



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas – Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROTECCIÓN TEMPRANA DE
LA VARIANTE THIVERVAL DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA
CLÁSICA Y DEL ROL DE CD46 DURANTE SU ENTRADA A LA
CÉLULA**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Yanesis Lamothe Reyes
CONCEPCIÓN-CHILE
2023

Profesor Guía: Oliberto Sánchez Ramos
Co-Guía: Maximiliano Figueroa Yévenes
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

© 2023 YANEYSIS LAMOTHE REYES

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Profesor Guía de tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Maximiliano Figueroa Yévenes
Profesor Co-Guía de tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ángel Oñate Contreras
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Gustavo Moraga C.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ricardo Soto Rifo
Profesor Evaluador Externo
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Ariel Castro Alma
Director Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

*Al DIOS maravilloso en el que creo,
a mi familia.*

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Peste Porcina Clásica. Situación actual. Políticas de erradicación.	1
1.2 Virus de la Peste Porcina Clásica. Características generales.	3
1.2.1 Etiología de la enfermedad.	3
1.2.2 Organización del genoma	3
1.2.3. Mecanismo de replicación viral	5
1.2.4 Función de las proteínas virales.	6
1.2.4.1 Proteínas no estructurales	6
1.2.4.2 Proteínas estructurales	7
1.2.4.3 Características de la glicoproteína E2	9
1.3 Receptores involucrados en la entrada del virus	11
1.3.1 Proteína CD46. Características generales y estructura.....	12
1.3.3 Participación de CD46 porcino en la infección por el VPPC.....	13
1.4 Patogénesis de la enfermedad	16
1.5 Signos clínicos de la enfermedad	17
1.6 Vacunación como alternativa para el control de la enfermedad.	19
1.6.1 Vacunación de emergencia en territorios libres de la Peste Porcina Clásica. ...	19
1.6.2 Vacunación profiláctica en territorios con Peste Porcina Clásica endémica. ...	20
1.6.2.1 Thiverval.....	22
1.7 Determinantes moleculares de virulencia del virus de la Peste Porcina Clásica.....	23
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Materiales	28
4.1.1 Proteínas.....	28
4.1.1.1 Proteínas recombinantes	28
4.1.1.2 Enzimas	28
4.1.1.3 Anticuerpos	28
4.1.2 Cepas bacterianas	29
4.1.3 Ácidos nucleicos	30
4.1.3.1 Plásmidos.....	30
4.1.4 Líneas Celulares.	30
4.1.5 Antibióticos.....	30
4.1.6 Medios de cultivo.	31
4.1.7 Animales	32
4.1.8 Virus.....	32

4.1.9	Reactivos químicos y materiales	33
4.1.10	Soluciones	35
4.1.10.1	Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmídico	35
4.1.10.2	Soluciones para electroforesis de ADN	36
4.1.10.3	Soluciones para electroforesis de proteínas	36
4.1.10.4	Soluciones para Western Blot.....	37
4.1.10.5	Soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos.....	38
4.1.10.6	Soluciones para inmunoensayo	38
4.1.10.7	Soluciones para transfección celular	38
4.1.10.8	Soluciones para purificación de suero hiperinmune	38
4.1.10.9	Soluciones para ensayo de Inmunoperoxidasa en Monocapa	39
4.1.11	Kits comerciales.....	39
4.1.12	Equipos	40
4.2	Métodos	41
4.2.1	Métodos generales de análisis y manipulación de ADN.....	41
4.2.2	Métodos generales de cultivo celular.....	42
4.2.3	Métodos generales empleados en los ensayos de inmunización y reto.....	42
4.2.3.1	Evaluación clínica de los animales	42
4.2.3.2	Diseño experimental y procedimiento de toma de muestras	43
4.2.4	Determinación de los niveles de IFN- α en suero mediante ELISA.....	45
4.2.5	Evaluación de la respuesta humoral contra las proteínas E2 y Erns del VPPC y determinación del título de anticuerpos neutralizantes.....	46
4.2.6	Detección del ARN del VPPC	48
4.2.7	Diseño, síntesis y generación del vector de expresión pEntry-CD46porc.....	49
4.2.7.1	Diseño y síntesis de la secuencia codificante del dominio extracelular de la proteína CD46 porcino.....	49
4.2.7.2	Generación del vector de expresión pEntry-CD46porc.....	49
4.2.8	Expresión de la glicoproteína rCD46his porcino en sobrenadante de cultivo celular	50
4.2.8.1	Transfección transiente de células CHO-K1 con el vector pEntry-CD46... 50	
4.2.8.2	Selección y amplificación de clones estables	50
4.2.8.3	Producción de la glicoproteína rCD46his porcino recombinante en sobrenadante de cultivo.....	51
4.2.9	Purificación de rCD46his porcino.....	51
4.2.10	Métodos para el análisis de la proteína rCD46his porcino	52
4.2.10.1	Métodos generales de análisis y manipulación de proteínas.....	52
4.2.10.2	Concentración y diafiltración de muestras de proteínas.....	52
4.2.10.3	Cuantificación de proteínas totales	53
4.2.10.4	Determinación de nivel de pureza y concentración de rCD46his porcino.....	53
4.2.11	Obtención y análisis de suero hiperinmune contra la proteína rCD46his porcino.....	53
4.2.11.1	Inmunización de ratones	53
4.2.11.2	Procedimiento de toma de muestras	54
4.2.11.3	Inmunoensayo de evaluación de reconocimiento de rCD46his porcino por suero hiperinmune.....	54
4.2.11.4	Purificación de suero hiperinmune anti rCD46his porcino	55
4.2.11.5	Determinación del efecto de bloqueo de la infección viral en presencia de suero hiperinmune antiCD46 porcino.....	56

4.2.11.6 Ensayo de Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA).....	56
4.2.12 Análisis matemáticos y estadísticos.	57
4.2.13 Alineamiento de secuencias.	58
4.2.14 Modelamiento de estructuras de las proteínas CD46 y E2.....	58
4.2.15 Análisis de interacción o docking proteína-proteína entre CD46 y E2 de las variantes Thiverval y Margarita.	59
4.2.16 Modelamiento de la estructura tridimensional del complejo E1-E2 de las variantes Thiverval y Margarita.	60
4.2.17 Análisis de potencial electrostático de superficie.....	60
4.2.18 Creación y análisis de imágenes.	61
5. RESULTADOS	62
5.1 Evaluación de la distribución, protección clínica y virológica e inmunogenicidad de la variante Thiverval del VPPC	62
5.1.1 Análisis del nivel de replicación en tejidos y órganos y la transmisibilidad hacia animales no vacunados	62
5.1.2 Evaluación del efecto protector en términos clínicos luego de 5 y 21 días post inmunización	64
5.1.3 Evaluación de la inmunogenicidad luego de 5 y 21 días post inmunización	67
5.1.4 Evaluación de la respuesta de IFN- α durante el estudio	73
5.1.5 Evaluación de la protección contra la replicación del virus del desafío luego de 5 y 21 días post inmunización.....	75
5.2 Evaluación del rol de CD46 durante la entrada de la variante Thiverval a la célula.	78
5.2.1 Obtención de la proteína CD46 porcino.....	78
5.2.1.1 Generación de la secuencia génica codificante de una forma secretable del segmento extracelular de la glicoproteína rCD46his porcino.....	78
5.2.1.2 Expresión de la glicoproteína rCD46his porcino en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1).....	82
5.2.1.3 Purificación de la glicoproteína rCD46his porcino producida en sobrenadante de cultivo.	83
5.2.1.4 Caracterización in vitro de la proteína rCD46his porcino purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.....	86
5.2.2 Generación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino	87
5.2.2.1 Producción y purificación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino ...	87
5.2.2.2 Análisis de la funcionalidad del suero hiperinmune anti rCD46his porcino	91
5.2.3 Evaluación del efecto bloqueador de anticuerpos anti-CD46 sobre la infección de variantes de distinta virulencia del virus de la Peste Porcina Clásica.	93
5.3 Análisis <i>in silico</i> de la influencia de las mutaciones de Thiverval en la interacción con CD46	98
5.3.1 Análisis comparativo de las secuencias de las variantes Thiverval, Margarita y Alfort/187	98
5.3.2 Análisis de docking proteína-proteína entre E2 y CD46 de las variantes Thiverval y Margarita.	104
6. DISCUSIÓN	108
6.1 Efecto protector temprano de la variante Thiverval del VPPC.....	109

6.2 Rol del receptor CD46 en la infección <i>in vitro</i> por la variante Thiverval del virus de la Peste Porcina Clásica.....	117
6.3 Influencia de los cambios conformacionales de la E2 de Thiverval en la interacción con CD46	123
7. CONCLUSIONES.....	126
8. RECOMENDACIONES.....	127
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización del genoma del virus de la Peste Porcina Clásica.	4
Figura 2. Estructura antigénica de la glicoproteína E2	11
Figura 3. Diseño experimental.	44
Figura 4. Detección de ARN del virus vacunal en muestras y tejidos durante los 21 dpi.	64
Figura 5. Evaluación de los signos y síntomas clínicos después del desafío.....	66
Figura 6. Cinética de la respuesta de anticuerpos contra E2 durante el estudio.....	69
Figura 7. Cinética de la respuesta de anticuerpos contra E2 durante el estudio.....	70
Figura 8. Determinación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes durante el estudio.	72
Figura 9. Detección de los niveles de INF-a en suero.	74
Figura 10. Detección de ARN del virus de la Peste Porcina Clásica en muestras y tejidos a diferentes tiempos después del desafío.	77
Figura 11. Generación de la secuencia génica codificante de la forma secretable de la proteína rCD46his porcino.	81
Figura 12. Análisis de la expresión de rCD46his porcino en células establemente transfectadas con el vector pEntry-CD46.	83
Figura 13. Purificación de rCD46his porcino mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos en matriz de agarosa Ni-NTA.	85
Figura 14. Caracterización de la proteína rCD46his porcino expresada en células CHO- K1.....	87
Figura 15. Análisis de la presencia de anticuerpos antiCD46 porcino en sueros de ratones inmunizados con rCD46his porcino.	88

Figura 16. Purificación de suero hiperinmune anti rCD46his porcino en columna de proteína A.	90
Figura 17. Análisis de la funcionalidad del suero hiperinmune antiCD46 generado.....	92
Figura 18. Inhibición de la infección de células PK15 con la variante Thiverval del VPPC en presencia de anticuerpos anti-CD46.....	94
Figura 19. Inhibición de la infección de células PK15 con la variante Margarita del VPPC en presencia de anticuerpos anti-CD46.....	96
Figura 20. Comparación del porcentaje de infección de las variantes Thiverval y Margarita en presencia de anticuerpos bloqueadores de CD46.....	97
Figura 21. Análisis de calidad con el servidor ProSA de los modelos de estructura tridimensional de E2 generados por Modeller.	100
Figura 22. Alineamiento estructural de las glicoproteínas E2 de las variantes Thiverval, Alfort/187 y Margarita.....	101
Figura 23. Análisis de potencial electrostático de superficie de las proteínas E2.	103
Figura 24. Docking proteína-proteína CD46-E2Thiverval y CD46-E2Margarita generado con ClusPro.	107

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcN	Anticuerpo neutralizante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCA	Ácido Bicincoínico
BSA	Albúmina de suero bovina
CCP	Complement Control Protein
CHO-K1	Células de ovario de hámster chino
CReSA	Centro de Investigación en Sanidad Animal
Ct	Cycle threshold
CYT	Cytoplasmic Tail
DAB	Diamino bencidina
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DL50	Dosis Letal 50
DMEM	Medio Mínimo Esencial Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	Envelope protein 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Erns	Envelope protein RNase secreted
GFP	Green fluorescent protein
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Heparán Sulfato
IFN	Interferón
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
Kan	Kanamicina
kb	Kilopares de bases
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
MCP	Membrane cofactor protein
MOI	Multiplicity of Infection
NPLA	Neutralizing Peroxidase-linked Antibody Assay
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PK-15	Células de riñón de cerdo
PLA	Peroxidase linked assay
PPC	Peste Porcina Clásica

RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
real time RT-PCR	Real time Reverse Transcription PCR
SDS	Sodium Dodecil Sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecil sulphate–poliacrilamide gel electrophoresis
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Ácido Tricloroacético
TCID	Tissue culture infectious dose 50%
TEMED	Tetrametiletilendiamina
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFP	Unidades formadoras de placas
UTR	Untranslated region
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
WAHIS	World Animal Health Information System

RESUMEN

La Peste Porcina Clásica es una enfermedad viral multisistémica que afecta exclusivamente a cerdos y genera pérdidas económicas significativas. Su agente causal, el virus de la Peste Porcina Clásica, es un virus en cuya envoltura se hayan expuestas las proteínas Erns, E1 y E2, involucradas en la unión inicial y entrada a la célula. Sin embargo, es la interacción de E2 con uno o más receptores en la membrana celular lo que media la endocitosis del virus. De acuerdo a la evidencia, la proteína de membrana CD46 está implicada en este proceso, aunque se ha observado que algunas variantes virales, luego de la adaptación a cultivo celular, desarrollan mecanismos de infección independientes de esta proteína. Se desconoce si estas variantes emplean mecanismos diferentes para el ingreso a la célula y si existen modificaciones en la proteína E2 que podrían dar cuenta de este fenómeno.

La vacunación constituye una alternativa viable para contener la diseminación del virus y eventualmente erradicarlo de aquellas regiones del mundo en donde aún permanece endémico. En estos contextos son ampliamente utilizadas las vacunas vivas modificadas, basadas en variantes del virus que han sido atenuadas luego de numerosos pases en cultivo. Sin embargo, se ha reportado la aparición de variantes de virulencia baja o moderada en zonas en donde se lleva a cabo una política activa de vacunación. Estas nuevas variantes favorecen la permanencia del virus en la población porcina y la generación de formas crónicas y persistentes de la enfermedad. Se cree que la presión inmunológica ejercida contra vacunas utilizadas durante muchos años, como es el caso de aquellas basadas en la cepa-China, ha contribuido a este fenómeno. Por lo tanto existe la necesidad de evaluar nuevas alternativas vacunales que sean igualmente seguras y eficaces en estos escenarios.

Thiverval es una variante atenuada del virus de la Peste Porcina Clásica aprobada por la Organización Mundial de Salud Animal para la vacunación contra la enfermedad. Sin embargo, los reportes de seguridad y eficacia luego estudios *in vivo* con esta variante, datan de los años 70 y fueron obtenidos con técnicas desactualizadas a la fecha. Además, se desconoce si la variante puede transmitirse hacia animales no vacunados, cuál es su tasa de replicación en tejidos y órganos, y su capacidad de conferir protección clínica y virológica en un tiempo menor a 7 días luego de una dosis simple. La actualización de la información referente a esta variante y la evaluación de su capacidad de conferir protección temprana pueden favorecer el uso de vacunas basadas en esta cepa en entornos en donde se ha dificultado el control de la enfermedad. Por otro lado, se desconoce si las mutaciones que condujeron a la atenuación de esta variante generan cambios en la interacción con CD46. Este conocimiento constituye una herramienta útil para el potencial desarrollo de variantes virales que puedan ser utilizadas como vacunas, empleando métodos que modifiquen directamente el mecanismo de ingreso del virus con posible uso transversal en otras enfermedades veterinarias. Por tanto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la capacidad de protección temprana de la variante Thiverval del virus de la Peste Porcina Clásica y el rol de CD46 durante su entrada a la célula.

Para la evaluación del efecto protector de la vacuna, dos grupos de animales fueron inmunizados con la variante Thiverval con 16 días de diferencia y se incluyó además en el estudio un grupo contacto y otro control. Todos los animales fueron desafiados con Margarita, variante altamente virulenta del VPPC, transcurridos 21 o 5 días post

inmunización (dpi). Los resultados de este estudio demuestran que la variante Thiverval se replica en el organismo de manera controlada, sin generar viremia ni transmisión detectable hacia el grupo contacto. Además induce la expresión de IFN- α y la respuesta humoral contra E2 y Erns, las principales proteínas de la envoltura del virus. Los anticuerpos generados tienen capacidad neutralizante y son detectados desde el día 14 post inmunización. Se alcanza protección clínica completa contra los síntomas exacerbados de la enfermedad con solo 5 dpi. Además, la formulación controla la replicación del virus del desafío, protegiendo virológicamente a los animales. El rol de CD46 durante la infección viral fue evaluado *in vitro* incubando previamente las células con diluciones de un suero hiperinmune antiCD46 antes de la adición de Thiverval. Una dilución 1/20 no generó la inhibición completa de la infección por Thiverval, sin embargo, cuando se empleó la variante Margarita, el porcentaje de infección fue prácticamente nulo. Esto sugiere la existencia de mecanismos de ingreso independientes de CD46 luego de la atenuación. Un análisis *in silico* de la estructura de E2 de la variante Thiverval evidenció cómo las mutaciones en la región definida previamente como importante para la interacción con CD46 que podrían estar afectando la interacción con el receptor.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la capacidad de protección temprana de la variante Thiverval contra la infección por el virus, lo cual la convierte en una alternativa atractiva para el control de la enfermedad en zonas endémicas. Además, esta investigación sienta las bases para investigar con más profundidad si las mutaciones que afectan la interacción inicial de un virus con sus receptores de entrada a la célula podrían ser responsables de su atenuación. Lo anterior abriría las puertas a la posibilidad de crear artificialmente variantes atenuadas con fines vacunales usando una aproximación basada en estructura proteica y la alteración la interacción del virus con su receptor natural.

