10 con cada una de las construcciones. Para verificar la inserción del plásmido en las colonias transformadas, se realizó una digestión enzimática del ADNp con EcoRI/HindIII, que flanquean el sitio de clonación en el plásmido pUC57. El análisis de ADN plasmídico de *E. coli* transformadas con el ectodominio GP5 en pUC57 se realizó en un gel de agarosa al 1.2% con SYBR-Safe como reactivo de revelado (Fig. 7).

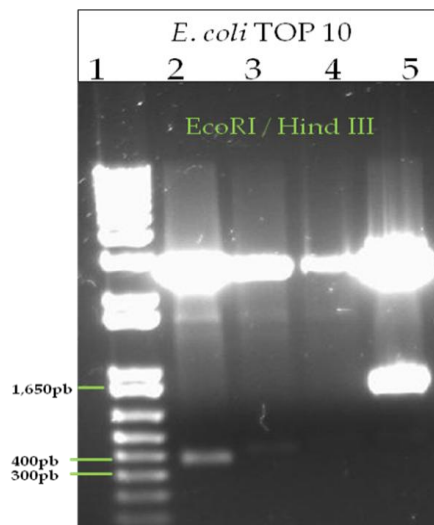


Figura 7. Análisis de ADN plasmídico de *E. coli* transformadas con el ectodominio GP5 en pUC57. El carril 2 corresponde a pGP5Cys (395pb), el 3 a pGP5 (448pb), el 4 a pGP5-L-Cys (470pb) y el 5 a pCys-L-GP5 (484pb); el carril 1 es el marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder.

En la parte inferior del gel se identificaron las bandas que correspondieron al tamaño de los pesos moleculares reportados en la información proporcionada por la empresa GenScript y que fueron generados por el corte enzimático de EcoRI/HindII en cada plásmido contenido en *E. coli* TOP10. L.

Posteriormente, se efectuó la liberación y movilización del ectodominio GP5 modificado por digestión enzimática con PstI/XbaI, del plásmido pUC57 al vector pPICZ α B para *P. pastoris* y la generación de líneas transformantes de *E. coli* TOP10. De igual manera, para verificar que se llevó a cabo la clonación e inserción del plásmido en las colonias transformadas, se realizó una digestión enzimática del ADNp con PstI/XbaI, que flanquean la región del ectodominio de GP5.

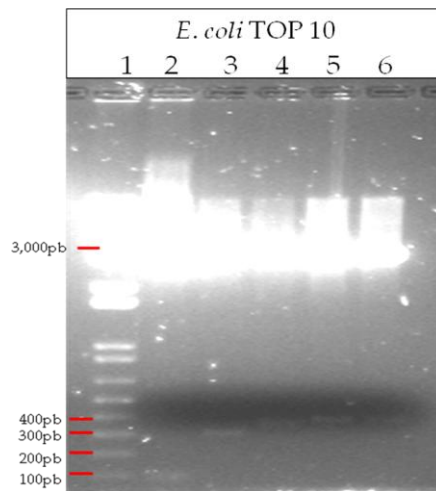


Figura 8. Análisis de ADN plasmídico de *E. coli* transformadas con ectoGP5-pPICZ α B.

El carril 2 corresponde al vector vacío pPICZ α B, el carril 3 a pGP5Cys (294pb), el 4 a pGP5 (345pb), el 5 a pGP5-L-Cys (366pb) y el 6 a GP5-L-Cys (366pb); el carril 1 es el marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder.

Se obtuvieron líneas transformadas de *E. coli* TOP10 con el plásmido ectoGP5-pPICZ α B para cada una de las construcciones que se diseñaron, como se muestra en la Fig. 8, en donde se observaron dos bandas como productos del corte enzimático. La banda con mayor peso molecular (aproximadamente 3,000pb) correspondió al vector, mientras que la banda de menor peso molecular, que se observa tenuemente en la parte inferior del gel correspondió a la región del ectodominio liberado para cada una de las construcciones.

Asímismo, para fines de estudios posteriores se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el vector pPICZαB vacío.

El ADNp de las colonias transformadas para cada construcción se mandó secuenciar a la Unidad de Secuenciación de LANGEBIO, usando como molde el iniciador AOX1 3' del vector pPICZαB, por ser el más cercano al sitio múltiple de clonación y se demostró con un alineamiento, con el programa informático CLC[®] sequence, que los plásmidos construidos se alineaban en su totalidad con la secuencia *in silico* diseñada; además, se corroboró que la secuencia clonada se encontró en fase dentro del vector. Cabe mencionar que los plásmidos de ectoGP5-pUC57 y ectoGP5- pPICZαB de cada construcción se encuentran actualmente almacenados en cepario a -70°C para estudios posteriores.

VII.1.2 Clonación del gen *gp5* de ResPRRS_MLV en dos modelos de expresión.

Otra estrategia para diseñar un gen *gp5* modificado con una etiqueta de cisteínas para conjugación química, alternativo al uso del ectodominio de GP5, partió de la secuencia amplificada del ORF5 de la cepa vacunal ResPRRS_MLV, obtenida por Lobato en 2011. La estrategia consistió en diseñar cebadores que amplifiquen el gen con una cisteína adicional adyacente y sitios de clonación en vectores para dos modelos de expresión, *E. coli* y *P. pastoris*. En el diseño de la secuencia a amplificar se consideró una secuencia sin péptido señal y otra sin codón de paro para ambos modelos; también se delimitó la amplificación de la proteína GP5, del aminoácido 27 al 199.

La distribución topológica de la proteína GP5 de la secuencia ResPRRS_MLV se despliega a continuación:

ORF5 del ResPRRS_MLV

MLEKCLTAGCCSQLLSLWCIVPFCFA-27-VLANASNDSSSHLQLIYNLTLCE
LNGTDWLANKFDWAVESFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFVHGR
YVLSIIYAVCALAALTCFVIRFAKNCMSWRYACTRYTNFLDTKGGLYRWRSPVIE
KRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGVSATPITRVSAEQWGR-199[‡]

En base a lo reportado por Han y col. en el 2006 (Anexo 1) se identificó, en la secuencia del ectodominio, con color amarillo y verde la primera y segunda región hipervariable, respectivamente; en color azul se enmarcó la presencia del epítotope A y en morado el epítotope B separados por sus siete residuos de aminoácidos, esto coincide con lo reportado por Ostrowsky y col. en el 2002; en la segunda región del extravirión (en verde) se enmarcaron las cisteínas nativas presentes en esta región; en color gris se enmarcó la región de la proteína que atraviesa la membrana; las zonas sin color correspondieron a la región del intravirión.

A partir de esta secuencia, se diseñaron tres genes *gp5* truncados (no contienen el péptido señal nativo) con una cisteína adicional en uno u otro extremo de la proteína hipotética y un gen *gp5* sin cisteína. Estos genes modificados se amplificaron con cebadores específicos para clonarlos en los modelos de expresión, *E. coli* y *P. pastoris*. En el Cuadro 13 se muestran los cebadores que se diseñaron para cada sistema de expresión y se indica en color amarillo la etiqueta de cisteína que se adicionó a la secuencia de GP5. Todos los cebadores delimitan en el interior del ORF5 del ResPRRS_MLV con un fragmento de aproximadamente 522pb y tienen una Tm promedio de 60°C para hacer eficiente el uso de un cebador como molde para amplificar otro gen *gp5*.

Cuadro 13. Iniciadores empleados para amplificar el gen <i>gp5</i> en dos modelos de expresión.			
Iniciador		Secuencia	Tm / %GC
<i>Pichia pastoris</i>			
ORF5	Fwd	tatataCTGCA↓GGGGTGCTCGCCAACGCCAG	Tm 60.67 70.59 %GC
	Rev	tatataTCTAG↓ACCAGGACGACCCCATTTGTTCCG	Tm 60.18 60.0% GC
CysORF5	Fwd	tatataCTGCA↓GGTGGTTGTGGTGGTGTGCTCGCCAA CGCCAG	Tm 60.67 70.59%GC
ORF5Cys	Rev	tatataTCTAG↓ACCACCACAACCACCAGGACGACCC ATTGTTCCG	Tm 60.18 60.0% GC

<i>Escherichia coli</i>			
ORF5	Fwd	CACCATGGTGCTCGCCAACGCCAG	Tm 60.67 70.59 %GC
	Rev	AGGACGACCCCATTGTTCCG	Tm 60.18 60.0%GC
CysORF5	Fwd	CACCATGGGTTGGTTGTGGTGGTGTGCTCGCCAACGCCAG	Tm 60.67 70.59%GC
ORF5Cys	Rev	ACCACCACAACCACCAGGACGACCCCATTGTTCCG	Tm 60.18 60.0 %GC

Se realizó la amplificación por PCR punto final del gen *gp5* truncado de la cepa vacunal ResPRRS_MLV utilizando los cebadores para ambos modelos.

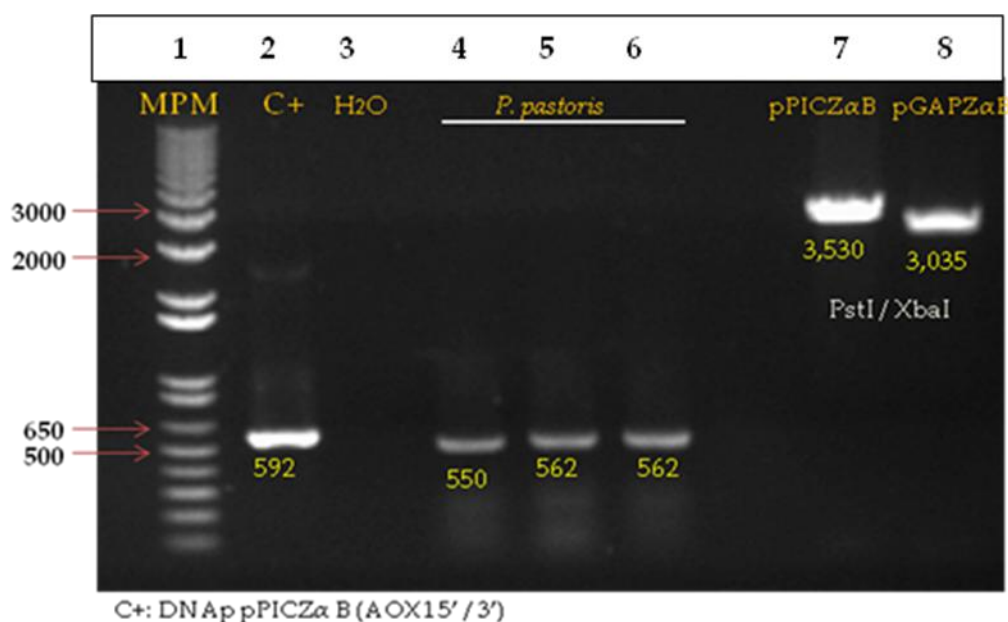


Figura 9. Amplificaciones de los genes *gp5* del ORF5 del ResPRRS_MLV para *P. pastoris*. El carril 2 y 3 se usaron controles positivos y negativos, respectivamente; el carril 4 corresponde a pORF5 (550pb), el 5 a CysORF5 (562pb) y el 6 a pORF5Cys (562pb); adicionalmente, los carriles 7 y 8 son productos del corte enzimático de los vectores de expresión de *P. pastoris*; el carril 1 es el marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder

Pichia pastoris. En el caso del sistema de expresión de *P. pastoris*, se observaron los productos de amplificación del gen *gp5*, en un gel de agarosa al 0.8% y SYBR-Safe como reactivo de revelado (Fig. 9) localizados en los carriles 4–6 con los tamaños correspondientes

al peso molecular esperado en cada una de las construcciones obtenidas a partir del juego de cebadores específicos para cada gen. En los carriles 7 y 8 se observaron los productos del corte enzimático de los vectores pPICZ α B y pGAPZ α B, respectivamente, que son necesarios para la clonación. La reacción de PCR se corroboró con la amplificación del control positivo y la falta de amplificación del agua, como control negativo. Posteriormente, la clonación de los fragmentos amplificados del gen *gp5* a los vectores pPICZ α B y pGAPZ α B se realizó a través de los cortes enzimáticos generados por las enzimas PstI/XbaI. La generación de líneas transformantes de *E. coli* TOP10, con las diferentes construcciones de *gp5*-pPICZ α B y *gp5*-pGAPZ α B, se verificó por digestión enzimática del ADNp con PstI/XbaI, que flanquean el gen *gp5* en el vector.

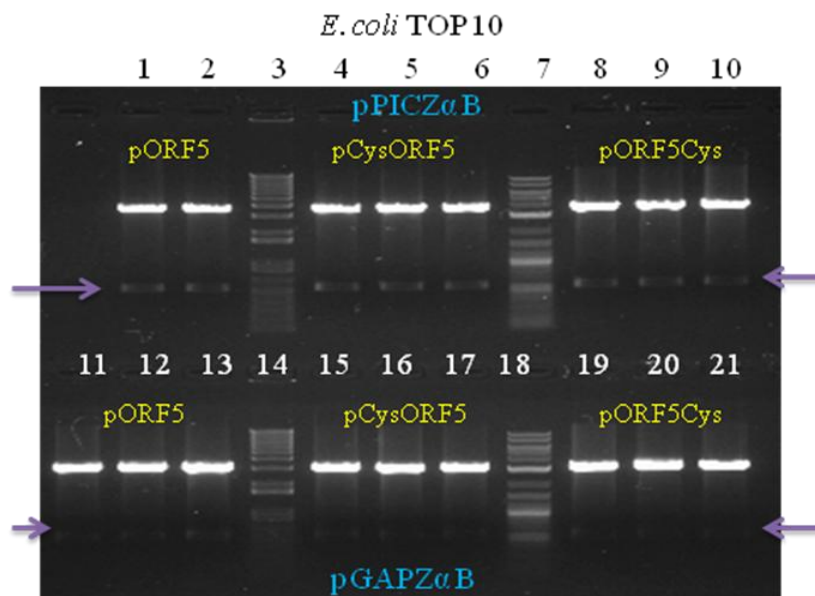


Figura 10. Análisis de ADN plasmídico de *E. coli* transformadas con el gen *gp5* del ORF5 en pPICZ α B y pGAPZ α B. Los carriles del 1 al 10 corresponden a las construcciones en pPICZ α B: los carriles 1 y 2 son el pORF5 (280pb), del 4-6 a pCysORF5 (294pb) y del 8-10 a pORF5Cys (345pb). Los carriles del 11 - 21 corresponden a las construcciones en pGAPZ α B: del 11-13 son pORF5 (280pb), del 15-17 a pCysORF5 (294pb) y del 19-21 a pORF5Cys (345pb). Los carriles 3 y 14 al marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder, mientras 7 y 18 al macador de peso molecular 2Log.

