



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**GENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS GENÉTICAMENTE CODIFICADAS  
COMO ACARREADORES PARA VACUNAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. JESÚS ZEPEDA CERVANTES**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dedicatoria:**

a mi madre,  
a mi hermana,  
a mis hijos,  
a mis tíos  
y a mis mentores

*“Se ha dicho que un buen veterinario es el que cura a los animales. Yo creo que un excelente veterinario es aquél que previene que los animales se enfermen”*

Jesús Zepeda Cervantes

## **Agradecimientos**

A los miembros del jurado: a la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, a la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, a la Dra. Alejandra Hernández Santoyo y al Dr. Karen Manoutcharian Airapetian por sus valiosos comentarios.

Al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), principalmente al Dr. Luis Vaca Domínguez por su confianza y entusiasmo, quien siempre me ha motivado a seguir aprendiendo, por su apoyo incondicional, gracias. A la Dra. Alicia Sampieri García, al MVZ Adolfo Cruz Reséndiz y al biólogo Daniel Martínez Flores por su apoyo con nuestros experimentos y con el uso de programas. A la Sra. Salustia Salgado Guzmán por facilitarnos el material para trabajar.

Al Departamento de Biología Molecular del IFC: a la Dra. Laura Ongay Larios; a la Unidad de Microscopía: al Dr. Fernando García Hernández y al M. en C. Rodolfo Paredes Días por su asistencia técnica. Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín del Departamento de Neuropatología Molecular por su asesoría técnica en diversas técnicas, así como por sus críticas y valioso comentarios sobre este trabajo. Al personal del bioterio, principalmente a la MVZ Claudia V. Rivera Cerecedo y al MVZ Héctor Alfonso Malagón Rivero.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Al Departamento de Medicina y Zootecnia de los cerdos, principalmente al Dr. José Iván Sánchez Betancourt y a la M. en C. Rosalba Carreón Nápoles por apoyarnos con aislados virales. Al MVZ Daniel Eduardo Meneses Rodríguez por su apoyo con el manejo de cerdos en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas: a la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian y nuevamente a la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde por ser parte de mi comité tutorial y por su apoyo a lo largo de todo el estudio. A la M. en C. Jacquelynne Cervantes Torres por su asistencia técnica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de posgrado (No. de becario 282604), sin la cual no habría podido realizar este estudio, y a la compañía farmacéutica Sanfer que también fue fundamental para este trabajo.

## Abreviaturas

AcNPV: *nucleopoliedrovirus de Autographa californica (Autographa californica nucleopoliedrovirus)*

APCs: células presentadoras de antígenos (antigen presenting cells)

BSA: albúmina sérica bovina (bovine serum albumin)

BV: virus libres (budded virus)

CD4<sup>+</sup>: linfocitos T cooperadores

CD8<sup>+</sup>: linfocitos T citotóxicos.

CMV: citomegalovirus

ConA: concanavalina

DAPI: (4', 6-diamino-2-fenilindol)

DCs: células dendríticas (dendritic cells)

DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DNA: ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EMSA: ensayo de cambio en la corrida electroforética (electrophoretic mobility shift assay)

SFB: suero fetal bovino

GDP: (ganancia diaria de peso)

GFP: proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)

GMSF: factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

H: hexámeros de nucleótidos

hpi: horas después de la infección (hours post infection)

HRP: peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IM: vía intramuscular

IPTG: (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido)

MHC: complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex)

ml: mililitro

MOI: multiplicidad de infección (multiplicity of infection)

NPs: nanopartículas

NTA: análisis del seguimiento de nanopartículas (nanoparticle tracking analysis)

ODV: virus ocluidos (occluded derived virus)

ORF: marco de lectura abierto (open reading frame)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)

PBS: solución salina tamponada con fosfato (phosphate buffered saline)

PBST: PBS con Tritón X-100 al 0.3%

PCV: circovirus porcino (Porcine Circovirus)

PDNS : síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (porcine dermatitis and nephropathy syndrome)

pH: potencial hidrógeno

PK-15: línea celular derivada de riñón porcino (porcine kidney)

PMWS : síndrome de emaciación posdestete (postweaning multisystemic wasting syndrome)

PNP: neumonía proliferativa y necrótica porcina (porcine necrotizing pneumonia)

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors)

PRRSV: virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (porcine reproductive and respiratory syndrome)

Rep y Rep': proteínas virales necesarias para la replicación del DNA viral

RNA: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

SAMS: síndrome de aborto y mortalidad de las cerdas (sow abortion and mortality syndrome)

SAPs: péptidos de auto-agregación (self-aggregating peptides)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Sf9: línea celular de *Spodoptera frugiperda*

TBS: solución salina tamponada con Tris (Tris-buffered saline)

TBSM: TBS con leche al 2.5% y Tween® 20 al 0.05%

TBST: TBS con Tween® 20 al 0.1%

TEM: microscopía electrónica de transmisión (transmission electron microscopy)

TLR: receptor tipo Toll (Toll-like receptor)

TMB: (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina)

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor)

VLP: partículas tipo virus (virus-like particles)

x g: fuerza g

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1.1. Importancia del PCV2 .....  | 1  |
| 1.2. Clasificación taxonómica.....   | 2  |
| 1.3. Genómica y proteómica viral.....  | 2  |
| 1.4. Replicación viral .....   | 3  |
| 1.5. El sistema inmune del cerdo y su interacción con PCV2 .....   | 5  |
| 1.6. Transmisión .....   | 6  |
| 1.7. Síndromes causados por PCV2.....  | 7  |
| 1.7.1. Síndrome de emaciación posdestete (PMWS) .....  | 7  |
| 1.7.2. Síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (PDNS) .....  | 9  |
| 1.7.3. Síndrome de aborto y mortalidad de las cerdas (SAMS) .....  | 10 |
| 1.7.4. Otras lesiones halladas en cerdos con PCV2 .....  | 11 |
| 1.8. Diagnóstico de PCV2.....  | 12 |
| 1.9. Prevención y control .....  | 14 |
| 1.9.1. Vacunas comerciales contra PCV2 .....   | 15 |
| 1.9.2. Adyuvantes usados en las vacunas contra PCV2 .....  | 19 |
| 1.9.3. El sistema baculovirus en la producción de vacunas .....  | 24 |
| 1.9.4. Uso de poliedras como sistema de entrega de antígenos .....   | 26 |
| 1.9.5. Diseño de una plataforma universal de vacunas basada en la incorporación de antígenos en NPs genéticamente codificadas..... | 26 |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....  | 29 |
| 3. HIPÓTESIS: .....  | 30 |
| 4. OBJETIVO GENERAL: .....   | 30 |
| 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....  | 30 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 31 |
| 5.1. Reactivos:.....   | 31 |
| 5.2. Células y virus .....   | 32 |
| 5.3. Producción de anticuerpos policlonales contra ORF2 de PCV2 y poliedrina .....   | 33 |



|   |    |
|---|----|
| 5.4. Determinación de la MOI adecuada para la producción de las partículas PH(1-110)PCV2 .....                              | 34 |
| 5.5. Determinación del tiempo de infección adecuado para la producción de las partículas PH(1-110)PCV2.....                 | 34 |
| 5.6. Producción y purificación de las partículas PH(1-110)PCV2 .....  | 35 |
| 5.7. Evaluación de la antigenicidad de las partículas PH(1-110)PCV2 por western blot.                                       | 36 |
| 5.8. Inmunofluorescencia para determinar auto-agregación de la proteína PH(1-110)PCV2 .....                                 | 37 |
| 5.9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para detectar baculovirus .....   | 37 |
| 5.10. Determinación del tamaño de las partículas por medio de un análisis de seguimiento de partículas (NTA) .....          | 38 |
| 5.11. Inmunización de cerdos .....  | 38 |
| 5.12. Determinación de anticuerpos contra ORF2 de PCV2 por ELISA .....  | 39 |
| 5.13. Detección de anticuerpos contra ORF2 de PCV2 en su forma desnaturalizada por western blot.....                        | 39 |
| 5.14. Ensayo de seroneutralización viral contra PCV2 y citometría de flujo.....   | 40 |
| 5.15. Declaración de ética y cuidado animal .....   | 41 |
| 5.16. Análisis estadístico .....  | 41 |
| 6. RESULTADOS:.....   | 43 |
| 6.1. Las partículas PH(1-110)PCV2 se pueden purificar de manera fácil, rápida y a bajo costo .....                          | 43 |
| 6.2. El mejor rendimiento de partículas PH(1-110)PCV2 se logra a las 72 hpi .....   | 45 |
| 6.3. Las partículas PH(1-110)PCV2 están conformadas por poliedrina y ORF2 de PCV2 .....                                     | 47 |
| 6.4. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega y forma partículas en el núcleo de las células Sf9 infectadas ..... | 49 |
| 6.5. Las partículas PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus .....  | 50 |
| 6.6. Las partículas PH(1-110)PCV2 son polidispersas y de escala nanométrica .....   | 51 |
| 6.7. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron anticuerpos contra ORF2 de PCV2 .....                       | 52 |
| 6.8. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron anticuerpos neutralizantes contra PCV2 .....                | 55 |
| 7. DISCUSIÓN.....   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| 8. CONCLUSIONES.....   | 64 |
| 9. PERSPECTIVAS .....  | 65 |
| 10. REFERENCIAS .....  | 67 |
| 11. ANEXO I: permisos otorgados para el uso de figuras en esta tesis ..... | 86 |
| 11.1. Síndromes causados por PCV2.....                                     | 86 |
| 11.2. Respuesta inmune contra SAPs .....                                   | 86 |
| 12. ANEXO II: publicaciones obtenidas durante la estancia doctoral .....   | 87 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Organización genómica y localización del origen de replicación del PCV2. ....   | 4  |
| Figura 2. Los cerdos afectados con el síndrome de emaciación posdestete (PMWS) presentan como característica principal un retraso en el crecimiento. ....                   | 9  |
| Figura 3. Cerdo afectado con el síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (PDNS). ....  | 10 |
| Figura 4. Corazón de un cerdo abortado proveniente de una cerda con el síndrome de aborto y mortalidad (SAMS). ....   | 11 |
| Figura 5. La proteína ORF2 de PCV2 se auto-ensambla y forma partículas tipo virus (VLPs). ....  | 17 |
| Figura 6. Interacción entre nanopartículas (NPs) formadas por péptidos de auto-agregación (SAPs) y el sistema inmune. ....  | 23 |
| Figura 7. Replicación de los baculovirus y producción de poliedras <i>in vivo</i> . ....  | 25 |
| Figura 8. Cristal de la proteína poliedrina de AcNPV y su oligomerización ....  | 27 |
| Figura 9. Esquema que muestra los procesos realizados para producir una vacuna contra PCV2 basada en NPs de poliedrina ....   | 44 |
| Figura 10. Una multiplicidad de infección (MOI) de 20 es adecuada para recuperar partículas PH(1-110)PCV2 con mayor pureza. ....  | 45 |
| Figura 11. Las partículas PH(1-110)PCV2 son reconocidas específicamente por sueros de ratones inmunizados con Foster® PCV y se alcanza un mejor rendimiento a las 72 hpi... | 46 |
| Figura 12. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 es reconocida por sueros contra poliedrina. ....   | 48 |
| Figura 13. Un suero de cerdo infectado naturalmente con PCV2 reconoce a la proteína de fusión PH(1-110)PCV2. ....   | 48 |
| Figura 14. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega y forma partículas localizadas en el núcleo de las células Sf9 infectadas. ....                               | 50 |
| Figura 15. Las partículas PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus en su interior. ....   | 51 |
| Figura 16. Las partículas PH(1-110)PCV2 son polidispersas y de escala nanométrica. ....   | 52 |
| Figura 17. Esquema de inmunización y toma de muestra de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con la vacuna comercial Circoflex®. ....                         | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 18. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con Circoflex® generan anticuerpos contra PCV2.....   | 53 |
| Figura 19. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron títulos de anticuerpos contra PCV2 parecidos a los obtenidos con la vacuna comercial Circoflex®.. | 54 |
| Figura 20. Los sueros de cerdos vacunados con las NPs PH(1-110)PCV2 reconocen la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en condiciones desnaturalizantes.....               | 55 |
| Figura 21. Los sueros de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 neutralizan la infección por PCV2 recombinante que expresa la GFP en cultivo celular.....     | 56 |
| Figura 22. Los sueros de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 inhiben la infección por PCV2 recombinante del 50 – 60% .                                     | 57 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Síndromes asociados a PCV2 y sus características principales.....  | 12 |
| Tabla 2. Lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en tejidos de cerdos con enfermedad sistémica causada por PCV2..... | 13 |
| Tabla 3. Vacunas comerciales contra PCV2: antígenos, adyuvantes y uso recomendado. ..   | 20 |

## RESUMEN

El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus desnudo de una sola cadena de DNA de gran importancia en la industria porcina a nivel mundial debido a que produce retraso en el crecimiento, problemas reproductivos, digestivos y respiratorios en los cerdos. Las vacunas comerciales actuales contra PCV2 están elaboradas con virus inactivados, virus atenuados o partículas tipo virus (VLPs). Las VLPs han demostrado ser más seguras que las vacunas que contienen virus atenuados así como promover respuestas inmunes tanto humorales como celulares. Sin embargo, para el proceso de purificación de VLPs se necesitan instrumentos especializados de laboratorio, y este proceso requiere de mucho tiempo, haciendo que las vacunas elaboradas con VLPs sean más costosas. Previamente, en nuestro laboratorio descubrimos un péptido de auto-agregación derivado del extremo N-terminal de la proteína poliedrina (PH(1-110)) del baculovirus *Autographa californica nucleopoliedrovirus* (AcNPV), el cual forma nanopartículas (NPs) que se pueden purificar fácilmente. En este trabajo, evaluamos si las NPs formadas por la proteína ORF2 de PCV2 fusionada a PH(1-110) (NPs PH(1-110)PCV2) podrían ser usadas como una vacuna de subunidad contra PCV2. Primero, caracterizamos las NPs PH(1-110)PCV2 por microscopía electrónica de transmisión, y observamos que éstas no contenían baculovirus contaminantes en su interior. Después, produjimos y purificamos las NPs PH(1-110)PCV2, inmunizamos cerdos y evaluamos la respuesta inmune humoral contra ORF2 de PCV2 por ELISA y western blot. Las NPs PH(1-110)PCV2 fueron fáciles de purificar. La purificación de estas NPs se llevó a cabo sonicando las células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante, y centrifugando las NPs a baja velocidad. Finalmente, generamos un PCV2 que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y realizamos ensayos de seroneutralización en células de riñón de cerdo con la línea celular PK-15. Nuestros resultados indican que la fusión de ORF2 de PCV2 al péptido PH(1-110) permite la formación de NPs que son fáciles de purificar, se pueden producir a gran escala con un alto rendimiento por usar un sistema viral robusto y que estas NPs son capaces de generar anticuerpos neutralizantes.

## ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a non-enveloped single-stranded DNA virus of great importance in the pig industry worldwide because it causes growth retardation, reproductive, digestive and respiratory symptoms in pigs. The current commercial vaccines against PCV2 are made of inactivated virus, attenuated virus or virus-like particles (VLPs). VLPs have been shown to be safer than vaccines containing attenuated viruses as well as to promote both humoral and cellular immune responses. However, specialized laboratory instruments are needed for the VLP purification process, and this process requires a lot of time, making vaccines based on VLPs more expensive. Previously, in our laboratory we discovered a self-aggregating peptide derived from the N-terminal of the polyhedrin protein (PH(1-110)) from baculovirus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV), which forms nanoparticles (NPs) that can be easily purified. In this work, we evaluated whether the NPs formed by ORF2 protein from PCV2 fused to PH(1-110) (PH(1-110)PCV2 NPs) could be used as a subunit vaccine against PCV2. First, we characterized the PH(1-110)PCV2 NPs by transmission electron microscopy, and we observed that these NPs did not contain contaminating baculoviruses inside of them. Then, we produced and purified PH(1-110)PCV2 NPs, immunized pigs and evaluated the humoral immune response against ORF2 from PCV2 by ELISA and western blot. The PH(1-110)PCV2 NPs were easy to purify. Purification of these NPs was carried out by sonicating insect cells infected with the recombinant baculovirus, and centrifugation of the NPs at low speed. Finally, we generated a PCV2 that expresses the green fluorescent protein (GFP) and we performed seroneutralization assays in pig kidney cells with the PK-15 cell line. Our results indicate that the fusion of ORF2 from PCV2 to PH(1-110) allows the formation of NPs that are easy to purify, can be produced on a large scale with high performance by using a robust viral system and these NPs are capable of generating neutralizing antibodies.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El circovirus porcino (PCV) fue identificado por primera vez como contaminante de la línea celular PK-15, con un diámetro de 17 nm, no citopático y de una sola cadena de DNA (1). Posteriormente, un virus similar al PCV se identificó en cerdos con una enfermedad caracterizada por lesiones linfoides severas y neumonía intersticial (2). Más tarde, se realizaron estudios moleculares que indicaron que el PCV aislado de cerdos enfermos era diferente al PCV contaminante de la línea celular PK-15. Por lo tanto, al PCV contaminante de la línea celular PK-15 se le dio el nombre de PCV1, mientras que al PCV que provocó enfermedad se le dio el nombre de PCV2 (3). Recientemente, un nuevo tipo de PCV fue identificado y fue nombrado PCV3. PCV3 también ha sido asociado con enfermedad sistémica en cerdos (4).

### **1.1. Importancia del PCV2**

La porcicultura es una actividad económica que crea empleos de manera directa e indirecta generando ingresos y contribuyendo a la economía mundial. En México, los principales estados en los que se produce carne de cerdo son: Jalisco, Sonora, Puebla, Guanajuato, Yucatán y Veracruz, y en el año 2006 estos estados produjeron el 76.5% de la producción de carne de cerdo a nivel nacional. Tan solo Sonora y Jalisco concentran el 40% de la producción nacional. La producción de cerdos se expande en los estados con productores tecnificados mientras que es deficiente en estados con pequeños y medianos productores (5). Jalisco y Yucatán fueron los primeros países declarados libres de fiebre porcina clásica y enfermedad de Aujeszky y han sido desde entonces los principales productores de la carne de cerdo de la mejor calidad por ser procesada en rastros Tipo Inspección Federal (TIF). Estos estados han sido los principales exportadores de carne porcina en Japón y Cuba (5,6).

PCV2 es un patógeno de distribución mundial que causa grandes pérdidas económicas en la industria porcina alrededor del mundo (3,7–10). Se ha estimado que las pérdidas económicas debidas a enfermedades asociadas con la infección por PCV2 es alrededor de 600 millones de euros por año tan solo para la Unión Europea (3). Las pérdidas se deben a



que los cerdos con enfermedad sistémica causada por PCV2 se debilitan y son incapaces de alcanzar un peso adecuado al mercado, hay mortalidad de cerdos en etapas de crianza y engorda, así como un aumento en el uso de antibióticos para controlar las infecciones bacterianas secundarias (3). En México se ha aislado PCV2 en tejidos linfoides de cerdos infectados (11).

## **1.2. Clasificación taxonómica**

PCV2 se encuentra en el grupo 2 de la clasificación de Baltimore por ser un virus de DNA de una sola cadena. PCV2 pertenece a la familia *Circoviridae*, está incluido en el género *Circovirus* y la especie es *Circovirus porcino tipo 2*. PCV2 se puede subdividir en PCV2a y PCV2b. PCV2a contiene 1767 nucleótidos y PCV2b contiene 1766 nucleótidos. PCV2c se encontró en Dinamarca, mientras que PCV2d y PCV2e han sido descritos en China (12). PCV2d también se ha detectado en Estados Unidos de América (13). Aunque hay más de un subtipo de PCV2, todas las vacunas se basan en el ORF2 (ORF, Open Reading Frame 2) de PCV2a, ya que los anticuerpos generados con esta vacuna reconocen otros subtipos de PCV2 (inmunidad cruzada) (7,12). El ORF2 de PCV2 contiene los principales epítomos neutralizantes (14–17). En México, PCV2a y PCV2b han sido aislados de cerdos con lesiones linfoides y se ha identificado que estos subgenotipos son diferentes de aquellos reportados en otras partes del mundo (11).

## **1.3. Genómica y proteómica viral**

El genoma de PCV2 contiene de 1766 a 1768 nucleótidos con una identidad mayor al 94% entre diferentes aislados de PCV2, mientras que con PCV1 solo muestra un 80% de identidad como lo indicaron los análisis de secuencias por alineamiento (3). PCV2 tiene dos genes principales: ORF1 y ORF2. ORF1 es codificada por la cadena positiva del virus, mientras que ORF2 se transcribe en la cadena complementaria (3). ORF1 codifica para las proteínas Rep y Rep' generadas por *splicing* alternativo. Rep contiene 312 aminoácidos, mientras que Rep' es una proteína trunca de 168 aminoácidos. El promotor de Rep es regulado negativamente por la proteína Rep (18). El promotor de Rep se encuentra dentro

del origen de replicación del DNA viral y el promotor de ORF2 se encuentra dentro del gen Rep (19). Rep y Rep' son esenciales para la replicación del DNA viral. Estos estudios fueron confirmados por la localización subcelular de las proteínas Rep y Rep' así como por un ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA) (18). ORF2 codifica para una proteína de 30 kDa encargada de formar la cápside (20,21). ORF2 se utiliza en el desarrollo de vacunas y ensayos serológicos (3). El análisis de ORF1 y ORF2 de PCV2 ha mostrado homología de nucleótidos del 83 y 67% con PCV1, respectivamente (3).

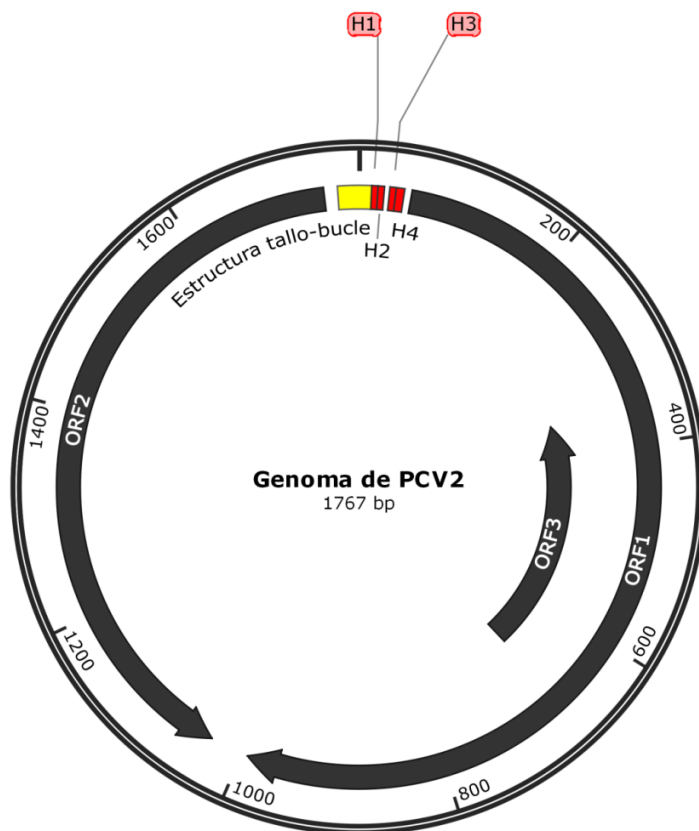
Se ha sugerido que PCV2 codifica para varios ORFs pequeños, pero solo ORF3 ha sido demostrado (19). El ORF3 se encuentra dentro de ORF1 en PCV1 y PCV2, pero posee un tamaño diferente. En PCV1, ORF3 contiene 621 nucleótidos mientras que en PCV2 contiene 315 nucleótidos (19). El ORF3 de PCV2 induce apoptosis, y parece ser importante en el desarrollo de lesiones linfoides (22,23). La eliminación de ORF3 en PCV2 genera cargas virales bajas sin generar lesiones microscópicas en los cerdos (19). Dada la marcada diferencia de ORF3 entre PCV1 y PCV2 en su tamaño y el hecho de que PCV2 sin ORF3 no genera lesiones, indica que ORF3 está involucrado en el desarrollo de enfermedades causadas por PCV2 (19) (en la figura 1 se esquematiza la organización genómica de PCV2).

#### **1.4. Replicación viral**

Al inicio de la infección por PCV2, la proteína ORF2 de la cápside se une al receptor celular heparán sulfato (21,24). Después de la entrada de PCV2, la proteína ORF2 se localiza en el nucléolo y más tarde se exporta al citoplasma (19). Las proteínas virales Rep y Rep' están implicadas en la replicación del DNA de PCV2 (21,25). Rep y Rep' se unen a los hexámeros H1 y H2, que son secuencias de 6 nucleótidos repetidos. Esta unión es esencial para el inicio de la replicación (19,21,25). Rep y Rep' colocalizan en el nucleoplasma de las células infectadas (19). El origen de replicación de PCV2 forma una estructura tallo-bucle encontrada en la región intergénica más larga, entre la región 5' de los genes ORF1 y ORF2 (19). Durante la replicación del DNA de PCV2 se genera una doble cadena y se transcriben 9 RNAs incluyendo el RNA de la cápside, 5 RNAs asociados a Rep y 3 RNAs no esenciales. En la infección productiva, los antígenos virales y la

progenie viral incrementan en una manera tiempo-dependiente. Estos antígenos se observan desde las 18 h después de la infección (hpi), y los virus liberados aparecen a las 30 hpi (3,26).

Al final de la replicación del DNA la proteína ORF2 se auto-ensambla y la región rica en argininas localizada en el N-terminal de esta proteína se une al DNA y lo encapsula (19) (figura 5). El ORF3 no parece ser esencial para la replicación de PCV2 (3), pero induce apoptosis y recluta macrófagos lo que puede facilitar la diseminación sistémica del PCV2 (23) (en la fig. 1 se esquematizan las estructuras encargadas de la replicación del DNA viral).