ABSTRACT

Classical Swine Fever is a multisystemic viral disease that exclusively affects pigs and generates significant economic losses. Its causative agent, the Classical Swine Fever virus, is a virus that exposes in its envelope the Erns, E1 and E2 proteins, which are involved in the initial union and entry into the cell. However, it is the interaction of E2 with one or more receptors on the cell membrane that mediates endocytosis of the virus. According to the evidence, the CD46 membrane protein is involved in this process, although it has been observed that some viral variants, after adaptation to cell culture, develop infection mechanisms independent of this protein. It is unknown if these variants use different mechanisms to enter the cell and if there are modifications in the E2 protein that could account for this phenomenon.

Vaccination is a viable alternative to contain the spread of the virus and eventually eradicate it from those regions of the world where it remains endemic. In these contexts, modified live vaccines are widely used, based on virus variants that have been attenuated after numerous passages in culture. However, the appearance of variants of low or moderate virulence has been reported in areas where an active vaccination policy is carried out. These new variants favor the permanence of the virus in the swine population and the generation of chronic and persistent forms of the disease. It is believed that the immunological pressure exerted against vaccines used for many years, such as those based on the China-strain, has contributed to this phenomenon. Therefore, there is a need to evaluate new vaccine alternatives that are equally safe and effective in these scenarios.

Thiverval is an attenuated variant of the Classical Swine Fever virus approved by the World Organization for Animal Health for vaccination against the disease. However, the safety and efficacy reports after *in vivo* studies with this variant date back to the 1970s and were obtained with techniques that are outdated to date. In addition, it is unknown whether the variant can be transmitted to non-vaccinated animals, its replication rate in tissues and organs, and its ability to confer clinical and virological protection in less than 7 days after a single dose. Updating the information regarding this variant and evaluating its ability to confer early protection may favor the use of vaccines based on this strain in settings where disease control has been difficult. On the other hand, it is unknown if the mutations that led to the attenuation of this variant generate changes in the interaction with CD46. This knowledge constitutes a useful tool for the potential development of viral variants that can be used as vaccines, using methods that directly modify the virus entry mechanism with possible cross-sectional use in other veterinary diseases. Therefore, the general objective of this research was to evaluate the early protection capacity of the Thiverval variant of the Classical Swine Fever virus and the role of CD46 during its entry into the cell.

To assess the protective effect of the vaccine, two groups of animals were immunized with the Thiverval variant 16 days apart, and a contact group and a control group were also included in the study. All the animals were challenged with Margarita, a highly virulent CSFV variant, at 21- or 5-days post immunization (dpi). The results of this study show that the Thiverval variant has a low replication rate in the organism and that it is not transmitted to the contact group. It also induces the expression of IFN- α and the humoral response against E2 and Erns, the main proteins of the virus envelope. Neutralizing antibodies are detected from day 14 post immunization and clinical protection against

exacerbated symptoms of the disease is achieved with only 5 dpi. In addition, the formulation controls viral replication after challenge, virologically protecting the animals. The role of CD46 during viral infection was assessed *in vitro* by pre-incubating cells with dilutions of an anti-CD46 polyclonal serum prior to the addition of Thiverval. A 1/20 dilution did not generate complete inhibition of Thiverval infection, however, when the Margarita variant was used, the infection rate was practically nil. This suggests the existence of CD46-independent entry mechanisms after attenuation. An *in-silico* analysis of the E2 structure of the Thiverval variant showed how the presence of mutations in the region previously defined as important for the interaction with CD46 could be affecting the interaction with the receptor.

The results obtained in this work demonstrate the early protection capacity of the Thiverval variant against infection by the virus, which makes it an attractive alternative for the control of the disease in endemic areas. In addition, this research lays the groundwork for further investigation of whether mutations that affect a virus's initial interaction with its cell-entry receptors could be responsible for its attenuation. This would open the doors to the possibility of artificially creating attenuated variants for vaccine purposes using an approach based on protein structure and altering the interaction of the virus with its natural receptor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Peste Porcina Clásica. Situación actual. Políticas de erradicación.

La Peste Porcina Clásica (PPC) se encuentra entre las enfermedades virales más devastadoras que afecta al género *Sus Scrofa*, al que pertenecen los cerdos domésticos y salvajes [1, 2]. Los primeros reportes de la PPC datan de principios del siglo XIX en Tennessee, Estados Unidos. En 1862 la enfermedad se describe por primera vez en Europa y para 1960 ya estaba distribuida en todo el mundo [3, 4]. Debido a sus efectos devastadores, su rápida propagación y las cuantiosas pérdidas económicas que genera, la PPC se encuentra en la lista de enfermedades de notificación obligatoria ante la Organización Mundial de la Salud Animal (fundada como Oficina Internacional de Epizootias, OIE) [2, 5].

En la actualidad, Norteamérica, Oceanía, gran parte de la Unión Europea y algunos países de Sudamérica, entre ellos Chile, son declarados por la OIE como territorios libres de PPC [6]. También se les otorgó este estatus a regiones específicas dentro de Brasil, Colombia y Ecuador. Sin embargo, en estos países, al igual que en otros de América Central, gran parte de América del Sur y el Caribe, la enfermedad continúa siendo endémica [6]. De acuerdo con el sistema mundial de información en salud animal (WAHIS; del inglés, *World Animal Health Information System*), los brotes más recientes se reportaron en Ecuador [7], Colombia [8], Brasil [9], Corea del Sur [10] y Japón [11].

Las políticas que han conducido a la erradicación de la enfermedad difieren de un país a otro. En el caso de la Unión Europea, desde los años 90 se implementó un programa de erradicación progresivo que incluyó una estricta vigilancia serológica acompañada del sacrificio, de los animales infectados y también de aquellos sanos que se encontraban en el radio cercano a la infección. Esta política excluyó totalmente la vacunación, sin embargo, los costos asociados a los brotes registrados en 1997 y 2001, en conjunto, están valorados en alrededor de 108 millones de euros [12, 13]. Estos estuvieron relacionados mayormente con el sacrificio de animales sanos fuera de las zonas de control debido a las restricciones de movimiento [14]. Estas prácticas son controversiales desde el punto de vista bioético, sobre todo teniendo en cuenta que otros países han alcanzado el estado de “libres de PPC” sin aplicar medidas tan extremas. Tal fue el caso de Uruguay en 1991, Chile en 1998 y Argentina en 2005, en donde la vacunación constituyó la principal herramienta para la erradicación de la enfermedad [15].

A pesar de los esfuerzos realizados, el riesgo de reemergencia de la enfermedad continúa siendo elevado. Evidencia de lo anterior es el caso de Japón, país en donde luego de 26 años de adquirir el estado “libre de PCC” la enfermedad reemergió tanto en cerdos domésticos como salvajes [1]. La alta densidad de la población porcina, la cercanía con países en donde la enfermedad es endémica, la presencia de jabalíes y cerdos salvajes enfermos, la política de no-vacunación o el fallo en la ejecución adecuada de esta, son factores que acrecientan la

amenaza y atentan contra la seguridad animal de los territorios libres de la enfermedad [16]. Por tanto, la PPC continúa siendo un problema global cuyas alternativas de solución son abordadas en diferentes investigaciones alrededor del mundo.

1.2 Virus de la Peste Porcina Clásica. Características generales.

1.2.1 Etiología de la enfermedad.

El agente etiológico de la PPC es un virus de ARN cuyo nombre es genérico de la enfermedad [2]. Los viriones tienen un diámetro entre 40 y 60 nm, una envoltura icosaédrica y una simetría hexagonal [17]. El virus de la peste porcina clásica (VPPC) está incluido dentro del género *Pestivirus* y la familia *Flaviviridae* [18]. A este género pertenecen otros patógenos como el virus de la enfermedad de frontera de oveja y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Entre este último y el VPPC existe un alto grado de identidad de secuencias y una reactividad antigénica cruzada [19, 20].

1.2.2 Organización del genoma

El material genético del VPPC consiste en un ARN de cadena simple con orientación positiva cuyo tamaño oscila alrededor de los 12,3 kb [21]. El genoma está compuesto por un marco abierto de lectura (ORF; del inglés, *Open Reading Frame*) flanqueado por una región 5'-UTR (del inglés, *Untranslated region*), que contiene un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES; del inglés, *Internal*

Ribosome Entry Site) y otra 3'-UTR, carente de la región de poliadenilación [22]. El ORF codifica para una poliproteína de aproximadamente 3898 aminoácidos cuya secuencia es procesada co- y post-traduccionalmente por la acción de proteasas virales y de la célula hospedera (**Figura 1**) [23]. Como resultado se generan 12 proteínas maduras: 4 estructurales y 8 no estructurales. Las proteínas se encuentran dispuestas en el siguiente orden: Npro, Core (C), Erns, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B [24].

El mapeo filogenético del VPPC está basado en secuencias parciales del extremo 5'-UTR, de la proteína E2 y del gen de la polimerasa NS5B. Los aislados del virus se dividen en 3 genotipos y 11 subgenotipos (1.1, 1.2, 1.3,1.4, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, y 3.4). El subgenotipo 2.1 se divide además en los sub-subgenotipos 2.1a, 2.1b, 2.1c, and 2.1d [25].

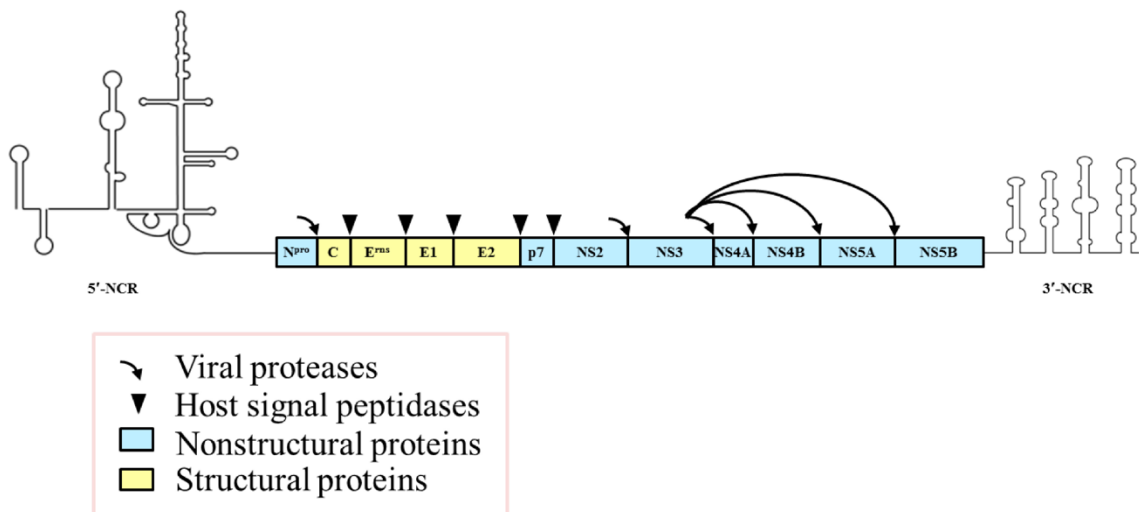


Figura 1. Organización del genoma del virus de la Peste Porcina Clásica.
 Extraído de [26]

1.2.3. Mecanismo de replicación viral

La replicación viral inicia con la entrada del virus a la célula, principalmente a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y dependiente de clatrina, dinamina y las proteínas Rab5 y Rab7 [27]. Las proteínas estructurales del VPPC participan en la interacción inicial, siendo solo E1 y E2 imprescindibles para la entrada [28], aunque Erns también facilita la unión inicial a la célula [29]. Luego de la entrada, la fusión de las membranas viral y celular es mediada por las glicoproteínas E1 y E2 en un proceso dependiente de pH [28], en el que se cree está involucrado el péptido $^{129}\text{CPIGWTVIEC}^{139}$ de E2 [30]. Una vez que el material genético es liberado al citosol en forma de ribonucleoproteína, se reclutan los ribosomas celulares y los factores necesarios para la iniciación del proceso de traducción viral [24]. La presencia del sitio IRES en el extremo 5'-UTR permite que la traducción inicie por un mecanismo independiente de la caperuza y del factor de iniciación eIF-4F [31].

Durante la traducción del ORF se generan las proteínas virales maduras o intermedias entre las que se encuentran aquellas necesarias para la replicación del genoma. Posteriormente, se sintetiza una cadena de ARN de orientación negativa, que sirve de molde para la síntesis del ARN genómico [32]. Los viriones son empaquetados en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi, donde adquieren su envoltura lipídica. Finalmente, transcurridas aproximadamente 10 horas post-infección, los virus son excretados a través del transporte vesicular (exocitosis) [33].

1.2.4 Función de las proteínas virales.

1.2.4.1 Proteínas no estructurales

La primera proteína traducida en el ORF del VPPC es la Npro, con un peso molecular de 19 kDa y localizada hacia el extremo 5'-UTR del genoma [34]. Es una cisteína-proteasa que conforma la familia de proteasas C53 [35] y genera su auto-escisión de la poliproteína [23]. Npro no está involucrada en la replicación viral [36], pero participa en la inhibición de la producción de interferón de tipo I (IFN-1) disminuyendo como consecuencia la respuesta antiviral en las células [37]. También desempeña un papel fundamental en el proceso de escape de la apoptosis inducida por RNA [38]. El resto de las proteínas no estructurales se encuentran distribuidas hacia el extremo 3' del genoma y son codificadas por una secuencia aminoacídica altamente conservada entre los miembros del género Pestivirus [39].

La proteína P7 es una proteína transmembrana tipo II de 70 kDa que puede influenciar la replicación y la formación de los viriones infectivos [40, 41]. La proteína es de corta vida y se degrada en el proteosoma, evento que induce la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , una de las reacciones fundamentales de la respuesta inmune innata contra la infección viral [42].

Las proteínas NS2 y NS3 son generadas luego de la maduración del precursor NS2-3 de 120 kDa [43]. Se ha demostrado que el complejo formado por el precursor NS2-3 y NS4A es necesario para formar las partículas infecciosas [44]. La proteína NS2 tiene actividad auto-proteasa, desempeña una función

reguladora de la replicación y su expresión puede antagonizar la respuesta de IFN-I [33, 45]. Por otro lado, NS3 es una proteína con actividad serino-proteasa, helicasa de ARN y NTPasa [44, 46]. Desempeña un papel importante en la transcripción y la traducción e induce en menor grado anticuerpos no neutralizantes después de la infección con el VPPC [47].

La proteína NS4A está formada por 64 aminoácidos y está involucrada en la replicación de ARN y en la formación de las partículas infecciosas [43]. Por otro lado, NS4B está compuesta de 374 aminoácidos y tiene actividad NTPasa [48].

La proteína NS5A, formada por 497 aminoácidos, estimula el ensamblaje de las poliproteínas e inhibe la transcripción y traducción a través de algunos de sus dominios conservados [49]. Además promueve la replicación viral y participa en la evasión inmune [50]. NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN de 718 aminoácidos [51]. La secuencia que codifica para esta proteína se encuentra muy conservada entre todos los pestivirus, por lo cual es utilizada para realizar estudios de relaciones filogenéticas entre diferentes cepas [47].

1.2.4.2 Proteínas estructurales

La proteína C tiene un tamaño de 14.3 kDa y se localiza después de Npro. Es escindida de la poliproteína después de que sus sitios N- y C-terminales son cortados por la proteína Npro y una peptidasa del hospedero, respectivamente. Se ha observado que la proteína influye en la expresión de los genes del hospedero [52]. Está implicada en la replicación, la producción de la progenie

viral y la evasión del sistema inmune [53]. A continuación de esta proteína, una secuencia que codifica para un péptido señal media la traslocación de las otras tres proteínas estructurales: Erns, E1 y E2 [54].