Se obtuvieron líneas transformadas de *E. coli* TOP10 con los plásmidos *gp5*-pPICZ α B y *gp5*-pGAPZ α B para cada una de las construcciones que se diseñaron, como se muestra en la

Fig. 10, en donde se observaron dos bandas como productos del corte enzimático. La banda con mayor peso molecular (aproximadamente 3,000pb) correspondió al vector, mientras que la banda de menor peso molecular, que se observa tenuemente en la parte inferior del gel correspondió a la región de gen *gp5* liberado para cada una de las construcciones.

Escherichia coli. En el caso del sistema de expresión de *E. coli*, se observaron los productos de amplificación del gen *gp5* en un gel de agarosa al 0.8% y SYBR-Safe como reactivo de revelado (Fig. 11) localizados en los carriles 3–5 con los tamaños correspondientes al peso molecular esperado para cada una de las construcciones obtenidas con el juego de cebadores específicos de cada gen. La reacción de PCR se corroboró con la amplificación del control positivo (592pb) y la falta de amplificación del agua como control negativo.

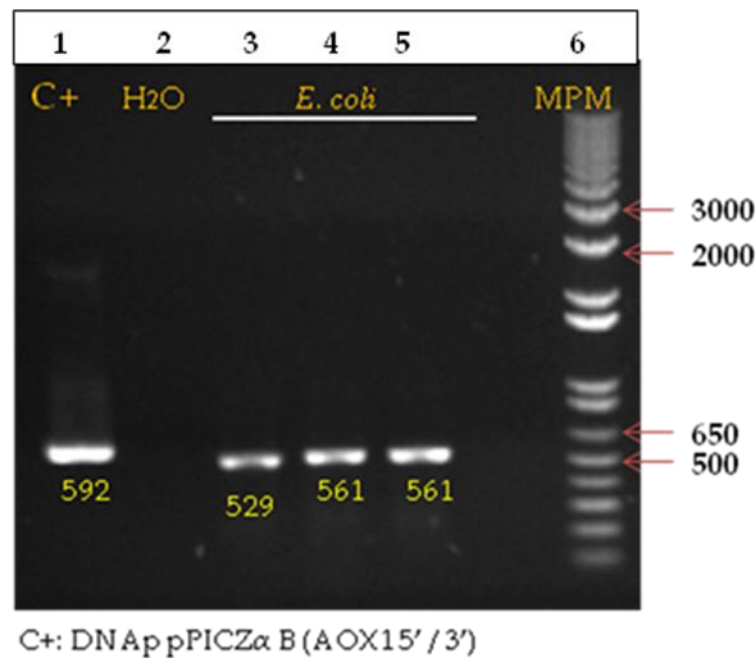


Figura 11. Amplificaciones de los genes *gp5* del ORF5 del ResPRRS_MLV para *E. coli*. En los carriles 1 y 2 se usaron controles positivos y negativos, respectivamente; el carril 3 corresponde a pORF5 (529pb), el 4 a CysORF5 (561pb) y el 5 a pORF5Cys (561pb); el carril 1 es el marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder

Los fragmentos del gen *gp5* de la cepa vacunal ResPRRS_MLV amplificados con la *Taq pol* fueron nuevamente amplificados por PCR punto final con una enzima *Pfu* (extraída de *Pyrococcus furiosus*) de corrección de lectura, que cataliza la polimerización en dirección 5' → 3' y tiene actividad exonucleasa en dirección 3' → 5', esto permitió la corrección de nucleótidos polimerizados erróneamente durante la primera amplificación. Los productos amplificados se verificaron en un gel de agarosa al 0.8% y SYBR-Safe como reactivo de revelado (Fig. 12).

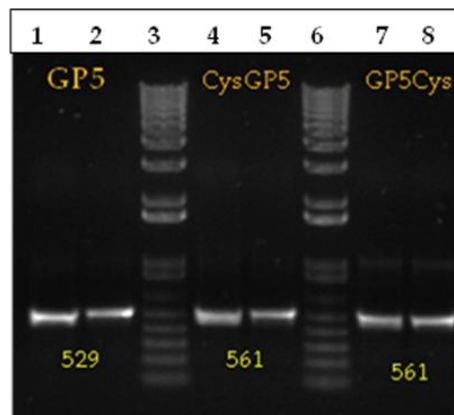


Figura 12. Amplificaciones con *Pfu* de los genes *gp5* del ORF5 del ResPRRS_MLV para *E. coli*. Los carriles 1 y 2 corresponden a pORF5 (529pb), los 4 y 5 a CysORF5 (561pb) y los 7 y 8 a pORF5Cys (561pb); los carriles 3 y 6 al marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder.

Las bandas correspondientes a cada uno de los genes diseñados del ORF5 del ResPRRS_MLV fueron clonados direccionalmente en el vector pET102/D-TOPO a través de la secuencia *cacc* integrada al gen *gp5* con los cebadores específicos para *E. coli* durante la primera amplificación. Para fines de manipulación, se transformaron células de *E. coli* TOP10 con cada una de las construcciones. Para verificar que se llevó a cabo la clonación e inserción del plásmido en las colonias transformadas, se realizó la amplificación del ADNp por PCR punto final utilizando cebadores del vector pET102/D-TOPO de Invitrogen que reconocen en 5' una secuencia interna en la tiorredoxina, corriente arriba del sitio de clonación del gen, y en dirección 3' una secuencia T7 corriente abajo del codón de paro. Los productos amplificados se verificaron en un gel de agarosa al 0.8% y SYBR-Safe. En la Figura 13, se observa que para el gen control (carril 1-4) las colonias 3 y 4 amplificaron la banda correspondiente al producto de la clonación en el vector pET102/D-TOPO, mientras que para los genes con cisteína

incorporada (CysGP5 de los carriles 6–9 y 14–19 y GP5Cys de los carriles 10-13) sólo se obtuvo una colonia transformada para cada gen.

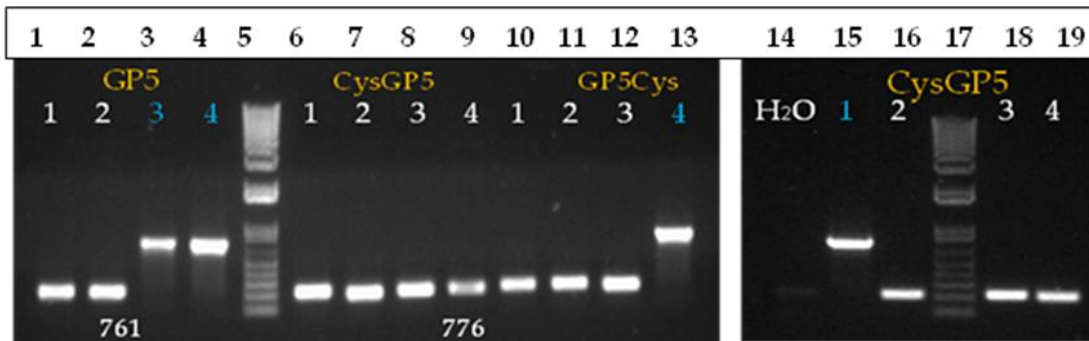


Figura 13. Clonación del gen *gp5* del ORF5 del ResPRRS_MLV en pET102/D-TOPO para *E. coli*. Los carriles del 1-4 corresponden a pGP5 (761pb), los carriles del 6-9 y 15-19 a CysGP5 (776pb) y los carriles del 10-13 a pGP5Cys (776pb); los carriles 5 y 17 al marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder.

Los plásmidos con el gen GP5 de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) actualmente se encuentran clonados en los vectores pPICZαB y pGAPZαB de *P. pastoris* y en el vector pET102/D-TOPO de *E. coli*. Las líneas transformantes de *E. coli* TOP10 se encuentran almacenadas en cepario a -70°C para estudios posteriores.

VII.2 Líneas transformantes con el gen *gp5* modificado del VSRRP.

El siguiente paso experimental fue la generación de transformantes de *E. coli* y *P. pastoris* con la secuencia del gen *gp5* modificada con una cisteína adicional, en sus dos versiones: ectodominio de GP5 de un aislado viral mexicano y el ORF5 truncado de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV). Para ello, se transformaron cepas de *E. coli* y *P. pastoris*, BL21(DE3) y X33/SMD1168H, respectivamente, con los plásmidos obtenidos en el segmento anterior. Se obtuvieron transformantes para los dos modelos de expresión en estudio; para el caso de BL21(DE3) de *E. coli*, el análisis de su transformación se realizó directamente en la expresión de la proteína madura; para *P. pastoris*, los resultados obtenidos demostraron la presencia del gen *gp5* en el genoma de la levadura y se describen en los apartados siguientes.

VII.2.1 Transformación en *Pichia pastoris* bajo dos promotores de expresión.

Una vez cumplido el objetivo de clonar los genes de *gp5* modificados con una cisteína en los vectores de expresión pPICZ α B y pGAPZ α B, se prosiguió a transformar a *Pichia pastoris* con las cuatro construcciones del gen que contiene el ectodominio de GP5 clonado en pPICZ α B en la cepa silvestre X-33 y el gen control *gp5* de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) clonado en pGAPZ α B en las cepas X-33 y SMD1168H. Los resultados de los análisis de las transformantes se desplegaron a nivel de genotipo para todas las transformaciones y a nivel de fenotipo para el caso del vector inducible.

VII.2.1.1 Transformación del gen *gp5* de ResPRRS_MLV en el promotor P_{GAP}.

En la estrategia de transformación de *Pichia pastoris*, la integración del gen *gp5* de la cepa vacunal ResPRRS_MLV por recombinación homóloga con el vector pGAPZ α B, fue dirigida a un promotor constitutivo del gen gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa (P_{GAP}). Para ello, la transformación se realizó en la cepa silvestre X-33 y deficiente en proteasas SMD1168H de *P. pastoris* únicamente con el gen control *gp5* clonado en el vector pGAPZ α B. El análisis genotípico de la integración del cassette de expresión en el genoma de las levaduras se verificó por PCR punto final en cinco colonias transformadas para cada cepa de *P. pastoris*, utilizando los cebadores de la secuencia en 5' empleada para la amplificación del gen *gp5* (apartado VII.1.2) y el 3' AOX1 propio del vector.

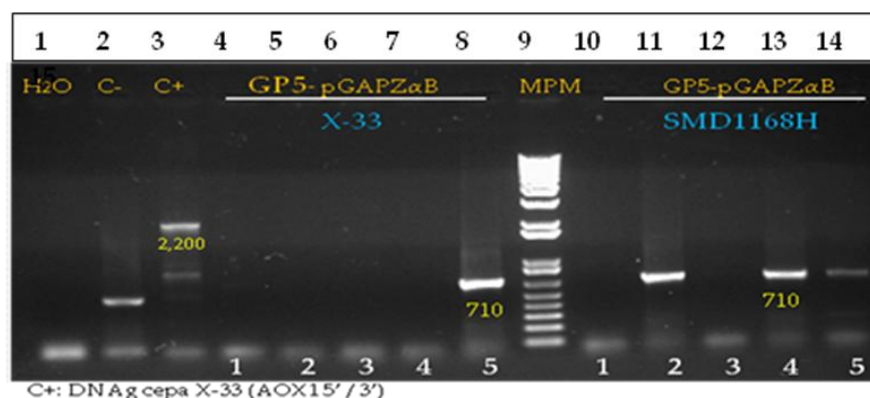


Figura 14. Análisis del genotipo de las transformantes con GP5 en el promotor P_{GAP}.

Los carriles 1 y 3 se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente, los carriles del 4-8 corresponden a pGP5 (710pb) en X-33 y los carriles del 10-14 a pGP5 (776pb) en SMD1168H, ; el carril 9 al marcador de peso molecular de 1 kb PLUS ladder.

Se obtuvieron líneas transformadas de *P. pastoris* con la construcción *gp5-pGAPZα B* para cada una de las cepas transformadas, como se muestra en la Fig. 14, en donde se observaron las bandas con el peso molecular de 710pb como producto de la amplificación. Para la transformación de la cepa silvestre X-33 (carriles 4-8), se observó en el carril 8 una sola colonia con el cassette de expresión integrado en el genoma; por otro lado, para la cepa SMD1168H (carriles 10-14) se observaron en los carriles 11, 13 y 14 tres colonias transformadas. La reacción de PCR se corroboró con la amplificación de la banda de 2.2kb del control positivo X-33 y la falta de amplificación del agua, como control negativo.

VII.2.1.2 Transformación del ectodominio GP5 del aislado viral en el promotor P_{AOX1}

Para la estrategia de transformación de *Pichia pastoris* con el ectodominio de GP5 de un aislado viral, la integración por recombinación homóloga con el vector pPICZα B se dirigió a un promotor inducible del gen alcohol oxidasa (P_{AOX1}). Para ello, la transformación se realizó en la cepa silvestre X-33 de manera independiente, con las cuatro construcciones diseñadas para el ectodominio de GP5 clonadas en el vector pPICZα B, así como del vector vacío. De igual manera, el análisis genotípico de la integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura se verificó por PCR punto final, utilizando los cebadores de las secuencias 5' y 3' AOX1 propias del vector. Dicho análisis se realizó a diez colonias por construcción y cuatro del vector vacío; como control positivo se usó la cepa X-33, debido a que con estos iniciadores AOX1 5'/3' se amplifica el gen de la enzima alcohol oxidasa con un peso molecular de 2.2kb.