**Figura 1. Organización genómica y localización del origen de replicación del PCV2.**

El PCV2 contiene 3 genes principales: ORF1 codifica para las replicasas virales Rep y Rep' (flecha grande); ORF2 es la única proteína estructural que forma la cápside de PCV2 (flecha mediana) y ORF3 (flecha pequeña) induce apoptosis en las células diana. El genoma de PCV2 contiene un origen de replicación entre los extremos 5' de los genes ORF1 y ORF2, y forma una estructura secundaria tallo/bucle (cuadro amarillo). Delante de esta estructura secundaria se localizan los hexámeros H1-H4 (rectángulos rojos). Las replicasas virales se unen a H1 y H2 para favorecer el inicio de la replicación del DNA viral (se utilizó el programa SnapGene® para el diseño de esta figura).

### **1.5. El sistema inmune del cerdo y su interacción con PCV2**

En general, el sistema inmune del cerdo es similar al del humano con respecto a la respuesta que se genera, y está formado por el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo (27). El sistema inmune innato está constituido por células presentadoras de antígenos (APCs) como las células dendríticas (DCs) y los macrófagos, principalmente. Las APCs contienen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) tanto en su superficie como en su interior alojados en endosomas. Los PRRs detectan moléculas de los patógenos conocidas como “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs). De esta manera, las APCs detectan a los patógenos, los fagocitan, los procesan en péptidos cortos y presentan estos péptidos a los linfocitos T del sistema inmune adaptativo. Los péptidos de los patógenos son cargados en la superficie de las APCs a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, para activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, respectivamente (27).

El sistema inmune adaptativo está constituido por la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral de los cerdos al igual que en otros mamíferos esta mediada por linfocitos B y se basa en IgG, IgA e IgM, principalmente. La inmunidad celular de los cerdos se distingue de la de otros mamíferos por contener linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> incrementan con la edad de los cerdos, y se consideran células efectoras/de memoria, producen IL-10, y pueden participar en la producción de anticuerpos promoviendo el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (28).

El sistema inmune del cerdo se ve afectado por virus inmunosupresores como PCV2 (29). PCV2 puede replicarse en linfocitos T, linfocitos B y monocitos. Los linfocitos B son las células con mayor permisividad (30,31), mientras que los monocitos podrían ser el lugar de persistencia de la infección por PCV2 (3). PCV2 se introduce en los monocitos porcinos por endocitosis mediada por clatrina, donde se requiere de un ambiente ácido para su internalización. En las DCs maduras y sus precursores, PCV2 entra por una vía diferente a la macropinocitosis en ausencia de replicación viral (3). PCV2 no es capaz de replicarse en DCs y macrófagos de los cerdos infectados, y aunque estas células captan una gran cantidad de PCV2 (3), el virus no puede ser procesado (30).

Algunos estudios *in vitro* indican que las DCs de cerdo infectadas con PCV2 pueden procesar antígenos y madurar, pero la señalización de TLRs se ve afectada (32), ya que el genoma viral de doble cadena que se genera durante la replicación viral, inhibe el IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (32,33). Por otro lado, en estudios *in vivo* se ha observado que al comienzo de la infección por PCV2, la producción de IFN- $\gamma$  disminuye mientras que la producción de IL-10 incrementa en los cerdos enfermos. Los cerdos infectados con PCV2 que no presentan signos clínicos mantienen una respuesta de IFN- $\gamma$  más estable. Adicionalmente, los cerdos con signos clínicos no son capaces de generar citocinas como IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e IFN- $\gamma$ , mientras que los cerdos vacunados si generan esta respuesta proinflamatoria (34). En conjunto, esto sugiere que los cerdos que no producen IFN- $\gamma$  en la etapa temprana de la infección están predispuestos a desarrollar la enfermedad causada por PCV2.

PCV2 requiere células en mitosis para replicarse (32) y es por esto que la inmunoestimulación favorece la replicación de PCV2. Los cerdos vacunados contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) y desafiados con co-infección de PRSSV con PCV2 generan lesiones más marcadas y títulos virales más altos de PCV2 que los cerdos que no fueron inmunizados (35). De manera similar, la administración del mitógeno concanavalina A (ConA) en las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> o a las células B IgM<sup>+</sup> favorece la replicación de PCV2. Sin embargo, la administración de IFN- $\gamma$  no incrementa la replicación de PCV2. Así, la replicación de PCV2 es más favorecida en linfocitos que se encuentran en mitosis que por la administración de sustancias inmunoestimulantes (31).

## **1.6. Transmisión**

PCV2 es de alta prevalencia en cerdos de todo el mundo (3,36). La principal ruta de transmisión es la vía oronasal, de esta manera, PCV2 alcanza los macrófagos alveolares de los pulmones. En condiciones de campo, la mayoría de cerdos presentan seroconversión contra PCV2 entre los 2 y 4 meses de edad, indicando que la transmisión horizontal es muy eficiente. Después de que las cerdas gestantes se infectan por la vía intranasal, ocurre la transmisión transplacentaria (3,37,38).

PCV2 se encuentra en gran cantidad en cavidad nasal, secreciones bronquiales y tonsilares, heces y orina de cerdos enfermos y en menor cantidad en cerdos clínicamente sanos. PCV2 también se ha detectado en semen, por lo tanto, la monta natural así como la inseminación artificial son consideradas rutas potenciales de infección y diseminación (3,39,40).

## **1.7. Síndromes causados por PCV2**

PCV1 no provoca enfermedad en los cerdos, mientras que la infección por PCV2 generalmente es subclínica. Sin embargo, PCV2 puede producir diferentes síndromes como: el síndrome de emaciación posdestete (PMWS), el síndrome de aborto y mortalidad de las cerdas (SAMS) (3,41,42), el síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (PDNS) y neumonía proliferativa y necrotizante porcina (PNP) (3,8). Así, cuando PCV2 se asocia con otros patógenos virales (como influenza porcina y PRRSV) y/o bacterianos (como *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*), la presentación de alguno de los síndromes asociados a PCV2 se ve favorecida, principalmente PMWS, SAMS y PNP (3,43).

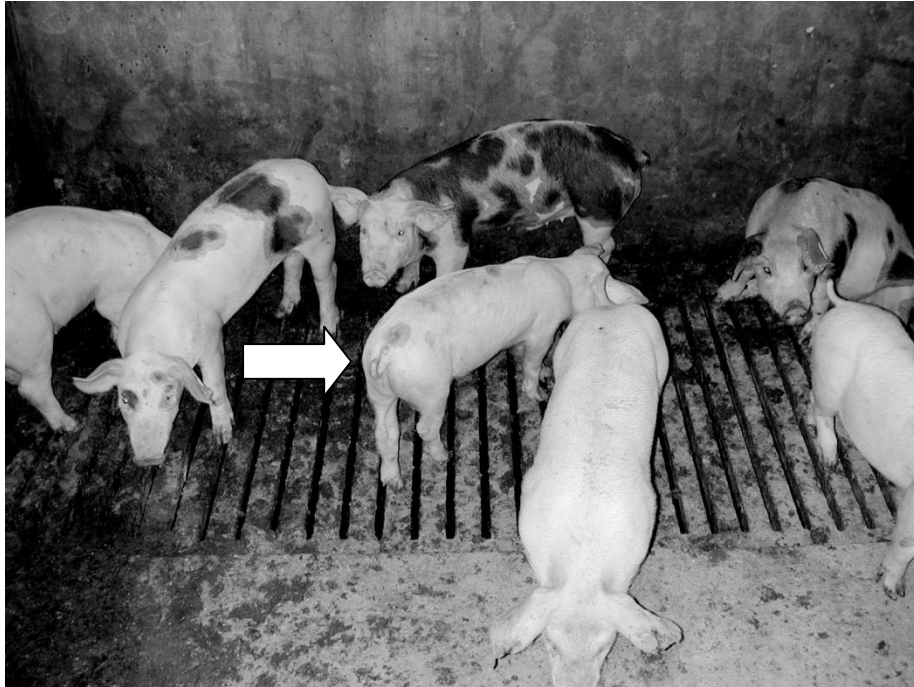
### **1.7.1. Síndrome de emaciación posdestete (PMWS)**

Entre los síndromes que puede producir PCV2, el PMWS es el de mayor impacto. El PMWS afecta cerdos de 1-6 meses de edad y se caracteriza por retardo en el crecimiento, pérdida de peso y muerte (3). Esto se correlaciona con la disminución de los anticuerpos maternos que ocurre entre las 2 y 4 semanas de edad de los lechones (44). Los cerdos con gran cantidad de copias genómicas de PCV2 (cerca de  $1 \times 10^7$ ) pierden 50 g/día de la ganancia diaria de peso (GDP) (45). La principal causa de muerte en cerdos con PMWS se debe a que PCV2 genera falla hepática. Los signos clínicos de un cerdo con PMWS incluyen debilidad, palidez en la piel, dificultad respiratoria, diarrea e ictericia, así como agrandamiento de los nódulos linfáticos (inguinales principalmente) (3). Las lesiones macroscópicas son: aumento del tamaño de los pulmones con consistencia rígida, el hígado pálido, y los nódulos linfáticos blanquecinos y edematosos. La pérdida de tejido linfoide

con infiltración de monocitos en los nódulos linfáticos es una característica importante (3,46). Los cerdos con bajo peso desarrollan PMWS con más frecuencia que los cerdos con un peso mayor. De manera similar, los machos castrados presentan el PMWS con mayor frecuencia que las hembras (3).

Si bien es cierto que el PCV2 es necesario para inducir el PMWS, no todos los cerdos infectados de PCV2 desarrollan algún síndrome asociado a PCV2 (47). A los 14 días después de la infección, PCV2 se puede detectar en los tejidos así como en las lesiones asociadas a PCV2, pero esto no correlaciona con signos clínicos (30). Las lesiones del PMWS se han reproducido en un porcentaje muy bajo. La co-infección de PCV2 con parvovirus porcino (48,49) así como la co-infección con PRRSV (50) genera lesiones más severas que la infección PCV2 solo. De manera similar, la administración de inmunoestimulantes genera lesiones del PMWS después del desafío (51) y la replicación de PCV2 incrementa, pero esto no induce el PMWS (52). El IFN- $\gamma$  incrementa la replicación de PCV2 en cultivo celular, pero una alta concentración de IFN- $\gamma$  en estudios *in vivo* muestra un efecto contrario (31). La administración de mitógenos como conA en cerdos que no han consumido calostro incrementa la replicación de PCV2, pero tampoco induce la presentación de signos clínicos (31).

Así, los inmunoestimulantes incrementan el número de células permisivas para la infección de PCV2 favoreciendo la replicación viral, aunque esto no garantiza la presentación del PMWS (3). Existen algunos trabajos que parecen incrementar la replicación de PCV2 *in vivo*, pero es difícil reproducir el PMWS (53) (en la fig. 2 se muestra un cerdo afectado con el PMWS que presenta retardo en el crecimiento y pérdida de peso).



**Figura 2. Los cerdos afectados con el síndrome de emaciación posdestete (PMWS) presentan como característica principal un retraso en el crecimiento.**

La flecha señala a un cerdo con PMWS con un tamaño menor que el resto de los cerdos provenientes de la misma camada. El cerdo con el PMWS tiene una condición corporal más baja que los cerdos sin el PMWS (modificada de ref. 3).

### **1.7.2. Síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (PDNS)**

El PDNS afecta principalmente lechones (cerdos que se alimentan de leche, aproximadamente de 3 semanas de edad) y cerdos en crecimiento. Los signos que presentan los cerdos con este síndrome incluyen máculas y pápulas irregulares en la piel. Estas lesiones están cubiertas por costras que se van decolorando. También se observa falla renal aguda que es la principal causa de muerte (3). En las lesiones macroscópicas se aprecia agrandamiento de los riñones y endurecimiento de los mismos, edema en pelvis renal y petequias en la corteza renal. En los estudios histopatológicos se observan glomérulos con fibrina e infiltración de células inflamatorias, necrosis de los vasos sanguíneos en piel, pelvis renal, mesenterio e infarto esplénico (3,54). Los cerdos con PDNS presentan títulos anticuerpos contra PCV2 elevados y un perfil de citocinas Th1. El PDNS es considerado como una reacción de hipersensibilidad tipo III en la que se forman complejos inmunes (3) (la fig. 3 muestra un cerdito con PDNS).





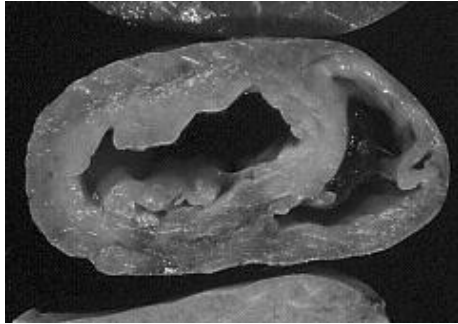
**Figura 3. Cerdo afectado con el síndrome de dermatitis/nefropatía porcina (PDNS).**

Los cerdos con el PDNS presentan máculas y pápulas en la piel debidas a inflamación y necrosis de los vasos sanguíneos. Las lesiones tienen una distribución generalizada pero se localizan mayoritariamente en las piernas y perineo (tomado de ref. 3).

### **1.7.3. Síndrome de aborto y mortalidad de las cerdas (SAMS)**

El SAMS está relacionado con la co-infección de PRRSV y PCV2. Se caracteriza por la alta incidencia de abortos en todas las etapas de gestación y mortalidad en las cerdas. Las lesiones en las cerdas incluyen neumonía intersticial, hiperplasia linfoide y hepatitis. PRRSV y PCV2 se pueden aislar de lesiones hepáticas de cerdas con el SAMS (55). En general, el SAMS es poco frecuente. Los fetos abortados presentan miocarditis necrótica o fibrosa y presencia de alta cantidad de PCV2 en estas lesiones (3). Casi todos los casos publicados de SAMS se han reportado en Norteamérica y solo pocos en Europa. Las lesiones macroscópicas en mortinatos abortados son: congestión hepática e hipertrofia cardiaca. Una lesión característica del SAMS es la necrosis de miocardiocitos (3).

Los fetos son susceptibles a la infección de PCV2 debido a que este virus replica en células en mitosis elevada como los miocardiocitos fetales (3). Los cerditos provenientes de cerdas con el SAMS contienen gran cantidad de PCV2 en el miocardio. Algunas cerdas no quedan gestantes después de la inseminación con semen infectado (56) y se ha demostrado que PCV2 también replica en embriones porcinos (3) (la fig. 4 muestra un corte transversal de un corazón de un cerdo abortado proveniente de cerda con el SAMS).



**Figura 4. Corazón de un cerdo abortado proveniente de una cerda con el síndrome de aborto y mortalidad (SAMS).**

Se realizó un corte transversal del corazón de un feto de cerdo abortado proveniente de una cerda con infección por PCV2. El miocardio contiene áreas pálidas irregulares que corresponden a necrosis (tomado de ref. 3).

#### **1.7.4. Otras lesiones halladas en cerdos con PCV2**

Aunque la PNP y el temblor congénito se relacionaron en un principio con PCV2, más tarde se demostró que la PNP está más asociada a la infección por PRRSV con o sin la co-infección de PCV2 (57,58). Cerdos co-infectados con el virus de la influenza porcina o con el virus de la Enfermedad de Aujeszky y PCV2 pueden presentar también PNP (59). PCV2 también parecía estar involucrado en el desarrollo del temblor congénito. El temblor congénito se caracteriza por contracciones clónicas de músculo esquelético en lechones. Algunos estudios iniciales sugirieron que la inoculación de cerdas gestantes con PCV2 al final de la gestación puede inducir temblor congénito (3,60), pero estudios posteriores mostraron que no existe una asociación entre el temblor congénito y la infección con PCV2 (61). En general, PCV2 se puede asociar con infecciones bacterianas producidas por *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, principalmente, generando lo que se le conoce como complejo respiratorio (62) (en la tabla 1 se resumen los síndromes asociados a PCV2).

**Tabla 1. Síndromes asociados a PCV2 y sus características principales.**

| <b>Síndrome</b> | <b>Edad de susceptibilidad</b>                              | <b>Signos clínicos</b>   | <b>Factores involucrados</b>  | <b>Ref.</b>   |
|-----------------|---|--|---|---------------|
| PMWS            | Destete (1 – 6 meses de edad)                               | Retardo en el crecimiento, pérdida de peso y muerte            | Inmunoestimulación, presencia de otros patógenos en la granja (parvovirus porcino y PRRSV), castración, cerdos destetados y bajos de peso | (3,46, 63–65) |
| PDNS            | Lechones y cerdos en crecimiento. Es raro en cerdos adultos | Máculas y pápulas irregulares en la piel de color rojo-púrpura | Los altos títulos de anticuerpos contra PCV2 y citocinas Th1  | (3,64)        |
| SAMS            | Gestación   | Abortos tardíos y mortinatos                                   | Alta prevalencia de PCV2 en granjas e infección transplacentaria en cerdas gestantes. Coinfección con PRRSV                               | (3,18, 64)    |

### **1.8. Diagnóstico de PCV2**

El diagnóstico de la enfermedad causada por PCV2 se realiza dependiendo del tipo de síndrome que presente el cerdo sospechoso. Un cerdo puede considerarse positivo a PMWS si cumple con 3 puntos: signos clínicos (retardo en el crecimiento, debilidad, disnea, crecimiento de los nódulos linfáticos inguinales, e ictericia), lesiones histopatológicas en tejidos linfoides (pérdida de tejido linfoide, inflamación granulomatosa y/o cuerpos de inclusión), detección de PCV2 en cantidad moderada a alta en tejidos linfoides (3,63).

El diagnóstico del PDNS incluye: lesiones hemorrágicas y necróticas en piel, (extremidades traseras y zona perineal), riñones pálidos e inflamados con petequias corticales. Las lesiones histopatológicas incluyen: vasculitis y glomerulonefritis fibrinosa con necrosis. La detección de PCV2 no se incluye en este diagnóstico (3).

El diagnóstico del SAMS se toma en cuenta la presencia de: abortos tardíos, mortinatos con fibrosis y/o miocarditis necrótica así como una alta cantidad de PCV2 en estas lesiones y otros tejidos fetales (3,66).

La detección de PCV2 en tejidos se basa en hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica. PCV2 se encuentra frecuentemente en el citoplasma de monocitos/macrófagos de cerdos afectados con el PDNS o el PMWS. Existe una fuerte correlación entre cantidad de PCV2 y severidad de las lesiones (3).

Dado que la infección con PCV2 ocurre de manera subclínica en casi todas las granjas, la cantidad de PCV2 es la principal diferencia entre cerdos infectados de manera subclínica y cerdos con el PMWS. Las técnicas como la PCR en tiempo real, el ELISA de captura y el análisis inmunohistoquímico permiten determinar la cantidad de PCV2 en tejidos y/o suero y por lo tanto, pueden ser usados para el diagnóstico del PMWS (en la tabla 2 se describen las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en los tejidos de cerdos con síndromes asociados a PCV2).

**Tabla 2. Lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en tejidos de cerdos con enfermedad sistémica causada por PCV2.**

| Síndrome | Lesiones macroscópicas  | Lesiones microscópicas   | Referencias |
|----------|---|--|-------------|
| PMWS     | Pulmones agrandados y duros, hígado pálido, manchas blancas en la corteza del riñón | Pérdida de tejido linfoide, infiltración de monocitos y alta cantidad de PCV2 en tejido linfoide | (3,46)      |
| PDNS     | Riñones con consistencia firme y edema en pelvis renal. Corteza renal con           | Glomerulonefritis y vasculitis necrótica en capilares dérmicos                                   | (3)         |

|      |  |  |        |
|------|--|--|--------|
|      | petequias. Máculas y pápulas en perineo    |  |        |
| SAMS | Congestión hepática e hipertrofia cardiaca | Cantidad elevada de PCV2 en las lesiones cardiacas. La lesión histopatológica característica es una miocarditis necrótica o fibrinosa. | (3,66) |

### 1.9. Prevención y control

Las vacunas contra PCV2 han mostrado prevenir las enfermedades asociadas a PCV2 o reducir su incidencia (7). La edad para la vacunación es crucial. La vacunación de los lechones a la primera semana de edad no es recomendable debido a la interferencia con los anticuerpos maternos. Los cerdos inmunizados a las 3 semanas de edad producen anticuerpos contra PCV2 y tienen un aumento en la GDP y una reducción de la viremia (67).

La inmunidad materna es una fuente de protección importante para prevenir el desarrollo del PMWS en los lechones (63). Las cerdas vacunadas contra PCV2 proporcionan anticuerpos maternos a los lechones por medio del calostro, pero estos anticuerpos disminuyen durante la crianza. El PMWS no se observa en cerdos menores de 4 semanas de edad, probablemente por la protección de los anticuerpos maternos. Los cerdos generan seroconversión de manera activa hasta las 7-12 semanas de edad, y estos anticuerpos duran hasta las 28 semanas de edad. Algunos cerdos que generaron anticuerpos contra PCV2 pueden presentar viremia, por lo tanto, los anticuerpos contra PCV2 no son totalmente protectores (3). Vacunar a las cerdas al empadre y a los cerditos a las 6 semanas de edad es altamente recomendable (44).

Los cerdos que tuvieron una infección previa por PCV2 y que fueron vacunados posteriormente, presentan una reducción en la viremia así como una menor cantidad de PCV2 en los ganglios linfáticos (68). Las cepas de PCV2 que circulan en granjas donde se

aplica la vacunación son diferentes a las cepas de PCV2 circulantes en las granjas sin vacunar (69).

PCV2 es poco sensible a desinfectantes comerciales basados en clorhexidina, formaldehído, yodo, alcoholes y cloroformo. PCV2 puede resistir un pH de 3 y ser estable a 70°C por 15 min. Por lo tanto, la principal medida para prevenir y/o controlar un brote de síndromes asociados a PCV2 es la vacunación (3). Aunque las vacunas contra PCV2 reducen la incidencia del PMWS, la presencia de PCV2 puede persistir en las granjas después de la vacunación (70).

### **1.9.1. Vacunas comerciales contra PCV2**

Todas las vacunas contra PCV2 se basan en la proteína ORF2 (7). Las vacunas contra PCV2 disminuyen la viremia, la morbilidad y la mortalidad por PCV2 y mejoran los parámetros productivos en las granjas porcinas (71–73). Las primeras vacunas contra PCV2 se basaron en virus completos y están hechas de virus inactivados o virus atenuados. Recientemente se han desarrollado vacunas basadas en partículas tipo virus (VLPs) (7,74–76).

#### **1.9.1.1. Vacunas basadas en virus completos**

La primera vacuna contra PCV2 fue Circovac® (Merial) que salió al mercado en el 2006 y está hecha de PCV2 inactivado con adyuvante oleoso (7). Las vacunas inactivadas son preparaciones de virus cultivados en células PK-15 que después son inactivadas con formol. Los cerdos vacunados con PCV2 inactivado con una sola dosis disminuye las lesiones y la viremia (77). Las vacunas inactivadas han mostrado inducir una respuesta robusta de anticuerpos, disminuir las lesiones microscópicas en los tejidos linfoides inguinales y la carga viral en suero (78). Las vacunas inactivadas han mostrado generar anticuerpos neutralizantes así como IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  se produce a las 3 semanas después de la primera inmunización y correlaciona con protección (79). Sin embargo, los anticuerpos inducidos con las vacunas inactivadas disminuyen rápido (78).

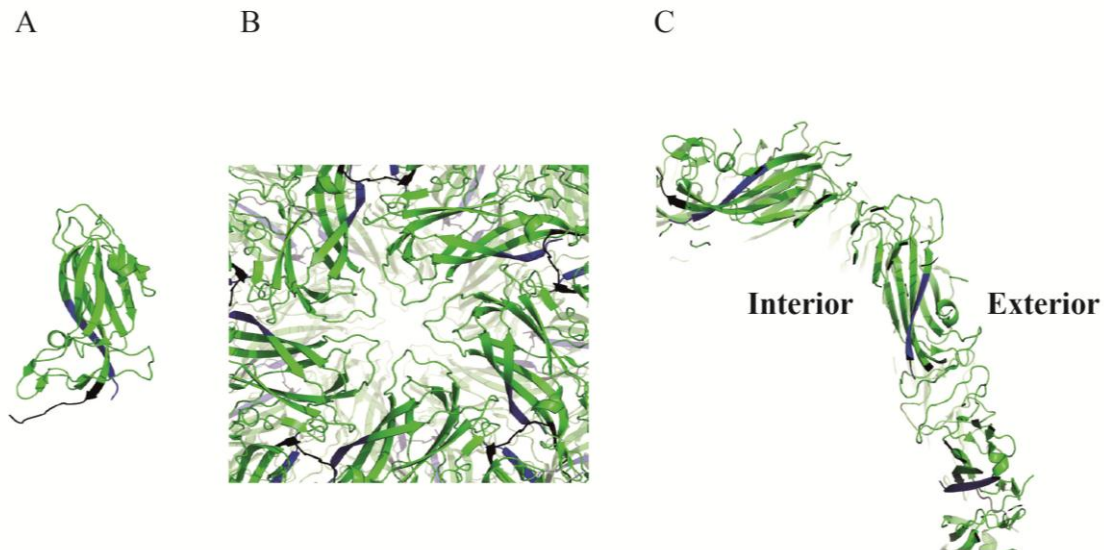
También se han usado vacunas atenuadas contra PCV2. Una vacuna de este tipo que fue usada ampliamente fue Suvaxyn® (Zoetis®) y estaba basada en un virus quimérico de PCV1/PCV2 (7). Aunque esta vacuna generaba títulos de anticuerpos neutralizantes más altos que las vacunas inactivadas, el virus quimérico de la vacuna Suvaxyn® se diseminó en los cerdos vacunados, y esta vacuna tuvo que sacarse del mercado (7,80). Más tarde, el PCV2 usado en la vacuna Suvaxyn® fue inactivado y usado en la formulación de una nueva vacuna contra PCV2 con el nombre de Foster® PCV.

### **1.9.1.2. Vacunas basadas en VLPs**

La biología molecular así como la biotecnología han permitido el desarrollo de vacunas que puedan ser alternativas a las vacunas tradicionales, tal es el caso de las VLPs (81). Las vacunas de PCV2 basadas en VLPs comenzaron a producirse en el 2007. La simple producción de la proteína ORF2 de PCV2 en células de insecto es suficiente para que esta proteína se auto-ensamble en partículas con estructura y antigenicidad muy parecida a la de las cápsides de PCV2 (82–87) (la fig. 5 muestra la estructura de la proteína ORF2 de PCV2 ensamblándose para formar la cápside). Las VLPs se pueden producir en bacteria, levadura o células de insecto (19,88). Actualmente, tres vacunas comerciales contra PCV2 se basan en VLPs: Circoflex® (Boehringer Ingelheim), Circumvent® (Intervet/Merk) y Porcilis PCV® (Shering Plough/Merk) y todas éstas son producidas con el sistema baculovirus (7).