La glicoproteína Erns (del inglés; *Envelope protein RNase secreted*) tiene un peso molecular de entre 44 y 48 kDa determinado mayormente por las glicosilaciones [55]. Erns forma homodímeros de aproximadamente 100 kDa, no posee dominio transmembrana, puede ser secretada luego de la maduración viral y no es imprescindible para la infección viral [54]. La proteína tiene actividad endonucleasa y puede regular la síntesis de RNA de las células infectadas, inhibir la síntesis proteica, inducir apoptosis de los linfocitos e inhibir etapas tempranas de la respuesta inmune del hospedero [56]. Además, induce la respuesta inmune como un antígeno minoritario durante la infección [58]. Se demostró que la proteína puede adherirse a la superficie celular de varias especies, inclusive de aquellas que no son susceptibles a la infección por el virus [57]. En células SK6 la mutación S476R en la proteína favorece su interacción con Heparán Sulfato, un polisacárido presente en todas las membranas celulares [58, 59]. También se ha descrito su interacción con el receptor de Laminina [60]. De acuerdo con los reportes de Li, X y col., [61] para la unión a la célula es importante la secuencia ₃₆₈LAEGPPVKECAVTCRYDKDADINVVTQARN₃₉₇.

La proteína E1 tiene un peso molecular de 33 kDa y consiste en 195 aminoácidos [24]. Es una proteína transmembrana tipo I cuyo ectodominio se encuentra localizado hacia el extremo N-terminal y en el C-terminal contiene el ancla

hidrofóbica que la une a la envoltura del virus [62]. Forma heterodímeros con la proteína E2 y media la unión a la membrana celular y la invasión, aunque no se tienen muchos detalles de su participación en el proceso [63].

1.2.4.3 Características de la glicoproteína E2

La glicoproteína E2 tiene peso de entre 51-55 kDa y es una proteína transmembrana tipo I que se encuentra anclada a la envoltura viral a través de su dominio C-terminal [64]. Se le puede encontrar formando homodímeros de aproximadamente 100 kDa, pero mayormente forma heterodímeros con E1 de alrededor de 75 kDa estabilizados mediante un puente disulfuro [65, 66]. Durante la traducción de la cadena polipeptídica naciente, se forman otros puentes disulfuro intramoleculares, mientras que los intermoleculares son formados más tardíamente [67]. Dentro del genoma del virus, la mitad N-terminal de la E2 es una de las regiones más variables, por lo cual, los análisis filogenéticos basados en 190 nucleótidos de esta región son empleados para la clasificación del virus [68].

E2 es imprescindible en el ciclo de vida del patógeno y uno de los principales determinantes de virulencia ya que mutantes del virus que contienen deleciones parciales o completas de la proteína no resultan viables [69, 70]. E2 es la proteína más inmunogénica del virus e induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes capaz de conferir protección, debido a lo cual se ha convertido en el foco para el desarrollo de nuevas vacunas [71, 72]. Además la proteína es

esencial para la unión inicial y posterior entrada del virus a las células, al mismo tiempo que determina el tropismo celular [28, 73].

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) dirigidos contra la proteína E2 de la cepa Brescia del VPPC, permitió identificar 4 dominios antigénicos: A, B, C y D, en el extremo N-terminal [74]. En el modelo construido a partir de la estructura tridimensional de la E2 de esta cepa (**Figura 2**) se identifican 4 dominios antigénicos (A, B, C y D), los sitios potenciales de glicosilación y los puentes disulfuro presentes. El dominio A tiene 3 subdominios: A1, A2 y A3, siendo los 2 primeros altamente conservados entre las diferentes cepas del virus, mientras que el A3 es más variable. Solo el subdominio A1 junto a los dominios B y C inducen anticuerpos neutralizantes, pero las secuencias correspondientes a los dominios B y C son menos conservadas [75]. La secuencia antigénica, $^{829}\text{TAVSPTTLR}_{837}$, localizada en el dominio A/D de la proteína, se definió como altamente conservada entre las diferentes variantes del VPPC, pero no entre los distintos pestivirus. Esta secuencia es además la diana de anticuerpos neutralizantes [76]. Un estudio en el que se empleó una librería de péptidos de 30 aminoácidos cuyas secuencias en conjunto abarcaban toda la proteína, identificó la secuencia $^{830}\text{AVSPTTLRTEVVKTFRRDKPFPHRMDCVTT}_{858}$, como implicada en la unión del virus a la célula [61]. Nótese que ambos estudios ratifican la importancia de esta región en la interacción con la célula, aunque en el último estudio se incluyen además otros aminoácidos. Se postula que luego de la interacción inicial del virus con las células permisivas, mediada por Erns y/o

E2, la interacción específica de esta última con su receptor es la que induce la entrada del virus a la célula [29].

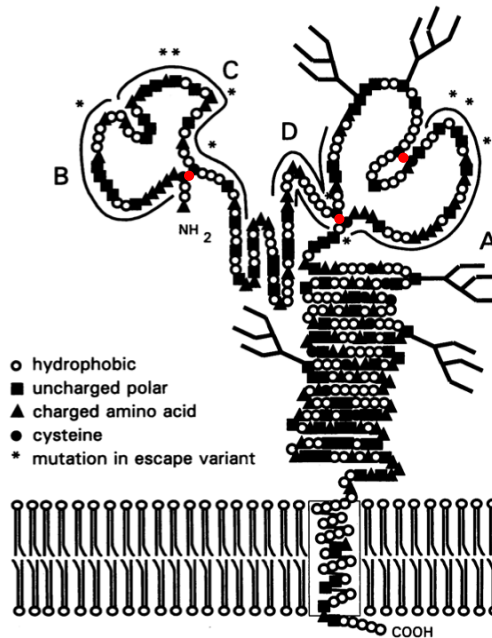


Figura 2. Estructura antigénica de la glicoproteína E2

Representación esquemática de la estructura antigénica de la glicoproteína E2 de la cepa VPPC "Brescia". Los aminoácidos fueron agrupados como: hidrofóbicos (A, G, M, I, L, V, F, W); polares sin carga (N, Q, S, T, Y); polares con carga (D, E, K, R, H); y cisteínas (C). Se indican los puentes disulfuro (rojo) y los grupos de N-glicosilación. Se observan dos subunidades estructurales independientes formadas por los dominios B/C y A/D, y estabilizadas por puentes disulfuro intramoleculares. Extraído de [74].

1.3 Receptores involucrados en la entrada del virus

El proceso de infección del VPPC, al igual que el de otros miembros de la familia *Flaviviridae*, es complejo y no se encuentra completamente dilucidado hasta el momento. La entrada a la célula de los pestivirus en general, y del VPPC en

particular, es probablemente uno de los eventos menos comprendido. Su estudio podría contribuir al desarrollo de candidatos no vacunales que inhiban la infección en sus etapas iniciales y comprender con mayor profundidad los mecanismos implicados en la infección viral.

Existen estudios aislados que reportan la participación de ADAM17 [77], Heparán Sulfato (HS) [78], Laminina [60], Integrina B3 [79], Anexina 2 [80], MERKT [81] y CD46 [78] en la infección del VPPC. Dentro de este grupo, la proteína CD46 es probablemente alrededor de la cual se concentra la mayor cantidad de información debido a que se identificó previamente su homólogo en bovinos como el receptor de otro pestivirus, el VDVB [82].

1.3.1 Proteína CD46. Características generales y estructura

La proteína cofactor de membrana o CD46, es una proteína transmembrana tipo 1 que actúa como reguladora del complemento [83]. En las células humanas se expresa como 4 isoformas que se derivan del empalme alternativo de un solo gen de aproximadamente 46 kb [84]. CD46 protege a las células del hospedero del ataque del complemento sirviendo de cofactor del Factor I en la inactivación proteolítica de C3b y C4b [85]. En cerdos, la proteína se encuentra presente en las células de origen epitelial y endotelial, en los fibroblastos y en las células en circulación y a diferencia de su homólogo en humanos, se encuentra abundantemente expresada en los eritrocitos [83, 86]. Ambas proteínas comparten un 42% de identidad de secuencia aminoacídica y hasta el momento

solo se encuentra disponible la estructura cristalina de la porción extracelular de molécula humana unida al Adenovirus 11 (PDB 3O8E) con una resolución de 2.84 Å [87].

En cerdos, la porción extracelular de la proteína se compone de 4 repeticiones consenso cortas (CCP; del inglés, *Complement Control Protein*), ricas en Cisteína que contienen 2 sitios potenciales de N-glicosilación [88]. Estas repeticiones son seguidas por una región abundante en Serina, Treonina y Prolina (STP), que es objeto de empalme alternativo [88]. La porción extracelular de la proteína está unida a un dominio transmembrana a través de una región corta cuya función es hasta el momento desconocida. El dominio intracelular de CD46 posee una porción carboxilo terminal, denominada tallo citoplasmático (CYT; del inglés, *Cytoplasmic Tail*). En humanos, producto del empalme alternativo de las regiones STP y CYT, se generan isoformas que muestran expresión tejido-específica [82]. Se cree que las diferentes isoformas observadas en cerdos se deban a un proceso de empalme similar, aunque hasta la fecha esto no ha sido confirmado a nivel de ARNm [89].

1.3.3 Participación de CD46 porcino en la infección por el VPPC

En un estudio que realizaron Hulst y col. [29]; se sugirió que el VDVB y el VPPC empleaban un receptor homólogo ya que la proteína E2 del VPPC en estado soluble podía inhibir la infección por ambos virus. Años más tarde se identificó a CD46 bovino como el receptor del VDVB luego de que un AcM dirigido contra el

receptor bloqueara la infección por el virus [82, 90]. Además la expresión de CD46 bovino en células porcinas incrementó la susceptibilidad de estas a la infección por el VDVB [90]. Estudios adicionales revelaron que para la interacción del receptor con el VDVB son cruciales los péptidos $_{66}\text{EQIV}_{69}$ y $_{82}\text{GQVLAL}_{87}$ localizados en hojas B antiparalelas del CCP 1 de CD46 [91]. Teniendo en cuenta que los pestivirus están estrechamente relacionados desde el punto de vista estructural y antigénico, se inició el estudio de la participación de CD46 porcino en la infección por el VPPC. Dräger y col. [78], incubaron células permisivas al virus con una mezcla de los anticuerpos monoclonales MCA 2262 y MCA 2310 dirigidos contra CD46 porcino. Posteriormente las células fueron infectadas con Roesrath, variante del VPPC de virulencia moderada e incubadas durante 72 horas. Finalmente, las células fueron analizadas mediante inmunofluorescencia para detectar evidencias de infección viral. Los resultados obtenidos en este grupo sugieren que CD46 está implicado en la infección del VPPC ya que el bloqueo de la proteína genera una inhibición casi total de la infección viral. Sin embargo, luego de que se repitiera el experimento, empleando la variante Roesrath sometida a 30 pases en cultivo, el bloqueo de CD46 tuvo una menor influencia en la infección. Los autores demostraron que esto se debía al uso favorecido de HS tras la adaptación a cultivo celular, lo cual también se ha observado en otros virus [92]. En estudios previos realizados por M. M. Hulst y col. [58] se había demostrado que en caso del VPPC luego de la adaptación a cultivo en células SK6, un cambio de Serina por Arginina en la posición 476 de la

proteína Erns favorece la unión a HS. Se desconoce si esta mutación en Erns, que además es suficiente para que ocurra la unión, surge para compensar alguna (s) mutación (es) en E2 que disminuyan la afinidad por su propio receptor. En el experimento anterior se desconoce cuáles fueron las mutaciones en las proteínas E2 y Erns ya que los autores no realizaron la secuenciación de la variante Roesrath luego de la adaptación. Esto habría permitido conocer qué cambios podrían estar vinculados con la adaptación a cultivo y evaluar si estos están relacionados con los mecanismos de entrada del virus a la célula. Desde entonces, se ha asumido que CD46 es uno de los receptores involucrados en la infección por el VPPC, que interactúa con E2 y que luego de la adaptación se favorece el uso de moléculas como el HS. Sin embargo, en un estudio reciente se cuestionó la participación de CD46 en la infección por el VPPC [93]. Luego de emplear aislados virales de distinto grado de virulencia y representativos de los genotipos 1 y 2 del virus, no se encontró que CD46 estuviera implicado en la infección. El *knockout* de la proteína no generó cambios en la infección viral. En este caso, los autores no especifican si los virus empleados habían sido adaptados a cultivo o eran aislados recientes, lo cual, como se ha descrito, podría haber influenciado el uso de esta proteína.

Estos resultados generan algunas preguntas: ¿está implicado CD46 en la infección por el VPPC?; de ser así, ¿puede la adaptación del VPPC generar cambios en E2 que disminuyan la afinidad por este receptor? ¿Cómo? Para

abordar estas preguntas se requiere el uso de variantes virales adaptadas a cultivo celular cuyas secuencias estén debidamente caracterizadas.

1.4 Patogénesis de la enfermedad

El VPPC se transmite a través de la vía oronasal, luego del contacto directo o indirecto con animales infectados y a través del consumo de alimentos contaminados [18]. Existe además la transmisión vertical a través de la placenta e igualmente se ha encontrado virus en el semen, por lo que puede transmitirse durante la inseminación [94].

El patógeno infecta en primer lugar las células epiteliales de las criptas tonsilares, independientemente de la vía de ingreso, y posteriormente invade los tejidos linfoides [95, 96]. Luego de ingresar a los capilares linfáticos, se transporta a los nódulos linfoides regionales e ingresa a los capilares sanguíneos eferentes dando lugar a la viremia. A partir de este momento, el virus alcanza la médula ósea y los órganos linfoides secundarios, tales como: las amígdalas, nódulos linfáticos y otras estructuras linfoides asociadas con el intestino delgado, desde donde se replica. Finalmente, en la fase tardía de la viremia, invade los órganos parenquimatosos [97]. Este pestivirus tiene una afinidad particular por las células endoteliales, los macrófagos y las células dendríticas (CD), empleando a estos últimos como vehículos para diseminarse por todo el organismo [98, 99].

La infección conduce a la desestabilización del sistema inmune caracterizada por una respuesta pro-inflamatoria aberrante (conocida como tormenta de

citoquinas), inmunosupresión severa y la incapacidad de controlar la progresión de la enfermedad [100, 101]. El proceso infeccioso está asociado a la linfopenia severa, apoptosis linfocitaria, trombocitopenia, agregación plaquetaria, aplasia medular, afectación de la mielopoiesis y megacariocitopoiesis, atrofia del timus y apoptosis timocítica [102-104].

1.5 Signos clínicos de la enfermedad

La PPC puede desarrollarse en 3 formas principales: aguda (transiente o letal), crónica, y persistente, requiriendo esta última la infección durante el embarazo [105]. El VPPC tiene un período de incubación entre 4 y 10 días y se observan los mismos síntomas clínicos tanto en cerdos domésticos como salvajes [18]. La progresión de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa, las respuestas del hospedero y las infecciones secundarias, por lo cual las manifestaciones clínicas pueden variar considerablemente [106].

De manera general, en la forma aguda de la enfermedad los síntomas clínicos inespecíficos (conocidos como “atípicos”) aparecen durante las dos semanas posteriores a la infección. Estos incluyen fiebre alta, anorexia, síntomas gastrointestinales, debilidad general y conjuntivitis [107, 108]. Alrededor de las 2-4 semanas aparecen los síntomas neurológicos: incoordinación, paresia, parálisis y convulsiones. Al mismo tiempo, aparecen las hemorragias cutáneas o la cianosis en zonas como las orejas, extremidades y abdomen ventral. Estos síntomas tardíos son conocidos como “típicos” [18]. En los casos agudos-letales,

la muerte ocurre entre las 2-4 semanas posteriores a la infección, pudiendo ser del 100% entre los 10 y 30 días, dependiendo de la edad del animal y de la virulencia de la cepa [109]. Debido al carácter inmunosupresor del virus, pueden aparecer enfermedades gastrointestinales y respiratorias secundarias que agravan el curso de la enfermedad y pueden llegar a encubrir los síntomas clínicos. Las infecciones con cepas altamente virulentas, tales como Margarita y Koslov (usualmente empleadas para la evaluación de las vacunas) pueden generar signos neurológicos severos dentro de los 7 a 10 días post infección y el 100% de mortalidad en animales de todas las edades [110, 111].

Las enfermedades que cursan de forma crónica tienen lugar cuando un animal infectado no es capaz de orquestar una respuesta inmunológica adecuada. Se caracterizan por síntomas clínicos no específicos y la excreción de altas cantidades de virus. El hospedero, más que los factores virales, pareciera desempeñar un papel preponderante en el establecimiento de este tipo de infección [112].

La forma persistente de la enfermedad la desarrollan aquellos animales infectados en el período fetal o entre las primeras 8 a 48 horas de vida [113]. Los animales son aparentemente sanos, pero mueren meses después debido a la “forma tardía” de la enfermedad [98]. Durante este período excretan altas cantidades de virus que pueden ser transmitidas. Este fenómeno genera un impacto considerable en la eficacia de las vacunas y puede complicar el control de la enfermedad en los países en los cuales ésta es endémica [113].