Se obtuvieron líneas transformadas de *P. pastoris* con la construcción ectoGP5-pPICZα B para cada una de las construcciones diseñadas, así como del vector vacío; como se muestra en la Fig. 15, se observaron las bandas con el peso molecular correspondiente al producto de la amplificación con los cebadores AOX1 5'/3' en cada construcción. En la imagen D), para la construcción Cys-L-GP5 se mostró que una de las diez colonias amplificó una banda de 2.2kb correspondiente al gen del alcohol oxidasa y no la banda de 894pb correspondiente al gen con el ectodominio de GP5. La reacción de PCR se corroboró con la amplificación de la banda de 2.2kb del control positivo X-33 y la falta de amplificación del agua, como control negativo.

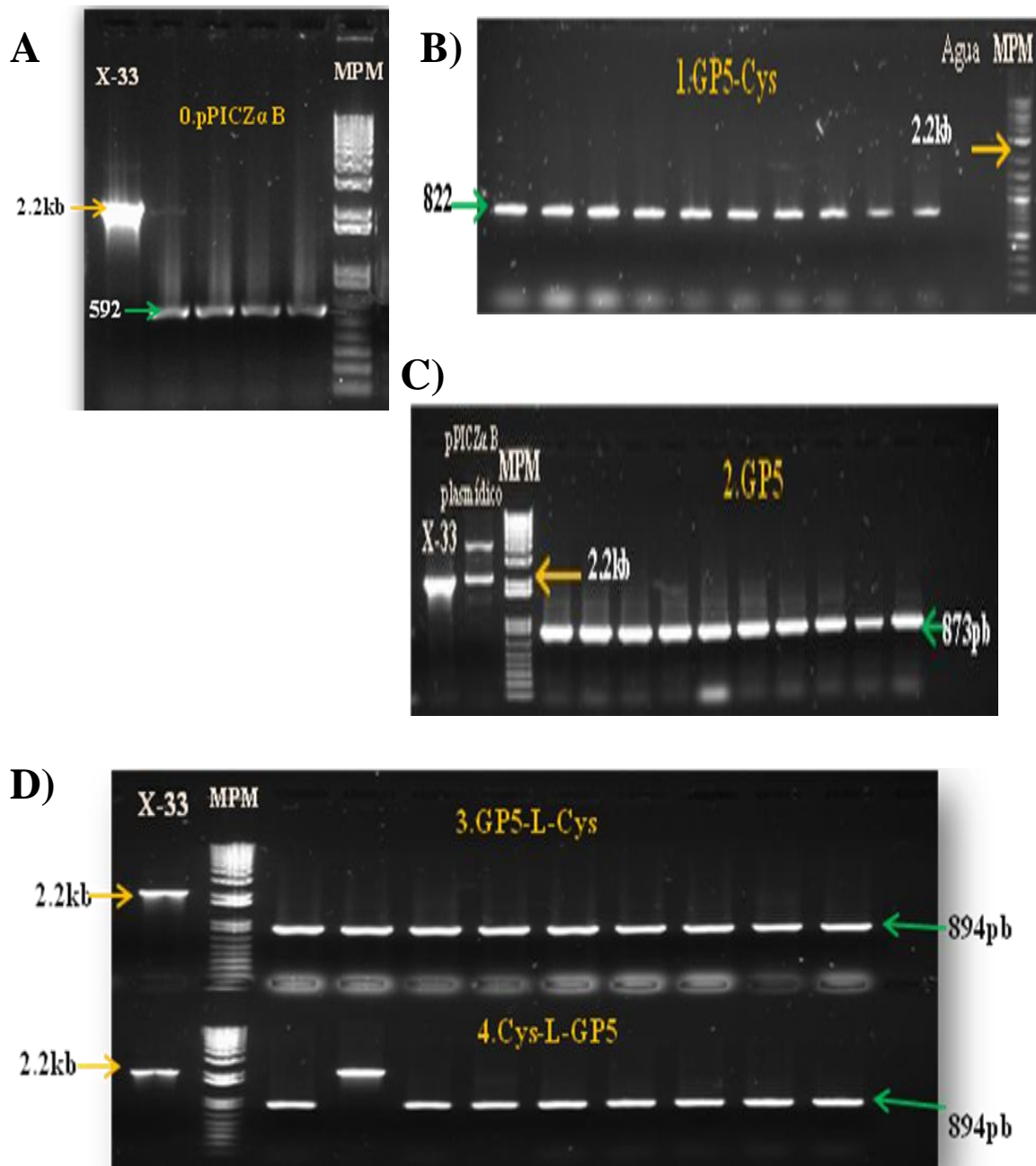


Figura 15. Análisis del genotipo de las transformantes con el ectodominio GP5 en el promotor P_{AOX1} . A) Análisis de las transformantes con el vector vacío (592pb); B) Análisis de las transformantes con el plásmido pGP5Cys (822pb); C) Análisis de las transformantes con el plásmido que contiene únicamente a GP5 (873pb). D) Análisis de las transformantes con el plásmido GP5-L-Cys y con Cys-LGP5 (894pb); MPM: 2 Log para las imágenes B y D y 1kb PLUS ladder para las imágenes A y C.

VII.2.1.2.1 Manifestación fenotípica del gen alcohol oxidasa

La inserción dirigida al promotor inducible P_{AOX1} se manifestó en el fenotipo de la levadura, lo que nos indicó si el gen *aox1* cromosómico no se afectó durante una recombinación simple. El fenotipo de la colonia transformada se indica en Mut^+ cuando esta fue capaz de crecer tanto en medio con glucosa (represivo) como en medio con metanol (inductivo); cuando solo fue capaz de crecer en glucosa se indica como fenotipo Mut^S . Bajo este concepto, en el análisis fenotípico de la Fig. 16 se mostró que todas las colonias, con excepción de la 8 para la construcción GP5-L-Cys, presentaron un fenotipo Mut^+ ; como control positivo se utilizó la cepa X-33 para comparar el fenotipo Mut^+ .

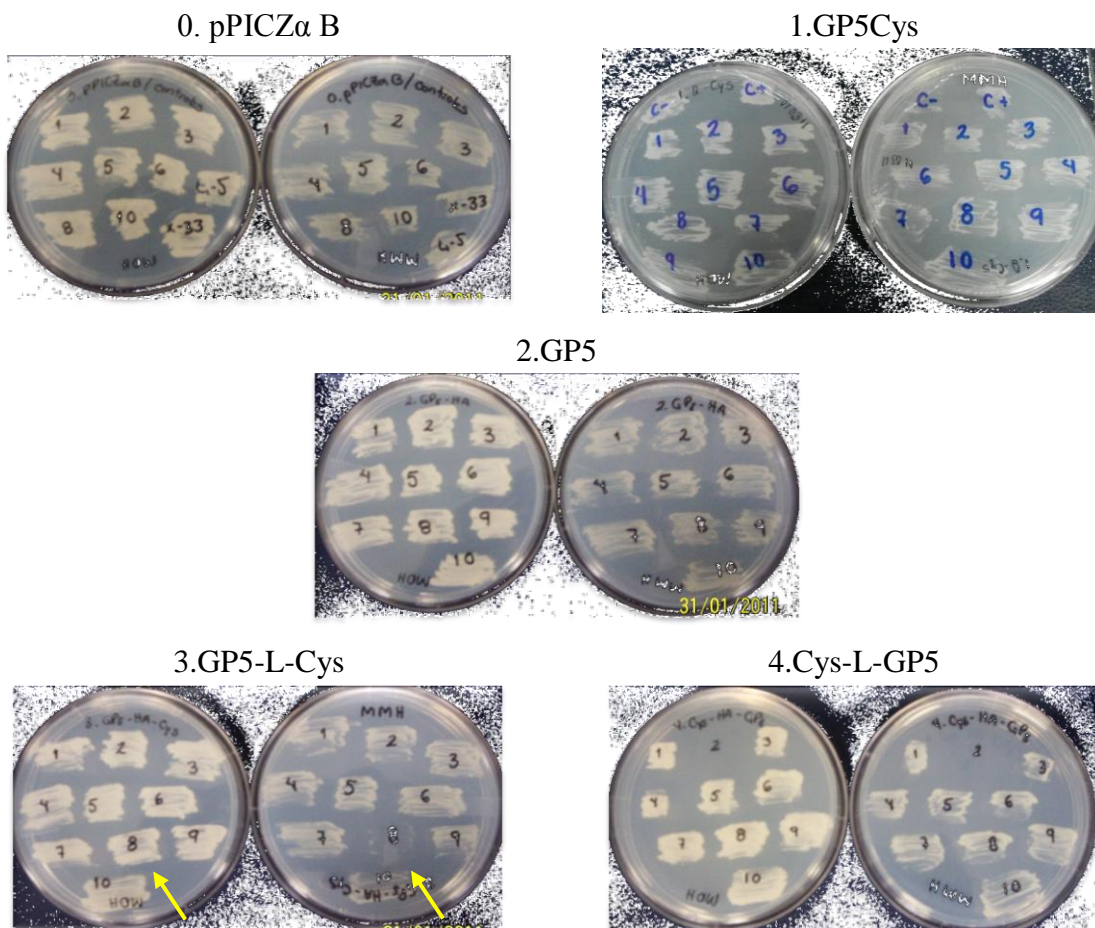


Figura 16. Análisis del fenotipo de las transformantes con el ectodominio GP5.

0) Análisis de las transformantes con el vector vacío y control positivo; 1) Análisis de las transformantes con el plásmido pGP5Cys; 2) Análisis de las transformantes con el plásmido que contiene únicamente a GP5. 3) Análisis de las transformantes con el plásmido GP5-L-Cys. 4) Análisis de las transformantes con el plásmido Cys-LGP5. Medio con glucosa: lado izquierdo. Medio con metanol: lado derecho.

VII.3 Expresión de la proteína GP5 del VSRRP en dos modelos.

La producción de la proteína recombinante GP5 del VSRRP adicionada con una cisteína que pueda estar disponible para conjugación química se llevó a cabo en dos modelos de expresión, *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*, bajo diferentes promotores. En el caso de *P. pastoris* se buscó expresar la proteína con el ectodominio GP5 utilizando al metanol como inductor, así como la producción de la proteína GP5 de la cepa vacunal de manera constitutiva. Para *E. coli*, se expresó la proteína GP5 de la cepa vacunal en presencia de IPTG. La presencia de la proteína madura en ambos modelos de expresión se determinó por anticuerpos a través de la etiqueta de histidinas presente en el carboxilo terminal.

VII.3.1 Expresión en *Pichia pastoris* bajo dos promotores.

El sistema de expresión basado en *Pichia pastoris* permite expresar proteínas heterólogas de forma inducible (P_{AXO1}) o constitutiva (P_{GAP}) con la opción de ser secretadas al medio extracelular con un mínimo de proteínas nativas de la levadura. En base al promotor del gen *aox1*, se expresó el ectodominio de GP5 de un aislado viral, tanto en medio rico como en medio mínimo, en presencia de metanol como inductor. Mientras que con el promotor del gen *gap*, se expresó la proteína GP5 (sin péptido señal) de la cepa vacunal ResPRRS_MLV de manera constitutiva. Para cada una de las estrategias se realizaron cinéticas de expresión, las cuales se describen en los siguientes dos apartados, con sus respectivos análisis.

VII.3.1.1 Expresión del ectodominio GP5 modificado en presencia de metanol.

El proceso de inducción en presencia de metanol para la expresión de la proteína con el ectodominio GP5 de un aislado viral modificado con una cisteína en *P. pastoris*, se llevó a cabo en dos fases: 1) generación de biomasa celular en un medio con glucosa como represor y 2) la inducción en un medio con metanol como inductor. La variante del medio rico o medio mínimo se modificó en la fase 2 del proceso de inducción; el medio mínimo carece de hidrolizados peptídicos. Se realizaron cinéticas de expresión a colonias de fenotipo Mut⁺ para determinar el tiempo óptimo de expresión de la proteína; las colonias se seleccionaron en base

a su densidad óptica, ya que se ha asociado el crecimiento de la levadura con la expresión de la proteína recombinante (Cereghino y Cregg, 2000).

1) **Medio Rico (BMMY)**

En los análisis de expresión con metanol realizados a transformantes de *P. pastoris* con el ectodominio de GP5, se consideró trabajar primeramente con la colonia 7 del gen GP5-L-Cys que posee una cisteína acoplada en el extremo carboxilo de la proteína madura; debido a que fue la colonia que obtuvo mayor densidad óptica como cultivo madre. La cinética de expresión con 1% de metanol como inductor se analizó cada 12h hasta las 96h en medio rico, tanto en la fracción del medio como en el lisado celular; el patrón de las proteínas presentes en ambas fracciones se observó en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS (SDS-PAGE al 15%), mientras la detección de la proteína ectoGP5 se determinó a través del reconocimiento por anticuerpos de la etiqueta de seis histidinas (His₆ tag) presentes en el extremo carboxilo de la proteína madura.

En la Figura 17, se observó en la fracción del medio extracelular (muestras previamente liofilizadas) que mediante el análisis de proteínas secretadas con tinción de Coomasie no se observó la banda de 16.5KDa correspondiente al peso molecular de la proteína ectoGP5-L-Cys en ninguno de los tiempos de inducción; no obstante, mediante la detección de His₆ tag se observó reconocimiento a partir de las 24h, a un peso molecular de aproximadamente 25 - 27KDa, la cual se encuentra por arriba del peso estimado para la proteína. Del mismo modo, se realizó el análisis de la presencia de la proteína en el lisado celular, donde se observó que no hubo reconocimiento por anticuerpos en ninguno de los tiempos de inducción.