Las VLPs son eficientemente captadas por las APCs para su presentación tanto para MHC-I como para MHC-II (88). La inmunización con VLPs de PCV2 generan anticuerpos neutralizantes (89). La inmunización con estas vacunas basadas en VLPs disminuye la viremia así como la carga viral nasal y fecal. Una sola dosis de VLPs puede ser suficiente para generar altos títulos de anticuerpos neutralizantes, pero se ha observado que la administración de un refuerzo induce una respuesta inmune más robusta (73,90). La administración de VLPs derivadas de levadura por vía oral genera una respuesta humoral basada en IgG e IgA (91). Aunque las VLPs inducen respuestas humorales y celulares (82), la principal desventaja de esta tecnología es que su purificación es costosa ya que se necesita de un equipo de laboratorio especializado (92–94). Por ejemplo, las vacunas de

PCV2 basadas en VLPs (así como las vacunas tradicionales contra PCV2) tienen un costo de aproximadamente 80 pesos/dosis.



**Figura 5. La proteína ORF2 de PCV2 se auto-ensambla y forma partículas tipo virus (VLPs).**

La proteína ORF2 de PCV2 está constituida por hojas  $\beta$  y segmentos desordenados como estructuras secundarias (A). La proteína ORF2 tiene la capacidad de auto-ensamblarse para formar la cápside de PCV2. Los segmentos desordenados en forma de asas son fundamentales para la oligomerización de la proteína ORF2. El ensamblado final es un arreglo de 60 subunidades que ensamblan una partícula de PCV2 (B). PCV2 tiene una región rica en argininas encargadas de unirse al DNA viral. Esta región no ha sido determinada por cristalografía pero se encuentra en la parte N-terminal de ORF2 (azul). El extremo N-terminal se localiza en el interior de la cápside (C). En negro se muestra el extremo C-terminal de la proteína ORF2 y en verde el cuerpo de la proteína ORF2 constituido principalmente por hojas  $\beta$  (figura realizada con el programa Pymol y usando el archivo PDB 6E32).

### 1.9.1.3. Vacunas contra PCV2 en desarrollo

Existe gran variedad de vacunas contra PCV2 en desarrollo. Estas vacunas incluyen: el despliegue de péptidos en superficies bacterianas (95), vacunas de DNA (96), uso de proteínas inmunoestimulantes (97), el uso de vectores virales (14,98) e incluso la fusión de ORF2 con hormonas promotoras de crecimiento (99). Estas vacunas han mostrado disminuir el número de copias de DNA de PCV2 así como un incremento en la GDP (99).



**a) *Despliegue de la proteína ORF2 de PCV2***

La proteína ORF2 de PCV2 se ha desplegado en sistemas bacterianos y virales. La inmunización con *Lactococcus lactis* que despliega ORF2 de PCV2 en su superficie genera un incremento en la GDP y disminuye las lesiones causadas por PCV2 (95). El virus del mosaico del pepino también se ha usado para el despliegue de epítomos de PCV2 en su superficie, y la inmunización con estos virus induce anticuerpos contra PCV2 (100). De manera similar, la inmunización con el fago lambda que despliega epítomos de ORF2 de PCV2 genera anticuerpos neutralizantes y respuesta inmune celular contra PCV2 (15). En adición, la inmunización con baculovirus recombinantes que expresan la proteína ORF2 de PCV2 en su superficie también induce anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmune celular (16).

**b) *Uso de virus quiméricos como vectores de expresión***

Algunos virus porcinos han sido modificados para expresar proteínas de PCV2. Por ejemplo, el virus de la enfermedad de Aujeszky fue modificado genéticamente para inducir la expresión de ORF2 de PCV2 *in vivo*. La inoculación con este virus promovió la producción de anticuerpos contra PCV2 (98). De manera similar, el virus de la viruela porcina (suipoxvirus) también fue modificado genéticamente para co-expresar ORF2 de PCV2, así como la citocina IL-18. La inoculación con este virus generó anticuerpos neutralizantes así como IL-4 e IFN- $\gamma$  (14).

**c) *Vacunas de DNA***

Las vacunas de DNA contra PCV2 generalmente se basan en un plásmido que contiene la secuencia de nucleótidos de ORF2 de PCV2 y que induce la expresión de esta proteína en las células inoculadas. Previamente se demostró que la co-inoculación de ratones con plásmidos que contienen las secuencias de nucleótidos ORF2 e IL-15, induce la expresión de estas moléculas en las células inoculadas y es capaz de generar una respuesta inmune tanto humoral como celular. La respuesta inmune fue más robusta con la

inoculación de los plásmidos IL-15 y ORF2 de PCV2 que con la inoculación del plásmido que contiene únicamente ORF2 de PCV2 (96).

### **1.9.2. Adyuvantes usados en las vacunas contra PCV2**

La función clave de un adyuvante es mejorar la inmunogenicidad de las vacunas, permitiendo un mejor reconocimiento del patógeno. Esto también permite que se requieran menos refuerzos o una dosis menor de la vacuna (101,102). Los adyuvantes más utilizados se basan en las sales de aluminio (103,104) y emulsiones de aceite en agua (101,102). En los Estados Unidos de América están aprobadas las sales de aluminio particuladas como el hidróxido y el fosfato de aluminio; el MF59 y el AS03, que son emulsiones basadas en escualeno en agua; y el AS04 que es una combinación de monofosforil lípido A e hidróxido de aluminio (105). Todas las vacunas comerciales contra PCV2 contienen adyuvante: Circoflex® contiene carbómero que es un polímero acuoso, Circuvent® y Porcillis PCV® contienen D1- $\alpha$ -tocoferol con parafina líquida, Circovac® contiene aceite ligero de parafina y Foster® PCV contiene sulfolipo-ciclodextrina en escualeno en agua (7) (la tabla 3 muestra las vacunas comerciales actualmente disponibles contra PCV2).

**Tabla 3. Vacunas comerciales contra PCV2: antígenos, adyuvantes y uso recomendado.**

| Nombre                 | Marca                          | Tipo                               | Adyuvante  | Dosis/vía   | Uso   |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|---|---|
| Ingelvac<br>Circoflex® | Boehringer<br>Ingelheim        | VLP<br>producida en<br>baculovirus | Carbómero<br>(polímero<br>acuoso)                      | 1 ml IM<br>dosis única                                      | Cerdos de 3 o<br>más semanas<br>de edad                         |
| Circumvent®<br>PCV     | Merck<br>Animal<br>Health, Inc | VLP<br>producida en<br>baculovirus | D1- $\alpha$ -<br>tocoferol con<br>parafina<br>líquida | 2 ml IM.<br>Refuerzo 3<br>semanas<br>después                | Cerdos de 3 o<br>más semanas<br>de edad                         |
| Fostera®<br>PCV        | Zoetis                         | Quimera<br>PCV1-2<br>inactivado    | Sulfolipo-<br>ciclodextrina<br>en escualeno<br>en agua | 2 ml IM.<br>Dosis única<br>o refuerzo a<br>las 3<br>semanas | Cerdos de 3 o<br>más semanas<br>de edad                         |
| Circovac®              | Merial                         | PCV2<br>inactivado                 | Aceite ligero<br>de parafina                           | 2 ml IM.<br>Refuerzo 3<br>o 4 semanas<br>después            | Cerdas<br>núlparas /<br>cerdos de 3 o<br>más semanas<br>de edad |

### 1.9.2.1. Uso de citocinas y proteínas acarreadoras como adyuvantes en vacunas de PCV2

La co-administración de ORF2 de PCV2 con IFN- $\gamma$  porcino o la fusión de estas dos proteínas también ha sido evaluada en la generación de anticuerpos. Un estudio indicó que la co-administración de PCV2 con IFN- $\gamma$  porcino indujo más anticuerpos que la administración de ORF2 de PCV2 solo o fusionado a IFN- $\gamma$  porcino. Este estudio sugirió que la fusión de ORF2 de PCV2 con IFN- $\gamma$  puede provocar cambios conformacionales en estas proteínas, inhibiendo su actividad biológica (97). La inmunización con flagelina (de *Salmonella typhimurium*) fusionada con ORF2 de PCV2 en ratones también ha sido evaluada. La inmunización de ORF2 de PCV2 fusionada a flagelina generó anticuerpos neutralizantes así como citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sin adyuvante (17).

### **1.9.2.2. Uso de péptidos de auto-agregación (SAPs) como sistemas de entrega de antígenos**

Los SAPs son secuencias cortas de aminoácidos que se asocian espontáneamente formando estructuras mesoscópicas como: nanotubos, nanoesferas, nanofibras, nanocintas, entre otras (106–109). El proceso de auto-agregación involucra interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas y apilamientos  $\pi$ - $\pi$  (106,109–116). Los SAPs de manera típica forman hojas  $\beta$  (117) pero también pueden formar  $\alpha$ -helices, las cuales se ensamblan en hélices superenrolladas (113).

#### ***1.9.2.2.1 Respuesta inmune generada con SAPs que forman nanopartículas (NPs)***

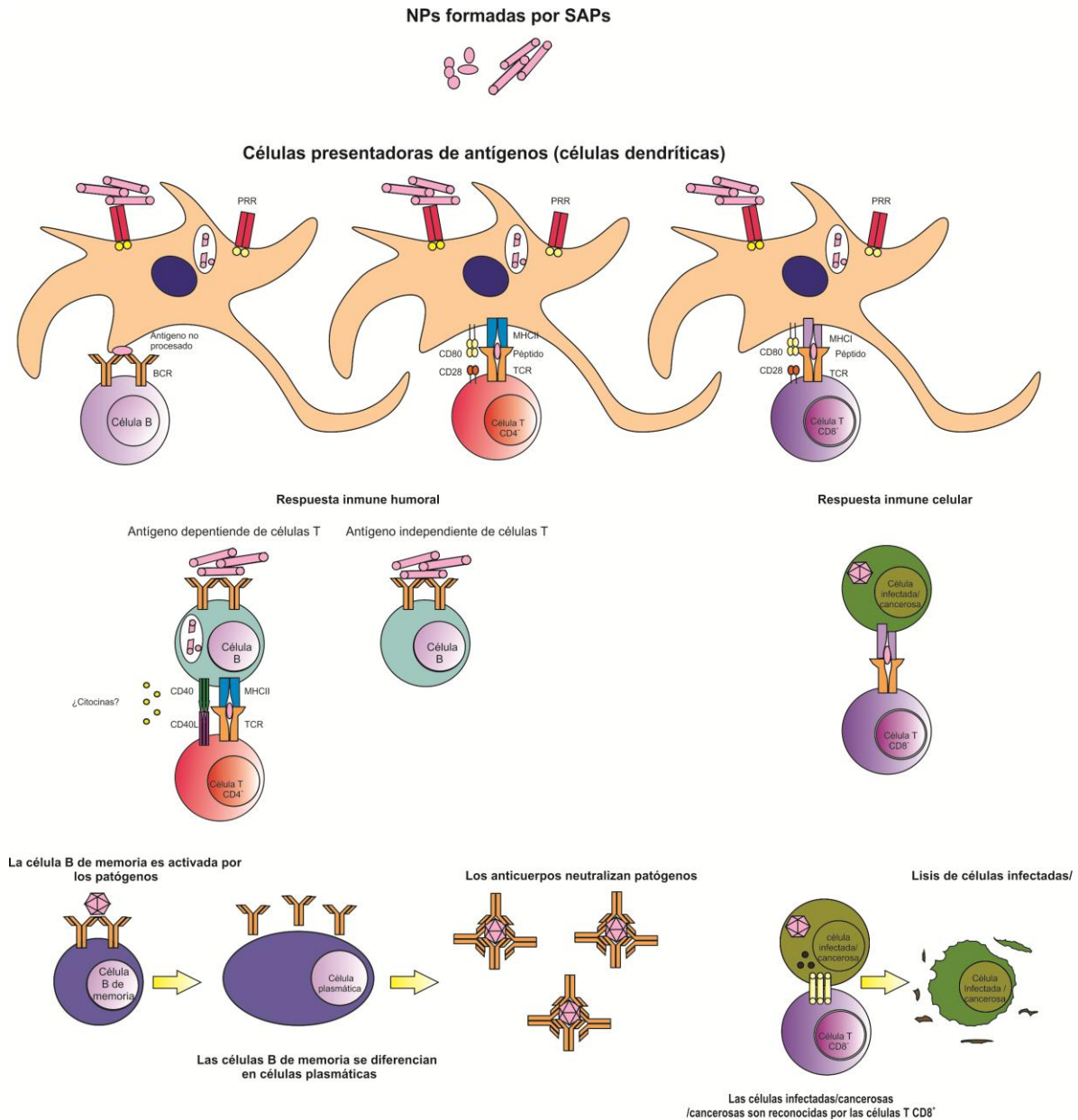
Los sistemas de entrega de antígenos basados en NPs han mostrado incrementar la inmunogenicidad de los antígenos actuando como adyuvantes (88). Las NPs se definen como cualquier material particulado con un tamaño de 1-1000 nm (118–122). Un antígeno en forma de partícula puede permitir el entrecruzamiento directo de los receptores de los linfocitos B para promover la respuesta de anticuerpos (88). Los SAPs han mostrado inducir una respuesta inmune adaptativa basada tanto en anticuerpos como en células T. Algunos SAPs inducen altos niveles de anticuerpos, generan protección contra patógenos y brindan estabilidad a los antígenos sin generar inflamación (123).

El tamaño de las partículas juega un papel muy importante en la respuesta inmune, pues facilita que las APCs puedan reconocer estas partículas y capturarlas (124,125). Después de que las APCs capturan las NPs, estas células procesan los antígenos de las NPs, degradándolos en péptidos más cortos para presentarlos a los linfocitos T (126). La activación de células T se puede evaluar de manera indirecta por medio de la determinación de citocinas.

Las respuestas inmunitarias generadas por SAPs generalmente son dependientes de receptores tipo Toll (TLRs) o de células T. Un ejemplo de este fenómeno es el péptido Q11. La inmunización de nanofibras formadas por Q11 conjugadas con un epítipo de

*Plasmodium falciparum* genera una respuesta robusta de anticuerpos; pero la inmunización de ratones *knockout* de MyD88 con estas nanofibras no induce anticuerpos. Se han observado resultados similares después de la inmunización de ratones desnudos (no contienen linfocitos T) con estas nanofibras (127). Por lo tanto, las células T y la señalización de TLRs juegan un rol importante en la producción de anticuerpos cuando los ratones son inmunizados con NPs generadas por SAPs. Adicionalmente, Q11 no genera inflamación (123) (la fig.6 muestra la interacción entre NPs generadas por SAPs y el sistema inmune).

Algunas limitantes de los SAPs son que deben sintetizarse en laboratorios especializados, generalmente en fase sólida, y el antígeno debe ser conjugado a las NPs ensambladas, ya que por ser secuencias cortas de aminoácidos, no se pueden fusionar antígenos grandes porque esto puede afectar la estructura secundaria de los SAPs y su auto-ensamblaje (109).



**Figura 6. Interacción entre nanopartículas (NPs) formadas por péptidos de auto-agregación (SAPs) y el sistema inmune.**

Los SAPs se auto-agregan por interacciones no covalentes y forman NPs. Estas NPs se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y son endocitadas por células presentadoras de antígenos (APCs) como las dendríticas. Las APCs procesan las NPs y las degradan generando péptidos cortos. Los péptidos se cargan en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y son presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Adicionalmente, una vez que las APCs maduran sobreexpresan moléculas coestimuladoras como CD80 que se unen a otras moléculas coestimuladoras como CD28 encontrada en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. Algunos linfocitos T CD4<sup>+</sup> o cooperadores ayudan a la activación de las células B mientras otros ayudan a la activación de las células T CD8<sup>+</sup> o citotóxicas. Las células B de memoria pueden vivir varios meses e incluso años, y tienen la capacidad de convertirse en células plasmáticas que generan anticuerpos que pueden neutralizar patógenos extracelulares o viriones libres mientras las células T citotóxicas lisan células infectadas con patógenos intracelulares o incluso células cancerosas (modificada de ref. 109).

### **1.9.3. El sistema baculovirus en la producción de vacunas**

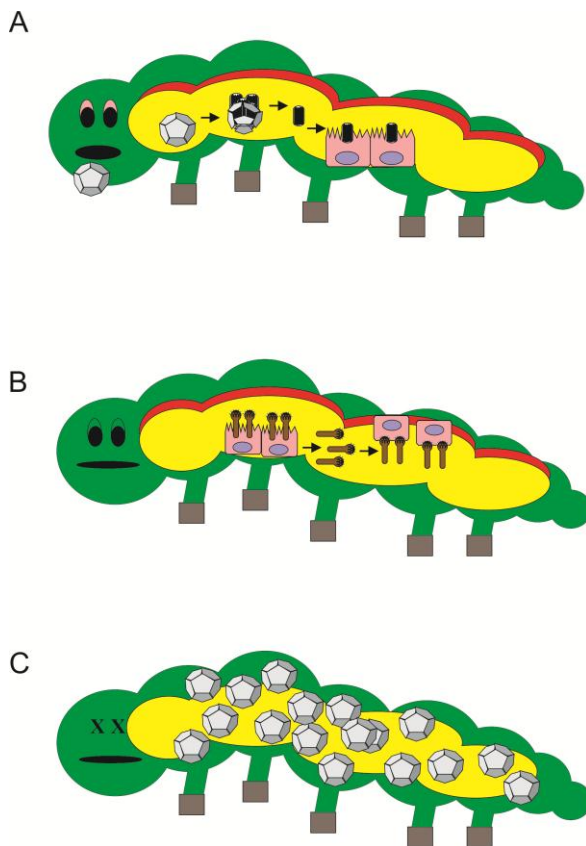
Como mencionamos anteriormente las vacunas contra PCV2 basadas en VLPs son producidas con el sistema baculovirus. Los baculovirus son virus de insecto de distribución mundial cuya función es regular la población de insectos en la naturaleza; pertenecen a la familia *Baculoviridae* y contienen un gran genoma circular de DNA de doble cadena, los viriones son envueltos y tienen forma de báculo. Hay cientos de especies de baculovirus y se clasifican en dos géneros: los nucleopoliedrovirus y los granulovirus cuya diferencia es la morfología y tamaño de los cuerpos de oclusión que producen. Los cuerpos de oclusión de los nucleopoliedrovirus se llaman poliedras por su morfología y tienen un tamaño de 800-2000 nm mientras que los cuerpos de oclusión de los granulovirus tienen forma de cápsulas con un tamaño de 200 nm de ancho y 500 nm de largo (128). El *nucleopoliedrovirus de Autographa californica* (AcNPV) fue el primer baculovirus en ser secuenciado genéticamente, su genoma está constituido por más de 133,894 pares de bases codificando para más de 150 genes y es ampliamente usado en biología molecular (129).

#### **1.9.3.1. Ciclo de replicación de los baculovirus**

Durante el ciclo de infección por baculovirus, se producen dos formas virales: los virus libres (BV) que salen por gemación de la membrana plasmática de las células infectadas y los virus ocluidos en los cuerpos de oclusión (ODV). Los BV se encargan de la infección de célula a célula dentro del insecto mientras que los ODVs son responsables de la transmisión a otros insectos por vía oral. El ciclo de infección comienza cuando un insecto consume alimento contaminado con los cuerpos de oclusión o poliedras, y los viriones ocluidos se liberan al intestino medio, donde el pH alcalino activa una proteasa viral que degrada a la poliedrina (128), proteína que constituye más del 50% de las poliedras (130). La poliedrina contiene 245 aminoácidos, tiene un peso molecular de 29 kDa y es expresada bajo un potente promotor tardío (130).

Los BVs y ODVs son idénticos en su cápside e información genética pero difieren en su envoltura viral. En la fase temprana de la infección, que abarca entre 12 y 20 hpi, se producen los BVs, mientras que en la fase tardía, que inicia a las 20 hpi, se favorece la

producción de ODVs, que concluyen con la lisis de las células y la muerte del insecto a las 48 hpi cerrando el ciclo (128). Las poliedras son muy importantes en el ciclo de infección porque son estructuras que le brindan estabilidad a los viriones ocluidos en su interior manteniéndolos infectivos durante decenas de años y quizá por siglos al protegerlos de condiciones ambientales adversas principalmente de la desecación y la radiación solar (128) (la fig. 7 esquematiza el ciclo de infección del baculovirus y la generación de poliedras).



**Figura 7. Replicación de los baculovirus y producción de poliedras *in vivo*.**

A) Las larvas de algunos insectos (como *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Spodoptera frugiperda*, etc.) consumen material contaminado con poliedras que contienen baculovirus ocluidos en su interior. Los baculovirus se liberan de las poliedras en el intestino medio del gusano e infectan las células del epitelio intestinal en pocas h. B) Entre 12 – 20 h después de la infección (hpi), las células intestinales infectadas producen y liberan baculovirus libres (BVs). Los BVs contienen la proteína gp64 en su membrana, que les permite salir de las células infectadas por gemación, para unirse nuevamente a otras células del insecto por medio de la fusión de membranas dependiente de pH hasta propagarse a la hemolinfa. C) A las 48 hpi el insecto muere por un mecanismo llamado licuefacción que es facilitado por proteasas virales como la quitinasa. Esto permite la liberación de poliedras en el ambiente, contaminando el alimento de otras larvas de insecto y facilitando de esta manera el siguiente ciclo de infección.



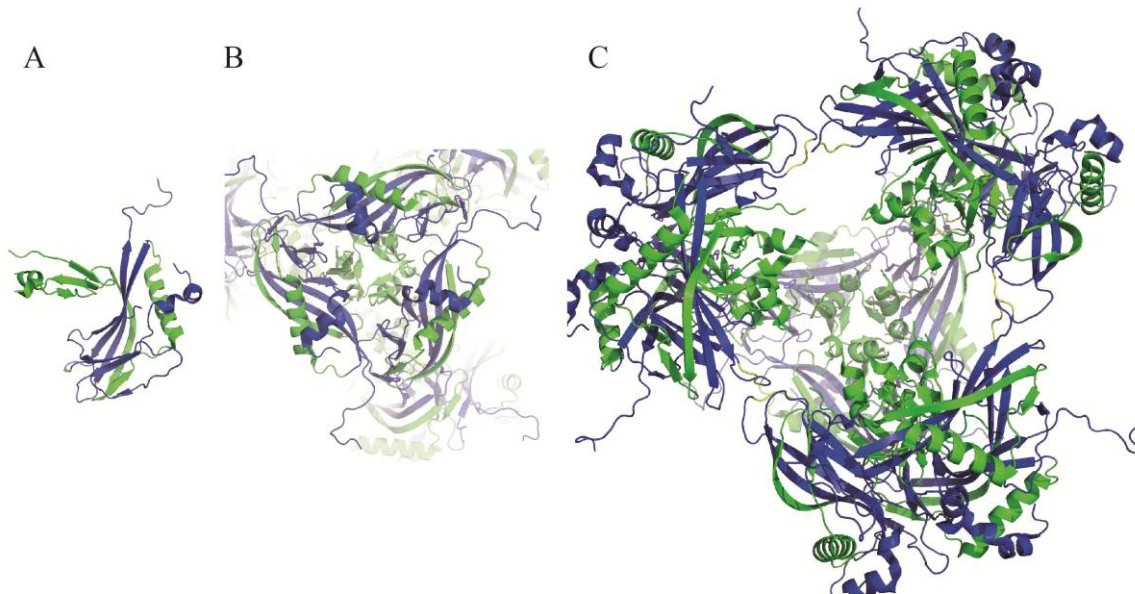
#### **1.9.4. Uso de poliedras como sistema de entrega de antígenos**

A diferencia de las VLPs, los SAPs y otros sistemas de entrega de antígenos, las poliedras se han usado como sistema de entrega de antígenos en pocos estudios. Una característica importante de las poliedras es que brindan estabilidad a las proteínas que se ocultan en su interior (128,131,132). Esto ha sugerido que las poliedras pueden ser útiles en aplicaciones biotecnológicas (132).

Los primeros intentos por introducir proteínas exógenas en las poliedras fueron realizados fusionando proteínas a un fragmento del extremo N-terminal de la poliedrina del nucleopolihedrovirus del gusano de la seda (*Bombyx mori*) (132,133). Las proteínas fusionadas a los primeros 100 aminoácidos de la poliedrina de este virus pudieron ser introducidas eficientemente en las poliedras (133). Para el caso particular de AcNPV, se ha usado la proteína poliedrina completa para fusionar proteínas exógenas en su extremo C-terminal. Esto ha permitido la incorporación de proteínas exógenas en las poliedras (134). También se han insertado epítomos cortos de hemaglutinina de influenza en el extremo N-terminal de la poliedrina y se ha demostrado que las poliedras no ocultan virus eficientemente (135). En contraste, en un trabajo similar, donde se fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C-terminal de la poliedrina, se observó que esta proteína de fusión formaba gránulos fluorescentes en lugar de poliedras (136). Otros antígenos que se han generado en el sistema de poliedras son: el antígeno E2 del virus de la fiebre porcina clásica (137), gD del virus de la enfermedad de Aujeszky (138), entre otros.

#### **1.9.5. Diseño de una plataforma universal de vacunas basada en la incorporación de antígenos en NPs genéticamente codificadas**

La poliedrina contiene 13 hojas  $\beta$ , 5  $\alpha$ -hélices y dos segmentos desordenados. Las subunidades de poliedrina de AcNPV se oligomerizan para formar trímeros, que a su vez se ensamblan formando una unidad de dodecameros de 4 trímeros unidos por puentes disulfuro (cisteína 132) (figura 8); por lo tanto, el ensamblaje de las poliedras involucra tanto interacciones no covalentes como enlaces covalentes (139).