1.6 Vacunación como alternativa para el control de la enfermedad.

La vacunación constituye la herramienta más efectiva para la prevención y/o control de la enfermedad. Sin embargo, su uso está limitado a las políticas aprobadas por las entidades de cada país. En aquellos países en donde se ha erradicado la enfermedad, pero existe riesgo potencial reemergencia, la vacunación es una alternativa valorada exclusivamente para situaciones de emergencia, con el objetivo de evitar la muerte por sacrificio, estrategia éticamente cuestionable y muy costosa. Sin embargo, en los países en donde la enfermedad es endémica, las campañas sistemáticas de vacunación, acompañadas de procedimientos adecuados de diagnóstico, constituyen la principal medida de control epidemiológico. La vacunación de los cerdos salvajes puede contribuir también a disminuir la incidencia de la PPC, y como consecuencia, la amenaza de reintroducción de la enfermedad en los animales domésticos [114].

1.6.1 Vacunación de emergencia en territorios libres de la Peste Porcina Clásica.

Ante la emergencia de brotes de la enfermedad en países declarados como “libres” la vacunación es una estrategia que comienza a ser cada vez más valorada, aunque hasta el momento nunca ha sido aplicada. Estas vacunas deben permitir la diferenciación entre animales infectados y animales vacunados (DIVA, del inglés; *Differentiating infected from vaccinated animals*), generando

una respuesta de anticuerpos diferente de aquella desarrollada luego de la infección natural [115]. Esto es imprescindible para evitar las restricciones de movimiento y comercialización de animales que podrían estar potencialmente infectados [102].

Las vacunas que siguen una estrategia DIVA contienen una proteína antigénica o epítipo menos que el virus nativo, diferenciando el virus vacunal del virus en circulación y deben emplearse en conjunto con un test diagnóstico [116]. En la búsqueda de nuevos candidatos vacunales con características DIVA se han seguido hasta la fecha 4 estrategias fundamentales: las vacunas de subunidades, las de vectores virales (vacunas quiméricas y replicones), las de péptidos inmunogénicos y las de ADN [117]. Dentro de estas se puede destacar la vacuna Porcilis[®] Pestis (Intervet International BV, Boxmeer, The Netherlands), aprobada por la EMA para su uso en situaciones de emergencia [118] y los candidatos basados en pestivirus quiméricos CP7_E2alf [119], vRiemsABC-Gif [120] y Flic-LOM-BERns [121]. También se ha desarrollado el candidato FlagT4Gv, el cual hasta la fecha es uno de los más prometedores para ser aplicado en situaciones de emergencia [117].

1.6.2 Vacunación profiláctica en territorios con Peste Porcina Clásica endémica.

En aquellos países en donde la PPC es endémica, y se emplea la vacunación profiláctica como medida de control epidemiológico, las vacunas vivas atenuadas

continúan siendo el método más empleado [117]. Si bien es cierto que estas no cumplen con el criterio DIVA, han sido empleadas para el control y erradicación de la enfermedad en diferentes lugares del mundo [116, 122]. La principal razón radica en su alta inmunogenicidad y su capacidad de inducir respuesta inmune celular y humoral.

Este tipo de vacunas contienen como inmunógeno principal alguna de las diferentes variantes del VPPC, atenuada a través de mutaciones adaptativas producidas aleatoriamente luego de numerosos pases en conejos o células en cultivo [123]. Entre las cepas más comúnmente utilizadas se encuentran: la cepa China (cepa-C) y todas sus derivadas, la variante rusa LK-VNIVViM, las variantes PAV mexicanas y Thiverval [115, 124, 125]. De modo general las vacunas vivas atenuadas han demostrado ser muy seguras y capaces de inducir una respuesta inmune protectora que puede durar hasta 1 año después de una inmunización simple [126]. Dentro de este grupo, las vacunas basadas en la cepa-C son empleadas en varios lugares del mundo para el control de la PPC en cerdos domésticos [2, 117]. Sin embargo, en los últimos años, en muchos de los lugares en donde se emplean vacunas basadas en esta cepa, se ha reportado el surgimiento de variantes del VPPC de virulencia baja y moderada que dificultan el control de la enfermedad. De acuerdo con los expertos, la presión inmunológica ejercida por la vacunación con esta variante del virus es una de las causas más probables [2, 127]. Esto incentiva el uso de otras vacunas vivas atenuadas, que

brinden un nivel de protección similar al conseguido con la cepa-C y que además sean seguras y costo-efectivas.

1.6.2.1 Thiverval

Thiverval es una variante atenuada del VPPC aprobada por la OIE para su uso en los programas de vacunación contra este patógeno [5]. Esta variante deriva de la cepa virulenta Alfort/187 luego de más de 170 pases a temperaturas de 29-30°C en células PK15 [117]. La vacuna fue patentada en Francia aproximadamente en 1971 y ha mostrado estabilidad genética y un alto grado de seguridad aun cuando fue administrada a animales inmunodeprimidos [128]. La variante Thiverval no muestra virulencia residual ni factores de reversión de la virulencia [129]. Durante muchas décadas esta vacuna ha demostrado un alto nivel de eficacia, seguridad y capacidad de prevenir la transmisión vertical del virus cuando es administrada a cerdas preñadas [130]. Además, la vacunación con Thiverval no tiene efectos negativos en el desarrollo de la gestación o en los animales recién nacidos. Los estudios que se encuentran disponibles, realizados en los años 70, han demostrado que la vacuna induce una respuesta sistémica y local, protegiendo a los animales del reto, independientemente de la vía de administración empleada (oral o intramuscular) [131]. Se ha determinado que luego de 7 días post vacunación los animales están protegidos frente al reto con una variante virulenta, aunque se desconoce si antes de este tiempo podría existir protección completa [132].

Lamentablemente, no se han registrado estudios recientes, empleando las técnicas actualmente aprobadas y validadas por la OIE (por ejemplo, RT-PCR en tiempo real) para evaluar aspectos como la transmisibilidad del virus vacunal y su replicación en tejidos y órganos. Hasta el momento también se desconoce si la vacuna es capaz de conferir protección clínica y virológica en un tiempo menor a 7 días, lo cual evitaría las muertes por sacrificio. Esta información sería útil para incentivar el uso de este tipo de vacunas en territorios en donde se dificulta el control y erradicación de la enfermedad y también como alternativa en situaciones de emergencia.

1.7 Determinantes moleculares de virulencia del virus de la Peste Porcina Clásica.

La atenuación de la virulencia está relacionada con la introducción de mutaciones en aquellos dominios conservados relacionados con la entrada y liberación del virus, su velocidad de replicación, su interacción con las proteínas del hospedero, y otros procesos fisiológicos esenciales [133]. Hasta la fecha, las proteínas Npro, NS4B, p7, C, Erns, E1 y E2 han sido relacionadas con la virulencia del VPPC [24]. Sin embargo, varios autores coinciden en que es la proteína E2 uno de los principales determinantes de la virulencia del VPPC dado su papel protagónico en la unión y entrada del virus a la célula [70, 133]. Aquellos cambios que, de acuerdo con predicciones de estructura secundaria, afectan la antigenicidad, la

hidrofobicidad, la formación de las hojas plegadas β e incluso generan pérdida de la estructura de alfa hélice en el terminal carboxílico de la proteína, pueden producir atenuación del virus por métodos aún desconocidos [134].

1.7.1 Atenuación de la variante Thiverval

Con el objetivo de investigar los posibles factores moleculares implicados en la atenuación de la variante Thiverval, Yunfeng Fan y col., [135] compararon su secuencia con la de Alfort/187, cepa a partir de la cual Thiverval fue generada. Solo se encontraron cambios en la región 3'-UTR y en la secuencia de la proteína E2. Por un lado, en la región 3'-UTR de los diferentes clones obtenidos, se encontraron inserciones cuyos tamaños oscilaron entre los 6 y 32 nucleótidos (nt). El tamaño de estas inserciones es proporcional a la complejidad de la estructura que se genera, al mismo tiempo que aumenta la energía libre, haciéndola menos estable. Inserciones de 12-14 nucleótidos, mayormente del tipo T, en el extremo 3'-UTR, se han reportado en la mayoría de las variantes atenuadas del VPPC, tales como HCLV, cepa-C, Porcivac, Ravoc y la LK-rusa [136-138]. En el caso de la glicoproteína E2 existen en su secuencia aminoacídica 3 mutaciones no conservativas localizadas en los residuos 791(Leucina→Glutamina), 855 (Ácido Aspártico→Fenilalanina) y 1059 (Leucina → Prolina). Es posible que la inserción en la region 3-UTR junto con las mutaciones en el gen de la E2 sean responsables de la atenuación de la variante Thiverval del VPPC. Pero no se ha estudiado si los cambios en E2 podrían

generar una pérdida de afinidad por su receptor, lo cual podría ocurrir teniendo en cuenta que el residuo 855 se encuentra en la región que se describe como importante para la interacción del virus con la membrana.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes aquí presentados, consideramos que el estudio de esta variante del VPPC podría ser productivo en varios sentidos. En primer lugar, determinar su capacidad de inducir una respuesta de protección temprana contra la infección por el virus validaría su utilización en contextos en donde el control de la enfermedad está siendo un problema. Por otro lado, el análisis *in vitro* de su proceso de entrada, enfocado en la utilización de CD46, contribuiría a evaluar si las mutaciones implicadas en su atenuación podrían explicar el por qué variantes atenuadas emplean mecanismos de ingreso diferentes. La relación entre la atenuación viral y los mecanismos de entrada constituye una herramienta eficaz para el diseño de variantes atenuadas que puedan ser utilizadas como vacunas. Finalmente, el contar con la secuencia de esta variante permitirá analizar, a través herramientas bioinformáticas, los resultados obtenidos luego de los análisis *in vitro* en busca de patrones que expliquen lo observado.

2. HIPÓTESIS

“La variante Thiverval induce protección temprana contra la infección por el VPPC y emplea mecanismos de entrada a la célula independientes de CD46”

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la capacidad de protección temprana de la variante Thiverval del virus de la Peste Porcina Clásica y el rol de CD46 durante su entrada a la célula.

Objetivos Específicos:

1- Evaluar la capacidad de protección temprana de la variante Thiverval del VPPC frente al desafío con la variante Margarita, forma severa del virus, luego de 5 post vacunación.

2- Evaluar el rol *in vitro* del receptor CD46 durante la entrada variante Thiverval a la célula.

3- Evaluar mediante análisis *in silico* la influencia de las mutaciones de Thiverval en la interacción con el receptor CD46.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Proteínas

4.1.1.1 Proteínas recombinantes

- IFN- α (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, New Jersey)
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus (MaestroGen, EE. UU.)
- Patrón de peso molecular de ADN 1kb (New England Biolabs, EE. UU.)

4.1.1.2 Enzimas

Endonucleasas de restricción y modificación: Las endonucleasas de restricción y las enzimas de modificación (T4 Ligasa, Fosfatasa Antártica, PNGasa F y ADN Polimerasas) utilizadas en este trabajo se adquirieron a través de New England Biolabs (Inglaterra) y fueron utilizadas según las recomendaciones del fabricante.

4.1.1.3 Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal anti polihistidina producido en ratón (BioLegend, EE. UU.).

- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 680 producido en cabras (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.).
- Anticuerpos monoclonales K9 y F17 anti IFN- α porcino producidos en cabras (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, New Jersey)
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP producido en cabras (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.)
- Anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado a HRP producido en cabras (ThermoFisher Scientific, EE. UU.)
- Suero porcino anti PPC obtenido de animales infectados con el virus en experimentos previos desarrollados en el Centro de Investigación en Sanidad Animal del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA-CReSA), España.

4.1.2 Cepas bacterianas

- *Escherichia coli*, cepa Top10 (Life Technologies, EE.UU.): F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL(StrR) endA1 nupG. Cepa bacteriana utilizada para la amplificación de plásmidos.

4.1.3 Ácidos nucleicos

4.1.3.1 Plásmidos

- pEntry_CD46porc: vector construido en nuestro laboratorio para la expresión de la porción extracelular de la proteína CD46 porcino (rCD46his porcino). La construcción incluye el gen que codifica para CD46, un sitio IRES y el gen que codifica para la Proteína Fluorescente Verde, (GFP; del inglés, *Green Fluorescence Protein*), en ese orden. Además, el gen de rCD46porc se encuentra en el mismo marco de lectura de la cola 6xHis. Se realizó el clonamiento del gen codificante para la porción extracelular de CD46 porcino (residuos 45 a 330 de UniProt O02839) en el vector pCMV6-Entry-FSH-(ht)Lgl entre los sitios de restricción *Nhe I* y *Hpa I*.

4.1.4 Líneas Celulares.

PK15: células de riñón de cerdo (ATCC, CCL-33) libres de pestivirus. Línea celular utilizada para la producción y titulación viral, y los ensayos de neutralización.

CHO-K1: células de ovario de hámster chino (ATCC, CCL-61). Línea celular utilizada para la expresión de la proteína recombinante.

4.1.5 Antibióticos

- Ampicilina (US Biological, EE. UU.).
- Kanamicina (Merck, Alemania).

- Cloranfenicol (Sigma, Alemania).
- Tetraciclina (Sigma, EE. UU.).
- Estreptomicina (Merck, Alemania).

4.1.6 Medios de cultivo.

- Medio LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl.
- Medio LB Agar: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar.
- 2xYT: 16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl.
- Medios de crecimiento: RPMI-1640 o DMEM *high glucose* suplementados con 10% (v/v) suero fetal bovino.
- Medio de congelación: RPMI-1640 suplementado con 40% (v/v) de suero fetal bovino y 10% (v/v) DMSO.

Los medios RPMI-1640 y DMEM y el suero fetal bovino fueron adquiridos a través de Biological Industries (EE. UU.).

Los reactivos químicos y componentes microbiológicos utilizados en la preparación de los medios de cultivo se obtuvieron de las compañías Becton, Dickinson and Company (EE. UU.), Merck (Alemania) y Sigma (Alemania).

4.1.7 Animales

- Ratones C57 machos de 25-28 g, entre 8 y 10 semanas de edad y libres de anticuerpos contra el VPPC u otro pestivirus. Los animales se emplearon para la obtención de suero hiperinmune contra la proteína rCD46his porcino.
- Cerdos (*Sus Scrofa*) machos de 6 semanas de edad, fueron comprados en España a una granja comercial libre de Pestivirus. Los animales se emplearon para la evaluación de la respuesta clínica e inmunológica contra las variantes Thiverval y Margarita del VPPC.

Los ratones se manipularon acorde a las normas establecidas y aprobadas por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UdeC.

La manipulación de los cerdos y toda la actividad experimental asociada fue realizada de acuerdo con las regulaciones españolas y europeas vigentes y las aprobadas por el Comité de Ética de la Generalitat de Catalonia, España (número de proyecto 10908). Además, se realizó una solicitud de seguimiento al comité de bioética de la Universidad de Concepción.

4.1.8 Virus

- *Cepa Margarita VPPC*: genotipo 1.4, usada en Cuba desde 1965 en los estudios de evaluación de potencia de vacunas. La cepa induce los síntomas clínicos asociados a la forma severa de la enfermedad. Se utilizó en el desafío, la neutralización y los ensayos de bloqueo de la infección *in vitro*.

- Cepa Alfort/187: genotipo 1.1, donación del laboratorio europeo de referencia para la Peste Porcina Clásica (EURL; del inglés, *EU Reference Laboratory*), Hanover, Alemania. Se empleó en el ensayo de neutralización.
- *Cepa Thiverval*: (Coglapest[®], CEVA, Santé Animale, France), genotipo 1.1, cepa vacunal atenuada disponible comercialmente. Se empleó en la vacunación y en el ensayo de bloqueo de la infección *in vitro*.