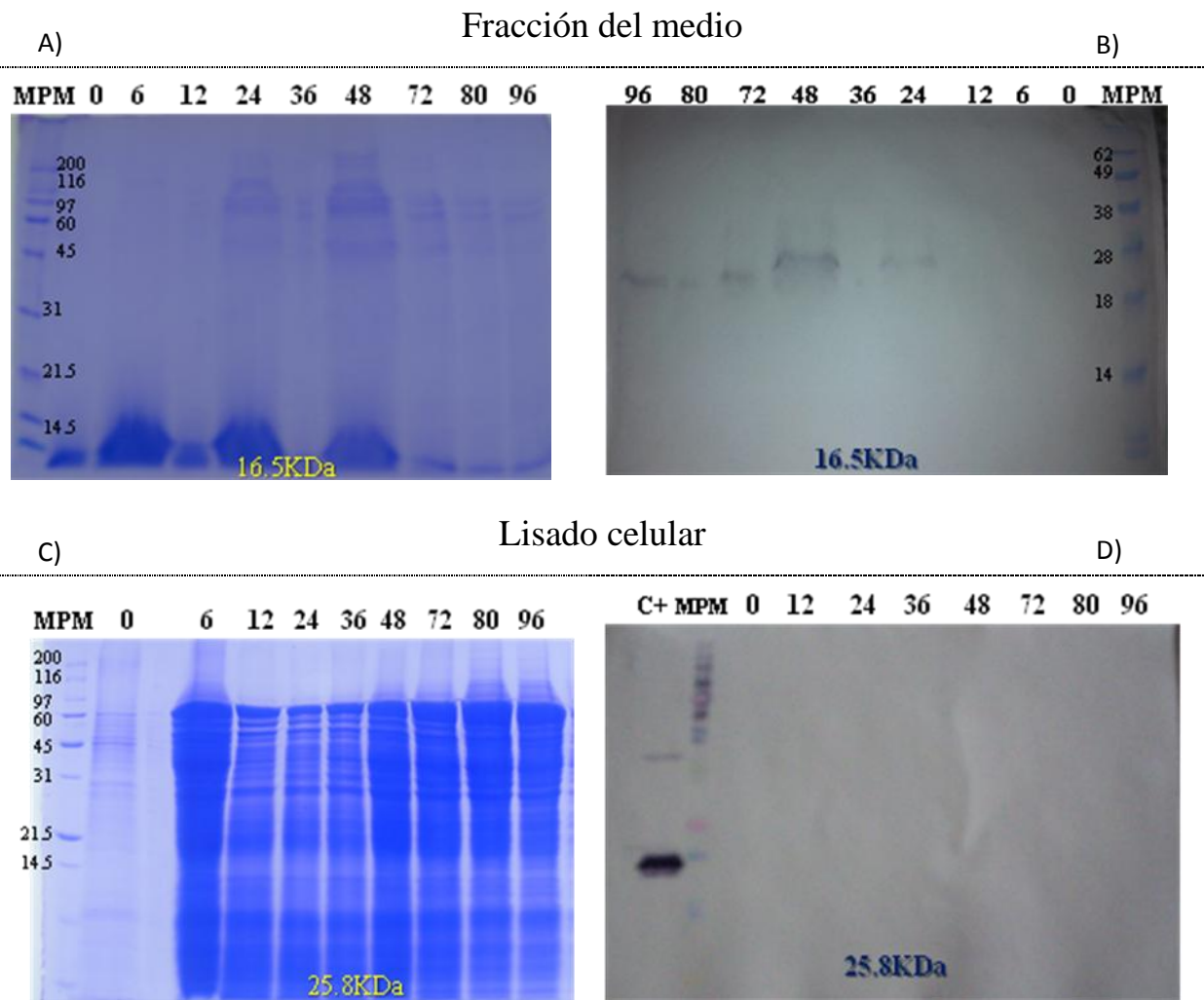


Figura 17. Análisis de la expresión en *P. pastoris* de ectoGP5-L-Cys en medio rico.

A) Análisis de la fracción del medio extracelular por tinción de Coomasie; B) Análisis de la fracción del medio extracelular por Western blot; C) Análisis del lisado celular por tinción de Coomasie. D) Análisis del lisado celular por Western blot. C+: proteína recombinante positiva a His₆ tag.MPM SDS-page con Tinción de Coomasie: Broad Range. MPM Western blot: B) See Blue; D) kaleidoscope.

Se amplió el análisis de la expresión de la proteína con el ectodominio de GP5 a otras colonias transformadas; para ello, se consideró una colonia control GP5 y dos colonias GP5-L-Cys, en las cuales se indujo la expresión con 0.5% de metanol como inductor cada 24h hasta las 96h en medio rico, se monitoreó el crecimiento por densidad óptica a 600nm y el patrón de proteínas en el medio extracelular por SDS-PAGE al 15% con tinción de Coomasie. En la Figura 18, se observó que durante la inducción en medio rico hubo un crecimiento celular de

una $OD_{600} \leq 2$ a $OD_{600} \leq 10$ en las primeras 24h p.i., aumentando dos unidades cada 24h hasta una $OD_{600} \leq 10$ a las 96h p.i., mostrando un patrón similar para cada una las colonias analizadas; sin embargo, no se observó en el gel SDS-PAGE al 15% con tinción de Coomassie un patrón de proteínas secretadas al medio en ninguno de los tiempos de inducción.

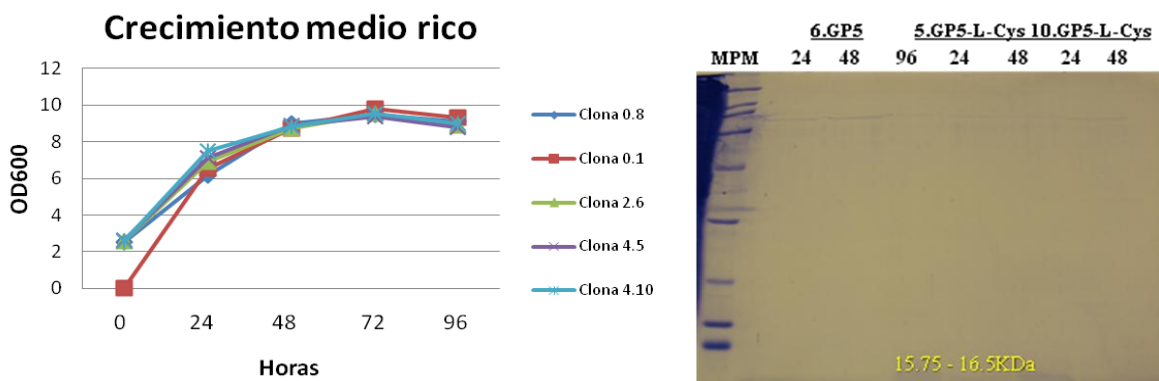


Figura 18. Cinética de crecimiento en medio rico con metanol.

2) Medio mínimo (MMY)

Con fin de cuantificar la cantidad de proteína presente en el medio extracelular, se realizó una cinética de expresión en medio mínimo con metanol como inductor, utilizando dos colonias transformadas con cada construcción diseñada, una colonia con el vector vacío y la cepa silvestre X-33 sin transformar. La cinética se monitoreó cada 24h hasta las 96h por densidad óptica a 600nm, se analizó la expresión génica por RT-PCR a los tiempos de 0, 24 y 48 p.i., se cuantificó la cantidad de proteína total secretada al medio por el método de Bradford y finalmente se determinó la presencia de la proteína madura en el medio extracelular a los tiempos de 0, 24 y 48 p.i. a través del reconocimiento por anticuerpos de la etiqueta de seis histidinas (His_6 tag) presente en el extremo carboxilo de la proteína madura.

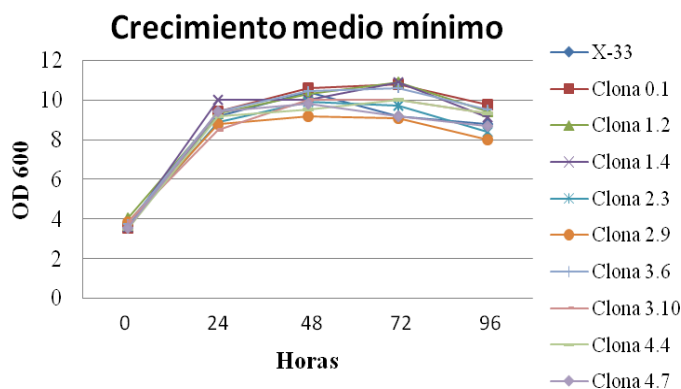


Figura 19. Cinética de crecimiento en medio mínimo con metanol.

En la Figura 19, se observó que durante la inducción hubo un crecimiento celular de una $OD_{600} \leq 1$ a $OD_{600} \leq 9$ en las primeras 24h p.i., aumentando una unidad cada 24h hasta una $OD_{600} \leq 12$ a las 96h p.i., observándose un patrón similar para cada una de las colonias analizadas.

A su vez, el análisis del transcrito por RT-PCR mostró expresión del mensajero con los pesos moleculares esperados durante la amplificación para las colonias transformadas con el ectodominio de GP5 a los tiempos 24 y 48 p.i.; en algunos casos, hubo amplificaciones en tiempo 0h p.i., aunque se descartó la presencia de material genómico; mientras, en el vector vacío y X-33 no se mostró amplificación en ninguno de los tiempos, tal como se esperaba. Los productos de las amplificaciones del cDNA (Fig. 20) se observaron en un gel de agarosa; como control positivo se utilizó el ADN plasmídico de las colonias transformadas en *E. coli*.

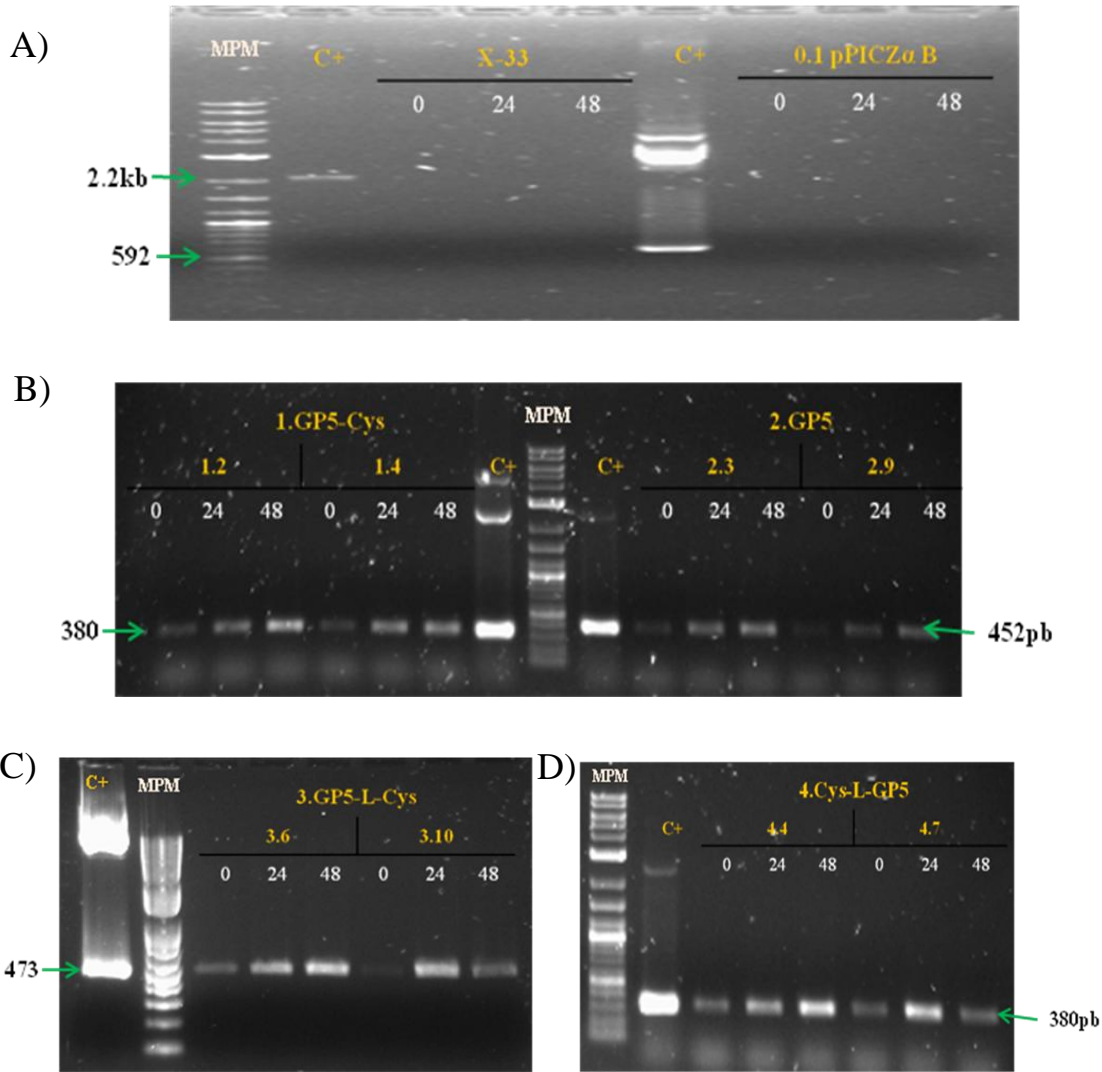


Figura 20. Análisis de la expresión génica por RT-PCR durante la cinética de expresión de la proteína recombinante. A) Análisis del cDNA de X-33 sin transformar y la colonia 0.1 del vector vacío; B) Análisis del cDNA de las colonias 2 y 4 de la construcción GP5Cys (380pb) y de las colonias 3 y 9 de la construcción de GP5; C) Análisis del cDNA de las colonias 6 y 10 de la construcción GP5-L-Cys (473pb); D) Análisis del cDNA de las colonias 4 y 7 de la construcción Cys-LGP5 (380pb); MPM: 2 log.

Para la concentración de proteína secretada al medio, no fue posible obtener lecturas de absorbancia mayores al punto más bajo de la curva (0.05 mg/ml) durante las 96h de inducción en todas las construcciones con el método de Bradford (Fig. 21); a su vez, no se mostró un patrón similar en las diferentes colonias analizadas así como en los tiempos de inducción en cada una de ellas.

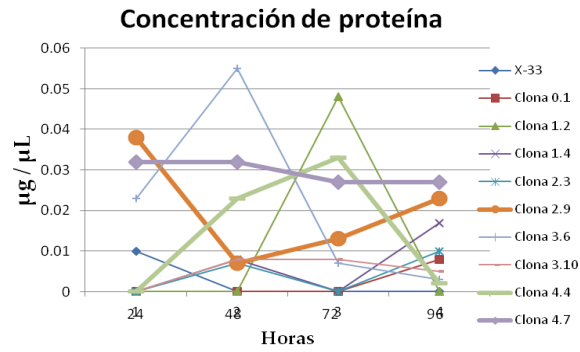


Figura 21. Cuantificación de proteína en medio mínimo con metanol.