**Figura 8. Cristal de la proteína poliedrina de AcNPV y su oligomerización**

La proteína poliedrina de AcNPV está formada por hojas  $\beta$ ,  $\alpha$ -hélices y segmentos desordenados. Las  $\alpha$ -hélices constituyen el núcleo hidrofóbico mientras que el cuerpo de la poliedrina es un barril- $\beta$  formado por 4 hojas  $\beta$ . Durante la oligomerización de poliedrina, cada subunidad se empaqueta formando trímeros, proceso que necesita al extremo N-terminal que provee interacciones hidrofóbicas (verde). Cuatro trímeros unidos covalentemente por puentes disulfuro en los que participa la cisteína 132 (localizada en un segmento desordenado marcado con color amarillo) forman un dodecámero con gran estabilidad. Después, otros 4 trímeros se unen al dodecámero para formar la celda unitaria. De esta manera, los ocho trímeros se ordenan para llenar la celda unitaria en forma de cubo (139). En verde se muestra la estructura de poliedrina que corresponde a los primeros 110 aminoácidos del extremo N-terminal (5 hojas  $\beta$  y 3  $\alpha$ -hélices). En azul se muestra el extremo C-terminal (figura realizada con el programa Pymol y el PDB ID 2WUY;).

En nuestro laboratorio desarrollamos algunos péptidos derivados del extremo N-terminal de la poliedrina de AcNPV con base en su estructura secundaria y exploramos tanto su capacidad de auto-agregación como su capacidad para incorporar proteínas en NPs (140). Para esto, diseñamos baculovirus recombinantes que inducen la expresión de GFP fusionada al extremo C-terminal de estos péptidos de poliedrina. El péptido PH(1-110) fue el más eficiente para auto-agregarse e incorporar la GFP en NPs. Este péptido está constituido por 5  $\beta$ , 3  $\alpha$ -hélices y un segmento desordenado, pero no contiene la cisteína involucrada en la formación de puentes disulfuro.

Más tarde, evaluamos el uso de las NPs formadas por GFP fusionada al péptido PH(1-110) (NPs PH(1-110)GFP) como sistema de entrega de antígenos en un modelo murino. La inmunización con las NPs PH(1-110)GFP indujo altos títulos de anticuerpos contra la GFP sin generar inflamación (109). Adicionalmente, la inmunización con las NPs PH(1-

110)GFP almacenadas a temperatura ambiente por 6 meses sigue induciendo la producción de anticuerpos contra GFP (datos no publicados). Por lo tanto, este sistema de entrega de antígenos permite incorporar al antígeno de interés en NPs proteicas que se pueden purificar fácilmente y que son termoestables.

En este trabajo, nosotros usamos al PCV2 como modelo antigénico porque causa pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial, incluyendo a la porcicultura mexicana. Nosotros fusionamos la proteína ORF2 de PCV2 al péptido PH(1-110) lo cual permitió la formación de las NPs (NPs PH(1-110)PCV2), caracterizamos estas NPs y evaluamos si la inmunización con estas NPs inducía la generación de anticuerpos neutralizantes contra PCV2 después de la inmunización de cerdos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las vacunas tradicionales contienen patógenos inactivados y/o atenuados. Estas vacunas han ayudado a disminuir la prevalencia de muchas enfermedades e incluso a erradicar algunas de ellas. Sin embargo, las vacunas tradicionales tienen ciertas desventajas: muchos patógenos no pueden cultivarse *in vitro* y se necesita una línea celular para producir cada una de las vacunas. Además, los virus contenidos en algunas vacunas tradicionales se replican en el huésped y se diseminan entre los individuos vacunados.

Por otro lado, las vacunas subunitarias se basan generalmente en partes antigénicas de patógenos en lugar de patógenos completos. Las VLPs son un ejemplo de vacuna subunitaria y se basan en la sobreexpresión de una o varias proteínas virales que se pueden auto-ensamblar formando partículas similares al virus nativo. Las VLPs han demostrado resolver algunos de los inconvenientes de las vacunas tradicionales. Por ejemplo, las VLPs no contienen ácido nucleico infeccioso, por eso son más seguras que las vacunas tradicionales. Además, las VLPs se pueden producir *in vitro* en bacteria, levadura o células de insecto.

No obstante, la recuperación de las VLPs y su purificación toman mucho tiempo y se necesitan equipos de laboratorio especializados que son muy costosos. En la purificación de VLPs se utilizan desde los gradientes de sacarosa hasta la cromatografía. También se pueden sintetizar péptidos y proteínas recombinantes para usarse como antígenos. Aunque los péptidos y proteínas recombinantes se pueden purificar por medio de columnas, su rendimiento y pureza que se alcanzan con esta metodología no siempre son los deseados.

Además de la pureza y el rendimiento, otro punto importante en la producción de vacunas es la inmunogenicidad de los antígenos. En general, las NPs son más inmunogénicas que las micropartículas o que los antígenos solubles. Es muy conveniente desarrollar una plataforma que permita incorporar antígenos en NPs que sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora, y que además se puedan purificar de manera fácil, rápida y económica.

### **3. HIPÓTESIS:**

La inmunización con partículas PH(1-110)PCV2 induce una inmunidad humoral específica contra PCV2 que neutraliza la infección.

### **4. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar si los cerdos inmunizados con las partículas PH(1-110)PCV2 inducen una inmunidad humoral específica contra PCV2 capaz de neutralizar la infección viral.

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Diseñar un baculovirus recombinante que induzca la expresión de la proteína ORF2 de PCV2 fusionada al péptido de poliedrina PH(1-110) para generar las partículas PH(1-110)PCV2.
- Caracterizar las partículas PH(1-110)PCV2 determinando su morfología, co-localización y tamaño.
- Evaluar si los cerdos inmunizados con las partículas PH(1-110)PCV2 producen anticuerpos contra la proteína ORF2 de PCV2 mediante ensayos serológicos.
- Determinar los títulos de anticuerpos generados por la inmunización con las partículas PH(1-110)PCV2 y compararlos con los títulos de anticuerpos generados con una vacuna comercial.
- Determinar si los anticuerpos generados por la inmunización con las partículas PH(1-110)PCV2 neutralizan la infección viral de PCV2 *in vitro*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos:

El kit para la determinación de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay (no. catálogo 10741395), el antibiótico-antimicótico 100X que contiene 10,000 UI de penicilina/ml, 10,000 µg de estreptomina/ml y 25 µg de anfotericina B/ml (no. catálogo 15240-062), el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Cy3 (no. catálogo A10521), el DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) (no. catálogo D3571), el IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) (no. catálogo 15529019), el medio de cultivo DMEM (Eagle Modificado de Dulbecco) (no. catálogo 12800082), el medio de cultivo Optimem™ (no. catálogo 22600134), el medio Grace (no. catálogo 11300-043 or 11605102), el reactivo de transfección Lipofectamine® 2000 (no. catálogo 11668019), el SDS (dodecil sulfato de sodio) (no. catálogo 18220), el sustrato SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity (no. catálogo 34095), el TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) (no. catálogo N301), el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (no. catálogo 15520018), el yeastolate (no. catálogo 292805), la polimerasa Platinum® Pfx (no. catálogo 11708039), la proteinasa K (no. catálogo 25530015) y el sistema baculovirus Bac-to-Bac™ (no. catálogo 10359-016) que contiene: el plásmido pFastBac™, las células competentes DH10Bac™ *E. coli*, y Cellfectin® II fueron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). El ácido plurónico F-68 (no. catálogo P1300), el anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) (no. catálogo A5670), el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP (no. catálogo A9044), el clorhidrato de D-glucosamina (no. catálogo G4875), el medio LB (no. catálogo L3152), la albúmina sérica bovina (BSA) (no. catálogo A5611), la lactalbúmina (no. catálogo L9010), fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Las membranas de nitrocelulosa (no. catálogo HATF00010), las células BL21 (no. catálogo 69386-3) y el plásmido pET-28a-c(+) (no. catálogo 69864), fueron de Merck Millipore, Ltd. (Tullagreen, Carrigtwohill. Co. Cork, Irlanda). El suero fetal bovino (SFB) (no. catálogo 081105) fue de Biowest (Rue du Vieux Bourg, Nuaille, Francia). El kit Qiagen plasmid Midi (catalog no. 12143) fue de QIAGEN (Hilden, Alemania). El plásmido pGEM® T Easy (no. catálogo A1360) fue de promega (Madison, WI, EE. UU.). El marcador de peso molecular de proteínas Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

(no. catálogo 1610374) fue de Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.). El medio de montaje para fluorescencia Dako (no. catálogo S3023) fue de Agilent (Santa Clara, CA, EE. UU.). Las siguientes vacunas fueron usadas: Foster® PCV (lote no. 14075700), Circoflex® (lote no. 1601035B) y Circovac® (lote no. L433873). Las jeringas fueron de 1 y 3 ml y las agujas fueron 26G × 1/2" (0.45 × 12 mm) (agujas marrones) y 22G × 1 1/4" (0.7 × 30 mm) (agujas negras) (para su uso en ratones y cerdos, respectivamente).

## 5.2. Células y virus

En este trabajo se utilizaron las células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (no. catálogo B82501; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) que son células de insecto y las células PK15-C1 (American Type Culture Collection, ATCC® número PTA-8244™; Boulevard Universidad Manassas, VA 20110-2209 EE. UU.) que son células de riñón de cerdo, para infectarlas con baculovirus y PCV2, respectivamente.

Para producir las partículas formadas por la proteína ORF2 de PCV2 fusionada al péptido PH(1-110) diseñamos el baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 usando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, USA). El PCV2 usado en este trabajo fue aislado de una muestra de suero de un cerdo infectado naturalmente. El DNA de PCV2 fue proporcionado por el departamento de Medicina y Zootecnia de los Cerdos de la FMVZ-UNAM. Brevemente, el gen ORF2 de PCV2 fue amplificado por PCR a partir de DNA, utilizando los cebadores delantero 5'-CCATGGCTATGACGTATCCAAGGAGGCG-3' y reverso 5'-GTCGACTTAGGGTTAAGTGGGGGG-3' que contienen los sitios de restricción NcoI y SalI (subrayados), respectivamente. El ORF2 de PCV2 se insertó en un plásmido pFastBac™ modificado en nuestro laboratorio que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido PH(1-110) bajo el promotor de poliedrina. El plásmido pFastBac™ con ORF2 de PCV2 fusionado a PH(1-110) fue insertado en el báculo que contiene el genoma del baculovirus por recombinación usando bacterias competentes (DH10Bac™ *E. coli*). Las bacterias competentes con el báculo recombinante fueron identificadas por PCR, digestión del DNA con enzimas de restricción y secuenciación. El DNA del báculo recombinante fue transfectado en células Sf9, el baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 fue recuperado, amplificado y titulado por ensayo de placa. También se utilizaron los

baculovirus PH(1-110)GFP y PH(245) que se diseñaron para inducir la expresión del péptido PH(1-110) fusionado a GFP o la expresión de la proteína poliedrina completa (245 aminoácidos), respectivamente.

Para el ensayo de seroneutralización, diseñamos un PCV2 recombinante que expresa la GFP bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) como modelo de infección *in vitro*. Para esto, el DNA genómico del PCV2 fue amplificado por PCR y se ligó con el DNA del plásmido pGEM® T easy. La secuencia de nucleótidos que codifica para la GFP fue insertada bajo el promotor de CMV. Este plásmido fue amplificado en bacterias competentes, se extrajo el DNA y se purificó. Se transfectaron células PK-15 con 2 µg de plásmido con Lipofectamine 2000® en Optimem™ y se cambió el medio a las 12 h. Se obtuvo sobrenadante de células transfectadas para recuperar el PCV2 recombinante.

### **5.3. Producción de anticuerpos policlonales contra ORF2 de PCV2 y poliedrina**

Para obtener anticuerpos policlonales contra ORF2 de PCV2 y contra poliedrina se usaron 2 grupos de ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad. Los ratones del primer grupo se inmunizaron con la vacuna Foster® PCV. Los ratones del segundo grupo se inmunizaron con 50 µg de poliedras con adyuvante completo de Freund. El volumen final usado en las inmunizaciones fue de 50 µl. Para obtener las poliedras, se infectaron células Sf9 con el baculovirus PH(245) usando una multiplicidad de infección (MOI) de 20. A las 72 hpi se recuperaron las células y se sonicaron como se describió anteriormente para recuperar las poliedras. Las poliedras se lavaron con 0.1% de SDS en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar debris celular, y se dio un lavado final con PBS para eliminar el SDS residual. La vía de inmunización fue intramuscular y se utilizaron 2 refuerzos para todos los ratones con intervalos de dos semanas. Para los refuerzos administrados en los ratones inmunizados con poliedras se usó adyuvante incompleto de Freund. Los sueros se obtuvieron a las 8 semanas después de la primera inmunización en los dos grupos de ratones.



#### **5.4. Determinación de la MOI adecuada para la producción de las partículas PH(1-110)PCV2**

La MOI es un parámetro crucial para la producción de proteínas cuando se usa el sistema baculovirus (141,142). Es por esto, que para producir las partículas PH(1-110)PCV2 el primer paso fue determinar la MOI adecuada. Para esto, se usaron células Sf9 con una confluencia de  $2 \times 10^6$ /ml y se infectaron con diferentes MOIs (0.2, 2 y 20) del baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 en frascos de cultivo celular T25. A las 72 hpi, se tomó 1 ml de las células Sf9 infectadas y se lisaron por sonicación. Las partículas PH(1-110)PCV2 fueron recuperadas por centrifugación y lavados con PBS como se describe más adelante. Las partículas PH(1-110)PCV2 se mezclaron con amortiguador de Laemmli (50 mM Tris-HCl, 3% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.7% azul de bromofenol pH 6.8), se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE) durante 1 h y media a 120 volts. El gel se tiñó con azul de Coomassie durante 2 h y se destiñó toda la noche con solución de desteñido. El gel se escaneó con un fotodocumentador.

#### **5.5. Determinación del tiempo de infección adecuado para la producción de las partículas PH(1-110)PCV2**

Otro factor importante en la producción de proteínas recombinantes con el sistema baculovirus además de la MOI es el tiempo de infección (141,142). Para conocer el tiempo en el que se obtiene el mejor rendimiento para obtener las partículas PH(1-110)PCV2 realizamos un ELISA sensibilizando placas con partículas PH(1-110)PCV2 obtenidas a las 48 hpi y 72 hpi. Brevemente, las células Sf9 con una confluencia de  $2 \times 10^6$ /ml fueron infectadas con una MOI de 20 del baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 usando frascos de cultivo celular T25 con un volumen de 10 ml. A las 48 y 72 hpi se recuperaron 4 ml estas células. Las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron por sonicación y lavados. El pellet de partículas PH(1-110)PCV2 purificadas se resuspendió en un volumen final de 100  $\mu$ l de PBS para cada muestra.

El ELISA para determinar el tiempo adecuado de infección con el baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 consistió en sensibilizar microplacas Corning® de 96 pozos

de alta unión con 50 µl de una dilución 1:1000 del stock de partículas PH(1-110)PCV2 recuperadas a las 48 o a las 72 hpi. La placa se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se bloqueó con BSA al 2% 1 h a 37°C. Se utilizó un pool de sueros de ratones inmunizados con la vacuna comercial Foster® PCV para detectar ORF2 de PCV2 en las partículas PH(1-110)PCV2 a una dilución 1:200, así como un pool de sueros de ratones inyectados con PBS como control negativo a la misma dilución. Después de 5 lavados, se administró el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 1 h a 37°C a una dilución 1:5000, la placa se lavó nuevamente y se administraron 50 µl de TMB. 20 min después se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico a 0.16 M. Las placas se leyeron con un filtro de 450 nm. Los datos se reportaron como el promedio de las absorbancias ± error estándar.

## **5.6. Producción y purificación de las partículas PH(1-110)PCV2**

Después de estandarizar la MOI y el tiempo de infección del baculovirus PH(1-110)PCV2, se infectaron células Sf9 con este virus con una MOI de 20. Cada lote de partículas PH(1-110)PCV2 fue producido en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, añadiendo un volumen de 100 ml de células Sf9 con una densidad celular de  $2 \times 10^6$  en medio Grace con 10% de SFB, 3.33g/l yeastolate, 3.33g/l hidrolizado de lactoalbúmina, antibiótico-antimicótico conteniendo 100 UI de penicilina/ml, 100 µg de estreptomicina/ml y 0.25 µg de anfotericina B/ml y ácido plurónico F-68 a una concentración final de 0.1%. Las células Sf9 se colocaron a 100 RPM a 27°C. A las 72 hpi, las células se centrifugaron a  $3000 \times g$  durante 10 minutos, y el pellet se resuspendió en 10 ml de PBS. Las células fueron lisadas por sonicación (sonicador Qsonica 700, USA) con una amplitud del 20% durante 30 s en hielo utilizando tubos Falcon de 14 ml, con un volumen de 3.33 ml de células infectadas por tubo. Este procedimiento se llevó a cabo en hielo para evitar pérdida de las partículas por calentamiento. Se utilizaron 3 ciclos de sonicación. El pellet con las partículas PH(1-110)PCV2 se resuspendió en 1 ml de PBS en microtubos de 1.5 ml. Al final, se realizó un solo ciclo de sonicación con una amplitud del 15% 30 s y 1 lavado. Las partículas PH(1-110)PCV2 se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.7. Evaluación de la antigenicidad de las partículas PH(1-110)PCV2 por western blot**

Para saber si las partículas PH(1-110)PCV2 eran reconocidas por anticuerpos específicos contra ORF2 de PCV2 y contra poliedrina se realizaron western blots. Para detectar la proteína ORF2 de PCV2 en las partículas PH(1-110)PCV2, 30 µg de las partículas PH(1-110)PCV2 y 30 µg de las partículas PH(1-110)GFP se corrieron por SDS-PAGE como previamente se describió. Todas las proteínas analizadas se corrieron por duplicado, una parte del gel de poliacrilamida fue teñida con azul de Coomassie y la otra parte se transfirió en membranas de nitrocelulosa a 80 volts durante 1 h y media. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS. Para evaluar la especificidad del western blot, la membrana se incubó con un suero de cerdo negativo a PCV2 a una dilución de 2:4000 en TBS con leche al 2.5% y Tween® 20 al 0.05% (TBSM) por 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó con TBS con Tween® al 0.1% (TBST) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo conjugado con HRP, diluido 1:5000 en TBSM y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después de los lavados con TBST, la membrana se secó, se incubó con Supersignal West Femto® y se escaneó con el equipo LiCor. La misma membrana se lavó y se incubó con un suero de cerdo infectado naturalmente con PCV2 a una dilución de 2:4000 en TBSM para detectar la proteína ORF2 de PCV2 en las partículas PH(1-110)PCV2. La membrana se lavó, se incubó con el anticuerpo anti-IgG de cerdo y se siguió el protocolo usado con el suero del cerdo negativo a PCV2.

De manera similar, evaluamos si los sueros contra poliedrina reconocían las partículas PH(1-110)PCV2. Para esto se corrieron partículas PH(1-110)PCV2, partículas PH(1-110)GFP y lisados de células Sf9 por SDS-PAGE. Una parte del gel se tiñó con azul de Coomassie y a otra parte se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se añadió un suero de ratón inmunizado con poliedras diluido 2:4000 en TBSM a la membrana y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó, se administró el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP a una dilución de 1:5000 en TBSM y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado, la membrana se secó y se le administró SuperSignal™ West Femto. La membrana se escaneó con el equipo LiCor.

## **5.8. Inmunofluorescencia para determinar auto-agregación de la proteína PH(1-110)PCV2**

Exploramos la posibilidad de que el péptido PH(1-110) conservara la capacidad de auto-agregarse y formar partículas, así como su localización subcelular. Para esto realizamos una inmunofluorescencia contra ORF2 de PCV2 usando un pool de sueros de ratones inmunizados con la vacuna comercial Foster® PCV y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3. Primero se sembraron  $1 \times 10^6$  células Sf9/ml en placas de 6 pozos con cubreobjetos estériles y las células se infectaron con el baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 o con el baculovirus PH(1-110)GFP con una MOI de 20. Tanto las células infectadas con el baculovirus PH(1-110)PCV2 como las células infectadas con el baculovirus PH(1-110)GFP fueron tratadas para inmunofluorescencia contra ORF2 de PCV2.

A las 72 hpi, los cubreobjetos que contenían las células Sf9 infectadas se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con PBST (PBS Tritón X-100 al 0.3%) por 15 min. Después de cada procedimiento, los cubreobjetos se lavaron con PBS. Los cubreobjetos se incubaron con glicina al 50 mM en PBS durante 10 minutos y se bloquearon con BSA al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. El suero de ratones inmunizados con la vacuna comercial Foster® PCV se diluyó 1:500 con BSA al 2% en PBS, y fue añadido a los cubreobjetos, incubándolos por 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Cy3 se diluyó 1:1000 y se añadió a los cubreobjetos incubándolos por 1 h a temperatura ambiente. Se añadió DAPI a los cubreobjetos, a una dilución 1:1000 y se incubaron por 5 minutos. Los cubreobjetos se montaron con DAKO y las partículas se visualizaron con el microscopio confocal Fluoview FV10i (Olympus). Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ.

## **5.9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para detectar baculovirus**

Nosotros exploramos si las partículas PH(1-110)PCV2 contenían baculovirus en su interior. Para esto, se cultivaron células Sf9 con una confluencia de  $2 \times 10^6$  y se infectaron con el baculovirus recombinante PH(1-110)PCV2 con una MOI de 20. A las 72 hpi, las

células se recuperaron por centrifugación y se procesaron de la siguiente manera: el pellet celular se resuspendió con PBS, y la muestra se incluyó en resina epóxica de donde se obtuvieron cortes de 90 nm de grosor. Las células Sf9 infectadas fueron contrastadas con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. Las partículas PH(1-110)PCV2 se observaron en el equipo JEOL GEM 12000 EXII a 80 kv y se analizaron con el programa ImageJ.

#### **5.10. Determinación del tamaño de las partículas por medio de un análisis de seguimiento de partículas (NTA)**

El NTA se basa en el movimiento browniano. El principio es simple, las partículas muy pequeñas, por ejemplo aquellas de escala nanométrica, difunden más rápido que las partículas más grandes (143). Para determinar el tamaño de las partículas PH(1-110)PCV2 se infectaron células Sf9 con el baculovirus recombinante como previamente se describió y las células infectadas se sonicaron en agua inyectable. Las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron por centrifugación y se resuspendieron a una concentración de 0.33 µg/ml. Las partículas se analizaron con el equipo NanoSight instrument (Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom) y se corrieron 3 muestras independientes. Los datos obtenidos se registraron como el promedio del tamaño de las partículas en nm más la desviación estándar.

#### **5.11. Inmunización de cerdos**

Nueve cerdos destetados de tres semanas de edad (5 hembras y 4 machos) de la raza Pietrain/York se obtuvieron de una granja mexicana y se determinó por PCR que estaban libres de PCV2. Se realizaron ELISAs 5 semanas después para corroborar la ausencia de anticuerpos maternos. Así, los cerdos con 8 semanas de edad se seleccionaron de manera aleatoria para formar tres grupos de 3 cerdos cada uno. El primer grupo de cerdos fue inmunizado con la vacuna comercial Circoflex®, el segundo grupo fue inmunizado con 200 µg de las partículas PH(1-110)PCV2 y el tercer grupo fue inmunizado con 2000 µg de las partículas PH(1-110)PCV2. Se administraron 2 refuerzos en todos los grupos con intervalos de 2 semanas y todas las inmunizaciones fueron por vía intramuscular. Los cerdos se sangraron cada semana por 7 semanas por punción de la vena yugular usando agujas verdes

de 21GX1-1/2" (0.8X38 mm) y tubos Vacutainer®. Los tubos se centrifugaron a 2000 x g por 15 min y los sueros se recuperaron y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.12. Determinación de anticuerpos contra ORF2 de PCV2 por ELISA**

Para los ensayos serológicos se utilizaron microplacas Corning® de poliestireno de 96 pozos, sensibilizadas con 50 µl/pozo de una solución de 0.33µg/ml de la proteína ORF2 de PCV2 producida en bacteria y se incubaron por 1 h a 37°C. Las microplacas se bloquearon con BSA al 2% en PBS (PBS-BSA) por 1 h a 37°C y se lavaron una vez (PBS con Tritón X-100 al 0.2%). Los sueros de cerdo se diluyeron 1:200 y se colocaron 50 µl de esta dilución en PBS-BSA con Tritón X-100 al 0.2% y se incubaron por 1 h a 37°C. Las microplacas se lavaron y se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo a una dilución de 1:5000 en PBS-BSA con Tritón X-100 al 0.2% incubándolas por 1 h a 37°C. Después de los lavados, se colocó TMB como sustrato durante 20 min y se utilizó ácido sulfúrico al 0.16 M como solución de paro. La lectura de las placas se llevó a cabo por medio de un lector SkanIt for Multiskan FC 3.1 con un filtro de 450 nm. Se consideró un valor positivo por ELISA a los sueros que dieron una absorbancia  $\geq$  al doble de la absorbancia del suero pre-inmune. Los títulos de anticuerpos se determinaron con la dilución más alta de los sueros que daba un valor positivo por ELISA.

Para detectar IgG contra poliedrina, las placas de poliestireno se sensibilizaron con 50 µl/pozo de una concentración de 10 µg/ml de partículas PH(1-110)GFP y se colocaron toda la noche a 4°C. El resto del procedimiento fue el mismo que se utilizó para evaluar anticuerpos anti-ORF2 de PCV2.

### **5.13. Detección de anticuerpos contra ORF2 de PCV2 en su forma desnaturalizada por western blot**

Nosotros exploramos la posibilidad de que los cerdos inmunizados con las partículas PH(1-110)PCV2 reconocieran la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en su forma desnaturalizada. Veinte µg de la proteína ORF2 de PCV2 se analizaron por SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida al 12%. El gel fue transferido en membranas de

nitrocelulosa y se bloquearon con leche al 5%. Las membranas de nitrocelulosa se cortaron en tiras, y cada tira se incubó con un suero de cada uno de los cerdos a una dilución 1:1000 en TBSM con por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron, se les añadió un anticuerpo anti-cerdo conjugado con HRP a una dilución 1:5000 y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Las tiras de membrana se lavaron con TBST, se secaron y se incubaron con Supersignal™ West Femto. Las membranas fueron escaneadas con el equipo LiCor digits.