4.1.9 Reactivos químicos y materiales

- Acetona (Diprolab, Chile)
- Ácido acético (Merck, Alemania)
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico (Merck, Alemania)
- Ácido sulfúrico (Merck, Alemania)
- Ácido tricloroacético (Merck, Alemania)
- Acrilamida (Merck, Alemania)
- Agarosa (Lonza, EE. UU.)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Merck, EE. UU.)
- Ámicon Ultra-15 30 kDa (Merck, Alemania)
- Azul de bromofenol (Merck, Alemania)
- Azul de Coomassie brillante R250 (Merck, Alemania)
- Bisacrilamida (Merck, Alemania)

- Bromuro de etidio (Merck, Alemania)
- Chelating Sepharose Fast Flow
- Cloroformo (Winkler, Chile)
- Columna HiTrap® Desalting Columns (Sigma-Aldrich)
- Columna HiTrap® Protein A (GE, EE. UU.)
- Cubetas de electroporación de 2 mm (Biorad, EE. UU.)
- Desoxicolato de sodio (Merck, Alemania)
- Discos de Ultrafiltración de 30 kDa (Millipore Corporation, EE. UU.)
- Etanol absoluto (Merck, Alemania)
- Filtros de 0,22 µm, filtros de 0,45 µm (Jet Biofil)
- G418 Geneticin® (ThermoFisher Scientific, EE. UU.)
- Glicerol (Calbiochem, Alemania)
- Glucosa (Merck, Alemania)
- Isopropanol (Merck, Alemania)
- Membrana de Nitrocelulosa, Amersham Protran 0,2 µm, 300 mm x 4 m (GE Healthcare Life Science, Alemania)
- Metanol (Merck, Alemania)
- Montanide ISA61 (Seppicc, Francia)
- OPD (o-Fenilendiamina) (Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU.)
- Paraformaldehído 4% (PFA) (ThermoFisher Scientific, EE. UU.)
- Pentobarbital (Merck, Alemania)

- Peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania)
- Placas de cultivo: placas de 100 mm, placas de 12 pozos, placas de 24 pozos, placas de 6 pozos, placas de 96 pocillos (todas de Corning, EE. UU.).
- Polietilenimina, branched Mw 25000 (Sigma, Alemania)
- Portaobjetos, Laminillas cubreobjetos (Marienfeld)
- Sales: Persulfato de Amonio, Tris, Glicina, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NH₄Cl, MgSO₄, CaCl₂, MgCl₂, EDTA, NaOH, KAc, Citrato trisódico dihidratado (todas de Merck, EE. UU.).
- SDS (Calbiochem, Alemania)
- Suero fetal bovino (SFB) (Biological Industries, EE. UU.)
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Merck, Alemania)
- Tripsina (Merck, EE. UU.)
- Tritón X-100 (Merck, EE. UU.)
- Tubos Amicon® Ultra 3 y 10 kDa (Merck Millipore, Alemania)
- Tween-20 (Sigma, EE. UU.)
- β-Mercaptoetanol (Sigma, Alemania)

4.1.10 Soluciones

4.1.10.1 Soluciones para extracción y purificación de ADN plasmídico

- Solución I: 50 mM Glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 mg/ml RNasa A.

- Solución II: 0,2 M NaOH, 1% (p/v) SDS.
- Solución III: 5 M Acetato de potasio, Ácido acético glacial.
- Cloroformo, Isopropanol, Etanol absoluto.

4.1.10.2 Soluciones para electroforesis de ADN

- Tampón TAE: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético.
- Tampón de carga ADN 6x: 30% (v/v) Glicerol y 0.25% (p/v) Azul de bromofenol.
- 1% Bromuro de etidio en agua.
- Agarosa.
- Marcador de peso molecular de ADN 1kb.

4.1.10.3 Soluciones para electroforesis de proteínas

- 30% (p/v) Acrilamida, 0,8% (p/v) Bisacrilamida
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8.
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8.
- 10% (p/v) SDS.
- 10% (p/v) Persulfato de amonio.
- TEMED.
- Desoxicolato de sodio 0,15% (p/v)
- Ácido tricloroacético 76% (p/v)

- Tampón de corrida: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% (p/v) SDS.
- Tampón de carga 6X con β -Mercaptoetanol (Condición desnaturante y reductora): 10% (p/v) SDS, 0,6% (v/v) β -Mercaptoetanol, 0,012% (p/v) azul de bromofenol, 0,35 M Tris, 30% (v/v) glicerol.
- Tampón de carga 6X (Condición desnaturante y no reductora): 10% (p/v) SDS, 0,012% (p/v) azul de bromofenol, 0,35 M Tris-Cl, 30% (v/v) Glicerol.
- Patrón de peso molecular AccuRuler RGB Plus.
- Solución de tinción Azul de Coomassie: 0.25% (p/v) Azul de Coomassie brillante R250, 10% (v/v) ácido acético, 45% (v/v) Metanol.
- Solución de destinción: 5% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético.

4.1.10.4 Soluciones para Western Blot

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 0,037% (p/v) SDS, 20% (v/v) Metanol.
- TBS: 3,0 g/L Tris, 8,0 g/L NaCl, pH 7,6.
- Solución de bloqueo: 5% (p/v) leche descremada en TBS.
- Rojo Ponceau: 0,1% (p/v) Rojo Ponceau en 5% (v/v) ácido acético.
- TBS-T: TBS con 0,1% (v/v), Tween-20.
- Membrana Nitrocelulosa (Amersham Protran, Sigma, Alemania) 0,2 μ m, 300 mm x 4 m.

4.1.10.5 Soluciones para cromatografía de afinidad a iones metálicos

- NiSO₄ 200 mM.
- Imidazol.

4.1.10.6 Soluciones para inmunoensayo

- Tampón de recubrimiento: 2,93 g/l NaHCO₃; 1,52 g/l Na₂CO₃.
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄.
- PBS-T: PBS con 0,1% (v/v) Tween-20 (Sigma, EE. UU.).
- Tampón sustrato (peroxidasa): 29,4 g/l Citrato trisódico dihidratado, pH 4,5 ajustado con HCl.
- Solución de revelado: mezcla de 5 mg de OPD (o-Fenilendiamina), 12,5 ml de tampón sustrato, 5 µl de 30% peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: 2,5 M Ácido sulfúrico.

4.1.10.7 Soluciones para transfección celular

- Solución de transfección: Polietilenimina branched Mw 25000; 0,8 mg/ml en H₂O.

4.1.10.8 Soluciones para purificación de suero hiperinmune

- Fosfato de Sodio 20 mM pH 7
- Citrato de Sodio 0,1 M pH 3

- Tris-HCl 1 M pH 9

4.1.10.9 Soluciones para ensayo de Inmunoperoxidasa en Monocapa

- PBS-T: PBS 1X- Tween-80 0,05%
- Solución Stock: NN Dimetilformamida 15ml + 0,1g (3-amino-9-Ethylcarbazol) (AEC)
- Tampón sustrato: 1L H₂O; 4,101 g CH₃COONa x 3H₂O, pH=5.0; 1M Ac. Acético

4.1.11 Kits comerciales

- E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek, EE. UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmidial desde bacterias.
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega-Biotek, EE. UU.), kit utilizado para purificar ADN plasmidial desde gel de agarosa.
- E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega-Biotek, EE. UU.), kit utilizado para purificar productos de PCR.
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, EE.UU.).
- Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), kit utilizado para la cuantificación de proteínas totales.
- IDEXX CSFV Ag Serum Plus (IDEXX Laboratories, Liebfeld, Switzerland), kit utilizado para la detección de anticuerpos contra la E2 del VPPC en suero.

- pigtype© CSFV Erns Ab (Quiagen, Leipzig, Alemania), kit utilizado para la detección de anticuerpos anti Erns en suero.
- IndiMag® Pathogen (Indical bioscience, Leipzig, Germany) kit utilizado para la extracción de ARN viral.

4.1.12 Equipos

- Agitador magnético con placa calefactora MSH-20A (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Agitador Orbital SHO-1D (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific, EE.UU.)
- Bloque térmico MaXtable H10-Set (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Cabina de Flujo Laminar AVC-4D1 (ESCO Technologies, Inc., Singapur).
- Centrífuga refrigerada 3K20 (Sigma, Alemania).
- Centrífuga Rotina 380 (Hettich, Alemania)
- Centrífuga Sorvall Legend Micro 21 (ThermoFisher Scientific, Alemania).
- Centrífuga Sorvall RC6 plus (ThermoFisher Scientific, Alemania).
- Electroporador Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, EE. UU.).
- Equipo de Trasferencia semi-húmeda Trans-Blot SD Cell (Bio-Rad, EE. UU.).
- Equipo foto-documentador Odyssey (LI-COR Biosciences, USA).
- Equipo purificador de agua Máxima SC (ELGA, Bélgica).

- Fuente de poder EV 202 (Consort, Bélgica).
- Fuente de poder PowerPac™ Basic (Bio-Rad, Singapur).
- Incubador de placas de pozo profundo TS-DW (BioSan, Letonia)
- Incubador digital SWIG-50 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Incubador digital WIS-20 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek, EE. UU.).
- Mezclador Vortex VM-10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea).
- Microscopio de fluorescencia Floid™ Cell imaging station (Life Technologies, EE. UU.).
- Sistema de Cromatografía ÄKTA™ Start (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia).
- Tanque de Nitrógeno 8207 (ThermoFisher Scientific, EE. UU.)
- Transiluminador UV WUV-L10 (Daihan Scientific Co.Ltd., Corea)
- Unidad de diafiltración XFUF07601 (Millipore Corporation, EE. UU.)

4.2 Métodos

4.2.1 Métodos generales de análisis y manipulación de ADN

Las técnicas generales de biología molecular, tales como la preparación de células competentes, transformación genética, purificación de plásmidos, digestión con endonucleasas de restricción, ligazón y electroforesis en geles de

agarosa, se llevaron a cabo según los protocolos descritos en el libro *Molecular Cloning: A laboratory Manual* [139]. Las variaciones particulares introducidas a cada técnica se describen en las secciones correspondientes.

4.2.2 Métodos generales de cultivo celular

Las técnicas básicas de cultivo celular, tales como descongelación, propagación y congelación, se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en el libro *Cell Culture Basics Handbook* [140].

4.2.3 Métodos generales empleados en los ensayos de inmunización y reto

4.2.3.1 Evaluación clínica de los animales

Se emplearon 23 cerdos de 6 semanas de edad, libres de anticuerpos contra el VPPC u otro pestivirus. Los animales se distribuyeron al azar en 4 grupos, se alimentaron una vez al día y pudieron beber *ad libitum*.

Veterinarios entrenados monitorearon a los animales y les midieron la temperatura rectal diariamente comenzando en el día de la vacunación y hasta el final del experimento. A cada animal se le asignó un puntaje entre 0 y 6 de acuerdo con el estado clínico y según lo descrito previamente por [141, 142], donde: 0, sin signos; 1, fiebre moderada; 2, signos clínicos leves a moderados; 3, signos clínicos moderados; 4, signos clínicos moderados a severos; 5, signos clínicos severos; 6, muerte.

4.2.3.2 Diseño experimental y procedimiento de toma de muestras

Se trabajó con 4 grupos experimentales: grupo A (animales 1-7), grupo B (animales 8-13), grupo C (animales 14-18) y grupo D (animales 19-23). Luego de un período de aclimatación, los grupos A y C fueron inmunizados con 2 mL (4×10^3 Unidades Formadoras de Placas, UFP) de la vacuna basada en la variante Thiverval a través de inyección intramuscular en el cuello, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La inmunización de estos grupos tuvo lugar con 16 días de diferencia de modo tal que cuando tuviera lugar el desafío hubieran transcurrido 21 y 5 dpi para los grupos A y C, respectivamente. Los animales del grupo B fueron inoculados con PBS estéril al momento de la vacunación del grupo A y colocados junto a estos 24 horas después, sirviendo de grupo contacto para monitorear la transmisibilidad del virus vacunal. Los animales del grupo D, fueron tratados como control de infección e inoculados también con PBS al momento de la vacunación del grupo C, pero mantenidos en un cubículo independiente **(Figura 3)**.

Para evaluar la transmisibilidad y replicación del virus vacunal en tejidos, 1 animal del grupo A y dos animales del grupo B fueron eutanasiados a los 21 días post vacunación, y se colectaron muestras provenientes de las amígdalas, el timus, el bazo y los linfonodos mesentéricos.

A los 21 post vacunación del grupo A y 5 días post vacunación del grupo C, los 4 grupos experimentales fueron sometidos a un desafío mediante inyección intramuscular en el cuello con 10^5 TCID de la cepa Margarita del VPPC.

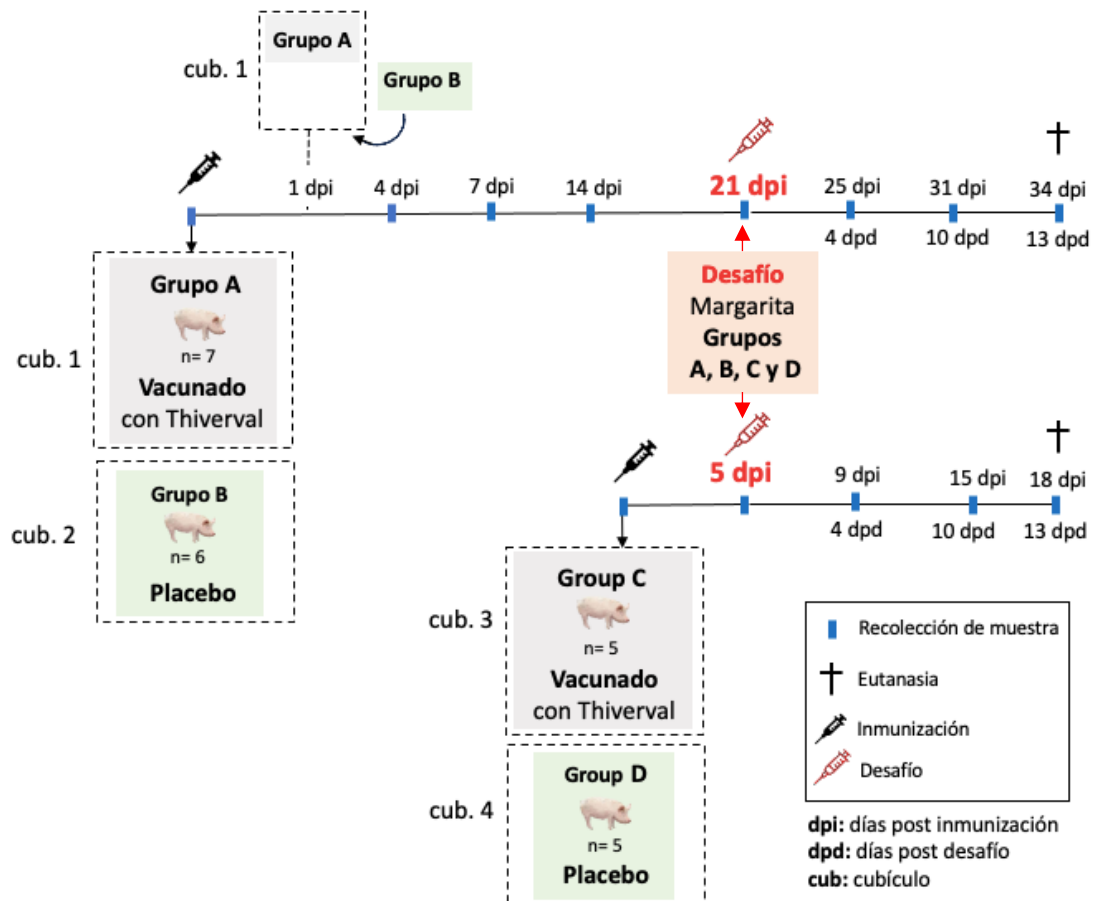


Figura 3. Diseño experimental.

Las muestras provenientes del suero y exudados nasal y rectal fueron colectadas el día de la vacunación para todos los grupos, y los días 4, 7 y 14 post vacunación para los grupos A y B. También se realizó el muestreo en el día del reto, y los días 4, 10 y 13 post reto para todos los grupos experimentales. Los animales fueron eutanasiados antes del final del experimento por razones éticas cuando estos mostraron postración o alcanzaron un puntaje clínico ≥ 5 . Al día 13 post reto, el ensayo fue concluido y todos los animales sobrevivientes fueron eutanasiados y se colectaron muestras provenientes de las amígdalas, el timus,

el bazo y los linfonodos mesentéricos. Para la eutanasia se empleó una sobredosis de Pentobarbital de 60-10 mg/kg de peso, la cual fue administrada a través de la vena yugular de acuerdo con las directrices europeas. El experimento se realizó de acuerdo con las regulaciones españolas y europeas vigentes, y fue aprobado por el Comité de Ética de la Generalidad de Cataluña, España, bajo el proyecto experimental número 10908.

4.2.4 Determinación de los niveles de IFN- α en suero mediante ELISA

La concentración de IFN- α en suero fue determinada mediante test ELISA desarrollado y validado en el IRTA-CReSA, según [143]. Se emplearon los anticuerpos monoclonales (K9 y F17) e IFN- α recombinante (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, New Jersey, EE. UU.). El valor de corte del ensayo fue calculado como el promedio de la densidad óptica de los controles negativos (el blanco y el suero negativo antes de la inmunización) más 3 desviaciones estándar. Las concentraciones de las citoquinas en el suero fueron determinadas empleando una curva de regresión lineal construida a partir de las densidades ópticas de los estándares empleados. Se analizaron muestras de suero obtenidas el día de la vacunación para todos los grupos y los días 4, 7 y 14 post vacunación para los grupos A y B. También se evaluaron muestras de suero en el día del reto y los días 4, 7, 10 y 13 post reto de los 4 grupos experimentales.

4.2.5 Evaluación de la respuesta humoral contra las proteínas E2 y Erns del VPPC y determinación del título de anticuerpos neutralizantes

Los títulos de anticuerpos específicos contra la proteína E2 del VPPC fueron determinados en las muestras de suero empleando el kit Elisa comercial IDEXX Ag Serum Plus, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las placas recubiertas con antígeno E2 en presencia del suero de los animales. Luego de la incubación y lavado, se añadió a cada pocillo el conjugado (anticuerpos monoclonales anti E2 conjugados a HRP). El revelado se realizó empleando TMB. El desarrollo de color es débil (resultado positivo) cuando en la muestra existen anticuerpos específicos contra E2, mientras que es máximo (resultado negativo) en ausencia de anticuerpos específicos. El porcentaje de bloqueo es calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{NC \bar{x} Abs - Sample Abs}{NC \bar{x} Abs} \times 100$$

Donde:

NC: negative control; Abs: Absorbancia a 450 nm; Sample: muestra.