Fracción del medio

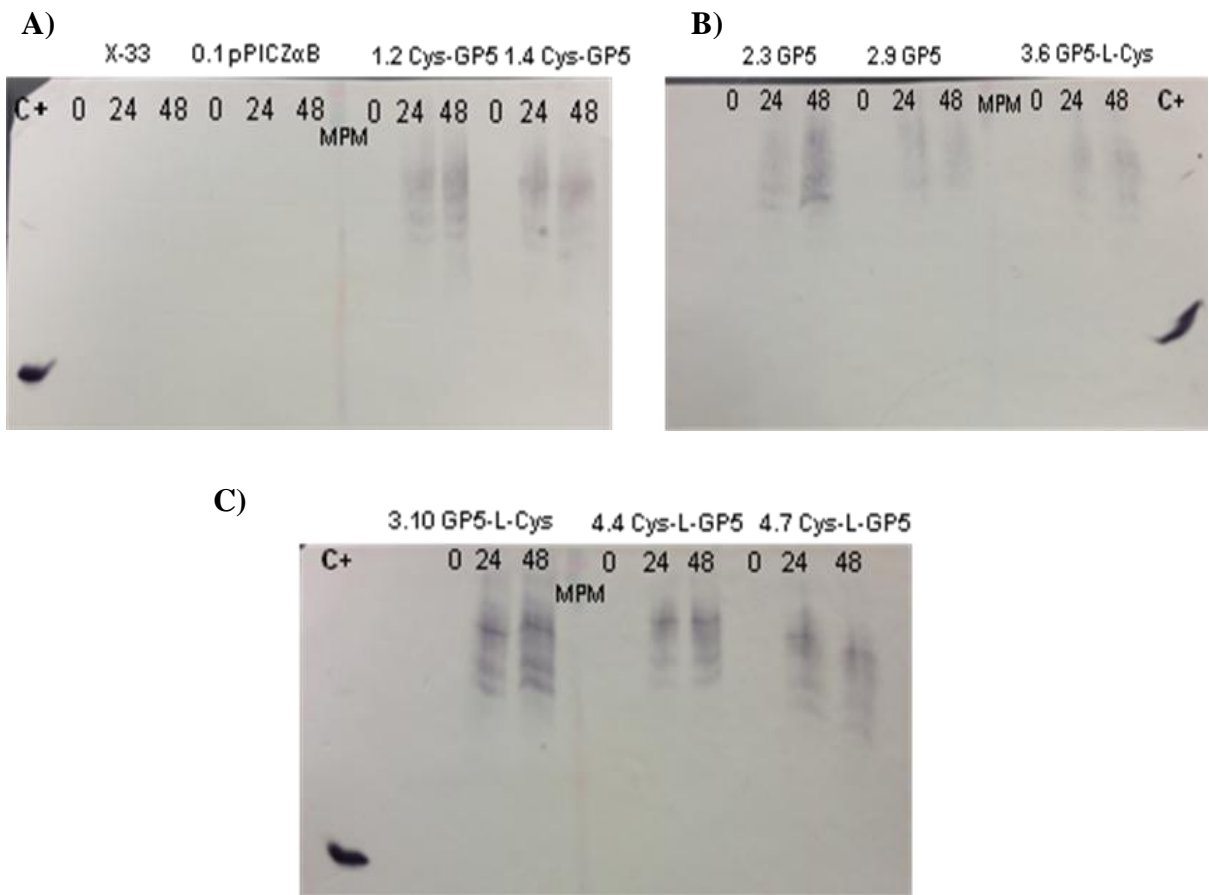


Figura 22. Reconocimiento de la proteína madura del ectodominio GP5 por Western blot en *P. pastoris*. Para cada una de las muestras se analizaron los tiempos 0, 24 y 48 p.i. A) La cepa X-33 sin transformar, el vector pPICZαB y dos clonas de la construcción GP5-Cys; B) Dos clonas de la construcción con solo GP5 y una clona de GP5-L-Cys; C) Una clona de la construcción GP5-L-Cys y dos clonas de Cys-L-GP5; C+ es una proteína recombinante reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-His6X; MPM: Kaleidoscope.

Finalmente, el análisis de la proteína madura (Fig. 22) por Western blot a los tiempos de 0-48h p.i. mostró un reconocimiento específico a la etiqueta de histidinas en las clonas que deberían expresar la proteína de interés únicamente a 24 y 48h p.i., observando ausencia de reconocimiento en los tiempos 0h p.i. y en todos los tiempos correspondientes a la cepa X-33 sin transformar o transformada con el vector vacío. Como control positivo del ensayo de Western blot, se incluyó una proteína recombinante que contiene una etiqueta de histidinas que también fue reconocida por el anticuerpo utilizado. A pesar de que el tratamiento de las muestras liofilizadas no permitió determinar el peso molecular de la proteína, se supuso que es de mucho mayor peso de lo esperado para la proteína con el ectodominio de GP5 en sus diferentes versiones.

Existen varios parámetros que pudieron haber afectado la expresión del ectodominio GP5 del VSRRP bajo el control transcripcional del P_{AOX} en *P. pastoris*. Algunos de ellos son propios de la levadura, otros están relacionados con la naturaleza de la proteína y otros con parámetros que influyen en el proceso de inducción; sin embargo, muchos fueron considerados en el diseño de la secuencia de la proteína y otros durante la manipulación de *P. pastoris*. Dentro de los problemas intrínsecos del sistema de expresión, se consideró que las colonias tuvieran el mismo fenotipo Mut⁺ que la cepa silvestre X-33; se dirigió la recombinación homóloga al gen *aox1* en el genoma de la levadura linearizando en dirección 5' con la enzima SacI; sin embargo; la secuencia señal de secreción en ocasiones es una limitante cuando la proteína no es plegada correctamente, lo que la hace susceptible a proteasas endógenas de la levadura (Porro y col., 2005). Con respecto a la naturaleza de la proteína, se optimizaron las secuencias del ectodominio GP5 con el uso de codones para *P. pastoris*, aunque existen factores como el contenido de GC/AT o el grado de toxicidad de la proteína en la levadura, la estabilidad que pueda tener el ARNm, así como las modificaciones post-traduccionales requeridas para GP5 como las *N*-glicosilaciones (Gillisen G., 2000). No obstante, los parámetros en el proceso de inducción están más relacionados con el metabolismo del metanol, ya que éste genera subproductos tóxicos para la célula, además de la toxicidad intrínseca del metanol *per se* cuando éste se encuentra a elevadas concentraciones (Poutou y col., 2005). Es por ello que se debe precisar la velocidad de crecimiento de la

levadura con la adición del metanol, de tal manera que no perjudique la viabilidad celular y que asegure la expresión óptima de la proteína.

VII.3.1.2 Expresión de la proteína GP5 modificada de la cepa vacunal.

De manera alternativa a la expresión del ectodominio GP5 modificado, se expresó la proteína GP5 de la cepa vacunal ResPRRS_MLV adicionada con una cisteína para conjugación química en *P. pastoris* bajo un promotor constitutivo como es el gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa (P_{GAP}). Este promotor permitió que se llevara a cabo la expresión sin la variable del metanol como fuente de carbono inductora, pudiendo utilizar una fuente de carbono común como glucosa. En el apartado VII.2.1.1 se indicó que la transformación de las cepas X-33 y SMD1168 sólo se había realizado con el gen control GP5 sin modificación con cisteína, para fines de determinar en principio si la levadura fue capaz de expresar la proteína GP5 de la cepa vacunal en su forma nativa.

Para ello, se realizó una cinética de expresión utilizando una colonia X-33 y una SMD1168H transformada con GP5, así como las mismas cepas sin transformar como controles. El crecimiento de las levaduras se monitoreó cada 24h hasta las 96h por densidad óptica a 600nm, tal como se muestra en la Figura 23, donde se observó que durante la cinética de expresión hubo un crecimiento celular de una $OD_{600} \leq 1$ a $OD_{600} \leq 11$ en las primeras 48h a 72h. La cepa control SMD1168H alcanzó su densidad máxima a las 48h de $OD_{600} \leq 11$, mientras que la cepa X-33 y las transformadas con GP5 alcanzaron su máxima densidad a las 72h de $OD_{600} \leq 10$, que disminuyó a las 96h a una $OD_{600} \geq 9$.

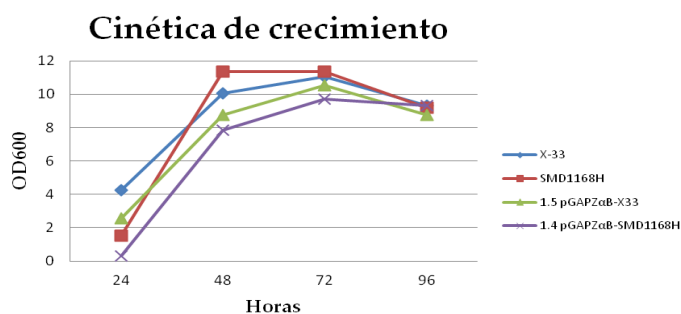


Figura 23. Cinética de crecimiento en medio constitutivo.

Se determinó directamente la presencia de la proteína madura por Western blot a los tiempos de 48, 72 y 96h. En la Fig. 24, se observó que no hubo reconocimiento de la etiqueta de histidinas en las proteínas secretadas al medio extracelular o en el lisado celular; como control positivo se utilizó la misma versión de la proteína GP5 expresada en *E. coli*. Este resultado demostró que no fue posible expresar la proteína GP5 nativa de la cepa vacunal sin modificación bajo un promotor constitutivo en *Pichia pastoris*.

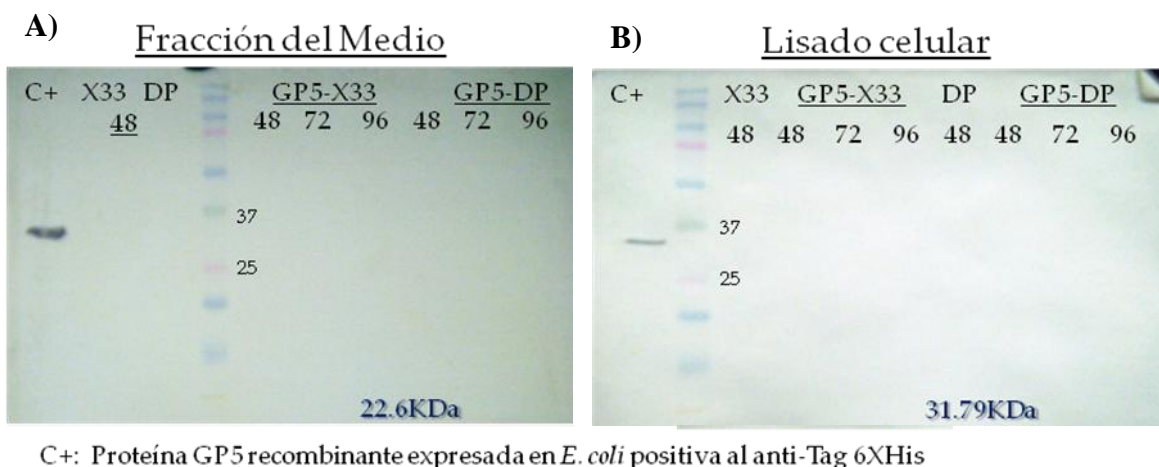


Figura 24. Reconocimiento de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en *P. pastoris*. Para cada una de las muestras se analizaron los tiempos 48, 72 y 96h. A) Análisis de la fracción del medio extracelular; B) Análisis del lisado celular. C+: proteína recombinante positiva a His₆ tag.MPM: Kaleidoscope.

Actualmente, sólo se cuenta con un antecedente de expresión en *P. pastoris* de un antígeno del VSRRP. Éste fue reportado por Quian y col., en 2006, al expresar la proteína de matriz del VSRRP en la cepa GS115 bajo un sistema inducible (pPICZα A). De igual manera, se dirigió la recombinación homóloga al gen *aox1* linearizando en 5' con la enzima SacI, la inducción de la expresión de M se realizó en medio rico a una concentración de 0.5-1% de metanol como inductor y se determinó que el tiempo óptimo de expresión fue a las 84h p.i. y la proteína secretada al medio extracelular tuvo una concentración de 2mg/ml. Otro sistema eucariótico utilizado en la expresión de GP5 fue el reportado por Chia y col. en 2010, donde expresaron la proteína GP5 de un aislado viral en *Nicotiana tabacum* vía agroinfección. En su estrategia de expresión, adicionaron una etiqueta de retención en retículo endoplasmático (RE)

específico para plantas en la región C-terminal de la proteína, que incrementa el tiempo de GP5 en el RE. La proteína GP5 se obtuvo del homogenizado de hojas de tabaco a una concentración de 1.2mg/ml de proteína total soluble.

Una de las ventajas de los sistemas eucarióticos se relaciona con las modificaciones post-traduccionales que se realizan a la proteína, en especial las N-glicosilaciones de alta manosa en los sitios del ectodominio de la proteína GP5; sin embargo, Ansari y col., en 2006 indicaron que la presencia de estos azúcares en la proteína GP5 ayudan al VSRRP en la evasión del sistema inmune; al igual que Owstrosky y col, en 2002, Ansari y col., en 2006 y Mateu y Díaz en 2007 han propuesto que la ausencia de N-glicanos en GP5 expone estéricamente al epítipo neutralizante y mejora el reconocimiento por linfocitos B. Esto respalda el hecho de utilizar sistemas procarióticos que carecen de modificaciones post-traduccionales para expresar la proteína GP5 del VSRRP.

VII.3.2 Expresión en *Escherichia coli* de GP5 modificada de la cepa vacunal.