#### **5.14. Ensayo de seroneutralización viral contra PCV2 y citometría de flujo**

Más tarde, exploramos si los anticuerpos generados por los cerdos inmunizados con las partículas PH(1-110)PCV2 eran neutralizantes. Para esto, realizamos un ensayo de seroneutralización viral usando el PCV2 recombinante que expresa GFP bajo el promotor de CMV. Se colocaron 50,000 células PK-15/pozo en microplacas de cultivo celular. Los sueros pre-inmunes o sueros de los cerdos inmunizados (con la vacuna Circoflex® o con las partículas PH(1-110)PCV2) se diluyeron 1:500 en medio Optimem® y se mezclaron 50 µl de esta dilución con 50 µl de PCV2 recombinante. Estas mezclas se incubaron 1 h a 37°C y fueron añadidas a cada pozo de la microplaca con células PK-15. Se incubó por 1 h a 37°C para permitir que los PCV2 recombinantes no neutralizados se pudieran adherir a las células PK-15 e infectarlas. Las microplacas se lavaron con PBS, se le colocó 200 µl de medio Optimem® suplementado con 1% de SFB. Las células PK-15 fueron incubadas durante todo el experimento a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, se recuperaron a las 72 hpi y se analizaron por citometría de flujo usando el equipo Attune™.

Las células PK-15 de cada pozo de la microplaca se colocaron en microtubos individuales de 1.5 ml. Se registraron 10,000 eventos por cada microtubo, y cada evento representó una célula PK-15 con una intensidad de fluorescencia de GFP específica. Los datos se obtuvieron con el programa Attune® Cytometer v2.1 (life technologies) y fueron graficados como histogramas. Las células PK-15 no infectadas y las células PK-15 infectadas con PCV2 recombinante fueron usadas como indicadores de 0 y 100% de infección y fueron usadas para ajustar los histogramas. Los datos se representaron como porcentaje de inhibición de la infección, tomando el promedio de la intensidad de

fluorescencia de GFP de las células PK-15 infectadas con el PCV2 recombinante como el 100% de infección.

### **5.15. Declaración de ética y cuidado animal**

Los ratones utilizados en este trabajo fueron alojados en el vivario del IFC-UNAM con ciclos de 12 h de luz/oscuridad con agua y alimento *ad libitum* con el protocolo LVD74-5 aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IFC-UNAM. Los cerdos se mantuvieron en corraletas individuales (2 m<sup>2</sup>/cerdo) con aire filtrado, con agua y alimento *ad libitum* durante todo el experimento (2 meses) en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

### **5.16. Análisis estadístico**

Los tamaños de las partículas PH(1-110)PCV2 se determinaron por un NTA y se expresaron como la media y el error estándar. Para determinar el tiempo de infección adecuado para obtener las partículas PH(1-110)PCV2, se realizó un ELISA analizando la absorbancia de las partículas obtenidas a las 48 y 72 hpi. Estos datos se analizaron con un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni. El análisis serológico se llevó a cabo con un ELISA indirecto específico para PCV2, en el que se compararon las absorbancias de los sueros pre-inmunes con las absorbancias de los sueros de los cerdos inmunizados (con Circoflex® o con las partículas PH(1-110)PCV2). Un valor positivo de ELISA fue dado cuando la absorbancia promedio de los cerdos inmunizados fue  $\geq$  al doble de la absorbancia de los sueros pre-inmunes. Los títulos de anticuerpos contra PCV2 se determinaron con la dilución más alta de los sueros que daba un valor positivo por ELISA. El efecto neutralizante de los sueros de los cerdos inmunizados se calculó con la dilución 1:500 y se representó como porcentaje de inhibición. El análisis estadístico para datos con normalidad se llevó a cabo con un ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey. Los datos que no asumían normalidad, se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis

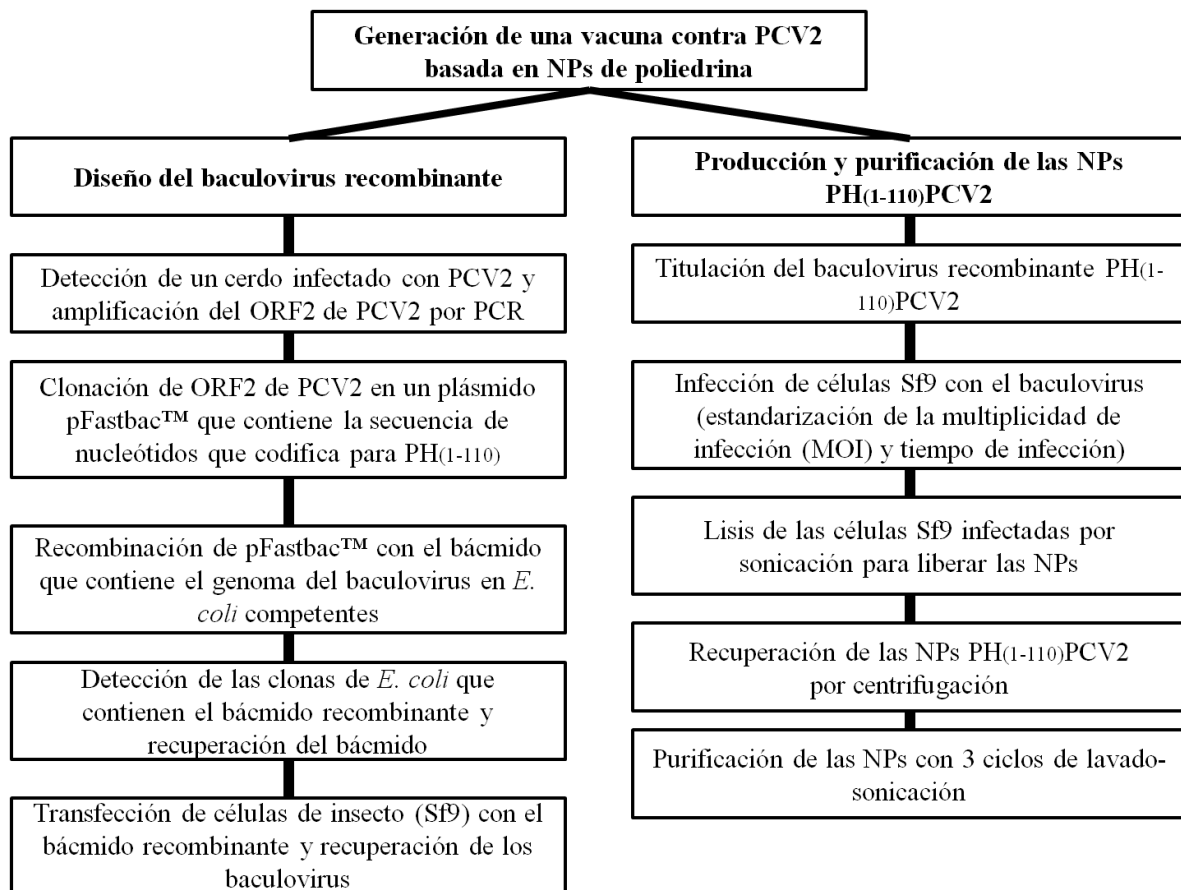


seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. La significancia fue  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ .

## 6. RESULTADOS:

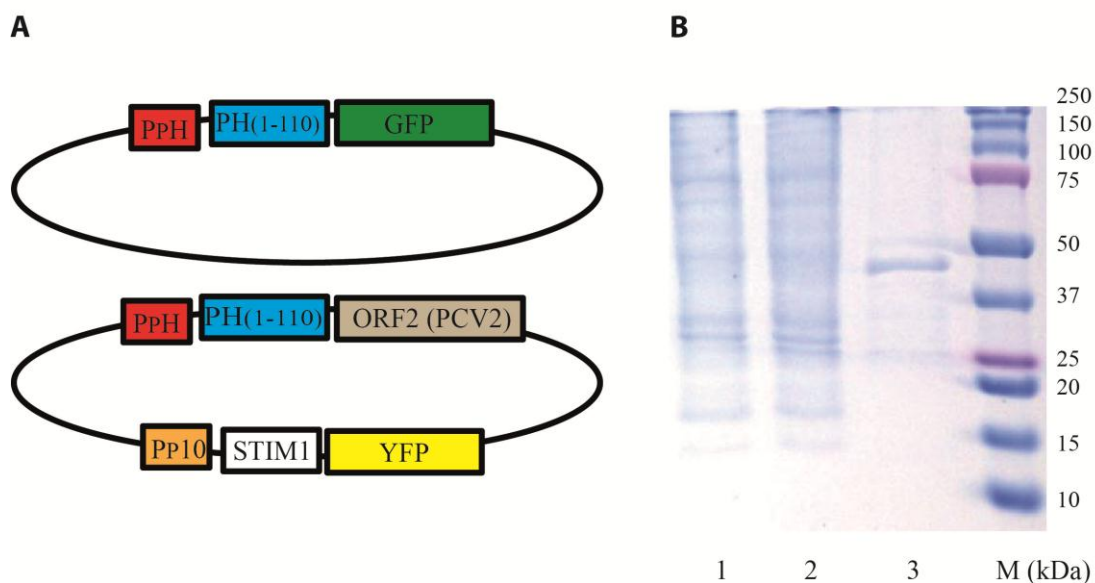
### 6.1. Las partículas PH(1-110)PCV2 se pueden purificar de manera fácil, rápida y a bajo costo

Previamente reportamos que el péptido PH(1-110) derivado del extremo N-terminal de la poliedrina del baculovirus AcNPV tiene propiedades de auto-agregación que permiten la formación de partículas (109,140). Este péptido contiene  $\alpha$ -hélices que forman el grupo hidrofóbico, hojas  $\beta$  que forman el cuerpo de la poliedra y un segmento desordenado encargados del ensamblaje de la poliedrina (139). En este trabajo, nosotros diseñamos un baculovirus recombinante que induce la expresión de la proteína ORF2 de PCV2 fusionada al péptido PH(1-110) para producir partículas que incorporan a la proteína ORF2 de PCV2 (fig. 9 y 10A, parte inferior). Un punto importante en la producción y purificación de proteínas usando el sistema baculovirus es la MOI (141,142). Así, lo primero que hicimos fue explorar diferentes MOIs para determinar la MOI adecuada para obtener partículas PH(1-110)PCV2 con la pureza más alta. Las células Sf9 se infectaron con el baculovirus PH(1-110)PCV2 usando MOIs de 0.2, 2 y 20 y se sonicaron a las 72 hpi para liberar las partículas. Las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron (centrifugación y lavados con PBS) y se corrieron por SDS-PAGE. La SDS-PAGE mostró que la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 obtenida de células Sf9 en las que se utilizó una MOI de 20 presentó una mejor pureza observando una banda mayoritaria de 42 kDa, que corresponde al peso esperado de la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 (fig. 10B). Más tarde corroboramos la presencia de poliedrina y ORF2 de PCV2 en las NPs PH(1-110)PCV2 por western blot (fig 12 y 13). Por lo tanto, las partículas PH(1-110)PCV2 recuperadas de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante usando una MOI de 20 tuvieron la mejor pureza. El rendimiento de las NPs fue de 380 mg/l y el costo de producción por litro de medio fue de \$ 1812 pesos.



**Figura 9. Esquema que muestra los procesos realizados para producir una vacuna contra PCV2 basada en NPs de poliedrina**

Se diseñó un baculovirus recombinante para producir las NPs PH(1-110)PCV2. Primero se detectó un cerdo infectado con PCV2, y se realizó una PCR para amplificar el ORF2 de PCV2 usando cebadores con los sitios de restricción NcoI y SalI. La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pFastbac™ para transformar bacterias *E. coli* competentes que contienen el bÁcrido. Se seleccionaron las clonas de bacterias con el bÁcrido recombinante por PCR y análisis de restricción. Se obtuvo el bÁcrido recombinante, se transfectaron las células de insecto con el bÁcrido y se obtuvieron los baculovirus recombinantes. Los baculovirus recombinantes se titularon y se determinó el tiempo de infección adecuado y la multiplicidad de infección (MOI). Una vez estandarizados estos parámetros, las células infectadas se centrifugaron, se recuperó el pellet y se lisaron las células por sonicación para liberar las NPs. Las NPs se purificaron con 3 ciclos de lavados y sonicación (para ver información más detallada ver las secciones 5.4-5.6 de materiales y métodos).



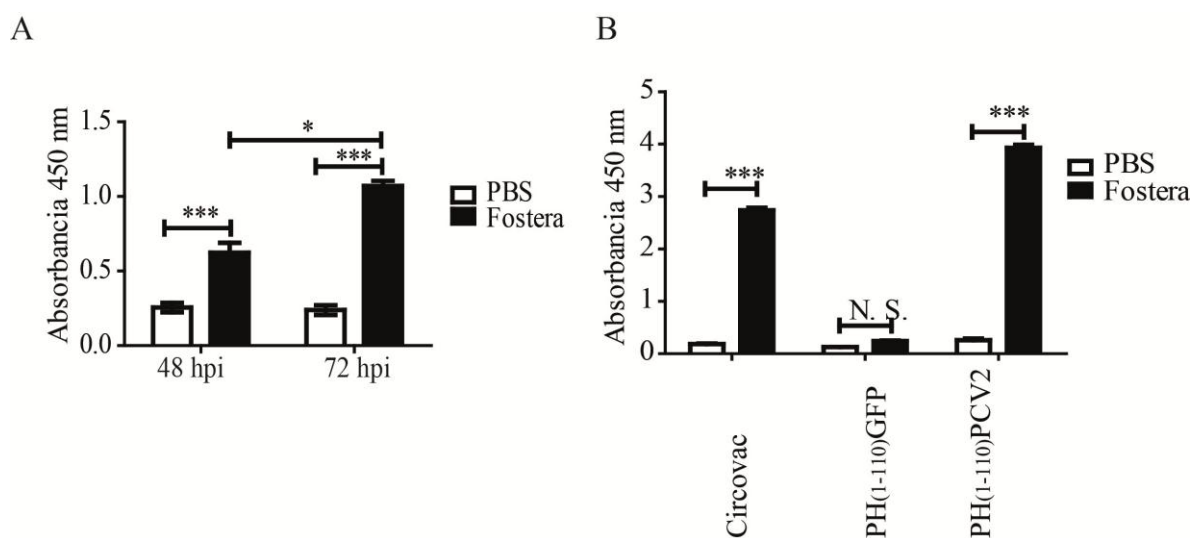
**Figura 10. Una multiplicidad de infección (MOI) de 20 es adecuada para recuperar partículas PH(1-110)PCV2 con mayor pureza.**

A) Diseño de los baculovirus recombinantes PH(1-110)GFP y PH(1-110)PCV2 que inducen la producción de partículas PH(1-110)GFP y PH(1-110)PCV2, respectivamente. La secuencia codificante para la proteína de fusión PH(1-110)GFP (superior) o PH(1-110)PCV2 (inferior) se insertó bajo el promotor de poliedrina (PpH). Para el diseño del baculovirus PH(1-110)PCV2, la secuencia codificante para la proteína de fusión STIM1–YFP fue insertada bajo el promotor P10 para facilitar la titulación viral. B) Determinación de la MOI adecuada para recuperar partículas PH(1-110)PCV2 con más pureza. Las células Sf9 se infectaron con diferentes MOIs del baculovirus PH(1-110)PCV2 (MOIs de 0.2, 2 y 20 que corresponden a los carriles 1,2 y 3, respectivamente) se lisaron a las 72 hpi por sonicación. Las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron empleando lavados con PBS y sonicación. Una SDS-PAGE fue realizada para determinar pureza y peso molecular de la proteína recombinante PH(1-110)PCV2. La SDS-PAGE indicó que el baculovirus recombinante induce la producción de una proteína con un peso de 42kDa, que es el peso esperado de la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 y esta proteína presentó mayor pureza cuando se usa una MOI de 20.

## 6.2. El mejor rendimiento de partículas PH(1-110)PCV2 se logra a las 72 hpi

Después de determinar la MOI adecuada para producir las partículas PH(1-110)PCV2, nosotros evaluamos el tiempo necesario para alcanzar un buen rendimiento de estas partículas. Para esto, las células Sf9 fueron infectadas con una MOI de 20 y recuperadas a las 48 y 72 hpi, las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron y se usaron para sensibilizar placas de ELISA. Las partículas PH(1-110)PCV2 fueron reconocidas específicamente por sueros de ratones inmunizados con una vacuna comercial contra PCV2 (Fostera® PCV). Cuando las células infectadas se obtuvieron a las 72 hpi se logró una

mayor recuperación de partículas PH(1-110)PCV2 que cuando se obtuvieron a las 48 hpi como lo evidencian los resultados obtenidos por ELISA (fig. 11A). Estos sueros reconocieron específicamente a las partículas PH(1-110)PCV2 ya que no identificaron a las partículas PH(1-110)GFP (fig. 11B). El hecho de que los sueros de los ratones reconozcan las partículas PH(1-110)PCV2 puede indicar que la fusión del péptido PH(1-110) a ORF2 de PCV2 no afecta el plegamiento de los epítomos conformacionales de ORF2.

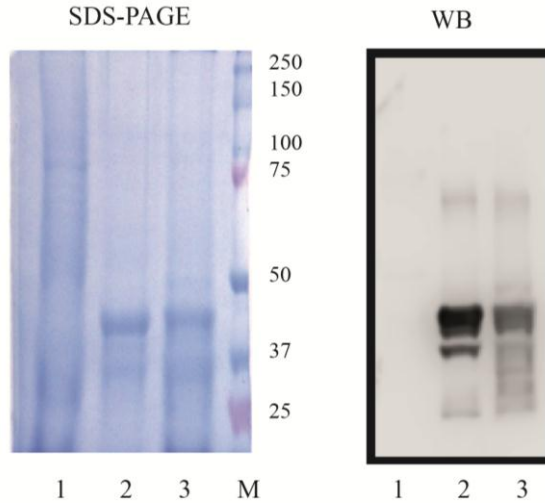


**Figura 11. Las partículas PH(1-110)PCV2 son reconocidas específicamente por sueros de ratones inmunizados con Fosterera® PCV y se alcanza un mejor rendimiento a las 72 hpi**

A) Determinación del tiempo de infección adecuado para obtener un mejor rendimiento de las partículas PH(1-110)PCV2. Se sensibilizaron microplacas de ELISA con partículas PH(1-110)PCV2 obtenidas a las 48 y 72 hpi. Se usó un pool de sueros de ratones inmunizados con Fosterera® PCV o sueros de ratones inyectados con PBS para detectar estas partículas por ELISA. Las partículas PH(1-110)PCV2 fueron detectadas desde las 48 hpi (\*\*P<0.001), pero se alcanzó una mejor detección a las 72 hpi (\*P<0.05). Se usó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni. B) Las partículas PH(1-110)PCV2 fueron reconocidas específicamente por sueros de ratones inmunizados con Fosterera® PCV. Para verificar que los sueros de ratones inmunizados con Fosterera® PCV reconocieran específicamente a ORF2 de PCV2 y no reconocieran a poliedrina de las partículas PH(1-110)PCV2, se sensibilizaron microplacas de ELISA con partículas PH(1-110)GFP o PH(1-110)PCV2 (10 µg/ml) siguiendo el protocolo estándar para el ELISA. Los sueros de ratones inmunizados con Fosterera® PCV reconocieron a las partículas PH(1-110)PCV2 pero no reconocieron a las partículas PH(1-110)GFP. Una prueba de *t* de Student fue usada para detectar diferencias entre estos grupos. Las barras son el promedio de las absorbancias detectadas con un filtro de 450 nm y las líneas son el error estándar. El asterisco indica diferencias con los ratones inyectados con PBS.

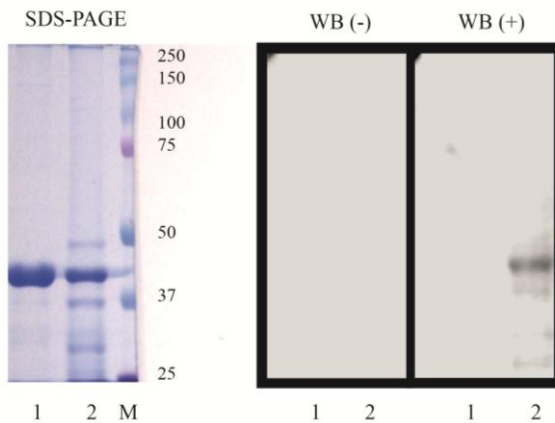
### **6.3. Las partículas PH(1-110)PCV2 están conformadas por poliedrina y ORF2 de PCV2**

Para conocer si las partículas PH(1-110)PCV2 contienen poliedrina, las partículas PH(1-110)PCV2, las partículas PH(1-110)GFP y lisados de células Sf9 se analizaron por SDS-PAGE y western blot. Tanto las partículas PH(1-110)PCV2 como las partículas PH(1-110)GFP fueron reconocidas de manera específica por el suero anti-poliedrina mostrando una banda principal con un tamaño de 42 kDa. No se detectó ninguna proteína del lisado de células Sf9 sin infectar, indicando alta especificidad del suero contra poliedrina (fig. 12). Más tarde, evaluamos la presencia de ORF2 de PCV2 en las partículas de PH(1-110)PCV2 usando las partículas PH(1-110)GFP esta vez como control negativo. Las partículas PH(1-110)PCV2 y PH(1-110)GFP se cargaron con amortiguador de Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE y western blot. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 fue reconocida por un suero de cerdo infectado con PCV2 como lo indicó el western blot al observarse una banda de 42 kDa. El suero del cerdo infectado con PCV2 no reconoció a las partículas PH(1-110)GFP. De manera adicional, un suero de un cerdo libre de PCV2 no reconoció las partículas PH(1-110)GFP ni las partículas PH(1-110)PCV2 (fig.13). Estos resultados juntos indican que las partículas PH(1-110)PCV2 son antigénicas, están conformadas por el péptido de poliedrina y por ORF2 de PCV2, y que esta proteína de fusión es de 42 kDa.



**Figura 12. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 es reconocida por sueros contra poliedrina.**

Se realizó una SDS-PAGE así como un western blot para evaluar si las partículas PH(1-110)PCV2 eran reconocidas por sueros de ratones inmunizados con poliedras. Se corrieron lisados de células Sf9 así como las proteínas PH(1-110)GFP y PH(1-110)PCV2 (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). El gel fue teñido con azul de Coomassie (lado izquierdo) e indica que las partículas PH(1-110)PCV2 tienen un peso aproximado de 42 kDa, similar a las partículas PH(1-110)GFP. Para el western blot se utilizaron sueros de ratones inmunizados con poliedras. El western blot (lado derecho) indicó la presencia de poliedrina en las partículas PH(1-110)PCV2. Adicionalmente, el suero contra poliedrina no reconoció el lisado celular de la línea Sf9 sin infectar.



**Figura 13. Un suero de cerdo infectado naturalmente con PCV2 reconoce a la proteína de fusión PH(1-110)PCV2.**

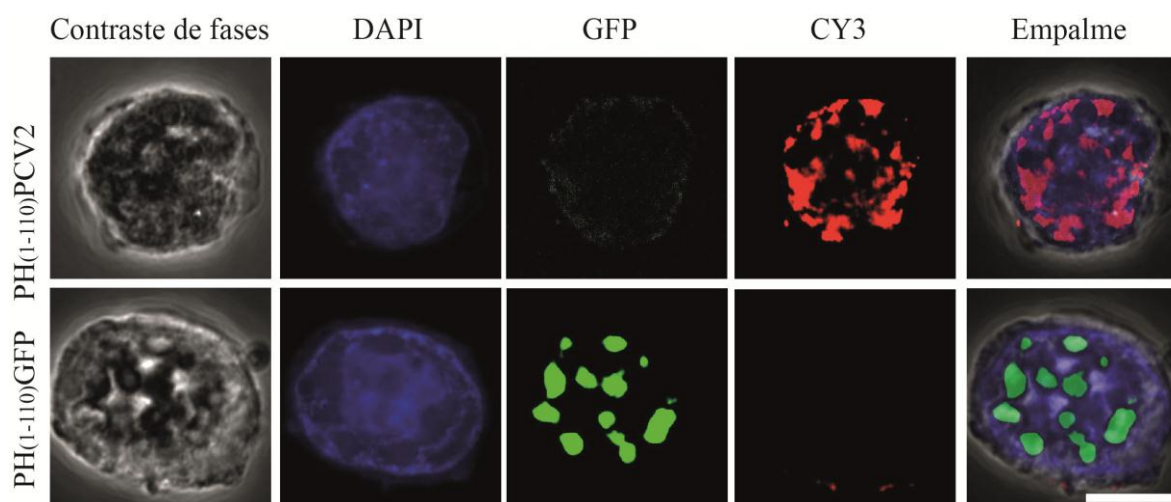
Para evaluar si la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 contenía ORF2 de PCV2 se realizó una SDS-PAGE así como un western blot. La SDS-PAGE indicó que las proteínas de fusión PH(1-110)GFP y PH(1-110)PCV2 tienen un peso molecular aproximado de 42 kDa (lado izquierdo). El western blot indicó que la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 es reconocida por un suero de cerdo infectado naturalmente con PCV2. El suero de cerdo infectado de PCV2 no reconoció a la proteína de fusión PH(1-110)GFP (lado derecho; WB(+)). El suero de cerdo libre de PCV2 no reconoció a ninguna de las dos proteínas de fusión (PH(1-110)GFP y PH(1-110)PCV2) (lado derecho, WB(-)).

#### **6.4. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega y forma partículas en el núcleo de las células Sf9 infectadas**

Previamente nosotros reportamos que el péptido PH(1-110) tiene la capacidad de auto-agregarse para formar partículas (109,140). En este trabajo, nosotros evaluamos por inmunofluorescencia si la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 conserva la capacidad de auto-agregación así como también evaluamos su co-localización en las células Sf9 infectadas. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 tuvo la capacidad de auto-agregarse, lo que permitió la formación de partículas. Las partículas PH(1-110)PCV2 fueron amorfas con un tamaño entre 0.5 – 3 micras y se localizaron en el núcleo de las células de insecto Sf9 infectadas como lo indicó el marcador fluorescente DAPI que tiñe el DNA. De manera similar, las partículas PH(1-110)GFP tuvieron un tamaño de 1-2 micras y se localizaron en el núcleo de las células Sf9 infectadas, pero a diferencia de las partículas PH(1-110)PCV2, las partículas PH(1-110)GFP tuvieron una morfología tipo poliedra.