Valores por debajo del 30% fueron considerados negativos, entre el 30 y el 40% dudosos, y mayores del 40% positivos, de acuerdo a lo estipulado por el fabricante.

La respuesta de anticuerpos contra la proteína Erns se evaluó empleado el ensayo de anticuerpos anti Erns VPPC pigtype©. Los resultados se calcularon de acuerdo con la formula:

$$S/P = \frac{OD(m) - OD\bar{X}(neg)}{OD\bar{X}(pos) - OD\bar{X}(neg)}$$

Donde:

OD: Optical density (densidad óptica); *m*: muestra; *pos*: control positivo; *neg*: control negativo.

Valores de S/P por debajo de 0,3 se consideraron negativos, entre 0,3 y 0,5 dudosos, y mayores de 0,5 positivos.

La respuesta de anticuerpos neutralizantes contra las cepas Alfort/187 y Margarita se determinó mediante el ensayo de neutralización ligado a peroxidasa (NPLA; del inglés, *neutralization peroxidase linked assay*) [144]. Brevemente, diluciones seriadas en base 2 de los sueros de los animales inactivados a 56°C fueron mezclados con igual volumen (50 µL) de 100 TCID₅₀ de cada variante viral, por separado. Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 1 hora y posteriormente incubadas junto al mismo volumen de células PK-15 (2,5x10⁵ células/mL) en placas de 96 pocillos. Se incluyeron como controles cada virus titulado empleando diluciones seriadas en base 10 y 8 pocillos por dilución y la titulación del suero hiperinmune empleado en la detección de la infección. A las 72 horas post-infección, las células fueron fijadas y teñidas para detectar el VPPC mediante inmunohistoquímica con suero anti-PPC diluido 1/100 y luego anti-IgG

porcino conjugado a HRP diluido 1/500. El análisis de la infección se realizó al microscopio. Los títulos de neutralización se expresaron como la dilución recíproca de suero que neutraliza 100 TCID de Alfort/187 o Margarita en el 50% de las réplicas en cultivo (8 réplicas por dilución de suero).

4.2.6 Detección del ARN del VPPC

Se extrajo el ARN viral de las muestras de suero, exudados nasal y rectal y tejidos empleando el kit IndiMag® Pathogen de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se emplearon un ensayo de RT-qPCR en tiempo real para la detección específica de la cepa Margarita, desarrollado y validado en el IRTA-CReSA [145]. Las muestras fueron consideradas negativas cuando la fluorescencia fue indetectable y positivas cuando los valores umbrales del ciclo (Ct; del inglés, *Cycle threshold*) fueron iguales o menores que 40. La carga de ARN viral fue definida como alta (Ct menor que 23), moderada (Ct entre 23 y 28) o baja (Ct mayor de 28), de acuerdo con lo descrito previamente [146].

4.2.7 Diseño, síntesis y generación del vector de expresión pEntry-CD46porc

4.2.7.1 Diseño y síntesis de la secuencia codificante del dominio extracelular de la proteína CD46 porcino

La secuencia correspondiente al dominio extracelular de la proteína CD46 porcino fue obtenida de la base de datos UniprotKB (número de acceso: O02839 (MCP_PIG)). La empresa GenScript sintetizó la secuencia en el vector de expresión pCI-neo para generar el vector pCI-neo-CD46.

4.2.7.2 Generación del vector de expresión pEntry-CD46porc

El fragmento codificante de CD46 porcino se extrajo del vector pCI-neo-CD46 mediante digestión enzimática con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *SmaI*. El fragmento resultante de la digestión se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa I para generar un extremo romo a partir del extremo 5' protuberante producido por la endonucleasa *NcoI*. Este último fragmento de ADN tratado se clonó en el vector pCMV6-Entry-FSH(ht)-Lgl(1), previamente digerido con las endonucleasas *NheI* y *HpaI*. Los clones recombinantes derivados de este paso de clonación se detectaron mediante análisis de restricción con las enzimas *SacI*, *HincII* y *SmaI*. En el vector pEntry-CD46porc resultante, el gen CD46 porcino quedó insertado bajo el control del promotor CMV.

4.2.8 Expresión de la glicoproteína rCD46his porcino en sobrenadante de cultivo celular

4.2.8.1 Transfección transiente de células CHO-K1 con el vector pEntry-CD46

Se sembraron células CHO-K1 en placas de cultivo de 6 pocillos con medio de crecimiento y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70%. Las transfecciones se realizaron por triplicado, empleando por cada pocillo 1 µg del vector pEntry_CD46porc, previamente linealizado con la enzima *AgeI* y utilizando PEI, en una relación DNA:PEI de 1:1. El proceso de transfección se ejecutó de acuerdo a lo establecido por Longo, P. A. y col [147], y se tomó como criterio de transfección la expresión de GFP en un microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón) con una magnificación de 100X.

4.2.8.2 Selección y amplificación de clones estables

Trascurridas 24 horas desde la transfección, se tripsinizaron las células y el contenido de cada pocillo fue amplificado a 3 placas de 100 mm, conteniendo medio de crecimiento y G418 a una concentración de 500 µg/mL. Las placas fueron incubadas durante 3 semanas y el medio fue renovado cada 5 días. Las células establemente transformadas lograron sobrevivir a la incubación en presencia de G418. Finalmente, las células fueron seleccionadas mediante citometría de flujo, de acuerdo con la intensidad de GFP. Se incubaron placas de 96 pocillos, conteniendo una célula única, luego del proceso de selección, hasta

alcanzar confluencia celular del 90%. Aquellos pocillos en donde los clones generados poseían una alta intensidad de fluorescencia fueron amplificados en placas de 100 mm y congelados una vez se alcanzó la confluencia, hasta iniciar la producción.

4.2.8.3 Producción de la glicoproteína rCD46his porcino recombinante en sobrenadante de cultivo

Los clones establemente transformados se descongelaron y se sembraron en placas de 150 mm hasta alcanzar confluencia. Las placas se lavaron exhaustivamente con PBS para retirar todo el suero que pudiera quedar. Para iniciar la producción se añadió medio de crecimiento nuevo sin suero y se incubaron las placas durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo se colectó el medio de cultivo, el cual se conservó a -80°C hasta su purificación. Las células se incubaron por 24 horas con medio de crecimiento para recuperarlas y posteriormente se inició un nuevo proceso de producción. Cada placa rindió 3 procesos productivos.

4.2.9 Purificación de rCD46his porcino

La proteína fue purificada por cromatografía de afinidad a ion metálico níquel desde el sobrenadante de cultivo utilizando el sistema de cromatografía AKTA *Start*. Al sobrenadante de cultivo conteniendo rCD46his porcino se le añadió Imidazol hasta obtener una concentración final de 5 mM. El sobrenadante se

aplicó en una columna empaquetada con la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow*, previamente cargada con sulfato de níquel y equilibrada con PBS 1X e Imidazol 5 mM. Durante la corrida se mantuvo un flujo de 0,2 mL/min y una vez concluido el pase de la muestra se realizó un paso de lavado con Imidazol 20 mM en PBS 1X a un flujo de 0,5 mL/min. La elución se realizó empleando diferentes concentraciones de Imidazol: 40, 80 y 250 mM, en PBS 1X. Finalmente, los eluatos fueron analizados mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

4.2.10 Métodos para el análisis de la proteína rCD46his porcino

4.2.10.1 Métodos generales de análisis y manipulación de proteínas

Los métodos comunes para el análisis y manipulación de proteínas, tales como la precipitación de proteínas, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el libro *The Protein Protocols Handbook* [148].

4.2.10.2 Concentración y diafiltración de muestras de proteínas

Las muestras de proteínas purificadas fueron concentradas utilizando una unidad de diafiltración Millipore con membranas de tamaño de poro de 30 kDa. Para este procedimiento, la muestra de proteína fue añadida a la unidad y se completó el volumen con Buffer Fosfato 0,05 M, pH 7,4. Se aplicó una presión de entrada inferior a los 90 psi y se añadieron durante el proceso hasta 8 volúmenes de

Buffer Fosfato. La proteína fue concentrada a través de centrifugaciones sucesivas de 25-40 minutos a 3900 g a 4°C, empleando Ámicon Ultra-15 de 30 kDa hasta un volumen final de 5 ml. La muestra obtenida fue cuantificada, alicuotada y almacenada a -20°C o -80°C.

4.2.10.3 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales fue realizada utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay y se procedió a cuantificar las muestras según el protocolo para microplacas descrito por el fabricante empleando curva estándar de BSA.

4.2.10.4 Determinación de nivel de pureza y concentración de rCD46his porcino

La imagen digital de electroforesis de la proteína purificada se analizó con el programa ImageJ para determinar la pureza mediante densitometría.

4.2.11 Obtención y análisis de suero hiperinmune contra la proteína rCD46his porcino

4.2.11.1 Inmunización de ratones

La formulación para la inmunización se realizó mezclando 1,2 mL de proteína rCD46his porcino (100 µg/mL) con igual volumen de adyuvante Montanide ISA61, para formular las 5 dosis a emplear y 1 dosis adicional para compensar las pérdidas a causa de la viscosidad de las emulsiones. La mezcla se emulsificó

hasta lograr un líquido blanco, medianamente viscoso. Ratones macho C57 recibieron 3 inmunizaciones, por vía intradérmica, los días 0, 21 y 35 del estudio.

4.2.11.2 Procedimiento de toma de muestras

Se realizó una extracción de sangre del plexo retro-orbital de los animales el día 35 del estudio para evaluar la generación de anticuerpos antiCD46 conforme a lo que se describe en el siguiente acápite. El día 42 se realizó la punción intracardiaca de los animales y finalmente fueron sacrificados. En ambos casos las muestras de sangre obtenidas en ausencia de anticoagulante se mantuvieron a 25°C durante 2 h para conseguir su adecuada coagulación. Posteriormente se centrifugaron a 1500 g durante 15 min para separar el suero, el cual se conservó a -20°C hasta el momento del análisis.

4.2.11.3 Inmunoensayo de evaluación de reconocimiento de rCD46his porcino por suero hiperinmune

Se recubrieron pocillos de placas *high binding* con 100 µL de rCD46his porcino a concentración 10 µg/mL en tampón de recubrimiento, se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. La solución de recubrimiento fue eliminada, se realizó un lavado con 200 µL por pocillo de PBS, y se bloquearon los pocillos con leche descremada 5% (p/v) en PBS (200 µL/pocillo) durante 2 horas a 37°C. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo, y se añadieron las muestras de suero (100 µL/pocillo) preparadas en PBS-T en diferentes diluciones. Se incubó

a 37°C por 1 hora, y se realizaron 3 lavados con PBS-T (200 µL/pocillo). Se añadió 100 µL/pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP a dilución 1:5000 y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego, se realizaron 4 lavados con PBS-T, se añadió solución de revelado (100 µL/pocillo) y se incubó en oscuridad de 10-20 minutos. La reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 2.5 M (50 µL/pocillo) y se realizó la lectura de D.O. a 492 nm.

4.2.11.4 Purificación de suero hiperinmune anti rCD46his porcino

Para la purificación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino se unificaron los sueros obtenidos de los ratones y se hizo una dilución 1:2 de la mezcla en PBS 1X pH 7.4. La purificación se realizó utilizando el sistema de cromatografía AKTA Start con columnas HiTrap® Protein A siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se mezclaron los sueros de los ratones y el suero resultante se diluyó en PBS 20 mM pH 7.4 hasta volumen final 5 ml. La elución se realizó empleando buffer Citrato de Sodio 0,1M pH 3 y el eluato fue inmediatamente neutralizado con Tris-HCl 1 M pH 9. El eluato fue concentrado en Amicon Ultra-15 a volumen final 2 ml y desalinizado en columna de Desalting HiTrap® Desalting Columns. Se realizó la cuantificación de proteínas totales y el suero fue analizado por SDS-PAGE y Western Blot.

4.2.11.5 Determinación del efecto de bloqueo de la infección viral en presencia de suero hiperinmune antiCD46 porcino

Para determinar el efecto de bloqueo de la infección viral del suero hiperinmune anti rCD46his porcino, el día anterior al experimento se sembraron 2×10^5 células PK15 en placas Corning™ Costar™ Flat Botom a 37°C y CO₂ 5%. Luego de haberse formado una monocapa, se incubaron las células durante 1 hora con las diluciones 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 del suero hiperinmune antiCD46. Posteriormente, se infectaron las células con las variantes virales Thiverval o Margarita a una MOI de 0,01 durante 72 horas. Como controles del experimento se emplearon células infectadas directamente (control positivo) o células no infectadas (control negativo). Transcurridas las 72 horas, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas a 80°C durante 3 horas para ser analizadas mediante Ensayo de Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA; del inglés, *Immunoperoxidase Monolayer Assay*).

4.2.11.6 Ensayo de Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)

Las células se trataron con suero anti PPC, diluido 1:200 en PBS-Tween durante 1 hora, seguido de anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado a HRP. El revelado se realizó empleando 100 mL de AEC, solución stock y H₂O₂. Las células fueron visualizadas en microscopio óptico con una magnificación de 40x. Para el análisis de imágenes se contrataron los servicios del Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción. Brevemente, la selección de las células

positivas se realizó manualmente aplicando un criterio fijo de forma, visibilidad del núcleo, color y visibilidad marcada en relación de su entorno. A cada imagen analizada se le aplicó un filtro de suavizado (gaussiano, de dos píxeles) para reducir el nivel de ruido, además de una sustracción de fondo para igualar las intensidades. Se cuantificó el área representada por las células positivas con respecto al área total en cada una de las imágenes analizadas. Se estableció como 100% de infección el promedio de las cuantificaciones realizadas con el control positivo.

4.2.12 Análisis matemáticos y estadísticos.

Los análisis matemáticos y estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 7.0. En análisis estadísticos se utilizó un valor de p menor o igual a 0,05 como estadísticamente significativo.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chigago, IL, USA), y se empleó “grupo” como unidad experimental. La prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) fue elegida para comparar los valores obtenidos de los puntajes clínicos, el ARN viral en el suero, las secreciones y tejidos, y los niveles de IFN- α entre los grupos experimentales, Se utilizó un valor de significancia $p \leq 0,05$ en todo el experimento.

4.2.13 Alineamiento de secuencias.

Todos los alineamientos de secuencias fueron realizados con el software ClustalOmega, alojado en el servidor web del EBI <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo> utilizando los parámetros por defecto, a excepción cuando se usó para generar alineamientos para modelamiento comparativo, donde se pidió formato PIR como resultado. Las secuencias de las variantes virales utilizadas en los alineamientos fueron obtenidas de Genbank con los correspondientes números de acceso: Thiverval (EU490425.1), Margarita (AFP86048.1), Alfort/187 (X87939).

4.2.14 Modelamiento de estructuras de las proteínas CD46 y E2

El modelamiento de las porciones extracelulares de CD46 porcino y las glicoproteínas E2 de las variantes Thiverval, Margarita y Alfort/187 del VPPC, incluyó en primer lugar la búsqueda de templados mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en el PDB (Protein Data Bank). Se empleó para CD46 su homóloga humana (PDB ID 3O8E con 48% de identidad de secuencia), y para E2, una variante atenuada del virus usada como vacuna (PDB ID 7EGY, con más de un 90% de identidad). Posteriormente, las secuencias a modelar fueron alineadas con aquellas correspondientes a las proteínas templado usando el software ClustalOmega. Usando el alineamiento previo y las coordenadas espaciales de las proteínas templado, se procedió a realizar modelamiento comparativo con el software Modeller 10.2 [149] utilizando

además un protocolo de *simulated annealing* para optimizar los elementos conectores entre estructuras secundarias y las configuraciones de las cadenas laterales. Finalmente, debido al alto grado de identidad entre las variantes de E2, se decide realizar un paso adicional en el modelamiento, con el objetivo de poder enfatizar cualquier diferencia estructural que no pudiera ser apreciada a través del modelamiento comparativo. Para esto, las variantes de E2 fueron sometidas a simulaciones de dinámica molecular (MD; del inglés, *Molecular Dynamics*) con el objetivo de relajar y obtener estructuras en conformaciones energéticamente más favorables. Las MD fueron realizadas con el software Gromacs 2021.2 [150], alojado en el Southern GPU Cluster de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. El protocolo de MD implicó una minimización energética, una MD de equilibrio del sistema, una MD de producción de data de 100 ns, y posteriormente una nueva minimización energética para obtener las estructuras de cada variante de E2.