El sistema de expresión pET es uno de los más utilizados para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Yin y col., 2007). En base a esto y como alternativa al sistema de expresión realizado en *P. pastoris*, se clonó la secuencia GP5 de la cepa vacunal ResPRRS_MLV corriente abajo del promotor T7 del vector pET102/D-TOPO (Invitrogen) y se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3). La expresión de la proteína GP5 de ResPRRS_MLV, modificada con una cisteína para conjugación química, se llevó a cabo en presencia de Isopropil- β -D tioglactopiranosido (IPTG); este inductor se une a la proteína codificada por el gen *lacI*, liberando al promotor *lacUV5* para que se sobre-exprese la ARN polimerasa y se transcriban los genes que se encuentren corriente abajo del promotor T7 (Serrano y Sainz, 2005; Corona y col., 2009).

En primera instancia, se realizó una expresión piloto en una colonia transformada con GP5 (sin modificación) de la cepa vacunal y una colonia transformada con el vector pET102/D/*LacZ* como control positivo. La cinética de expresión con IPTG como inductor se

realizó cada hora hasta las 6h p.i. a 37°C y se verificó la presencia de la proteína por anticuerpos que reconocen la etiqueta de seis histidinas (His₆ tag) presente en el extremo carboxilo de la proteína madura. En la Fig. 25, se observó en el gel SDS-PAGE al 12% mediante tinción Coomasie (Imagen A) el patrón de proteínas del extracto celular de *E. coli* a diferentes tiempos de inducción para ambas proteínas, destacando en la parte superior derecha del gel a 133KDa la proteína β-galactosidasa del vector pET102/D/LacZ; la proteína GP5 no pudo observarse con claridad a 36KDa; sin embargo, por la técnica de Western blot (Imagen B) se pudo reconocer la proteína en todos los tiempos de inducción, así como la β-galactosidasa. Esto demuestra que las condiciones de inducción permitieron la expresión de la proteína GP5 clonada en pET102/D-TOPO en la cepa BL21(DE3).

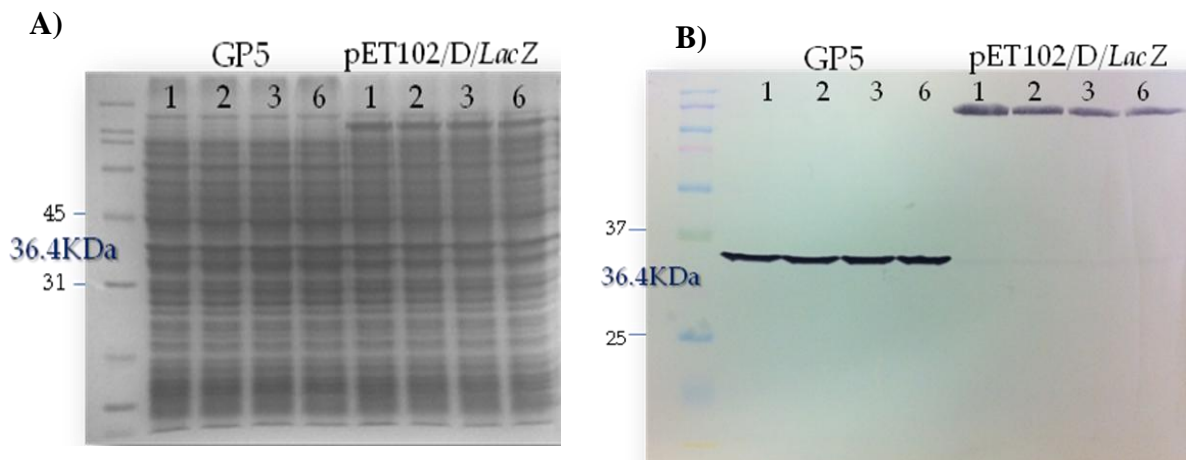


Figura 25. Expresión piloto de la proteína GP5 ResPRRS_MLV en *E. coli*. Se analizaron los tiempos 1, 2, 3 y 6 p.i. A) Análisis de la expresión de GP5 por SDS-PAGE al 12%; B) Análisis de la expresión de GP5 por Western blot; MPM: Broad range (SDS-PAGE), Kaleidoscope (Western blot).

Lo siguiente, dentro de la estrategia de expresión en *E. coli*, fue determinar el tiempo óptimo de expresión de la proteína GP5 de la cepa vacunal modificada con cisteínas en sus diferentes versiones. Se realizó una cinética de inducción con tiempos de 0, 1, 2, 3 y 6h para la proteína GP5; mientras para GP5 modificada con una cisteína se analizó a 0 y 4h. El patrón de proteínas de los extractos celulares se analizó con un gel SDS-PAGE al 12% (Fig. 26, A), sin poder determinar claramente la presencia de la proteína, mientras que con la técnica de

Western blot (Fig. 26, B) se demostró la expresión hasta las 4h p.i., siendo este tiempo óptimo de expresión de GP5.

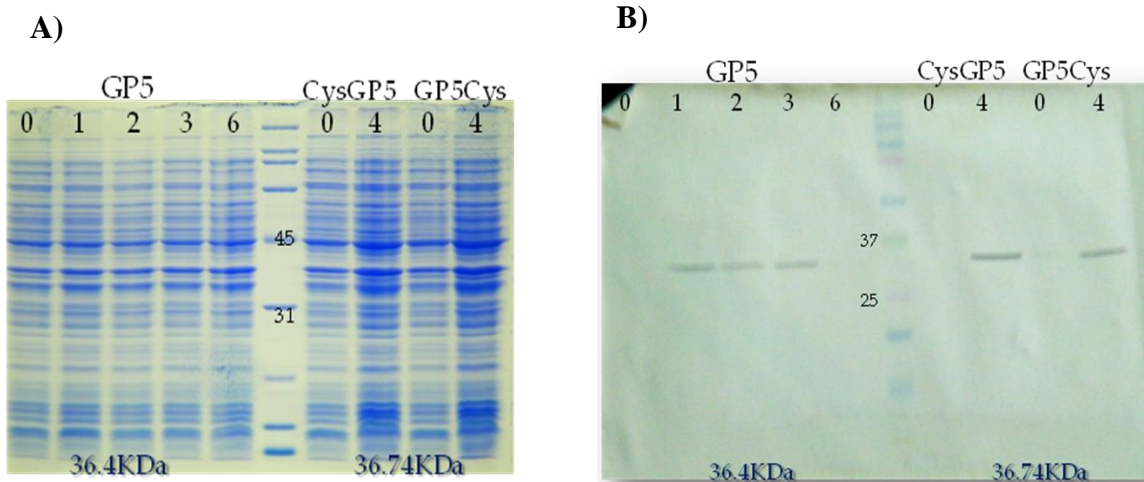


Figura 26. Cinética de expresión de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en *E. coli*. A) Análisis de la expresión de GP5 modificada por SDS-PAGE al 12%; B) Análisis de la expresión de GP5 modificada por Western blot; MPM: Broad range (SDS-PAGE), Kaleidoscope (Western blot).

VII.3.2.1 Localización celular de la proteína GP5 modificada en *E. coli*.

En el proceso de expresión de proteínas recombinantes, existen mecanismos que determinan la forma de obtener la proteína en *E. coli*, ya sea en forma soluble o contenida en cuerpos de inclusión (Singh y Panda, 2005; Yin y col., 2007). Por ello, se determinó por Western blot la localización de la proteína GP5 expresada en presencia de IPTG para cada una de las versiones diseñadas. En la Fig. 27, se pudo observar que la proteína expresada es obtenida exclusivamente en cuerpos de inclusión; como control positivo, se utilizó la misma versión de la proteína GP5 de la expresión piloto en *E. coli* (Fig. 25).

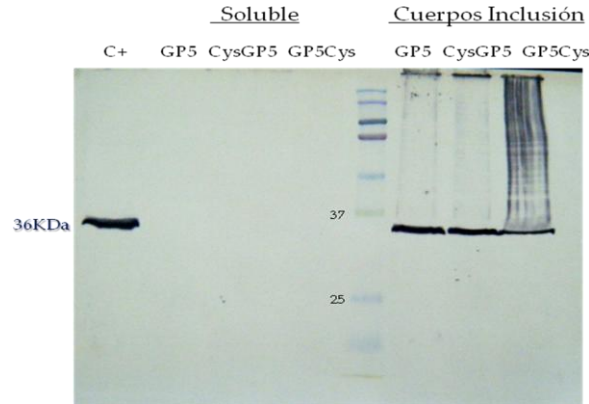


Figura 27. Localización celular de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por Western blot en *E. coli*. Del lado izquierdo se encuentran las proteínas que corresponden a la fracción soluble del extracto celular, mientras que del lado derecho se localizan los cuerpos de inclusión contenidos en la fracción no soluble; C+ es una proteína recombinante reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-His6X; MPM: Kaleidoscope.

VII.3.2.2 Purificación parcial por cromatografía de afinidad.

El procedimiento a seguir después de determinar la expresión de la proteína en *E. coli*, fue la purificación de la proteína GP5 modificada con cisteínas a través de la afinidad que tiene el grupo imidazol de las histidinas del extremo carboxilo de la proteína con la molécula de Níquel 2^+ . La técnica de cromatografía de afinidad con una columna de Ni^{2+} HisTrap™ High purification permitió purificar la proteína GP5 modificada de manera parcial, con perspectivas de ser purificada en su totalidad. En la Fig. 28, se muestran los geles de poliacrilamida al 12% con tinción de Coomasie para cada una de las proteínas GP5 expresadas en *E. coli*, donde se observó que en las eluciones 1 (E1) y 2 (E2) es donde se obtuvo mayor cantidad de proteína purificada a diferencia de las demás eluciones; esto es consistente en las purificaciones de las tres versiones de la proteína GP5 que se generaron.

Existen reportes donde se ha purificado la proteína GP5 a partir de cuerpos de inclusión a través de electroelución (Gonin y col., 2009) o purificación directa del gel SDS-PAGE (Ren y col., 2009), lo que indica que, aunado a la purificación por cromatografía de afinidad, es

necesario realizar purificaciones que permitan obtener un mayor rendimiento de la proteína purificada y que mantenga una conformación adecuada para la conjugación química.

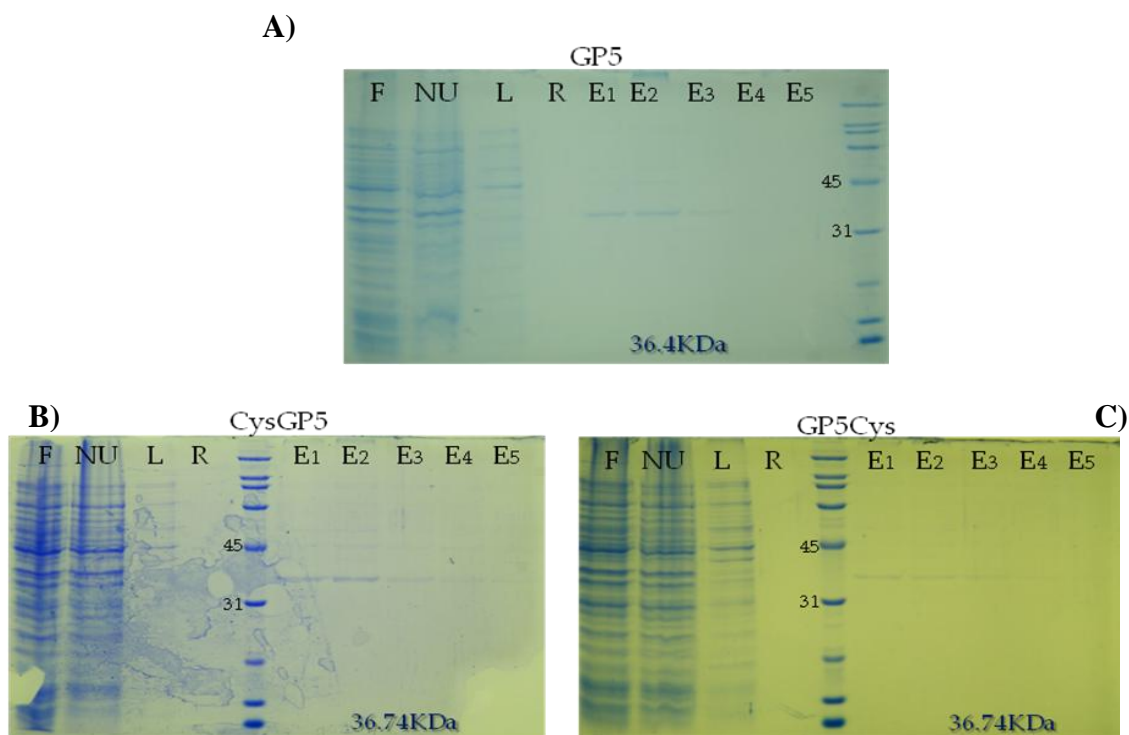


Figura 28. Purificación parcial de la proteína madura de GP5 ResPRRS_MLV por cromatografía de afinidad. A) Purificación de la proteína GP5 nativa; B) Purificación de la proteína CysGP5; C) Purificación de la proteína GP5Cys. **F:** filtrado. **NU:** Fracción no-unida. **L:** Fracción de lavado. **R:** Fracción de replegamiento. **E:** Elución. MPM: Broad range (SDS-PAGE).

Escherichia coli ha sido el único modelo de expresión bacteriano en la producción de la proteína GP5 nativa o fracciones de ella. Entre los trabajos que ya se encuentran reportados para la expresión de GP5 recombinante en *E. coli*, la cepa más utilizada es BL21 (DE3) bajo diferentes promotores; independientemente del sistema utilizado, se ha observado que la expresión de GP5 se obtiene en cuerpos de inclusión. Estos agregados se asocian al estrés celular que se presenta cuando la bacteria se ve forzada a producir la proteína de interés en concentraciones elevadas, lo que conlleva a la acumulación en forma de agregados insolubles (Singh y Panda, 2005). Dentro de las formas posibles de prevenir la formación de cuerpos de inclusión, se encuentra la expresión de la proteína de interés asociada a una proteína de fusión (Carrio y Villaverde, 2002). Sin embargo, en la expresión de GP5 se han encontrado

resultados que difieren del concepto de solubilidad que ofrecen las proteínas de fusión; aun así, dicha asociación confiere estabilidad y un aumento en el rendimiento de expresión y purificación de GP5.