La inmunofluorescencia fue específica para las partículas PH(1-110)PCV2, ya que los anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia no reconocieron a las partículas PH(1-110)GFP (fig. 14). El hecho de que la GFP o la proteína ORF2 de PCV2 fusionadas al péptido PH(1-110) se auto-agreguen confirma que éste péptido contiene una secuencia de auto-agregación que promueve la formación de partículas con morfologías que van desde la poliédrica hasta la amorfa. Por otro lado, el análisis de estas partículas con microscopía confocal indicó que el péptido PH(1-110) no solo promueve la auto-agregación, sino que las proteínas fusionadas a este péptido se localizan de manera específica en el núcleo de las células infectadas. Así, la formación de partículas proteicas fue importante para poder evaluarlas como una plataforma para producir una vacuna de subunidad contra PCV2.



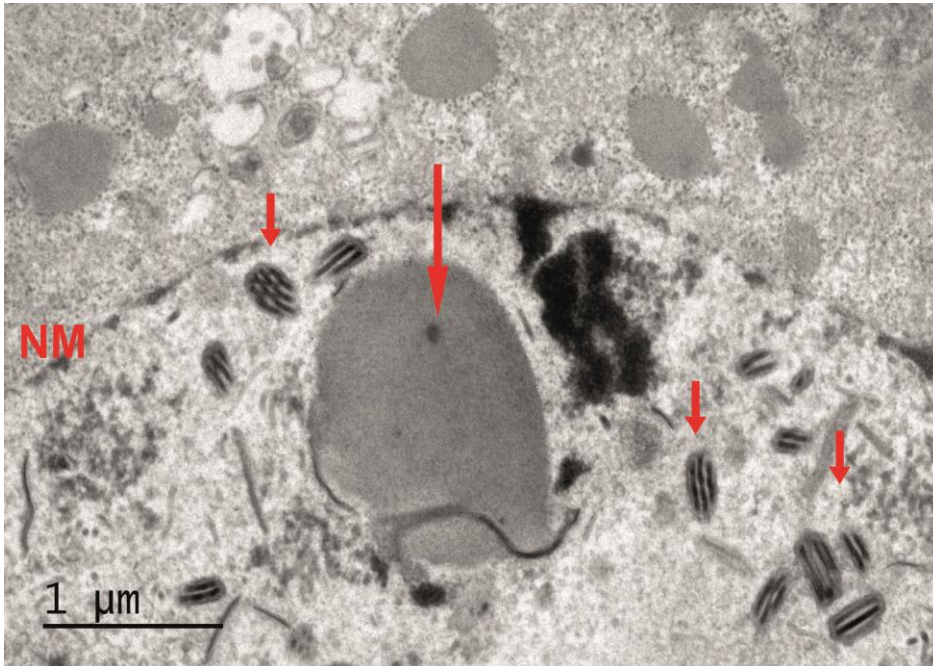


**Figura 14. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega y forma partículas localizadas en el núcleo de las células Sf9 infectadas.**

Se infectaron células Sf9 con los baculovirus recombinantes PH(1-110)PCV2 (paneles superiores) y PH(1-110)GFP (paneles inferiores) (MOI=20), los cuales promueven la expresión del péptido PH(1-110) fusionado a la proteína ORF2 de PCV2 o fusionado a la GFP, respectivamente. A las 72 hpi, las células se procesaron para inmunofluorescencia contra PCV2 usando los sueros de ratones inmunizados Fosterera® PCV y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Cy3. Las partículas PH(1-110)PCV2 y PH(1-110)GFP colocalizaron con en el núcleo de las células infectadas como lo indicó el colorante 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que marca DNA. La proteína PH(1-110)GFP se auto-agregó formando partículas tipo poliedra. La proteína PH(1-110)PCV2 se auto-agregó formando partículas amorfas. La inmunofluorescencia fue específica contra ORF2 ya que las partículas PH(1-110)GFP no se marcaron con el fluoróforo Cy3. Todas las imágenes de microscopía confocal tienen la misma escala. La barra indica 6 micras. Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio confocal FV10 usando el objetivo 60X.

### 6.5. Las partículas PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus

Las vacunas contra PCV2 basadas en VLPs contienen baculovirus contaminantes que han sido inactivados (7). Aunque los baculovirus no se replican en células de mamífero, la contaminación de vacunas con baculovirus puede modificar la respuesta inmune del huésped, por lo que es deseable que las vacunas producidas en el sistema baculovirus estén libres de estos contaminantes, ya que la contaminación con baculovirus no permite una correcta evaluación de la eficacia de la inmunización con estas vacunas (145). Previamente nosotros demostramos que las partículas PH(1-110)GFP no contienen baculovirus en su interior como lo indicó la TEM (140). De manera similar, en este trabajo exploramos si las partículas PH(1-110)PCV2 contenían baculovirus en su interior por TEM. La TEM indicó que las partículas PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus en su interior y confirmó que estas partículas se forman en el núcleo de las células infectadas. Aunque los baculovirus se localizaron en núcleo, éstos no se ocluyeron en las partículas (fig. 15).

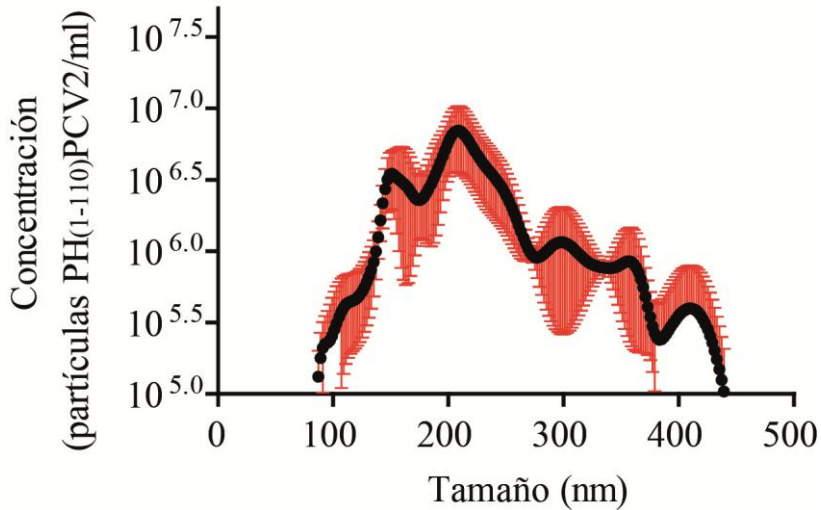


**Figura 15. Las partículas PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus en su interior.**

Las células de insecto se infectaron con el baculovirus PH(1-110)PCV2 con una MOI de 20 y a las 72 hpi, las células se lavaron con PBS, se fijaron con glutaraldehído y se contrastaron con tetróxido de osmio. Las partículas producidas por la infección por baculovirus PH(1-110)PCV2 (flecha grande) no contienen baculovirus ocluidos aunque se observó una gran cantidad de baculovirus (flechas pequeñas) cerca de estas partículas.

### **6.6. Las partículas PH(1-110)PCV2 son polidispersas y de escala nanométrica**

El tamaño de las partículas juega un papel importante en la respuesta inmune (146). Para evaluar el tamaño de las partículas PH(1-110)PCV2, nosotros realizamos un NTA usando el equipo Nanosight. Las partículas PH(1-110)PCV2 se purificaron por sonicación y se resuspendieron en agua inyectable. El análisis reveló que las partículas PH(1-110)PCV2 son de un tamaño de entre 90 y 450 nm, y se observaron 3 tamaños principales: 150, 210 y 300 nm (fig. 16). Debido a que la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega y forma NPs que se pueden purificar fácilmente, nosotros exploramos su uso como vacuna de subunidad contra PCV2.



**Figura 16. Las partículas PH(1-110)PCV2 son polidispersas y de escala nanométrica.**

Para obtener las partículas PH(1-110)PCV2, se infectaron células Sf9 con el baculovirus recombinante con una MOI de 20 y las células Sf9 infectadas se lisaron por sonicación a las 72 hpi. Las partículas se recuperaron por centrifugación y lavados con agua inyectable. El tamaño de las partículas se determinó por medio de un análisis de seguimiento de partículas (NTA) con el equipo Nanosight (Malvern). Los datos obtenidos indicaron que las partículas PH(1-110)PCV2 son de escala nanométrica y tienen un rango de 90-450 nm. La línea negra indica la media del tamaño de las partículas y la línea roja indica el error estándar.

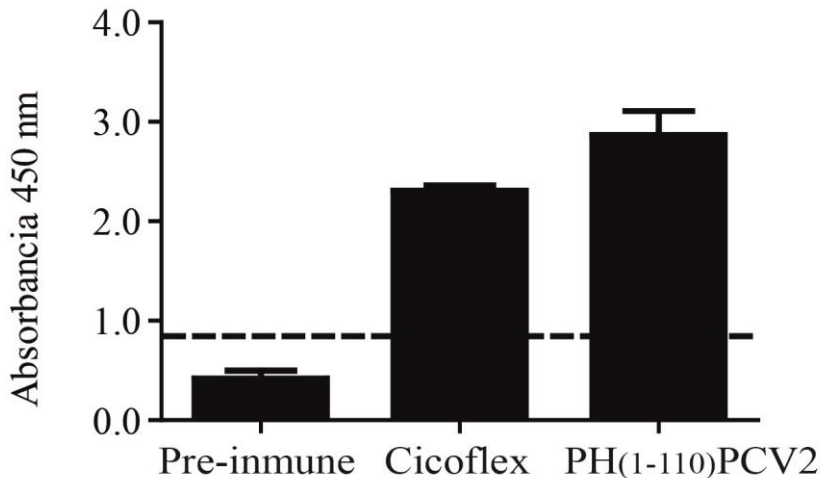
### **6.7. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron anticuerpos contra ORF2 de PCV2**

Las NPs PH(1-110)PCV2 y la vacuna comercial Circoflex® se usaron para inmunizar cerdos libres de PCV2 (fig. 17). La respuesta inmune basada en IgG contra PCV2 fue determinada por ELISA. Los sueros de los cerdos vacunados con las NPs PH(1-110)PCV2 así como los sueros de los cerdos vacunados con Circoflex® reconocieron la proteína ORF2 recombinante de PCV2 (fig. 18) alcanzando títulos de anticuerpos muy parecidos (1:1600) (fig. 19).



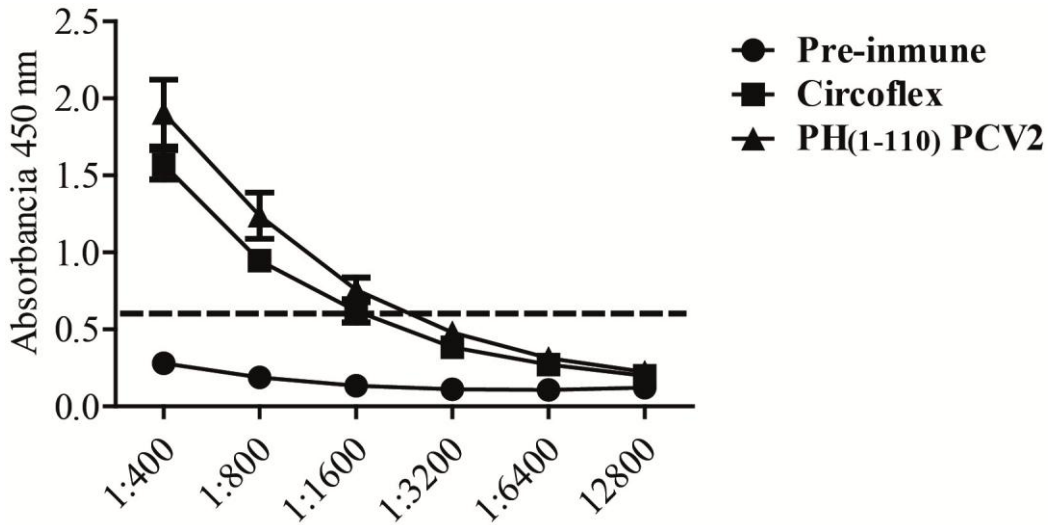
**Figura 17. Esquema de inmunización y toma de muestra de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con la vacuna comercial Circoflex®.**

Se usaron 9 cerdos de 8 semanas de edad de la raza Pietrain/York libres de PCV2. Los cerdos se inmunizaron 3 veces con intervalos de dos semanas y se tomaron muestras cada semana para detección de anticuerpos por ELISA.



**Figura 18. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con Circoflex® generan anticuerpos contra PCV2.**

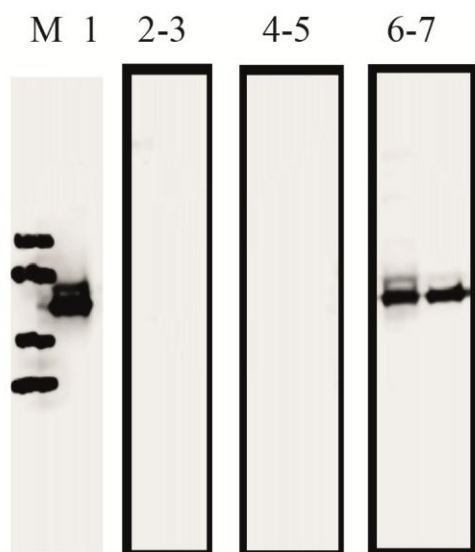
Los sueros de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con la vacuna Circoflex® se analizaron por ELISA para detección de anticuerpos contra ORF2 de PCV2. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con la vacuna Circoflex® produjeron anticuerpos contra ORF2 de PCV2. Las barras son el promedio de las absorbancias y las líneas verticales son el error estándar. La línea punteada representa el doble del promedio de la absorbancia de los sueros pre-inmunes y es el punto de corte para considerarse como un valor positivo por ELISA.



**Figura 19. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron títulos de anticuerpos contra PCV2 parecidos a los obtenidos con la vacuna comercial Circoflex®.**

Los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 así como los sueros de cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® fueron analizados por ELISA realizando diluciones para determinar el título de anticuerpos contra ORF2 de PCV2. Tanto los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 como los cerdos inmunizados con Circoflex® alcanzaron títulos de anticuerpos de 1:1600. Las líneas horizontales son el promedio de las absorbancias, las líneas verticales son el error estándar y la línea punteada es el punto de corte para considerarse un valor positivo por ELISA.

Interesantemente, los cerdos vacunados con la vacuna comercial Circoflex® no reconocieron la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en condiciones desnaturalizantes, y solo los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 así como un suero de un cerdo infectado con PCV2 de manera natural reconocieron la proteína ORF2 desnaturalizada como lo indicó el western blot (fig. 20).



**Figura 20. Los sueros de cerdos vacunados con las NPs PH(1-110)PCV2 reconocen la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en condiciones desnaturalizantes.**

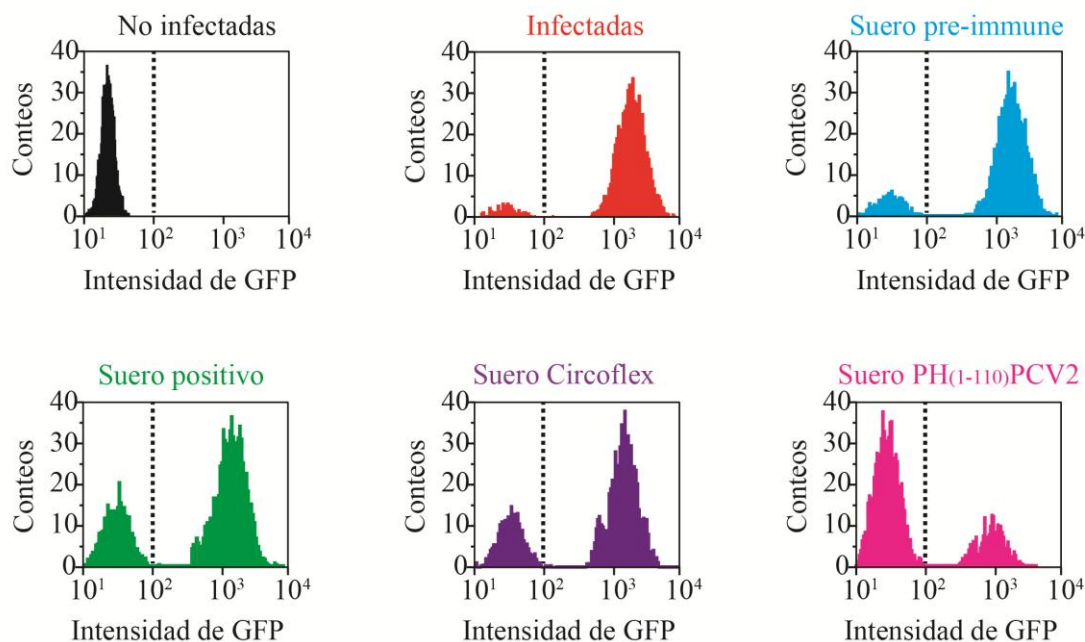
Se realizó un western blot usando ORF2 recombinante en condiciones desnaturalizantes y se usó el suero de un cerdo infectado (carril 1), sueros de los cerdos obtenidos antes de la inmunización (2-3), sueros de cerdos obtenidos después de la inmunización con la vacuna Circoflex® (4-5) y sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 (6-7) para detectar la proteína ORF2 desnaturalizada. Los sueros usados en este experimento fueron tomados a la semana 7 después de la primera inmunización. Los sueros de cerdos obtenidos antes de la inmunización y los sueros de cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® no reconocieron la proteína ORF2 recombinante de PCV2 en condiciones desnaturalizantes. Únicamente un suero de cerdo infectado con PCV2 de manera natural y los sueros de cerdos inmunizados con las partículas PH(1-110)PCV2 reconocieron una banda de 30 kDa correspondiente a ORF2 recombinante de PCV2. M=marcador de peso molecular y las bandas observadas de arriba hacia abajo corresponden a proteínas con pesos moleculares de 50, 37, 25 y 20 kDa.

### **6.8. Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron anticuerpos neutralizantes contra PCV2**

Se ha demostrado que la infección por PCV2 generalmente es asintomática (52). También se ha intentado mimetizar las lesiones y/o signos clínicos de la infección por PCV2 usando detonantes para inducir la enfermedad (co-infecciones o uso de inmunoestimulantes) pero se han obtenido resultados muy variables (3,52,147). Por otro lado, se ha demostrado que los anticuerpos que neutralizan la infección por PCV2 *in vitro* correlacionan con protección *in vivo* (29,148). Es por esto, que en la parte final de este trabajo nosotros decidimos desarrollar un ensayo de seroneutralización para evaluar la protección conferida por la inmunización con nuestras partículas. Para esto, diseñamos un PCV2 modificado genéticamente que expresa la GFP bajo el promotor de CMV y evaluamos la infección en células PK-15 por citometría de flujo. Los sueros de cerdos

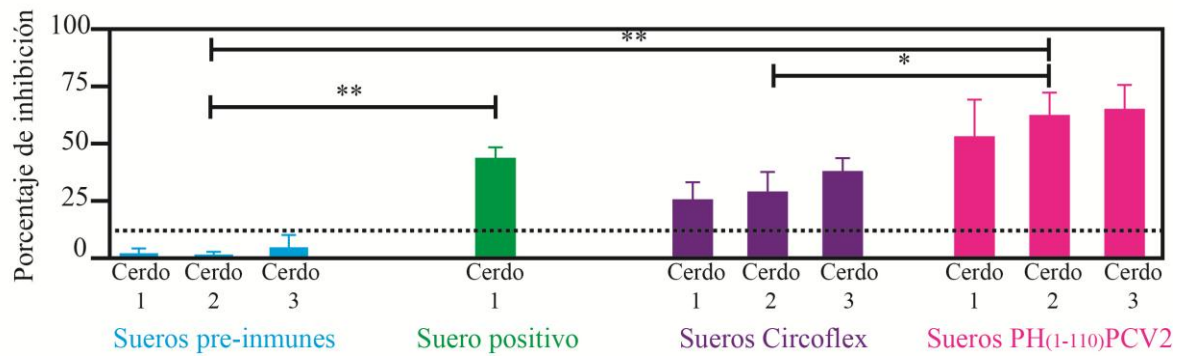


obtenidos antes de las inmunizaciones no inhibieron la infección mientras que los sueros de los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® así como los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 inhibieron la infección por el PCV2 recombinante (fig. 21). Los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 inhibieron la infección por el PCV2 recombinante en cultivo celular hasta un 50 – 60% mientras que los cerdos inmunizados con Circoflex® inhibieron la infección un 25 – 35 % (fig. 22) usando una dilución de los sueros 1:500. Estos resultados indicaron que tanto los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 como los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® tuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes de 1:500.



**Figura 21. Los sueros de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 neutralizan la infección por PCV2 recombinante que expresa la GFP en cultivo celular.**

Los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 o con Circoflex® se diluyeron 1:500 y se mezclaron con el PCV2 recombinante que expresa GFP. Las células PK-15 se incubaron con la mezcla de suero y PCV2, se recuperaron en microtubos a las 72 hpi y se analizaron por citometría de flujo usando el equipo Atune®. Se contaron 10,000 eventos y cada evento corresponde a una célula PK-15 con diferente intensidad de fluorescencia de la GFP. Las células PK-15 infectadas con el PCV2 recombinante tuvieron una elevada intensidad de fluorescencia de la GFP mientras que las células no infectadas no presentaron fluorescencia. Las células PK-15 que fueron incubadas con virus y suero de los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® o las NPs PH(1-110)PCV2 presentaron una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la GFP. Un suero de cerdo infectado (suero positivo) con PCV2 que se recuperó de la infección también disminuyó la intensidad de fluorescencia de la GFP en las células PK-15. La disminución en la intensidad de la fluorescencia de la GFP indica la presencia de anticuerpos neutralizantes contra PCV2. Los sueros pre-inmunes no disminuyeron la intensidad de la GFP en las células PK-15. Los datos se graficaron como histogramas.



**Figura 22. Los sueros de los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 inhiben la infección por PCV2 recombinante del 50 – 60%.**

Los datos obtenidos del ensayo de seroneutralización se expresaron como porcentaje de inhibición de la fluorescencia de GFP. Los sueros de cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 inhibieron la infección por el PCV2 recombinante un 50-60% mientras que los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® inhibieron la infección por el PCV2 recombinante un 25-35%, como lo indica el porcentaje de inhibición de la fluorescencia de GFP. Las barras son el promedio y las líneas verticales son el error estándar. El asterisco indica las condiciones que fueron diferentes a los sueros pre-inmunes (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ). Se utilizó un ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey.



## 7. DISCUSIÓN

PCV2 es uno de los patógenos más importantes en la industria porcina ya que genera pérdidas millonarias a nivel mundial (3,7,9,10). El PCV2 es un virus que provoca inmunosupresión en los cerdos de todas las edades. PCV2 produce diferentes síndromes que incluyen retardo en el crecimiento (PMWS), abortos (SAMS) y enfermedades respiratorias, dermatológicas y renales (PNP y PDNS), lo cual afecta gravemente la porcicultura (3,8,35,36). Las vacunas tradicionales contra PCV2 han mostrado generar una respuesta inmune robusta tanto humoral como celular (90,149) y mejora parámetros productivos como la ganancia de peso (67). Sin embargo, se ha reportado que al menos una vacuna tradicional contenía un PCV2 con la capacidad de diseminarse en los cerdos vacunados. Por lo tanto, las primeras vacunas contra PCV2 mostraron inconvenientes con respecto a su margen de seguridad (7,80).

Más tarde, salieron al mercado las primeras vacunas contra PCV2 basadas en VLPs, las cuales fueron las primeras vacunas de este tipo usadas en medicina veterinaria. Las vacunas basadas en VLPs han demostrado que inducen una respuesta inmune humoral que neutraliza la infección por PCV2 (7,150), promueven la GDP (72,150) y son más seguras que las vacunas tradicionales (92,104). Sin embargo, el uso de VLPs está limitado debido al alto costo de los procesos de purificación, que involucra desde el uso de gradientes de sacarosa hasta la cromatografía (93,151–153). Por lo tanto, la purificación de VLPs puede demorar varios días y se necesitan instrumentos de laboratorios especializados que son muy costosos (92,93).

Por otro lado, otro sistema para producir antígenos recombinantes que se ha propuesto está basado en poliedras (137,154). Las poliedras son cristales proteicos formados mayoritariamente por la proteína poliedrina, cuya función principal es ocluir baculovirus para protegerlos de condiciones adversas como temperatura, pH ácido, desecación y degradación, favoreciendo la infección entre insectos (128). Aunque estas características hacen a los cristales de poliedrina candidatos atractivos para la conservación de antígenos, las poliedras presentan ciertas desventajas para poder ser usadas como sistemas de entrega de antígenos, pues pueden resistir la acidez del endolisosoma y son incapaces de inducir la maduración de las APCs (154). Debido a esto, las poliedras se han

usado como sistema de expresión y purificación de antígenos solubles en vez de usarse como sistema de entrega de antígeno (137).

Nosotros recientemente reportamos un péptido que tiene la capacidad de auto-agregarse. Este péptido es derivado de la proteína poliedrina del baculovirus AcNPV y le denominamos PH(1-110) y propusimos su uso como sistema de entrega de antígenos. El péptido PH(1-110) fusionado a la GFP, permitió la formación de NPs (109,140), y la inmunización de ratones con estas NPs indujo una respuesta inmune humoral contra GFP basada en IgG (109).

Debido a estos antecedentes, en este trabajo, exploramos la posibilidad de incorporar al antígeno ORF2 de PCV2 en NPs por medio de la fusión de esta proteína con el péptido PH(1-110). Lo primero que determinamos fue la MOI adecuada para producir las NPs PH(1-110)PCV2, que fue de 20. Posteriormente, evaluamos el tiempo de recuperación de las NPs PH(1-110)PCV2 después de la infección de las células Sf9. El tiempo de recuperación de las NPs PH(1-110)PCV2 fue de 72 hpi y fue diferente a lo recomendado por el fabricante (48 hpi). Esto indica que el tiempo de infección y la MOI deben ser determinadas para cada baculovirus recombinante usado para producir proteínas de fusión con el péptido PH(1-110).