4.2.15 Análisis de interacción o docking proteína-proteína entre CD46 y E2 de las variantes Thiverval y Margarita

Para evaluar los complejos proteicos CD46-E2 de Thiverval y Margarita, se utilizaron las estructuras terciarias referidas en la sección 4.2.14. La región de interacción entre las proteínas fue determinada elegida de acuerdo con lo reportado en la literatura y descrito en la Introducción utilizando el servidor ClusPro 2.0 [151]. Por otra parte, el docking rígido se realizó con parámetros

estándar y de los modelos generados por el programa para cada complejo se seleccionó aquel con menor energía de formación del complejo. La calidad de los modelos generados fue analizada mediante ProSA [152] y la afinidad de unión se determinó mediante el servidor PRODIGY [153]. La visualización de los modelos de docking se realizó con PyMOL v2.3.2 [154].

4.2.16 Modelamiento de la estructura tridimensional del complejo E1-E2 de las variantes Thiverval y Margarita

Para la generación de un modelo molecular del complejo formado por las proteínas E1 y E2 de cada variante, las secuencias fueron modeladas tridimensionalmente mediante el uso del servidor AlphaFold [155]. Los modelos generados para cada variante se evaluaron mediante ProSA [152].

4.2.17 Análisis de potencial electrostático de superficie

Las estructuras modeladas de las distintas variantes de E2 fueron analizadas respecto a su potencial electrostático de superficie, utilizando el software APBS [156]. Para ello, las estructuras fueron sometidas en primer lugar a una asignación de estados de protonación en el servidor PDB2PQR <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr> asumiendo un pH fisiológico. Posteriormente se realizó el análisis con el software APBS, alojado en su servidor <https://server.poissonboltzmann.org/apbs>. Los resultados de potenciales

electrostáticos de superficie fueron analizados y visualizados con el software PyMol [154].

4.2.18 Creación y análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas y procesadas usando los programas ImageJ (<https://imagej.net>), Image Studio Lite (<https://www.licor.com/bio/image-studio-lite/>). Las imágenes de estructuras de proteínas y los análisis visuales fueron realizadas con el software PyMol [154]. Esquemas y figuras fueron creados utilizando la aplicación BioRender (<https://biorender.com>) y el programa GIMP versión 2.10 (<https://www.gimp.org>).

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la distribución, protección clínica y virológica e inmunogenicidad de la variante Thiverval del VPPC

5.1.1 Análisis del nivel de replicación en tejidos y órganos y la transmisibilidad hacia animales no vacunados

En este trabajo se decidió analizar en primera instancia la replicación de la variante Thiverval en tejidos y órganos durante los 21 días posteriores a la vacunación y su transmisibilidad hacia animales no vacunados. La información obtenida luego de estas evaluaciones resulta útil para caracterizar la distribución del virus vacunal en el organismo y validar que este no se excreta, lo cual minimiza los riesgos de reversión de la virulencia.

El análisis de la replicación de la variante Thiverval se realizó mediante la detección de ARN viral en las muestras de suero y los fluidos nasal y rectal de los grupos A (desafiado a los 21 dpi) y B (contacto del grupo A). La variante empleada en la vacunación es detectada en 4 de los 7 animales del grupo A entre los 4 y 7 dpi, con cargas virales muy bajas ($Ct > 28$). Solo en el suero de un animal pudo detectarse el virus vacunal a los 4 dpi con un valor de Ct de 35, 55, esto indica que la variante empleada no genera viremia (altos títulos virales en sangre). Adicionalmente, la carga viral en las secreciones nasales fue detectada

de manera esporádica en un animal a los 4 dpi y en tres a los 7 dpi, con valores de Ct mayores a 33. De modo similar, se detectó una baja carga viral en los fluidos rectales de solo 1 animal a los 7 dpi. Después de este tiempo, no es posible detectar el genoma viral en ninguna de las muestras analizadas. Por su parte el análisis de los tejidos del animal del grupo A sacrificado a los 21 dpi reveló que para este tiempo el virus puede ser detectado mayormente en amígdalas, aunque también en linfonodos mesentéricos y timo. Sin embargo, para este tiempo no es posible detectar el virus vacunal en el bazo.

En el caso del grupo contacto no se detectó carga viral en las muestras de suero, fluidos u órganos durante los 21 dpi, lo cual indica que de ocurrir transmisión del virus vacunal esta es indetectable. Todos los animales de ambos grupos estuvieron clínicamente saludables luego de la vacunación y en ningún caso se detectó fiebre (**Figura 4**).

Grupo de Animales	Día de inmunización	4dpi			7dpi			14dpi			21dpi								
		Suero	Fluido Nasal	Fluido Rectal	Suero	Fluido Nasal	Fluido Rectal	Suero	Fluido Nasal	Fluido Rectal	Suero	Fluido Nasal	Fluido Rectal	Amígdala	Bazo	Linfonodos mesentéricos	Timo		
Grupo A (desafiado a los 21 dpi)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,07	-	33,46	36,71
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	35,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	33,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo (contacto del grupo A)	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 4. Detección de ARN del virus vacunal en muestras y tejidos durante los 21 dpi.

Carga viral detectada mediante RT-PCR en tiempo real expresada como valores de Ct (Cycle Threshold). El símbolo (-) corresponde a muestras en las que la fluorescencia no pudo ser detectada. Las áreas en gris indican que los tejidos no fueron colectados en ese momento del estudio de acuerdo con el diseño experimental.

5.1.2 Evaluación del efecto protector en términos clínicos luego de 5 y 21 días post inmunización

Se evaluó el efecto protector de la variante Thiverval desafiando a los animales con Margarita, variante altamente virulenta del VPPC, luego de 5 o 21 dpi. La cepa Margarita es usada con frecuencia en los ensayos de desafío para determinar la efectividad de las vacunas y genera una sintomatología clínica compatible con una enfermedad de curso agudo-letal. El análisis clínico de todos los animales del estudio evidenció que los grupos no vacunados (B y D) desarrollaron fiebre (temperatura rectal superior a 40°C) a partir del segundo día

post-desafío. Para este tiempo comenzaron a evidenciarse también los signos y síntomas clínicos típicos compatibles con la forma severa de la enfermedad. Se observó un agravamiento de la condición clínica en los días sucesivos y en forma general los animales de estos grupos mostraron apatía, conjuntivitis, debilidad en las extremidades posteriores, temblores, disnea y diarrea. Por razones bioéticas fueron sacrificados durante los días 7 y 10 post desafío (**Figura 5**).

Por el contrario, los grupos inmunizados con la variante Thiverval y desafiados con Margarita a los 21 o 5 dpi mostraron ausencia total de signos clínicos durante la duración total del estudio (**Figura 5**). Este resultado es evidencia de la robusta protección clínica conferida por la vacuna con tan solo 5 días post vacunación, lo cual no había sido demostrado hasta el momento.

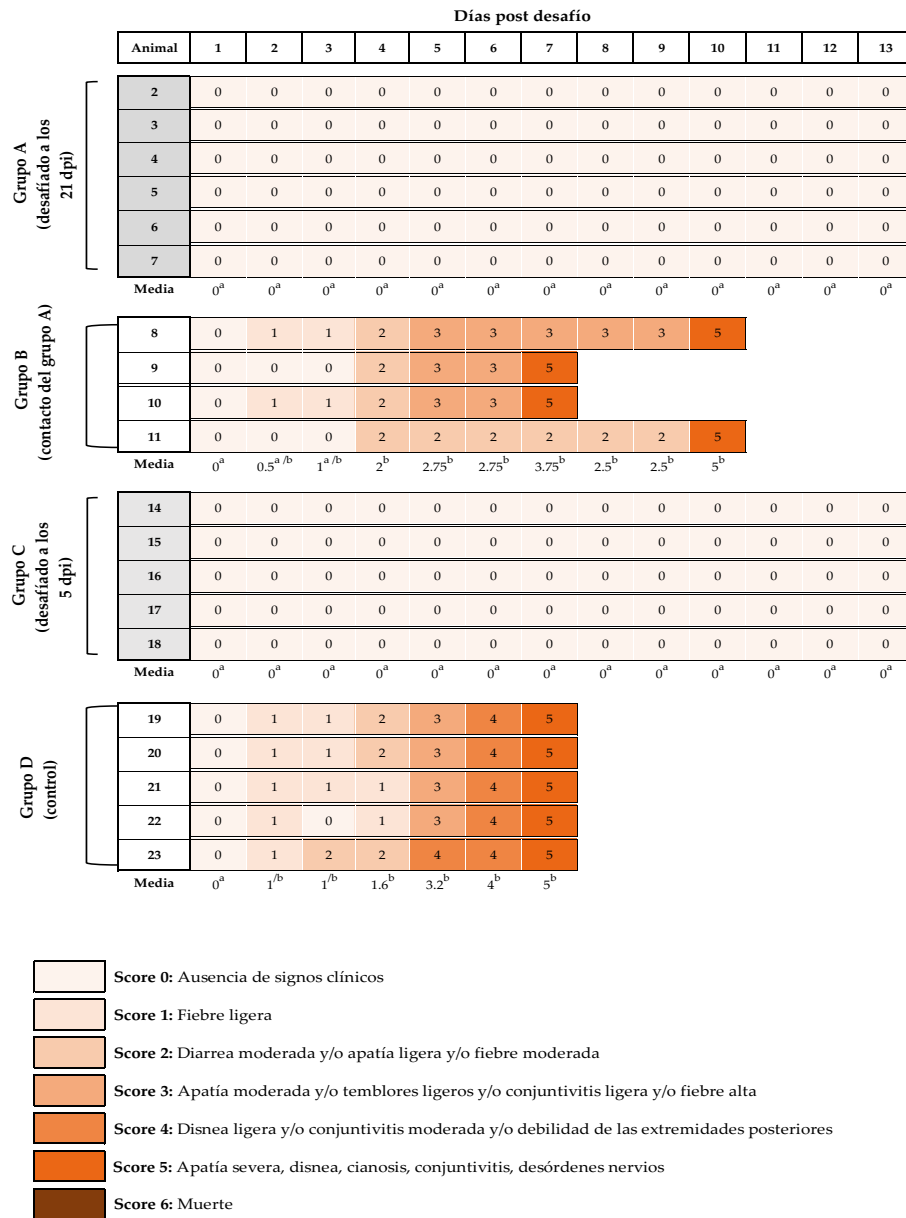


Figura 5. Evaluación de los signos y síntomas clínicos después del desafío. Sintomatología clínica posterior al desafío con la variante Margarita del VPPC. Los animales 2 al 7 (Grupo A) y 14 al 18 (Grupo C) fueron sometidos al desafío a los 21 y 5 dpi, respectivamente. Los animales 8 al 11 (grupo B), contactos del grupo A y 19 al 23 (Grupo D), control de infección, no fueron vacunados, pero si sometidos a desafío. Los animales fueron monitoreados diariamente durante los 13 días posteriores al desafío o hasta el sacrificio. La severidad de los signos clínicos está determinada por el puntaje clínico. Letras pequeñas en formato de super índice en el puntaje clínico medio de cada grupo representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ese día: letras similares indican que no existe diferencia significativa y letras diferentes indican diferencias ($p \leq 0,05$).

5.1.3 Evaluación de la inmunogenicidad luego de 5 y 21 días post inmunización

Con el objetivo de evaluar la implicación de la respuesta humoral en la sólida protección clínica observada y para caracterizar su desarrollo, se determinaron los niveles de anticuerpos contra las proteínas E2 y Erns. La respuesta humoral inducida por el VPPC está dirigida contra ambas proteínas de la envoltura del virión, principalmente E2. El análisis de la respuesta humoral del grupo A desafiado a los 21 dpi evidenció que los anticuerpos específicos contra la proteína E2 pueden ser detectados a partir de los 14 dpi (**Figura 6, A**). Seis de los 7 animales del grupo presentaron anticuerpos para este tiempo y para el día del desafío (21 dpi), los niveles habían incrementado en todos los animales. La respuesta de anticuerpos dirigidos contra la proteína se mantuvo elevada después del desafío y el porcentaje de bloqueo fue cercano al 100% al final del estudio. Sin embargo, en el grupo C, desafiado a los 5 dpi, no se detectó respuesta de anticuerpos específicos contra E2 antes del desafío con Margarita (**Figura 6, B**). Después del desafío, a los 4 días, en un animal de este grupo se detectó respuesta de anticuerpos anti E2. Sin embargo, no es hasta los 10 dpd que los anticuerpos contra esta proteína son detectados en la mayoría de los animales del grupo, siendo todos positivos para el final del estudio.

En cuanto a la detección de anticuerpos contra Erns, todos los animales del grupo A fueron positivos a los 14 dpi, aun cuando los valores de DO₄₅₀ se mostraron variables (**Figura 7, A**). Luego del desafío, se detectó un incremento considerable

en los niveles de anticuerpos anti Erns, con valores similares entre todos los animales del grupo A (valores > 2). En el grupo de animales desafiados con solo 5 dpi, similar a lo observado con la respuesta humoral anti E2, no se detectaron anticuerpos anti Erns antes del desafío (**Figura 7, B**). Se observó repuesta en un animal de este grupo a los 4 dpd, pero no fue hasta los 10 dpd cuando la mayoría de los animales resultaron positivos. Para el final del estudio todos los animales presentaron anticuerpos contra esta glicoproteína. La ausencia de anticuerpos contra las proteínas E2 y Erns en los primeros 10 días post desafío del grupo desafiado a los 5 dpi, sugiere que la protección clínica observada está sustentada en efectores de la respuesta inmunológica de acción más temprana.

En cuanto a los grupos no vacunados, solo 1 animal del grupo B mostró respuesta de anticuerpos anti E2 a los 10 dpd (**Figura 6, A y B**). En el caso de la proteína Erns, ningún animal no vacunado evidenció respuesta en ningún momento antes o después del desafío (**Figura 7, A y B**). El agravamiento de los síntomas clínicos obligó a sacrificar a los animales de ambos grupos no vacunados por razones éticas.

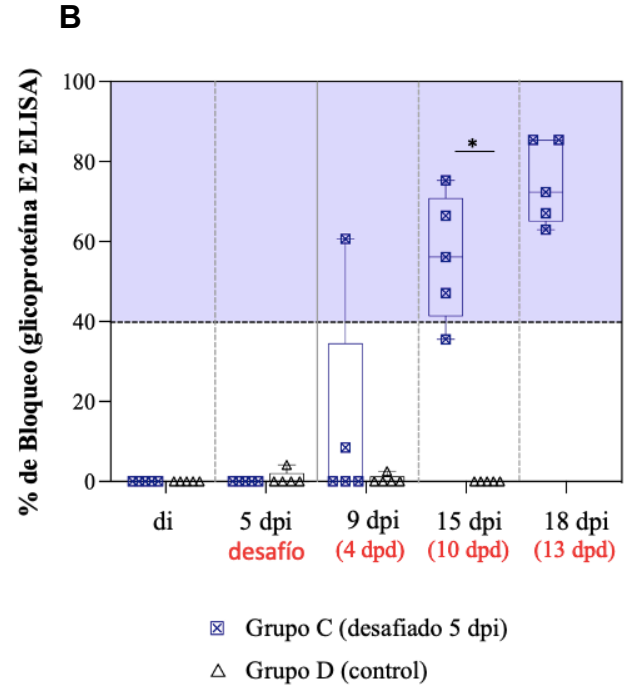
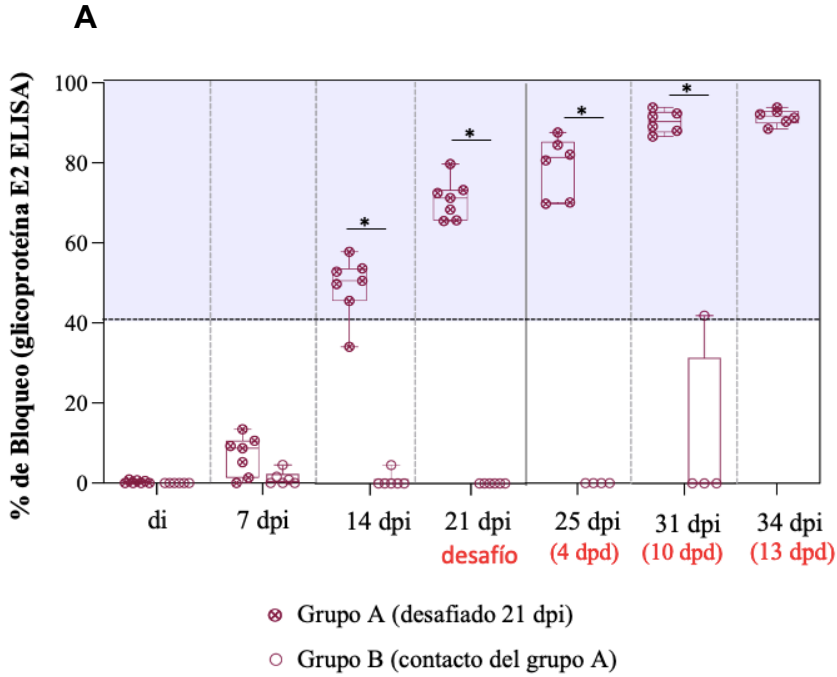


Figura 6. Cinética de la respuesta de anticuerpos contra E2 durante el estudio.