Pirzadeh y Dea en 1997 lograron expresar en BL21(DE3) la proteína GP5 del VSRRP utilizando los sistemas pET21a(+) y pGEX 4T₁; a diferencia del vector pET21a(+), el vector pGEX 4T₁ contiene el gen para Glutathion S-transferasa (GST) como proteína de fusión. En ambos sistemas, la proteína GP5 recombinante se acumuló dentro de la célula como cuerpos de inclusión, lo que demostró que la presencia de GST no fue determinante en la solubilidad; sin embargo, sí lo fue en el rendimiento, ya que se obtuvo una mayor producción de la proteína GP5. Estos resultados fueron reproducidos por Gonin y col. en 1999, donde lograron expresar las proteínas GP3, GP4, GP5 y M del VSRRP utilizando el vector pGEX 4T₁ en BL21(DE3), destacando que únicamente la expresión de GP5 recombinante fusionada a GST se obtuvo en cuerpos de inclusión. Otro sistema que contiene a GST como proteína de fusión son los vectores pGEX-6P-1; este vector fue utilizado por Zhou y col. en 2009 y Chen y col. en 2011 para expresar fracciones cortas de la proteína GP5 y la proteína completa, respectivamente. En este trabajo, se expresaron péptidos de entre 9 y 17 aminoácidos sin péptido señal y no se reportó que los péptidos fueran obtenidos de forma soluble o insoluble; por otro lado, el trabajo de Chen y col. reportaron que la expresión de la proteína completa se obtuvo en forma de cuerpos de inclusión, con un rendimiento del 30% del contenido total de proteína.

Algunos sistemas pET utilizados en la expresión de GP5 en *E. coli* pueden o no emplear modelos de fusión. Foss y col. en 2002 clonaron una secuencia del ORF 5 del VR-2332 (30 a 200 aminoácidos) en el vector pET24b y expresaron la proteína en BL21(DE3); este sistema permitió obtener la proteína GP5 en cuerpos de inclusión aún en ausencia de proteínas de fusión, según lo reportado. Los trabajos de Ren y col. en 2009 y Wang y col. en 2011, lograron expresar exitosamente proteínas truncadas de GP5 utilizando sistemas pET que contienen etiquetas de seis histidinas en *N*-terminal; además, Wang y col. expresaron la proteína truncada de GP5 en *E. coli* Rosetta-gamiTM 2(DE3) utilizando como vector el pET-

32a que contiene una etiqueta de tiorredoxina; sin embargo, no se reportaron resultados que demuestren la expresión.

Los resultados reportados en la expresión de GP5 del VSRRP han sugerido que se obtiene principalmente en cuerpos de inclusión aún fusionada a proteínas que otorgan solubilidad en *E. coli*. La importancia de fusionar una etiqueta que confiera estabilidad a la expresión de GP5 se demostró en el trabajo de Lobato en 2011, donde no se logró la expresión del ectodominio GP5, así como la proteína completa de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) en *E. coli* BL21 (DE3) y Rosetta-gami™ 2(DE3), utilizando como vector el pET101/D-TOPO; dicho vector no contiene una proteína de fusión en *N*-terminal. Por lo tanto, estos resultados y los mencionados anteriormente demuestran la importancia de una chaperona en la expresión de la proteína GP5 que incremente la eficiencia en el inicio de la traducción, favorezca un mejor plegamiento de la proteína, otorgue protección contra proteasas intracelulares y, en algunos casos, confiera solubilidad para evitar la formación de cuerpos de inclusión (LaVallie y col., 2003). Tal fue el caso del trabajo de Delgado en 2010, la cual expresó el dominio III de la proteína E del virus del dengue (EDIII) tipos 2 y 4 en *E. coli* BL21(DE3) a través del vector pET102/D-TOPO que contiene una etiqueta de tiorredoxina en *N*-terminal, lo que permitió obtener la proteína recombinante en forma soluble y con un plegamiento adecuado. Por el contrario, cuando el mismo dominio se expresó sin tiorredoxina se localizó en cuerpos de inclusión que, sin embargo, se solubilizaban con bajas concentraciones de guanidina (2M).

Hasta el momento no se tienen reportes de la expresión de GP5 del VSRRP fusionadas a la tiorredoxina en *E. coli*. Los antecedentes de Delgado en 2010 y Lobato en 2011, hacen suponer que la presencia de la tiorredoxina fue un proceso clave en la expresión de la proteína GP5 de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) bajo el sistema pET102/D-TOPO en *E. coli* BL21(DE3), de tal manera que pudo obtenerse en forma de cuerpos de inclusión, como se ha reportado en trabajos con GST, a diferencia de la expresión con el sistema pET101/D-TOPO donde la misma secuencia no pudo ser obtenida. Esto sugiere que podría existir una dependencia por parte de GP5 a estar fusionada a una proteína para lograr ser expresada, debido a su tendencia de formar heterodímeros con la proteína de matriz del VSRRP.

VIII. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron diseños de plásmidos específicos para clonar dos secuencias del gen *gp5* modificado, con una cisteína adicional para fines de conjugación química, en dos modelos de expresión, *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. En el caso de *P. pastoris*, se tiene la región del ectodominio de GP5 de un aislado viral mexicano del VSRRP en pPICZ α B y la secuencia de GP5 de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) sin péptido señal en pPICZ α B y pGAPZ α B. En *E. coli* se clonó la secuencia de GP5 de la cepa vacunal sin péptido señal en el vector pET102/D-TOPO.

Fue posible obtener líneas transformantes con el gen *gp5* del VSRRP modificado con una cisteína en ambos modelos. En *P. pastoris*, se tuvieron líneas transformantes de X-33 en el P_{AXO1} con el ectodominio de GP5 en sus cuatro versiones, todas de fenotipo Mut⁺; también se generaron líneas transformadas en el P_{GAP} con GP5 de la cepa vacunal en X-33 y SMD1168H. En *E. coli* se tienen líneas transformadas de BL21 (DE3) con GP5 de la cepa vacunal.

En *P. pastoris* no se obtuvieron niveles de expresión detectables del ectodominio GP5 modificado de manera inducible en presencia de metanol (bajo el control del P_{AXO1}) y la expresión constitutiva de GP5 de la cepa vacunal (bajo el control del P_{GAP}) fue nula.

Por el contrario, se expresó la proteína GP5 de la cepa vacunal (ResPRRS_MLV) modificada con cisteínas para conjugación química en *E. coli* BL21(DE3) bajo el sistema pET102/D-TOPO en presencia de IPTG a las 4h posterior a la inducción. La proteína se obtuvo en cuerpos de inclusión debido a la fusión con la tiorredoxina en el N-terminal de la proteína.

Se purificaron de manera parcial las tres versiones proteicas de GP5 expresadas en *E. coli* por cromatografía de afinidad a través de la etiqueta de histidinas presente en el C-terminal de la proteína.

Como perspectiva, se tiene que evaluar la disponibilidad de las cisteínas reactivas adicionadas a la proteína GP5 de la cepa vacunal mediante la unión covalente del grupo tiol de las cisteínas al reactivo Maleimida-PEG-biotina, con el fin de analizar si existen diferencias entre la posición de la cisteína adicionada en uno u otro extremo de la proteína de GP5.

Finalmente, se tiene que evaluar, en primera instancia, la inmunogenicidad de la proteína GP5 con suero de ratones inmunizados con la vacuna comercial Ingelvac® PRRS MLV para poder realizar posteriormente los ensayos de conjugación química a una partícula viral como adyuvante.

IX. REFERENCIAS

- Aliahmadi A., Rahmani N., Abdollahi M. (2006). Plant-derived human vaccines; an overview. *International Journal of Pharmacology*. **2**: 268 – 279.
- Ansari I., Kwon B., Osorio F., Pattnaik A. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of virology*. **80**: 3994-4004.
- Arias M., Barceló J., Muñoz A., Sánchez – Viscaíno JM. (Consultado Septiembre 2011). PRRS. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas [online]. <<http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/9/9-prrs.htm>>. ISBN 84-688-1585-3.
- AACP. 2006. Asociación argentina cabañeros porcinos. (Consultado Enero 2012). Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS) y su importancia en la producción porcina [online]. <www.produccion-animal.com.ar>.
- Badillo J., Oliver M., Garibay C., Jiménez C., Molina H. (2009). Manual de laboratorio de ingeniería genética. Instituto politécnico nacional. D. F. México.
- Balamurugan V., Reddy G. R., Suryanarayana V.S. (2007). *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins - Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology*. **6**: 175 – 186.
- Barfoed A., Blixenkroner M., Jensen MH., Botner A., Kamstrup S. (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine*. **22**: 3628-3641.
- Bastos RG., Dellagostin OA., Barletta RG., Doster AR., Nelson E, Zuckermann F. (2004). Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated

form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccin.* **22**:467-474.

Bautista E., Goyal S., Yoon I., Joo H., Collins J. (1993). Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest.* **5**: 163-165.

Balamurugan V., Reddy G., Suryanarayana V. (2007). *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology.* **6**: 175-186.

Bin Li, Xiao S., Wang Y., Xu S., Jiang Y., Chen H., Fang L. (2009). Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic ORF5 gene. *Vaccine.* **27**: 1957 – 1963.

Campa S. E., Mendoza F. L., Reséndiz M., Saavedra P. A., Haro M. V., Mwangi W., Hernández J. (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* **385**: 373 – 378.

Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits. (2010). Five-minute, directional TOPO® cloning of blunt-end PCR products into vector for high-level, inducible expression in *E. coli*. Invitrogen. MAN0000214.

Carrió M., Villaverde A. (2001). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters.* **498**: 29 – 33.

Cereghino L., Cregg J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews.* **24**: 45 -66

Chareerntantanakul W. (2009). Adjuvants for porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.**129**: 1 -13.

Chareerntantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J. (2006). Immune response and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.**109**: 99 -115.

Chen Y., Tian H., Hui He J., Yin Wu J., Shan Y., Liu X. (2011). Indirect ELISA with recombinant GP5 for detecting antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virologica Sinica*. **26**: 61 – 66.

Chia M. Y., Hsiao S. H., Chan H. T., Do Y., Huang P. L., Chang H. W., Tsai C., Lin C. M., Pang V., Jeng C. (2010). Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **135**: 234 – 242.

Chia M. Y., Hsiao S. H., Chan H. T., Do Y., Huang P. L., Chang H. W., Tsai C., Lin C. M., Pang V., Jeng C. (2011). Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **140**: 215 – 225.

Córdoba H., Algecira N., Poutou R., Barrea L. (2003). *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología*. **5**: 73 – 84.

Cos O., Ramón R., Montesinos J. L., Valero F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial cell factories*. **5**: 17.

- Cregg J.M., Madden K., Barringer K., Thill G., Stillman C. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and cellular biology*. **9**: 1316 – 1323.
- Cruz J., Zúñiga S., Bécares M., Sola I., Ceriani J., Juanola S., Plana J., Enjuanes L. (2010). Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Research*. **154**: 150-160
- Daly R., Milton H. (2005). Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition*. **18**: 119 – 138.
- Dea S., Gagnon A. C., Mardassi H., Pirzadeh B., Rogan, D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of virology*. **145**: 659 – 688.
- Dee SA, Molitor TW. (1998). Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *The Veterinary Record*. **143**: 474-476.
- Delgado P. (2010). Expresión y purificación de dominios inmunogénicos del antígeno E del virus del dengue (tipo 2) en *E. coli* susceptibles a conjugación química para el desarrollo de una vacuna particulada. Instituto tecnológico de Tepic. Tepic, Nayarit, México.
- Depuydt M., Leonard S., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K., Collet J. F. (2009). A Periplasmic Reducing System Protects Single Cysteine Residues from Oxidation. *Science*. **326**: 1109 – 1111.
- Díaz D., Finn M. (2007). Nanotecnología sobre virus: Una plataforma supramolecular, natural y accesible para la química orgánica. *An. Quím.* **103**: 5 – 13.

- Dokland T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Research*. **154**: 86-97.
- Drago M., Sainz T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*. **37**: 38 – 44.
- EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. (2009). For expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Invitrogen. Version I.
- Fang L., Jiang Y., Xiao S., Niu C., Zhang H., Chen H. (2006). Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus genes*. **32**: 5 – 11.
- Flores-Mendoza L., Hernandez J. (2010). Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): writing a history. *Vet. Méx*. **41**: 139-159.
- Foss D., Zilliox M., Meier W., Zuckermann F., Murtaugh M. (2002). Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral immunology*. **15**: 557 – 566.
- Grasso, S., Santi, L. (2010) Viral nanoparticles as macromolecular devices for new therapeutic and pharmaceutical approaches. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol*. **2**: 161-178.
- Greene J. Host cell compatibility in protein expression. Balbás P., Lorence A. (2004). Recombinant gene expression: Reviews and Protocols. 2nd Edition. Humana Press Inc
- Gonin P., Pirzadeh B., Gagnon C. Dea S. (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest*. **11**: 20 – 26.

Han J., Wang Y., Faaberg K. (2006). Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus research*. **122**: 175 – 182.

Hannig G., Makrides S. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *TIBTECH*. **16**: 54 – 60

Higgins D. Cregg J. M. (1998). *Pichia* protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 103. Humana Press Inc.

Hou Y.H., Chen, J., Tong G.Z., Tian Z.J., Zhou Y.J., Li G.X., Li X., Peng J.M., An T.Q., Yang H.C., (2008). A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine*. **26**: 1438–1449.

Jegerlehner A., Tissot A., Lechner F., Sebbel P., Erdmann I., Kündig T., Bächli T., Storni T., Jenning G., Pumpens P., Renner W., Bachmann M. (2002). A molecular assembly system that render antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*. **20**: 3101 – 3112.

Jiang P., Jiang W., Li Y., Wu S., Xu J. (2004). Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol*. **102**:321-328.

Jiang W., Jiang P., Li Y., Tang J., Wang X. (2006). Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol*. **113**:169-180.

Jiang W., Jiang P., Wang X., Li Y., Du Y. (2008). Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/ or GP4 of PRRS virus. *Virus Res.* **136**:50-57.