Una característica particular del péptido PH(1-110) es que la fusión de proteínas completas como GFP u ORF2 de PCV2 en su extremo C-terminal no afecta la formación de NPs (fig. 14) mientras que la fusión de proteínas completas con otros SAPs puede dañar el efecto de auto-agregación (109). Interesantemente, las NPs PH(1-110)PCV2 no contienen baculovirus en su interior y son polidispersas, como lo indicó la TEM y el NTA, respectivamente (figs. 15 y 16).

Otra característica importante que hay que considerar, es la eficiencia de encapsulación de los antígenos. Aunque otros sistemas como aquellos basados en NPs de ácido poliglicólico han reportado hasta el 50% de encapsulamiento de antígenos, en general, el porcentaje de encapsulamiento es muy bajo. Para preparar NPs de ácido poliglicólico se pierde bastante antígeno (109,162). Nuestros resultados de inmunofluorescencia indicaron que la proteína de fusión PH(1-110)PCV2 se auto-agrega con gran eficiencia formando partículas localizadas en el núcleo de las células Sf9 infectadas.

La eficiencia de incorporación del antígeno ORF2 dentro de las NPs es del 100% gracias a que cada proteína ORF2 de PCV2 esta fusionada al péptido PH(1-110).

Un punto importante que hay que considerar al producir vacunas es el rendimiento. Las NPs PH(1-110)PCV2 tienen un rendimiento excelente de 380 mg/l de medio Grace. Otros sistemas como aquellos basados en levaduras y bacterias llegan a producir de 0.75 a 700 mg/l; como un ejemplo, se diseñó una VLP quimérica en la que se fusionó un epítipo de PCV2 a la proteína de la cápside del virus de la mancha anular de la papaya. Estas VLPs producidas en bacteria mostraron inducir anticuerpos en un modelo murino y tuvieron un rendimiento de 65 a 80 mg/l (155). Una desventaja del uso de sistemas procariontes es que a estos les falta la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas como las glicosilaciones, necesarias en algunas ocasiones para inducir una respuesta inmune robusta (91,156,157).

Las células de mamífero tienen la ventaja de que realizan modificaciones postraduccionales complejas, pero el rendimiento de los antígenos (VLPs) solo llega a ser de 0.018 a 10 mg/l (156,157). Para el caso de las plantas transgénicas usadas en la producción de antígenos, se estima que el rendimiento es de aproximadamente 4 a 2380 µg/kg de tejido vegetal (156). El costo para producir 380 mg de las NPs PH(1-110)PCV2 fue de \$ 1812 pesos. Tomando en cuenta que cada cerdo inmunizado con 3 dosis de 200 µg de estas NPs genera una buena respuesta inmune, esta cantidad de NPs podría servir para inmunizar hasta 633 cerdos por cada litro de medio Grace, con un costo de \$ 2.86 pesos/dosis (sin contar costos de aditivos, mercadotecnia, distribución, envasado y etiquetado). La vacuna basada en las NPs PH(1-110)PCV2 tiene ventajas sobre las vacunas disponibles comercializadas en promedio en 80 pesos una dosis. Así, nuestro sistema basado en NPs, es uno de los más eficientes en cuanto a rendimiento y dado que las NPs PH(1-110)PCV2 son producidas en células de insecto, esto garantiza que se lleven a cabo las glicosilaciones en las proteínas, haciendo que los antígenos tengan una conformación muy parecida a la nativa (158).

La pureza de los antígenos es un punto de gran importancia para la aprobación y uso comercial de las vacunas. Las vacunas producidas en levadura llegan a contener del 1-5% de trazas de proteína de levadura. Los individuos con alergia a la levadura que son

inmunizados con vacunas producidas en levadura pueden presentar reacciones de anafilaxia (159). Situaciones similares se han observado con vacunas que se producen en huevo como es el caso de vacunas tradicionales contra influenza A (160,161). Otros contaminantes encontrados en vacunas son la gelatina, usada como estabilizador y el látex; ambos han demostrado inducir IgE, y son los alérgenos más comunes encontrados en las vacunas (161). Las NPs PH(1-110)PCV2 tienen la ventaja de que se pueden purificar de manera fácil, rápida y a bajo costo ya que solo se requiere de sonicación y lavados con PBS. En nuestros estudios de inmunización de ratones y cerdos no observamos signos de alergias (como prurito). Sin embargo, sería adecuado realizar estudios de alergia en los animales inmunizados con estas NPs.

El tamaño de las NPs juega un rol importante en la respuesta inmune. Las NPs que se encuentran entre 20 y 200 nm pueden viajar directamente hacia los ganglios linfáticos a través de la linfa, permitiendo que las células dendríticas foliculares las puedan presentar a los linfocitos T y B (146). Así, las NPs PH(1-110)PCV2 fueron buenas candidatas para ser evaluadas como una vacuna de subunidad contra PCV2 ya que tuvieron un buen rendimiento, se purifican fácilmente y tienen un tamaño adecuado para inducir una respuesta inmune óptima.

PCV2 fue usado como modelo antigénico por el impacto económico negativo que provoca en los cerdos a nivel mundial. El PCV2 frecuentemente no genera enfermedad en los cerdos infectados (3,52). Los intentos para reproducir algunos de los síndromes causados por PCV2 incluyen desde las co-infecciones con otros patógenos virales (3) hasta el uso de inmunoestimulantes, pero los resultados obtenidos son poco claros y con baja reproducibilidad (52,147). Una manera fácil de evaluar protección contra PCV2 es el ensayo de seroneutralización. Los anticuerpos neutralizantes correlacionan con la disminución del título viral y protección *in vivo* (29,148). Es por esto que en el presente trabajo, nosotros evaluamos el efecto protector de las NPs PH(1-110)PCV2 por medio de un ensayo de seroneutralización. En este ensayo, nosotros inmunizamos cerdos con las NPs PH(1-110)PCV2. Estos cerdos produjeron anticuerpos tanto contra ORF2 de PCV2 en su forma nativa como en la forma desnaturalizada, como se demostró por ELISA y western blot, respectivamente (figs. 18-20). Adicionalmente, estos anticuerpos neutralizaron la infección de un PCV2 recombinante que expresa la GFP (evidenciado por disminución de

la intensidad de fluorescencia de la GFP en las células PK-15 que se les administró el PCV2 recombinante incubado con sueros de cerdos inmunizados con la vacuna Circoflex® o con las NPs PH(1-110)PCV2) (fig.21 y 22). De manera similar, los cerdos inmunizados con la vacuna comercial Circoflex® así como un cerdo infectado con PCV2 de manera natural generaron anticuerpos neutralizantes contra PCV2. Esto es similar a lo reportado por Madson *et al.* (2009), que mencionan que tanto las vacunas comerciales como la infección natural con PCV2 inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

En general, las vacunas contra PCV2 que se han probado han mostrado inducir una respuesta inmune humoral. Sin embargo, en diferentes trabajos se ha observado alta variabilidad con respecto a los títulos de anticuerpos. Algunos trabajos en los que se inmunizó con vacunas contra PCV2 basadas en VLPs, se obtuvieron títulos de hasta 1:500 (82). Otras vacunas contra PCV2 basadas en DNA han generado títulos de anticuerpos de hasta 1:7000 (149). La inmunización de cerdos con las NPs PH(1-110)PCV2 indujo títulos de anticuerpos de 1:1600. Estos resultados tan diversos podrían ser explicados debido a la variabilidad de los antígenos inmunizados (expresados a través de transfecciones de plásmidos o inmunizados como proteínas), los adyuvantes (emulsiones, hidróxido de aluminio, etc.) y los kits de detección de anticuerpos (ELISAs comerciales, ELISAs caseros). Por ejemplo, aunque PCV2 posee inmunidad cruzada entre sus diferentes subtipos, se ha demostrado que PCV2 presenta gran variabilidad tanto genética como en su secuencia de aminoácidos del ORF2 que codifica para la cápside (13).

Nuestros resultados de los títulos de anticuerpos contra PCV2 son parecidos a los reportados por Jeon (2015), que evaluó los títulos de anticuerpos inducidos después de la inmunización con las vacunas comerciales Circoflex®, Circovac® y Foster PCV®, alcanzando títulos de anticuerpos de 1:1000, mientras que los cerdos infectados de manera natural alcanzan títulos de 1:400 a los 70 días después de una sola inmunización (150). Los cerdos inmunizados con las NPs PH(1-110)PCV2 generaron títulos de anticuerpos de 1:1600 después de la 3 inmunizaciones. Esto se realizó de esta manera debido a que no se detectaron anticuerpos después de la segunda inmunización.

Estos resultados en conjunto indican que las NPs PH(1-110)PCV2 se pueden producir de manera fácil, se recuperan rápidamente y a bajo costo promoviendo la

generación de anticuerpos neutralizantes contra PCV2. Además el péptido PH(1-110) brinda estabilidad a los antígenos a temperatura ambiente (datos en publicación). A nuestro conocimiento, ningún otro sistema de producción de antígenos recombinantes tiene estas características, lo que posiciona a este sistema como una nueva plataforma para la incorporación de antígenos en NPs proteicas para producir vacunas de subunidades.

El sistema basado en las NPs PH(1-110)PCV2 tiene bastantes ventajas sobre otros sistemas pero también presenta algunos inconvenientes. Uno de los inconvenientes de este sistema es que se necesita suficiente experiencia en el uso de herramientas de biología molecular y bioinformática; y deben estar reportadas las partes inmunorelevantes de los patógenos. También se debe tener experiencia en el uso de células de insecto y baculovirus para estandarizar el tiempo de infección y la MOI adecuada para cada baculovirus recombinante. Finalmente, es adecuado lograr que las NPs PH(1-110)PCV2 sean menos polidispersas y que se puedan purificar principalmente NPs de 20-100 nm sin afectar su rendimiento y se espera que de esta manera la inmunización con estas partículas induzca una respuesta inmune más robusta.

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo, desarrollamos la primera vacuna contra un PCV2 mexicano que es genéticamente diferente a los demás subtipos de PCV2 descritos en el mundo. Esta vacuna es de bajo costo y su producción es de alto rendimiento y calidad por ser producida usando el promotor de poliedrina del baculovirus AcNPV y por ser producida en células de insecto. Esta vacuna está basada en la fusión de ORF2 de PCV2 con el péptido PH(1-110) del baculovirus AcNPV. La proteína de fusión PH(1-110)PCV2 permitió que la incorporación de ORF2 de PCV2 en NPs fuera del 100%. Estas NPs se purifican de manera más fácil y rápida que las VLPs, pues solo involucra lisis de las células Sf9 infectadas por medio de sonicación y centrifugación de las NPs. La vacuna basada en las NPs PH(1-110)PCV2 es de subunidad, y por lo tanto, no lleva los riesgos de las vacunas que contienen patógenos completos. A diferencia de otros SAPs, el péptido PH(1-110) se puede fusionar a otros péptidos o proteínas sin dañar su capacidad de auto-agregación. Las partículas PH(1-110)PCV2 son de escala nanométrica y no contienen baculovirus contaminantes como ocurre en las vacunas contra PCV2 basadas en VLPs.

Como conclusión general, la vacuna basada en las NPs PH(1-110)PCV2 fue desarrollada por medio de biología molecular y bionanotecnología para producir la primera vacuna contra PCV2 basada en un péptido que se auto-agrega formando NPs que incorporan del antígeno viral ORF2 de PCV2 para facilitar su purificación disminuyendo los gastos de producción. Por lo tanto, esta nueva vacuna puede competir con las vacunas de PCV2 actualmente disponibles en el mercado.

## 9. PERSPECTIVAS

Los primeros estudios realizados en nuestro laboratorio indicaron que el péptido PH(1-110) puede ser utilizado como sistema de entrega de antígenos. El primer antígeno que probamos fue la GFP, y nuestros resultados indicaron que las NPs formadas por la GFP fusionada al péptido PH(1-110) son inmunogénicas. Se observaron resultados similares con el antígeno ORF2 de PCV2 sugiriendo que otros antígenos pueden ser fusionados al péptido PH(1-110) para producir nuevas vacunas. Así mismo, hemos demostrado que estas partículas no son tóxicas en un modelo de ratón así como en un modelo porcino.

El siguiente paso de este trabajo, podría ser la comercialización de estas NPs como un nuevo sistema de producción de antígenos que se pueden purificar fácilmente, así como su uso como sistema de entrega de antígenos termoestables.

Un punto importante, será evaluar si los antígenos fusionados en el péptido PH(1-110) se pliegan adecuadamente. Para esto se podría intentar realizar estudios de cristalografía, aunque para esto debemos perfeccionar nuestro proceso de purificación.

Las NPs formadas por la fusión de antígenos con el péptido PH(1-110) no solamente se pueden utilizar como vacunas, sino también como antígenos en ensayos serológicos (como lo hemos observado cuando usamos estas NPs para sensibilizar placas de ELISA).

Es evidente, que se deberá continuar probando nuevos antígenos. Algo que tenemos en mente, es fusionar la proteína hemaglutinina del virus de influenza A y probar la respuesta inmune humoral por medio de un ensayo de inhibición de la hemaglutinación y ELISAs.

Se pueden implementar estrategias como la fusión de péptidos inmunoestimulantes y/o cargar positivamente a las partículas para promover respuestas inmunes más robustas contra los antígenos fusionados al péptido PH(1-110) como se ha observado con otros sistemas de entrega.



Con el uso de herramientas bioinformáticas se pueden diseñar también partículas que contengan uno o varios epítomos de patógenos fusionados con el péptido PH(1-110).

En general, se deberán evaluar varios antígenos no solo virales sino de diferente origen. Los antígenos que pretendemos evaluar por el momento son de importancia veterinaria, pero posiblemente este sistema se pueda utilizar en salud pública, debido a su gran margen de seguridad, rendimiento y bajos costos en su proceso de purificación.

## 10. REFERENCIAS

1. Tischer, I, Gelderblom, H, Vettermann, W and Koch MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 1982;295(7):64–6.
2. Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*. 1998;39(1):44–51.
3. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Heal Res Rev* . 2005;6(02):119–42. Available from:  
[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1466252305000083](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1466252305000083)
4. Faccini S, Barbieri I, Gilioli A, Sala G, Gibelli LR, Moreno A, et al. Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(6):1661–4.
5. Iglesias Reyes AE, Ortíz Muñiz AR, Juárez Mosqueda M de L, Guevara González JA, Córdova Izquierdo A. Comportamiento de la porcicultura mexicana de los años 1970 a 2017 . Una revisión documental sobre su desempeño. *Soc Rural Prod Y mEDIO Ambient*. 2017;17(June):153–72.
6. Hernández Martínez, Juvencio; Rebollar Rebollar, Samuel; Rojo Rubio, Rolando; Cardoso Jiménez, Daniel; García Salazar, José Alberto; Guzmán Soria, Eugenio; Díaz Carreño MÁ. Competitividad del comercio exterior de la porcicultura mexicana en el Tratado de Libre Comercio de América del Norte. *Cienc ergo sum*. 2008;15(2):126–31.
7. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *Vet J* . 2012;194(2):151–7. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.031>
8. Pinheiro ALBC, Bulos LHS, Onofre TS, de Paula Gabardo M, de Carvalho OV, Fausto MC, et al. Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on commercial swine farms. *Res Vet Sci* . 2013;94(3):764–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.006>
9. Afghah Z, Webb B, Meng XJ, Ramamoorthy S. Ten years of PCV2 vaccines and

- vaccination: Is eradication a possibility? *Vet Microbiol* . 2017;206:21–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.002>
10. Karuppanan AK, Opriessnig T. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. *Viruses*. 2017;9(5):1–15.
  11. Bedolla López F, Trujillo Ortega ME, Mendoza Elvira S, Quintero Ramírez V, Alonso Morales R, Ramírez-Mendoza H, et al. Identification and genotyping of porcine circovirus type II (PCV2) in Mexico. *VirusDisease* . 2018;29(3):385–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13337-018-0460-6>
  12. Opriessnig T, Gerber PF, Xiao CT, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ. Commercial PCV2a-based vaccines are effective in protecting naturally PCV2b-infected finisher pigs against experimental challenge with a 2012 mutant PCV2. *Vaccine* . 2014;32(34):4342–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.004>
  13. Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, De Castro AMMG, Biagini P, et al. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology J* . 2015;12(1):131. Available from: <http://www.virologyj.com/content/12/1/131>
  14. Lin H xing, Ma Z, Yang X qiu, Fan H jie, Lu C ping. A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) co-infection. *Vet Microbiol* . 2014;171(1–2):198–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.018>
  15. Gamage LNA, Mcintosh KA, Parker S, Harding J, Krakowka S, Ellis J. Efficacy of parenteral vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in seropositive piglets. *Can J Vet Res*. 2012;76(4):301–7.
  16. Xu X-G, Wang Z-S, Zhang Q, Li Z-C, Ding L, Li W, et al. Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: baculovirus virions displaying simultaneously GP5 glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2. *J Virol Methods* . 2012 Mar [cited 2013 Nov 29];179(2):359–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22172969>

17. Zhang C, Zhu S, Wei L, Yan X, Wang J, Quan R, et al. Recombinant flagellin-porcine circovirus type 2 cap fusion protein promotes protective immune responses in mice. *PLoS One*. 2015;10(6):1–16.
18. Mankertz A, Çaliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, et al. Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol*. 2004;98(2):81–8.
19. Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses-Small but powerful. *Virus Res*. 2009;143(2):177–83.
20. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 9):2281–7.
21. Beach NM, Meng XJ. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* . 2012;164(1–2):33–42. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.041>
22. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol*. 2006;80(10):5065–73.
23. Karuppanan AK, Kwang J. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the of the virus. *Virology* . 2011;410(1):248–56. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.009>
24. Misinzo G, Delputte PL, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ. Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Res*. 2009;139(1):1–9.
25. Beach NM, Juhan NM, Cordoba L, Meng XJ. Replacement of the Replication Factors of Porcine Circovirus (PCV) Type 2 with Those of PCV Type 1 Greatly Enhances Viral Replication In Vitro. *J Virol* . 2010;84(17):8986–9. Available from:  
<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00522-10>
26. Cheung AK. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology*.

2003;305(1):168–80.

27. Mair KH, Sedlak C, Käser T, Pasternak A, Levast B, Gerner W, et al. The porcine innate immune system: An update. *Dev Comp Immunol* . 2014;45(2):321–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.022>
28. Jonasson R, Johannisson A, Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M. Differences in lymphocyte subpopulations and cell counts before and after experimentally induced swine dysentery. *J Med Microbiol*. 2004;53(4):267–72.
29. Meng X-J. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci* . 2013;1(1):43–64. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-031412-103720>
30. Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115(3–4):261–72.
31. Lefebvre DJ, Meerts P, Costers S, Misinzo G, Barbé F, Van Reeth K, et al. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. *Vet Microbiol*. 2008;132(1–2):74–86.
32. McCullough KC, Ruggli N, Summerfield A. Dendritic cells-At the front-line of pathogen attack. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1–3):7–15.
33. Vincent IE, Balmelli C, Meehan B, Allan G, Summerfield A, McCullough KC. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*. 2006;120(1):47–56.
34. Borghetti P, Morganti M, Saleri R, Ferrari L, De Angelis E, Cavalli V, et al. Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet Microbiol* . 2013;163(1–2):42–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.007>
35. Niederwerder MC, Bawa B, Serao NVL, Tribble BR, Kerrigan MA, Lunney JK, et al. Vaccination with a porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified

live virus vaccine followed by challenge with PRRS virus and porcine circovirus type 2 (PCV2) protects against PRRS but enhances PCV2 replication and pathogenesis compared to. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(12):1244–54.

36. Allan G, Krakowka S, Ellis J, Charreyre C. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Res.* 2012;164(1–2):4–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.013>
37. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, Reilly GAC, Adair B, Ellis WA, et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol.* 1995;44(1):49–64.
38. Kim J, Choi C, Chae C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 2003;128(1):52–9.
39. Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 2000;64(1):44–52.
40. Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4629–32.
41. Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol.* 2005;86(7):2057–68.
42. An DJ, Song DS, Park JY, Park BK. A DNA miniarray system for simultaneous visual detection of porcine circovirus type 1 (PCV1) and 2 (PCV2) in pigs. *Vet Res Commun.* 2009;33(2):139–47.
43. Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, Lefebvre DJ, Saha D, Huang L, et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res.* 2012;164(1–2):43–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.003>
44. Martelli P, Saleri R, Ferrarini G, De Angelis E, Cavalli V, Benetti M, et al. Impact of maternally derived immunity on piglets' immune response and protection against

- porcine circovirus type 2 (PCV2) after vaccination against PCV2 at different age. *BMC Vet Res* . 2016;12(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0700-1>
45. López-Soria S, Sibila M, Nofrarías M, Calsamiglia M, Manzanilla EG, Ramírez-Mendoza H, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Vet Microbiol*. 2014;174(3–4):296–301.
  46. Darwich L, Mateu E. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* . 2012;164(1–2):61–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.003>
  47. Albina E, Truong C, Hutet E, Blanchard P, Cariolet R, LHospitalier R, et al. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol*. 2001;125(4):292–303.
  48. Allan GM, Mc Neilly F, Meehan BM, Kennedy S, MacKie DP, Ellis JA, et al. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol*. 1999;66(2):115–23.
  49. Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, Sorden SD, Paul PS, et al. Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Pathol*. 2003;38(5):528–39.
  50. Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* . 2002;76(7):3232–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884547><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC136035>
  51. McNeilly F, McNair I, Mackie DP, Meehan BM, Kennedy S, Moffett D, et al. Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol*. 2001;146(5):909–22.

52. Resendes A, Segalés J, Balasch M, Calsamiglia M, Sibila M, Ellerbrok H, et al. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs. *Vet Res.* 2004;35:83–90.
53. Darwich L, Segalés J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol.* 2004;149(5):857–74.
54. Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: A review. *J Vet Diagnostic Investig.* 2000;12(1):3–14.
55. Arms PAH, Orden SDS, Albur PGH, Olin SRB, Ager KML, Orozov IM, et al. Experimental Reproduction of Severe Disease in CD / CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. 2001;539:528–39.
56. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol.* 2009;46(4):707–16.
57. Segalés J, Rosell C, Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 2004;98(2):137–49.
58. Larochelle R, Drolet R, Magar R, Morin M, Delisle B. Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet Pathol.* 2003;40(2):143–8.
59. Grau-Roma L, Segalés J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol.* 2007;119(2–4):144–51.
60. Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Kanitz CL. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol.* 1999;36(5):368–78.



61. Ha Y, Jung K, Chae C. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. *Vet Rec.* 2005;156(12):383–4.
62. Cheong Y, Oh C, Lee K, Cho KH. Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. *J Vet Sci.* 2017;18(3):283–9.
63. Baekbo P, Kristensen CS, Larsen LE. Porcine Circovirus Diseases: A review of PMWS. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59(SUPPL. 1):60–7.
64. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 2005;169(3):326–36.
65. Fenaux M, Halbur PG, Haqshenas G, Royer R, Thomas P, Nawagitgul P, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol.* 2002;76(2):541–51. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, et al. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in Capsid protein showed more virulence in vivo, compared with classical PCV2a/b strain. *PLoS One.* 2012;7(7).
67. Haake M, Palzer A, Rist B, Weissenbacher-Lang C, Fachinger V, Eggen A, et al. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol.* 2014;168(2–4):272–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.012>
68. Seo HW, Park C, Han K, Chae C. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. *Vet Res.* 2014;45(1):1–9. Available from: *Veterinary Research*
69. Kekarainen T, Gonzalez A, Llorens A, Segalés J. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms. *J Gen Virol.* 2014;95(PART 8):1734–42.

70. Velasova M, Alarcon P, Werling D, Nevel A, Wieland B. Effectiveness of porcine circovirus type 2 vaccination in reducing the severity of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet J* . 2013;197(3):842–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.043>
71. Martelli P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Guazzetti S, et al. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet Microbiol* . 2011;149(3–4):339–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.008>
72. Kristensen CS, Baadsgaard NP, Toft N. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Prev Vet Med* . 2011;98(4):250–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.11.015>
73. Fraile L, Grau-Roma L, Sarasola P, Sinovas N, Nofrarías M, López-Jimenez R, et al. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*. 2012;30(11):1986–92.
74. Seo HW, Lee J, Park C, Kim HJ, Kwak T-K, Kim S-H, et al. Comparison of commercial one-dose and two-dose baculovirus-expressed porcine circovirus type 2 subunit vaccines. *J Swine Heal Prod*. 2014;22(6):291–5.
75. Seo HW, Oh Y, Han K, Park C, Chae C. Reduction of porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia by a reformulated inactivated chimeric PCV1-2 vaccine-induced humoral and cellular immunity after experimental PCV2 challenge. *BMC Vet Res* . 2012;8(1):1. Available from: BMC Veterinary Research
76. Han K, Seo HW, Oh Y, Park C, Kang I, Jang H, et al. Efficacy of a piglet-specific commercial inactivated vaccine against Porcine circovirus type 2 in clinical field trials. *Can J Vet Res* . 2013;77:237–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3700452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

77. Yang K, Li W, Niu H, Yan W, Liu X, Wang Y, et al. Efficacy of single dose of an inactivated porcine circovirus type 2 (PCV2) whole-virus vaccine with oil adjuvant in piglets. *Acta Vet Scand* . 2012;54(1):67. Available from: *Acta Veterinaria Scandinavica*
78. Li J, Yu T, Wang X, Zhou J, Gao R, Zhang F, et al. Comparative efficacy of experimental inactivated and live-attenuated chimeric porcine circovirus (PCV) 1-2b vaccines derived from PCV1 and PCV2b isolates originated in China. *Virology* . 2015;12(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0338-9>
79. Zanotti C, Martinelli N, Lelli D, Amadori M. Correlates of Protection Following Vaccination with Inactivated Porcine Circovirus 2 Vaccines. *Viral Immunol* . 2015;28(10):600–8.
80. Gagnon CA, Music N, Fontaine G, Tremblay D, Harel J. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol* . 2010;144(1–2):18–23.
81. Castro-Acosta RM, Revilla AL, Ramírez OT, Palomares L a. Separation and quantification of double- and triple-layered rotavirus-like particles by CZE. *Electrophoresis* . 2010 Apr [cited 2013 Nov 29];31(8):1376–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336682>
82. Fan H, Ju C, Tong T, Huang H, Lv J, Chen H. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun* . 2007;31(4):487–96.
83. Yin S, Sun S, Yang S, Shang Y, Cai X, Liu X. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology* . 2010;7:166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646322>
84. Xi X, Mo X, Xiao Y, Yin B, Lv C, Wang Y, et al. Production of *Escherichia coli*-based virus-like particle vaccine against porcine circovirus type 2 challenge in piglets: Structure characterization and protective efficacy validation. *J Biotechnol* . 2016;223:8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.025>
85. Wu PC, Chen TY, Chi JN, Chien MS, Huang C. Efficient expression and

- purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* . 2016;220:78–85. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.017>
86. Nainys J, Lasickiene R, Petraityte-burneikiene R, Dabrisius J, Lelesius R, Sereika V, et al. Generation in yeast of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein and their use for a serologic assay and development of monoclonal antibodies. *BMC Biotechnol*. 2014;14(1):1–11.
87. Zaveckas M, Snipaitis S, Pesliakas H, Nainys J, Gedvilaite A. Purification of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein using ion-exchange monolith chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* . 2015;991:21–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.04.004>
88. Trovato M, Berardinis P De. Novel antigen delivery systems. *World J Virol*. 2015;4(3):156–68.
89. Hu G, Wang N, Yu W, Wang Z, Zou Y, Zhang Y, et al. Generation and immunogenicity of porcine circovirus type 2 chimeric virus-like particles displaying porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 epitope B. *Vaccine* . 2016;34(16):1896–903. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.047>
90. Fort M, Sibila M, Pérez-Martín E, Nofrarias M, Mateu E, Segalés J. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*. 2009;27(30):4031–7.
91. Bucarey SA, Noriega J, Reyes P, Tapia C, Sáenz L, Zuñiga A, et al. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine*. 2009;27(42):5781–90.
92. Vicente T, Roldão A, Peixoto C, Carrondo MJT, Alves PM. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol* .

- 2011;107(SUPPL.):S42–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.004>
93. Morenweiser R. Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Ther.* 2005;12:S103–10.
  94. Peyret H. A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. *J Virol Methods* . 2015;225(September):59–63. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.09.005>
  95. Li P cheng, Qiao X wen, Zheng Q sheng, Hou J bo. Immunogenicity and immunoprotection of porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap protein displayed by *Lactococcus lactis*. *Vaccine* . 2016;34(5):696–702. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.007>
  96. Dong B, Feng J, Lin H, Li L, Su D, Tu D, et al. Immune responses of mice immunized by DNA plasmids encoding PCV2 ORF 2 gene, porcine IL-15 or the both. *Vaccine*. 2013;31(48):5736–44.
  97. Wang YP, Liu D, Guo LJ, Tang QH, Wei YW, Wu HL, et al. Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN- $\gamma$  in mice. *Vaccine* . 2013;31(5):833–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.062>
  98. Chi JN, Wu CY, Chien MS, Wu PC, Wu CM, Huang C. The preparation of porcine circovirus type 2 (PCV2) virus-like particles using a recombinant pseudorabies virus and its application to vaccine development. *J Biotechnol* . 2014;181:12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.006>
  99. Li W, Wang X, Bai J, Ma T, Li Z, Li Y, et al. Construction and immunogenicity of recombinant porcine circovirus-like particles displaying somatostatin. *Vet Microbiol* . 2013;163(1–2):23–32. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.045>
  100. Gellért Á, Salánki K, Tombácz K, Tuboly T, Balázs E. A Cucumber Mosaic Virus Based Expression System for the Production of Porcine Circovirus Specific Vaccines. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10.

101. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: Past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol*. 2013;32(2):209–20.
102. Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*. 2015;3(2):320–43.
103. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines - US perspective. *Vaccine*. 2002;20(SUPPL. 3):18–23.
104. Arnon R, Ben-Yedidia T. Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(8):1195–204.
105. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2009;27(25–26):3331–4.
106. Gazit E. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chem Soc Rev* . 2007;36(8):1263. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b605536m>
107. Gilead S, Gazit E. Self-organization of short peptide fragments: From amyloid fibrils to nanoscale supramolecular assemblies. *Supramol Chem*. 2005;17(1–2):87–92.
108. Adler-Abramovich L, Reches M, Sedman VL, Allen S, Tendler SJB, Gazit E. Thermal and chemical stability of diphenylalanine peptide nanotubes: Implications for nanotechnological applications. *Langmuir*. 2006;22(3):1313–20.
109. Zepeda-Cervantes J, Vaca L. Induction of adaptive immune response by self-aggregating peptides. *Expert Rev Vaccines* . 2018;00(00):14760584.2018.1507742. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2018.1507742>
110. Hauser CAE, Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber biological materials. *Chem Soc Rev* . 2010;39(8):2780. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b921448h>
111. Wang J, Liu K, Xing R, Yan X. Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics. *Chem Soc Rev* . 2016;45(20):5589–604. Available from:

<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CS00176A>

112. Loo Y, Zhang S, Hauser CAE. From short peptides to nanofibers to macromolecular assemblies in biomedicine. *Biotechnol Adv.* 2012;30(3):593–603.
113. Rad-Malekshahi M, Lempsink L, Amidi M, Hennink WE, Mastrobattista E. Biomedical Applications of Self-Assembling Peptides. *Bioconj Chem.* 2016;27(1):3–18.
114. Cavalli S, Albericio F, Kros A. Amphiphilic peptides and their cross-disciplinary role as building blocks for nanoscience. *Chem Soc Rev.* 2010;39(1):241–63. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B906701A>
115. Banerji B, Chatterjee M, Pal U, Maiti NC. Formation of Annular Protofibrillar Assembly by Cysteine Tripeptide: Unraveling the Interactions with NMR, FTIR, and Molecular Dynamics. *J Phys Chem B.* 2017;121(26):6367–79.
116. Sun F, Chen L, Ding X, Xu L, Zhou X, Wei P, et al. High-Resolution Insights into the Stepwise Self-Assembly of Nanofiber from Bioactive Peptides. *J Phys Chem B.* 2017;121(31):7421–30.
117. Fink AL. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des.* 1998;3(1):9–23.
118. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(2):129–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722542> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2673971>
119. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol.* 2008;38(5):1404–13.
120. Silva AL, Rosalia RA, Sazak A, Carstens MG, Ossendorp F, Oostendorp J, et al. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8+T cell activation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83(3):338–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.006>

121. Fredriksen BN, Grip J. PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine* . 2012 Jan 11 [cited 2013 Nov 29];30(3):656–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100638>
122. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* . 2014;32(3):327–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
123. Chen J, Pompano RR, Santiago FW, Maillat L, Sciammas R, Sun T, et al. The use of self-adjuvanting nanofiber vaccines to elicit high-affinity B cell responses to peptide antigens without inflammation. *Biomaterials*. 2013;34(34):8776–85.
124. Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*. 2006;40(1):1–9.
125. Xiang SD, Wilson K, Day S, Fuchsberger M, Plebanski M. Methods of effective conjugation of antigens to nanoparticles as non-inflammatory vaccine carriers. *Methods* . 2013;60(3):232–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.03.036>
126. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol* . 2014;11(2):99–109. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1547691X.2013.821564>
127. Rudra JS, Mishra S, Chong AS, Mitchell RA, Nardin EH, Nussenzweig V, et al. Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope. *Biomaterials* . 2012;33(27):6476–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.041>
128. Slack J, Arif BM. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. *Adv Virus Res*. 2006;69(06):99–165.
129. López MG, Diez M, Alfonso V, Taboga O. Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(16):6765–74.



130. Kamita SG, Maeda S, Hammock BD. High-Frequency Homologous Recombination between Baculoviruses Involves DNA Replication †. 2003;77(24):13053–61.
131. Nazli-Huda. Stability of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in sodium dodecyl sulphate. *African J Biotechnol* . 2012;11(16):3877–81. Available from: [http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/23Feb/Nazli-Huda et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/23Feb/Nazli-Huda%20et%20al.htm)
132. Chiu E, Coulibaly F, Metcalf P. Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles. *Curr Opin Struct Biol*. 2012;22(2):234–40.
133. Chen L, Xiang X, Yang R, Hu X, Cao C, Malik FA, et al. Immobilization of foreign protein in BmNPV polyhedra by fusion expression with partial polyhedrin fragments. *J Virol Methods* . 2013;194(1–2):185–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.020>
134. Seo SJ, Jin BR, Choi JY, Je YH, Chang JH, Roh JY, et al. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *J Invertebr Pathol*. 2003;84(1):30–7.
135. McLinden, J. H.; Plopis, V. A.; Fraser, M. J.; Rosen ED. recombinant occlusion bodies of. *Vaccine*. 1992;10(4):231–7.
136. Roh JY, Choi JY, Kang JN, Wang Y, Shim HJ, Liu Q, et al. Simple Purification of a Foreign Protein Using Polyhedrin Fusion in a Baculovirus Expression System. *Biosci Biotechnol Biochem* . 2010 [cited 2013 Nov 29];74(8):1522–6. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/100016?from=CrossRef>
137. Lee KS, Sohn MR, Kim BY, Choo YM, Woo SD, Yoo SS, et al. Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *Mol Biotechnol*. 2012;50(3):211–20.
138. Kim BY, Lee KS, Sohn MR, Woo SD, Yoo SS, Je YH, et al. Production of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus envelope glycoproteins gB and gC as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *J Asia Pac Entomol* . 2012;15(1):114–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2011.10.001>
139. Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DI. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J* .

2010;29(2):505–14. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2824454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

140. Sampieri A, Luz-Madrigal A, Zepeda J, Vaca L. Identification of fragments from *Autographa Californica* polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation. *BMC Biochem* . 2015;16(1):5. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/16/5>
141. Yamaji H, Tagai SI, Fukuda H. Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement. *J Biosci Bioeng*. 1999;87(5):636–41.
142. Qi J, Liu T, Pan J, Miao P, Zhang C. Rapid baculovirus titration assay based on viable cell side scatter (SSC). *Anal Chim Acta* . 2015;879:58–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.007>
143. Tian X, Nejadnik MR, Baunsgaard D, Henriksen A, Rischel C, Jiskoot W. A Comprehensive Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight) for Characterization of Proteinaceous Submicron Particles. *J Pharm Sci* . 2016;105(11):3366–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.08.009>
144. Yoshikawa R, Shimode S, Sakaguchi S, Miyazawa T. Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Arch Virol*. 2014;159(3):399–404.
145. Thompson CM, Petiot E, Mullick A, Aucoin MG, Henry O, Kamen AA. Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnol* . 2015;15(1):1–12. Available from: ???
146. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* . 2010;10(11):787–96. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2868>
147. Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings DM, Allan G. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: Induction

- of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J.* 2007;48(7):716–24.
148. Fort M, Olvera A, Sibila M, Segalés J, Mateu E. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol.* 2007;125(3–4):244–55.
  149. Fan H, Pan Y, Fang L, Wang D, Wang S, Jiang Y, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J Virol Methods.* 2008;150(1–2):21–6.
  150. Jeong J, Park C, Choi K, Chae C. Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. *Vet Microbiol.* 2015;177(1–2):43–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.027>
  151. Li T-C, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Azeez Razak MA, Uchida T, et al. Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J Virol.* 1997;71(10):7207–13.
  152. Cook JC, Joyce JG, George HA, Schultz LD, Hurni WM, Jansen KU, et al. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 1999;17(3):477–84.
  153. Chung Y, Huang J, Lai C, Sheng H, Shih S, Ho M, et al. Expression , purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. 2006;12(6):921–7.
  154. Molina GN, Tavarone E, Taboga O, Molinari P. Two distinctive phenotypes of AcMNPV display different immune abilities and intracellular destiny. *PLoS One.* 2016;11(12):1–14.
  155. Aguilera BE, Chávez-Calvillo G, Elizondo-Quiroga D, Jimenez-García MN, Carrillo-Tripp M, Silva-Rosales L, et al. Porcine circovirus type 2 protective epitope densely carried by chimeric papaya ringspot virus–like particles expressed in *Escherichia coli* as a cost-effective vaccine manufacture alternative. *Biotechnol Appl Biochem.* 2017;64(3):406–14.

156. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol* . 2017;39:174–80. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.010>
157. Anzaghe M, Schülke S, Scheurer S. Virus-Like Particles as Carrier Systems to Enhance Immunomodulation in Allergen Immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018;18(12):1–12.
158. Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins. *Adv Virus Res*. 2006;68(06):159–91.
159. DiMiceli L, Pool V, Kelso JM, Shadomy S V., Iskander J. Vaccination of yeast sensitive individuals: Review of safety data in the US vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*. 2006;24(6):703–7.
160. Yang LPH. Recombinant trivalent influenza vaccine (Flublok®): A review of its use in the prevention of seasonal influenza in adults. *Drugs*. 2013;73(12):1357–66.
161. Vanlander A, Hoppenbrouwers K. Anaphylaxis after vaccination of children: Review of literature and recommendations for vaccination in child and school health services in Belgium. *Vaccine* . 2014;32(26):3147–54. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.096>
162. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Advances in Polymer Science*. 2012.

## 11. ANEXO I: permisos otorgados para el uso de figuras en esta tesis

### 11.1. Síndromes causados por PCV2

Figures from: Segalés, J., Allan, G., & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 119-142  
© CAB International 2005, published by Cambridge University Press

Thank you for your request to reproduce the above material in your forthcoming PhD thesis, for non-commercial publication. Cambridge University Press are pleased to grant non-exclusive permission, free of charge, for this specific one time use, on the understanding you have checked that we do not acknowledge any other source for the material. This permission does not include the use of copyright material owned by any party other than the authors. Consent to use any such material must be sought by you from the copyright owner concerned.

Please ensure full acknowledgement appears in your work.

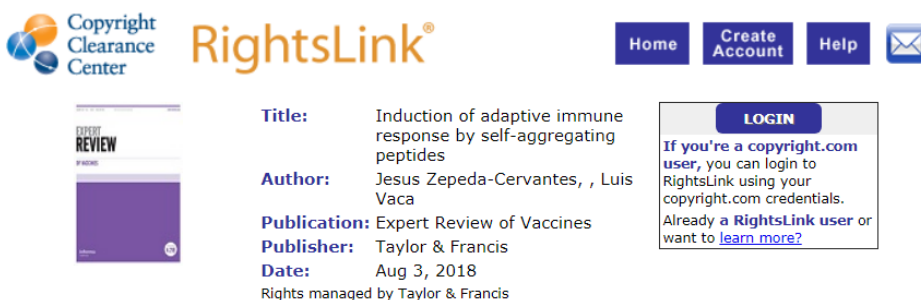
Should you wish to publish your work commercially in the future, please reapply to the appropriate Cambridge University Press office, depending on where your forthcoming work will be published. Further information can be found on our website at the following link:

<http://www.cambridge.org/about-us/rights-permissions/permissions/>

Kind regards,

Permissions Sales Team

### 11.2. Respuesta inmune contra SAPs



**Title:** Induction of adaptive immune response by self-aggregating peptides  
**Author:** Jesus Zepeda-Cervantes, , Luis Vaca  
**Publication:** Expert Review of Vaccines  
**Publisher:** Taylor & Francis  
**Date:** Aug 3, 2018  
Rights managed by Taylor & Francis

**LOGIN**  
If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to [learn more?](#)

#### Thesis/Dissertation Reuse Request

Taylor & Francis is pleased to offer reuses of its content for a thesis or dissertation free of charge contingent on resubmission of permission request if work is published.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2019 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

## 12. ANEXO II: publicaciones obtenidas durante la estancia doctoral

Sampieri et al. *BMC Biochemistry* (2015) 16:5  
DOI 10.1186/s12858-015-0034-9



### RESEARCH ARTICLE

### Open Access

# Identification of fragments from *Autographa Californica* polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation

Alicia Sampieri<sup>1</sup>, Agustín Luz-Madrigal<sup>2,3</sup>, Jesús Zepeda<sup>1</sup> and Luis Vaca<sup>1\*</sup>

#### Abstract

**Background:** Baculoviruses are widely used for the production of recombinant proteins, biopesticides and as gene delivery systems. One of the viral forms called polyhedra has been recently exploited as a scaffold system to incorporate or encapsulate foreign proteins or peptide fragments. However, an efficient strategy for foreign protein incorporation has not been thoroughly studied.

**Results:** Based on the crystal structure of polyhedrin, we conducted an *in silico* analysis of the baculovirus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) polyhedrin protein to select the minimum fragments of polyhedrin that could be incorporated into polyhedra. Using confocal and transmission electron microscopy we analyzed the expression and cellular localization of the different polyhedrin fragments fused to the green fluorescent protein (EGFP) used as reporter. The amino fragment 1–110 contains two repeats formed each of two  $\beta$  sheets followed by a  $\alpha$  helix (amino acids 1–58 and 58–110) that are important for the formation and stability of polyhedra. These fragments 1–58, 58–110 and 1–110 could be incorporated into polyhedra. However, only fragments 1–110 and 58–110 can self-aggregate.

**Conclusions:** These results demonstrate that 58–110 is the minimum fragment that contributes to the assembly of the recombinant polyhedra via self-aggregation. This is the minimum sequence that can be used to efficiently incorporate foreign proteins into polyhedra.

**Keywords:** *Autographa Californica*, Polyhedrin, Polyhedra, Baculovirus

#### Background

The development of eukaryotic systems for the expression of recombinant proteins has been a major goal in biotechnology due to its widespread utility in medicine, veterinary medicine, and agriculture, among other related areas [1].

The use of insect viruses to produce and to obtain different recombinant proteins has grown in recent decades [2,3]. Three of these eukaryotic systems are expressed in insect cells and are currently in use. Two of them are based on the DNA baculoviruses *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), and *Bombyx mori*

nucleopolyhedrovirus (BmNPV). The third uses the RNA virus *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) cypovirus. In nature, the viruses of these 2 families are protected from adverse environmental conditions as they are occluded into crystalline lattices called polyhedra or occlusion bodies, derived mainly from a single viral protein called polyhedrin [4]. The occlusion is an adaptation that allows baculoviruses to remain in a dormant but infective state in the environment for decades [5].

Polyhedrin is one of the most abundant proteins in a baculovirus-infected cell, since its expression is driven by a very strong promoter [6]. Because polyhedrin is not necessary for the propagation of the virus, the DNA sequence of the protein can be replaced with some other sequence of interest [7]. This in turn, has allowed the

\* Correspondence: lvaca@ifc.unam.mx

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Sampieri et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



REVIEW



## Induction of adaptive immune response by self-aggregating peptides

Jesus Zepeda-Cervantes and Luis Vaca

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CDMX, Coyoacán, Mexico

### ABSTRACT

**Introduction:** Recently, subunit vaccines are replacing some of the traditional vaccines because they offer a higher margin of safety. However, generally subunit vaccines have low antigenicity. Adjuvants are used in vaccine formulations to increase their immunogenicity, but current research suggests that adjuvants could induce serious side effects in susceptible individuals; therefore, the improvement of antigens and adjuvants is important.

**Areas covered:** Here we reviewed some self-aggregating peptides (SAPs) used as antigen delivery systems. SAPs are based on a short sequence of amino acids, which have self-aggregating properties, inducing self-interaction among peptide molecules by means of non-covalent interactions to generate nanoparticles (NPs).

**Expert commentary:** SAPs increase the immunogenicity of fused/conjugated antigens because they can interact with antigen-presenting cells and induce adaptive immunity based on both humoral and cellular responses. As an example, we report an antigen delivery system based on SAPs forming NPs. These NPs are synthesized using a recombinant baculovirus. We fused the green fluorescent protein to the first 110 amino acids of polyhedrin protein from *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, which has self-aggregating properties. We showed that these NPs prompt high antibody levels without inducing inflammation, similarly to some SAPs reported here.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 March 2018  
Accepted 30 July 2018

### KEYWORDS

Antigen delivery system; baculovirus; polyhedrin protein; self-aggregating peptides; subunit vaccine

### 1. Introduction

Recent advances in vaccine development have been shown that subunit vaccines are better than whole pathogen-based traditional vaccines in terms of safety. Traditional vaccines contain attenuated or inactivated pathogens, which can induce both an antigen-specific antibody response and a cytotoxic T lymphocyte (CTL) response that neutralize extracellular pathogens and kill host cells infected with intracellular pathogens, respectively [1]. Traditional vaccines have played a very important role in eradicating or at least reducing the incidence of many infectious diseases; however, some pathogens cannot be cultivated *in vitro* and it is difficult to determine the appropriate inactivation or attenuation of the pathogen in the vaccine [2]. That is why the development of subunit vaccines is important. A clear example of subunit vaccines are the virus-like particles (VLPs) [3]. VLPs are generally synthesized by expression of one single protein with self-assembly properties, producing nanoparticles (NPs). VLPs protect against pathogens and some of them have replaced the whole pathogen-based vaccines. Some VLPs need coadministration of adjuvant while others do not [3–7].

The development of new adjuvants is also important since it improves the immunogenicity of antigens. The mechanism of action of adjuvants is being studied; one of the most common adjuvants is based on aluminum salts and it has been shown that the inflammation induced by this adjuvant plays an important role in the activation of adaptive cellular

immunity [8]. The inflammation is characterized for its four cardinal signs: (1) redness, (2) swelling, (3) pain, and (4) warmth [9]. Although, the inflammation induced by adjuvants seems to be important in the immune response, some researchers have suggested that adjuvants could induce not only these cardinal signs of inflammation but also autoimmune diseases. Shoenfeld and Agmon-Levin (2011) coined the term autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. They reviewed some reports that suggest that the use of adjuvants can be associated to autoimmune diseases in susceptible individuals (both animal and humans) [10]. Due to these drawbacks of adjuvants, it is important the development of alternatives that improve the immunogenicity of antigens without side effects.

Subunit vaccines based on recombinant proteins are alternatives to traditional vaccines but have often poor immunogenicity [1,11]. NPs induce a higher immune response in comparison with soluble antigens [1,3]. NPs can be synthesized by oil-in-water emulsions and polymers [12], but nowadays there are other novel methods to synthesize them. For instance, self-aggregating peptides (SAPs) are short sequences of amino acids with self-aggregating properties, which can form secondary structures (mainly  $\beta$ -sheet) and self-assemble into NPs. The antigens conjugated to NPs formed by SAPs induce a strong humoral immune response against these antigens without the need of adjuvants in animal models without inducing inflammation [13]. Therefore, the NPs





## Incorporation of ORF2 from Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide

Jesús Zepeda-Cervantes<sup>a,b,1</sup>, Adolfo Cruz-Reséndiz<sup>a,1</sup>, Alicia Sampieri<sup>a</sup>, Rosalba Carreón-Nápoles<sup>c</sup>, José Iván Sánchez-Betancourt<sup>c</sup>, Luis Vaca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CDMX, Coyoacán 04510, Mexico

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, CDMX, Coyoacán 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CDMX, Coyoacán 04510, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 October 2018

Received in revised form 11 February 2019

Accepted 17 February 2019

Available online 26 February 2019

#### Keywords:

Nanoparticles  
Subunit vaccine  
Porcine Circovirus Type 2  
Polyhedrin  
Self-aggregating peptide

### ABSTRACT

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is one of the most important pathogens in pigs around the world. PCV2 is a non-enveloped virus and its capsid is formed by a single protein known as open reading frame 2 (ORF2). The aim of this study was to evaluate the antigenicity and immunogenicity of genetically encoded protein nanoparticles (NPs) containing ORF2 from PCV2 fused to the first 110 amino acids of the N-terminus of polyhedrin from the insect virus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (PH(1–110)). Our group has previously described that some polyhedrin fragments self-aggregate forming polyhedra-like particles. We identified a self-aggregating signal within the first 110 amino acids from polyhedrin (PH(1–110)). Fusing the ORF2 from PCV2 to the carboxyl terminus from PH(1–110) results in the formation of NPs which incorporate the antigen of interest. Using this system we synthesized NPs containing PH(1–110) fused to ORF2 (PH(1–110)PCV2) and purify them to immunize pigs and evaluate the humoral immune response generated by these NPs comparing them to a commercially available vaccine. Pigs immunized with PH(1–110)PCV2 NPs produced antibodies against ORF2 from PCV2 as indicated by western blot and ELISA analysis. Antibodies obtained with PH(1–110)PCV2 NPs were comparable to those obtained using a commercial PCV2 vaccine. These antibodies neutralized the infection of a recombinant PCV2 expressing the green fluorescent protein (GFP). These results together suggest that the self-aggregating peptide PH(1–110) can be used for the synthesis of subunit vaccines against PCV2.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Porcine circoviruses (PCV) are small DNA viruses showing worldwide distribution. Nowadays, at least 3 types of PCV have been identified. PCV1 was reported as a non-cytopathic virus contaminant of porcine kidney cells [1]. PCV2 was described for the first time in pigs affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 1991 in Canada [2–4]. PCV2 is associated to porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), reproductive disorders [3,5–7], respiratory diseases, hepatitis, enteropathy and neurologic syndrome [8]. PCV2 infects

monocytes/macrophages and enters to host cells via clathrin-mediated endocytosis [9]. PCV2 also induces lymphocyte depletion, and therefore, facilitates many infectious diseases by bacteria and other viruses [10]. PCV2 contains 2 main genes: open reading frame 1 (ORF1) implicated in viral DNA replication and ORF2 responsible for the formation of the capsid. The ORF2 protein has a molecular weight of 30 kDa [11] and binds to heparan sulfate from the target cells [12]. Antibodies against ORF2 are sufficient to neutralize the infection [4,13]. PCV3 is a novel circovirus species associated to PDNS, reproductive failure and systemic inflammation, which has been isolated recently in the United States, Italy [14], China [15], and Poland [16].

PCV2 is one of the most important pathogens in the pig industry around the world because it causes important economic losses [3,4,17,18]. There are several commercially available vaccines against PCV2 and all of them are based on the ORF2 [4,19]. The first

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [asampier@ifc.unam.mx](mailto:asampier@ifc.unam.mx) (A. Sampieri), [rcarreonn@prodigy.net.mx](mailto:rcarreonn@prodigy.net.mx) (R. Carreón-Nápoles), [lvaca@ifc.unam.mx](mailto:lvaca@ifc.unam.mx) (L. Vaca).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.