Jinshun CAI., Yonghe MA., Changguo YAN, Rongliang HU., Jiabao Z. (2010). Construction and characterization of a recombinant canine adenovirus expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* **72**: 1035 – 1040.

Kimman T., Cornelissen L., Moormann R., Rebel J., Zurwieden S. N. (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine.* **27**: 3704 – 3718.

Kratz P., Böttcher B, Nassal M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad.* **96**: 1915–1920

LaVallie E., DiBlasio-Smith E., Collins-Racie L., Lu Z., McCoy J. (2000). *E. coli* gene expression protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.

Lechner F., Jegerlehner A., Tissot A., Maurer P., Sebbel P., Renner W., Jennings G., Bachmann M. (2002). Virus-like particles as a modular system for novel vaccines. *Intervirology.* **45**: 212-217.

Lee A., Niu Z., Wang Q. (2009). Viruses and virus-like protein assemblies-chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Res.* **2**: 349-364.

Linghua Z., Xingshan T., Yong G., Fengzhen Z. (2006). Effects of CpG ODN on CD4+ and CD8+ T subpopulations in the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine. *Vaccine.* **24**:1874-1879.

Lobato P. (2011). Expresión del ectodominio de la proteína GP5 del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) en *E. coli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

Lopez O. J., Osorio F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*. **102**: 155 – 163.

Ludwing C., Wagner R. (2007). Virus-like particles – universal molecular toolboxes. *Pharmaceutical biotechnology*. **18**: 537 – 545.

Manuel C. (2012). Evaluación de la capacidad de conjugación química e inmunogenicidad del virus del jaspeado del tabaco. Tesis de Maestría. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México.

Mardassi H., Athanassious R., Mounir S., Dea S. (1994). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Morphological, Biochemical and Serological Characteristics of Quebec Isolates Associated with Acute and Chronic Outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Can J Vet Res*. **58**: 55-64.

Moreno L. (2010). Expresión y purificación de las proteínas recombinantes estructurales VP5, VP6 y VP8 del rotavirus. Tesis de Maestría. Universidad nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Murtaugh M. P., Elam M. R., Kakach L. T. (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Archives of Virology*. **140**: 1451 – 1460.

Mateu E., Diaz I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *Veterinary Journal*. **177**:345-351.

OIE. Organización mundial de sanidad animal. (Consultada Enero 2012). [online]. <http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_1.1.2.htm>.

Ostrowski M., Galeota J., Jar A., Platt K., Osorio F., Lopez O. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of virology*. **76**: 4241-4250.

Peralta A., Molinari P., Taboga O. (2009). Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *Virology Journal*. **6**: 192.

Phani B. Das. (2010). The glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their role in infection and immunity. Thesis for the degree of doctor. University of Nebraska, Lincoln Nebraska.

Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. (2010). pGAPZ A, B, and C, pGAPZ α A, B, and C. Invitrogen. MAN0000043.

Pirzadeh B., Dea S. (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *Journal of general virology*. **78**: 1867 – 1873.

Pirzadeh B., Dea S. (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of general virology*. **79**:989-999.

Plagemann G. W. P. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Origin hypothesis. *Emerging infectious Diseases*. **9**: 903-908.

Porro D., Sauer M., Branduardi P., Mattanovich D. (2005). Recombinant protein production in yeast. *Molecular Biotechnology*. **31**: 245 – 259.

Poutou R., Quevedo B., Cordoba H., Sáenz H., Barrea L. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA* ISSN 1794-2370. **3**: 75-87.

Pyo H., Seo J., Suh G., Kim K., Lee J., Kim T., (2010). Serodiagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection with the use of glycoprotein 5 antigens. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. **74**: 223 – 227.

Quian P., Li X., Tong G., Chen H. (2003). High – level expression of the ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in *Pichia pastoris*. *Virus genes*. **27**: 189 – 196.

Ren X., Wang M., Yin J., Ren Y., Li G. (2010). Heterologous expression of fused genes encoding the glycoprotein 5 from PRRSV: A way for producing functional protein in prokaryotic microorganism. *Journal of Biotechnology*. **147**: 130 – 135.

Roy P., Noad R. (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system. *Human vaccines*. **4**: 5-8.

Santos – Etxepare M., Arestín M., Castel – Ruiz A., Simón M. (2010). Sistemas de expresión de proteínas en *Escherichia coli* para la producción de biofármacos: alternativas y criterios de selección. *Farmaespaña Industrial*. **10**: 68 – 71.

Schöll I; Boltz-Nitulescu G., Jensen-Jarolim E. (2005). Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy. *Journal of Controlled Release*. **104**: 1-27.

SENASICA. (Consultado Febrero 2012). IX Encuentro nacional de porcicultura: Plan nacional de desarrollo de porcícola [online]. <http://www.cmp.org/eventos/CAMPECHE/Avances%20y%20Retos%20Sanitarios.%20SENASICA%20IX%20Encuentro%20Nacional.pdf>

Shen G., Jin N., Ma M., Jin K., Zheng M., Zhuang T. (2007) Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine*. **25**:4193-4202.

Singh M., Panda K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **99**: 303 – 310.

Smith ML, Lindbo JA, Dillard-Telm S, Brosio PM, Lasnik AB, McCormick AA, Nguyen LV, Palmer KE. (2006). Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology*. **348**:475-488.

Suarez F. P. (1995). Genética molecular del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino: aspectos evolutivos, diagnósticos e inmunógenos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Tian ZJ., Qiu HJ., Ni JQ., Zhou YJ., Cai XH., Zhou GH. (2005). Construction and characterization of a recombinant pseudorabies virus expressing porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5. *Yi Chuan Xue Bao*. **32**:1248-1255.

Wang S, Fang L., Fan H, Jiang Y., Pan Y., Luo R., Zhao Q., Chen H., Xiao S. (2007). Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*. **25**: 8220-8227.

Wang Y., Xing G., Gou J., Qiao S., Lu Q., Li Q., Zhang G. (2011). Immunogenicity of the glycoprotein 5 truncated transmembrane regions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *African Journal of Biotechnology*. **10**: 18266 – 18273.

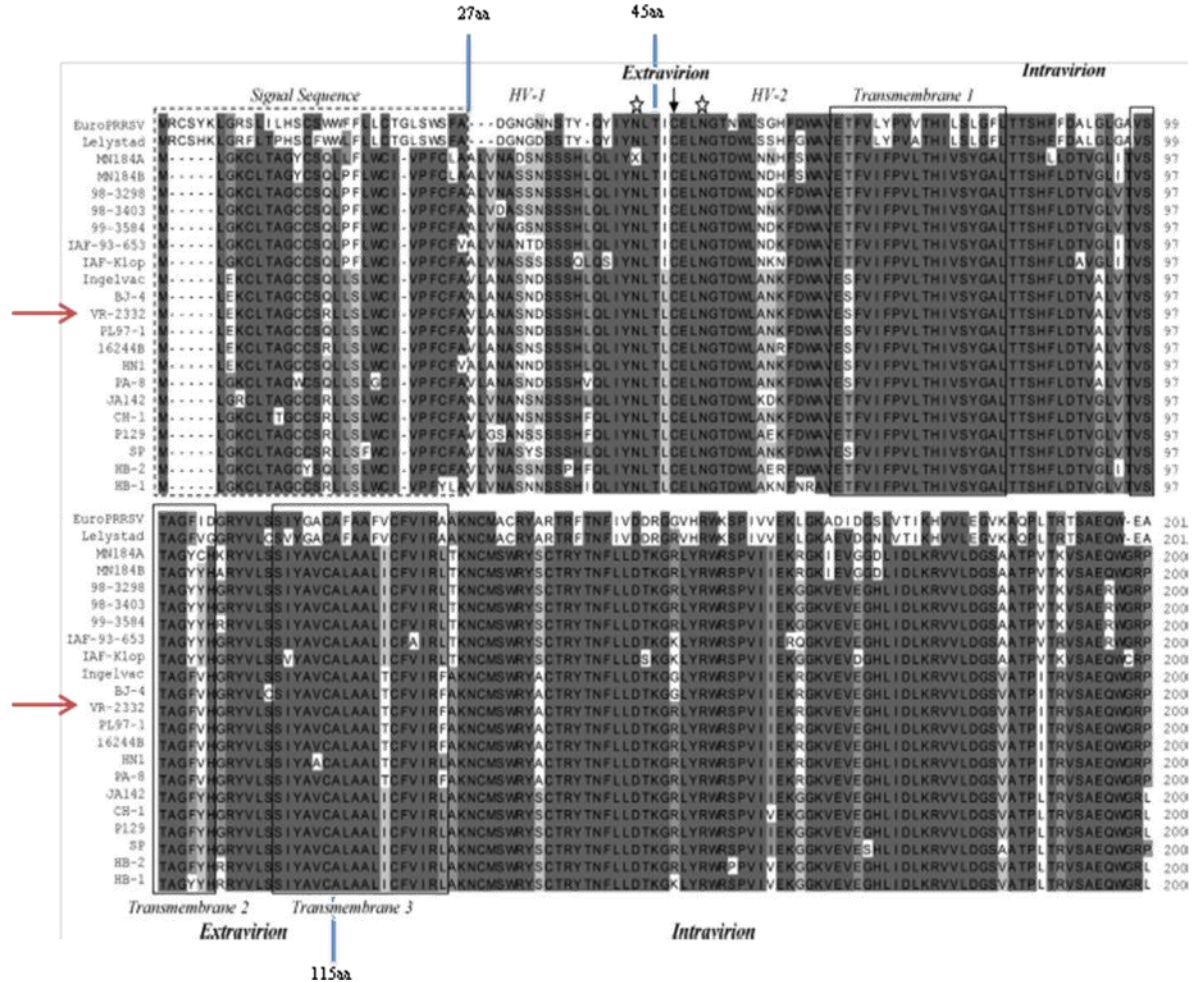
Yin J., Li G., Ren X., Herrler G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*. **127**: 335 – 347.

Zheng Q., Chen D., Li P., Bi Z., Cao R., Zhou B. Chen P. (2007). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune response or porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus genes*. **35**: 585 – 595.

Zhou Y., Yu H., Tian Z., Liu J., Qing T., Peng J., Xin G., Jiang F., Cai H., Xue Q., Wang M. (2009). Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus of GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*. **138**: 1 – 10.

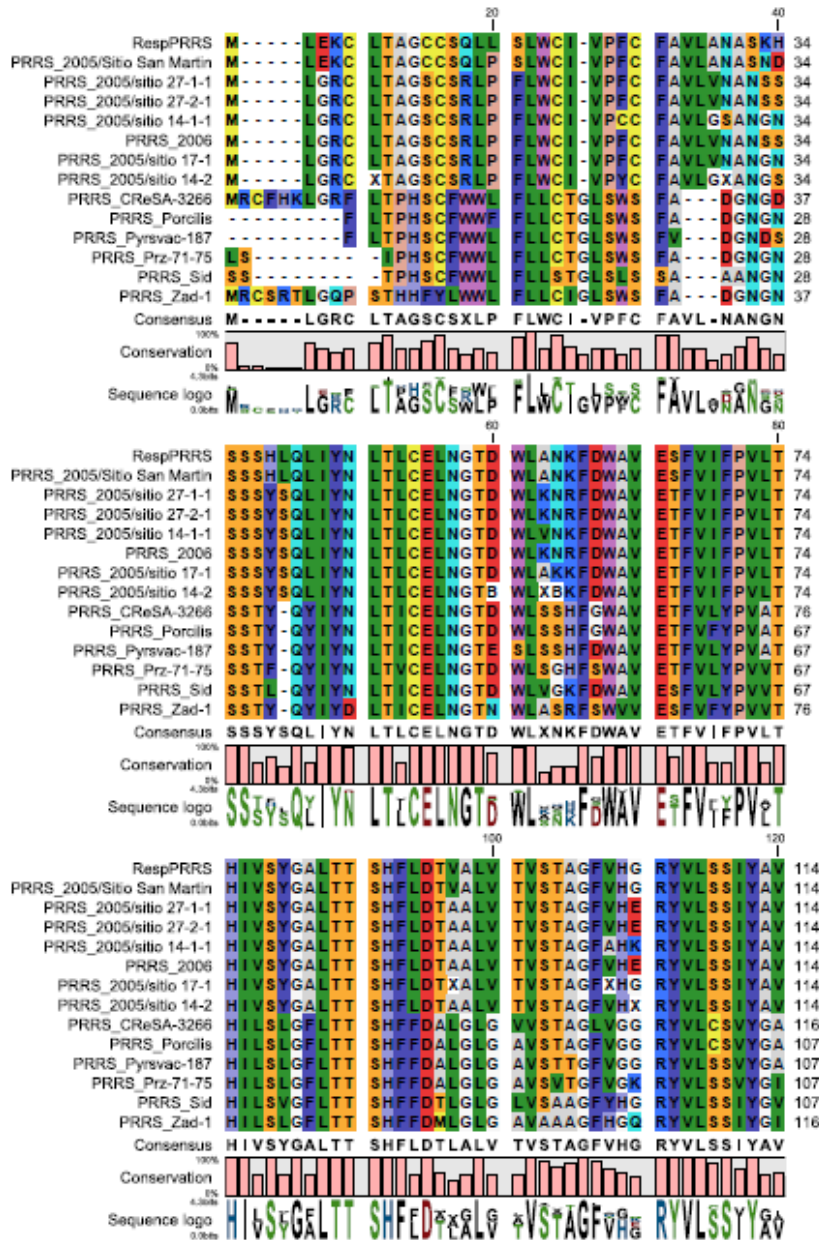
ANEXO 1

Análisis del marco de lectura abierta de la glicoproteína GP5 del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (Han y col., 2006)



ANEXO 2

Alineación de las secuencias de GP5 del VSRRP (CLC sequence).



ANEXO 3. Memoria en Extenso

3^{er} Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía

3.1 Carta de aceptación

3.2 Memoria en extenso

3.3 Reconocimiento

ANEXO 4. Memoria en Extenso

2^{do} Congreso Nacional de Biotecnología y Producción Agrícola Sustentable

3.1 Memoria en extenso

3.2 Reconocimiento