Respuesta de anticuerpos contra la glicoproteína E2 detectados en ELISA para los grupos A y B **(A)** y C y D **(B)**. Se consideran positivos porcentos de bloqueo superiores a 40% y estos indican que los anticuerpos en el suero bloquean la unión del AcM marcado a la proteína E2 con que está recubierta la placa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la respuesta de anticuerpos entre los grupos están representados con un símbolo de asterisco (*). Di: día de inmunización; dpi: días post inmunización; dpd: días post desafío.

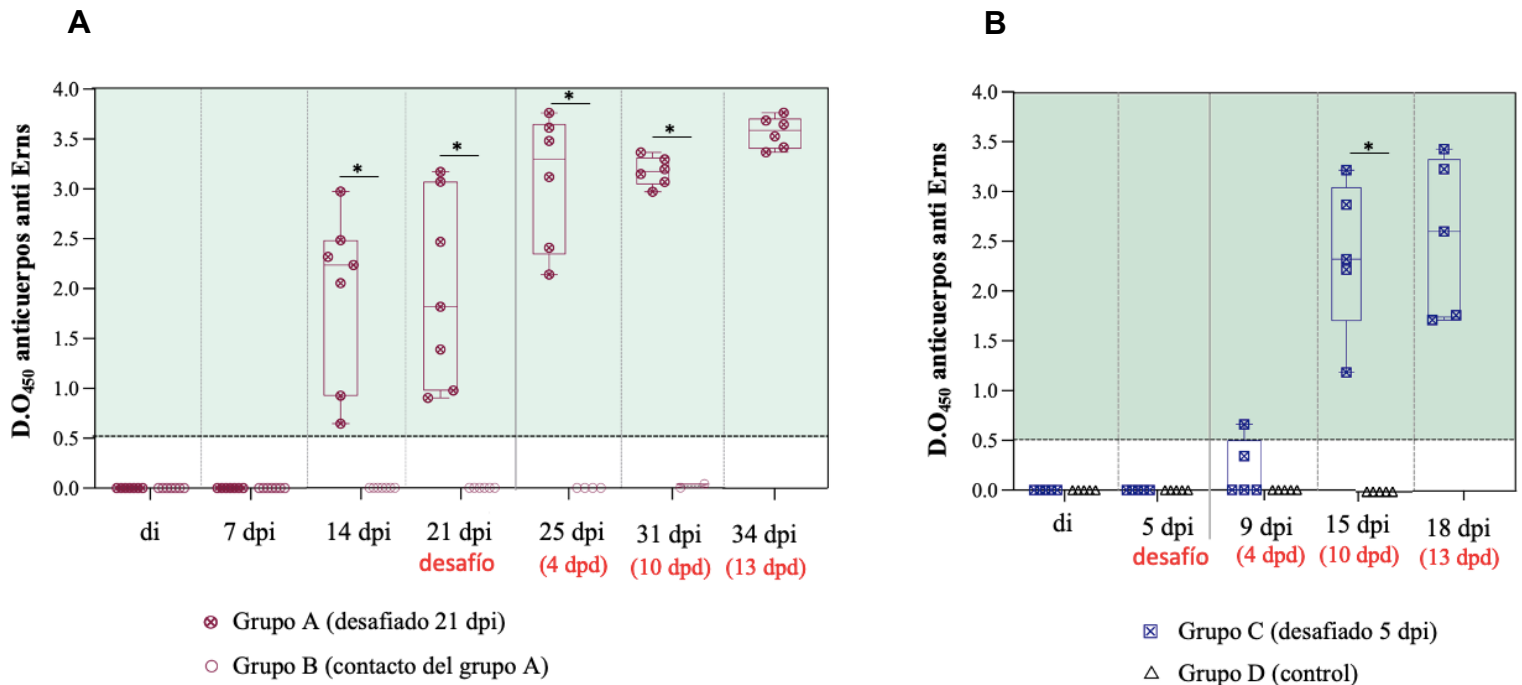


Figura 7. Cinética de la respuesta de anticuerpos contra Erns durante el estudio. Respuesta de anticuerpos contra la proteína Erns detectados por ELISA para los grupos A y B (**A**) y C y D (**B**). Se reporta el promedio de la densidad óptica de cada muestra y se consideran positivos valores de D.O superiores a 0,5. Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la respuesta de anticuerpos entre los grupos están representados con un símbolo de asterisco (*). Dpi: días post inmunización; dpd: días post desafío.

En este estudio también se evaluó la capacidad de los anticuerpos generados tras la vacunación para neutralizar *in vitro* la infección por las variantes Alfort/187 (cuya atenuación dio lugar a la variante Thiverval) y Margarita. En el grupo A, la respuesta de anticuerpos con capacidad para neutralizar a la variante Alfort/187 se detectó desde los 14 dpi en al menos 5 de los 7 animales (**Figura 8**). A los 21 dpi, los títulos de estos anticuerpos estuvieron alrededor de 1:40 en la mayoría de los animales y se observó un efecto estimulante luego del desafío,

registrándose títulos entre 1:320 y 1:10240 para el final del estudio. Los anticuerpos neutralizantes producidos tras la vacunación también son capaces de neutralizar al virus empleado en el desafío. Esta neutralización se observa antes del desafío, a partir del día 21 en 6 de los 7 animales de este grupo, y para los 13 dpd se detectaron títulos de hasta 1:640.

El grupo desafiado a los 5 dpi mostró respuesta de anticuerpos capacidad para neutralizar a la variante Alfort/187 y Margarita a partir de los 10 dpd (**Figura 8**). A los 13 dpd, todos los animales de este grupo mostraron respuesta de anticuerpos capaces de inhibir la infección de las dos variantes virales analizadas, siendo los títulos contra Alfort/187 mayores (entre 1:20 y 1:160) que contra Margarita (1:20). Por otro lado, conforme a lo observado luego del análisis de la respuesta humoral, no se detectó respuesta de anticuerpos neutralizantes en ninguno de los grupos no vacunados.

De modo general, en el grupo desafiado a los 21 dpi, la respuesta humoral inducida por la vacuna puede explicar la fuerte protección observada contra el desarrollo de los síntomas clínicos que aparecen después del desafío, lo cual como se mencionó anteriormente no ocurre en el grupo desafia con solo 5 días post vacunación.

Grupo de Animales	Días post Inmunización				Días post desafío						
	14 dpi		21 dpi / 5 dpi *		4 dpd		10 dpd		13 dpd		
	Alfort/187	Margarita	Alfort/187	Margarita	Alfort/187	Margarita	Alfort/187	Margarita	Alfort/187	Margarita	
Grupo A (desafiado a los 21 dpi)	1#	Neg	Neg	40	20	-	-	-	-	-	-
	2	10	Neg	40	10	80	40	640	80	320	80
	3	20	Neg	20	Neg	40	10	2560	320	640	160
	4	10	Neg	20	10	80	20	640	320	320	80
	5	20	Neg	80	20	160	20	5120	1280	10240	640
	6	40	Neg	160	10	160	20	320	40	640	80
	7	Neg	Neg	40	20	40	10	1280	320	640	320
Grupo B (contacto del grupo A)	8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	†	†
	9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	†	†
	10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	†	†
	11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	†	†
	12#	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
	13#	Neg	Neg	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
Grupo C (desafiado a los 5 dpi)	14		Neg	Neg	Neg	Neg	10	10	20	20	
	15		Neg	Neg	Neg	Neg	10	Neg	40	20	
	16		Neg	Neg	Neg	Neg	10	Neg	160	20	
	17		Neg	Neg	Neg	Neg	40	10	160	20	
	18		Neg	Neg	Neg	Neg	10	Neg	80	20	
Grupo D (control)	19				Neg	Neg	Neg	Neg	†	†	
	20				Neg	Neg	Neg	Neg	†	†	
	21				Neg	Neg	Neg	Neg	†	†	
	22				Neg	Neg	Neg	Neg	†	†	
	23				Neg	Neg	Neg	Neg	†	†	

Figura 8. Determinación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes durante el estudio.

Títulos de anticuerpos neutralizantes posterior a la vacunación y el desafío evaluados mediante NPLA. Los títulos se expresaron como la dilución recíproca de suero que neutraliza 100 TCID de Alfort/187 o Margarita en el 50% de las réplicas en cultivo. Neg: las muestras fueron negativas por NPLA; (†) indica que el animal fue sacrificado; (#) animales sacrificados el día del desafío, de acuerdo con el diseño experimental; (*) 21 dpi para grupos A y B y 5 dpi para grupos C y D.

5.1.4 Evaluación de la respuesta de IFN- α durante el estudio

La expresión de IFN- α es parte de respuesta inmunitaria innata ante la infección viral pues esta citoquina desempeña funciones antivirales e inmunomoduladoras. Esta respuesta tiene lugar en los primeros días posteriores a la infección y en ausencia de anticuerpos ha demostrado cumplir un importante rol protector. Por tanto, luego de la vacunación es deseable la inducción de esta respuesta en niveles moderados. La vacunación con la variante Thiverval indujo la expresión de IFN- α a los 4 y 5 dpi en los grupos A y C, respectivamente. Las concentraciones de IFN- α fueron significativamente mayores en ambos grupos vacunados, alcanzando valores alrededor de 100 unidades/mL. En los animales no vacunados, los valores de IFN- α se mantuvieron cercanos a 0 unidades/mL **(Figura 9, A)**.

Por otro lado, se ha descrito que la infección natural con variantes altamente virulentas del VPPC induce niveles elevados de IFN- α y este fenómeno tiene relación directa con la severidad de la enfermedad y las tasas de replicación del virus en el organismo. En este contexto, se produce una respuesta proinflamatoria aberrante, que hace imposible controlar la progresión de la enfermedad. En este estudio, después del desafío, a partir del día 4, se detectaron niveles significativamente altos de INF- α (>300 unidades/mL) en el suero de los animales no vacunados **(Figura 9, B)**. En el grupo control (Grupo D), la concentración de IFN- α se mantuvo elevada (>180 unidades/mL) al

momento del sacrificio. Por el contrario, los niveles de esta citoquina se mantuvieron cercanos a 0 unidades/mL en todos los animales vacunados.

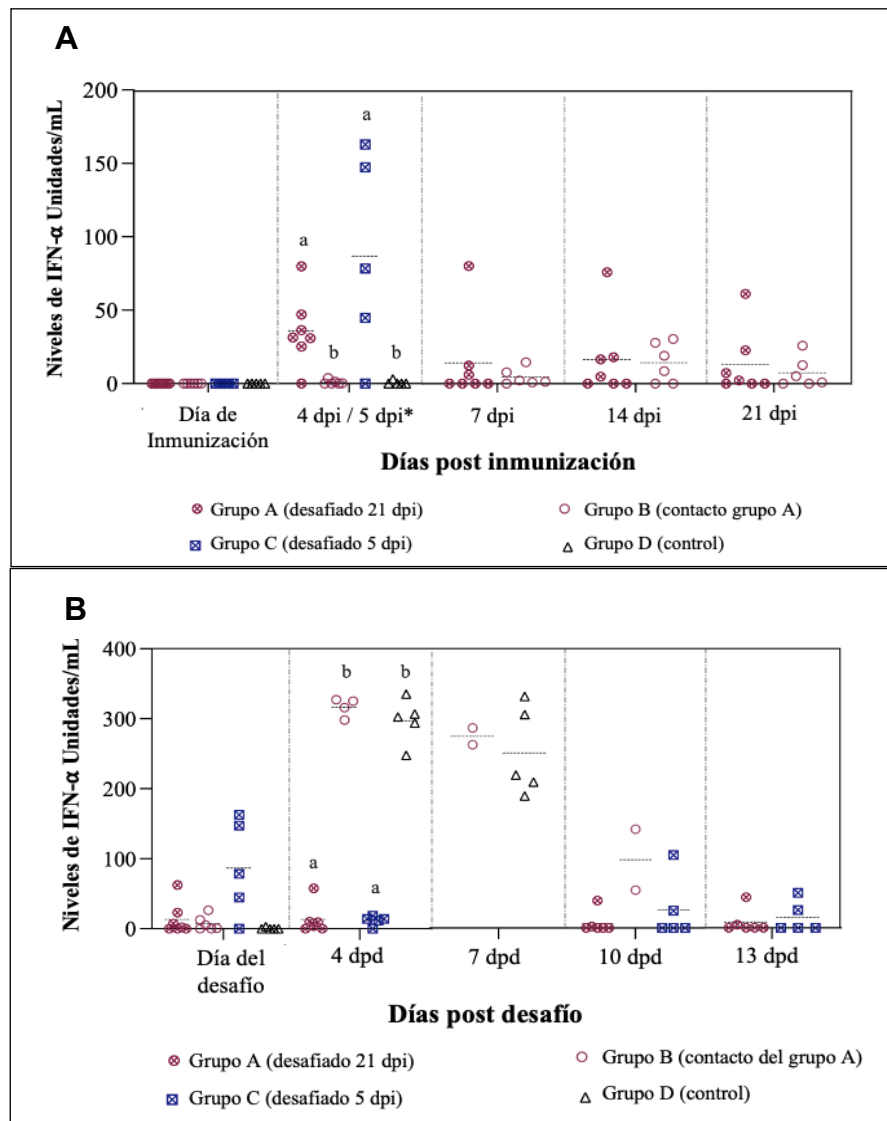


Figura 9. Detección de los niveles de INF-a en suero.

Niveles de INF- α determinados en ELISA a diferentes tiempos después de la vacunación con la variante Thiverval **(A)** y luego del desafío con la variante Margarita **(B)**. El símbolo (*) se refiere a 4 dpi para los Grupos A y B y 5 dpi para los Grupos C y D. Las letras encima de los símbolos son empleadas para representar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos el día en cuestión: letras similares indican que no existen diferencias significativas y letras diferentes muestran diferencias ($p \leq 0,05$).

5.1.5 Evaluación de la protección contra la replicación del virus del desafío luego de 5 y 21 días post inmunización

Uno de los requisitos indispensables de las vacunas de uso veterinario es el de proteger a los animales ante la posible infección con el agente patógeno induciendo una respuesta que sea duradera. Esta respuesta debe limitar la replicación del virus nativo en el organismo en caso de que tenga lugar la infección. Para evaluar la protección conferida por la variante Thiverval contra la replicación de la cepa Margarita empleada en el desafío se empleó una RT-PCR en tiempo real específica contra esta variante. Esta PCR fue desarrollada en el IRTA-CReSA, ha sido empleada previamente y tiene una sensibilidad analítica de 0,4 TCID₅₀.

Al realizar el análisis de las muestras del Grupo A después del desafío, no se detectó carga de ARN en el suero de ninguno de los animales. Esto confirma la capacidad del virus vacunal de proteger contra la viremia (circulación del virus patogénico en la sangre) generada por el virus empleado en el desafío (**Figura 10, A**). Solo a los 10 dpd se detectó una carga viral baja en algunas muestras de secreciones rectales y nasales, sin embargo, no se encontró ARN vacunal en el resto de las muestras del grupo después de este tiempo. El análisis de los órganos de estos animales al final del estudio (13 dpd) reveló que no es posible detectar el ARN viral en el bazo. En el caso de las amígdalas, solo en 3 animales se detectaron cargas bajas ($Ct > 31$), mientras que en los linfonodos mesentéricos las cargas virales estuvieron entre moderadas y bajas en todos los

casos. En el caso de los animales Grupo C (**Figura 10, B**), no se detectó ARN de la variante Margarita del VPPC en las muestras de secreciones nasales y rectales analizadas. Además, las bajas cargas de ARN detectadas en las muestras de suero a los días 4 y 10, valores de Ct estuvieron entre 31 y 3, indican ausencia casi total de replicación viral en la sangre de los animales. Al final del estudio no se detectó ARN de la variante Margarita en el suero o las secreciones de este grupo. Se encontraron mayormente cargas bajas en las muestras de bazo y linfonodos mesentéricos de estos animales y en el caso de las amígdalas 2 muestras mostraron cargas de ARN moderadas y el resto de los valores fueron bajos.

Por el contrario, todos los animales de los Grupos B y D (contactos y controles, respectivamente), fueron positivos en las muestras de suero y las secreciones nasales y rectales, después del desafío. A los 4 días post desafío, los valores de Ct se correspondieron con cargas moderadas y altas de ARN. Entre los días 7 y 10 dpd (momento del sacrificio), la carga de ARN viral fue significativamente mayor con respecto a los animales vacunados ($p \leq 0,05$). Todas las muestras de tejidos de estos grupos fueron positivas en ambos ensayos, mostrando cargas de ARN significativamente más elevadas en comparación con los animales vacunados.

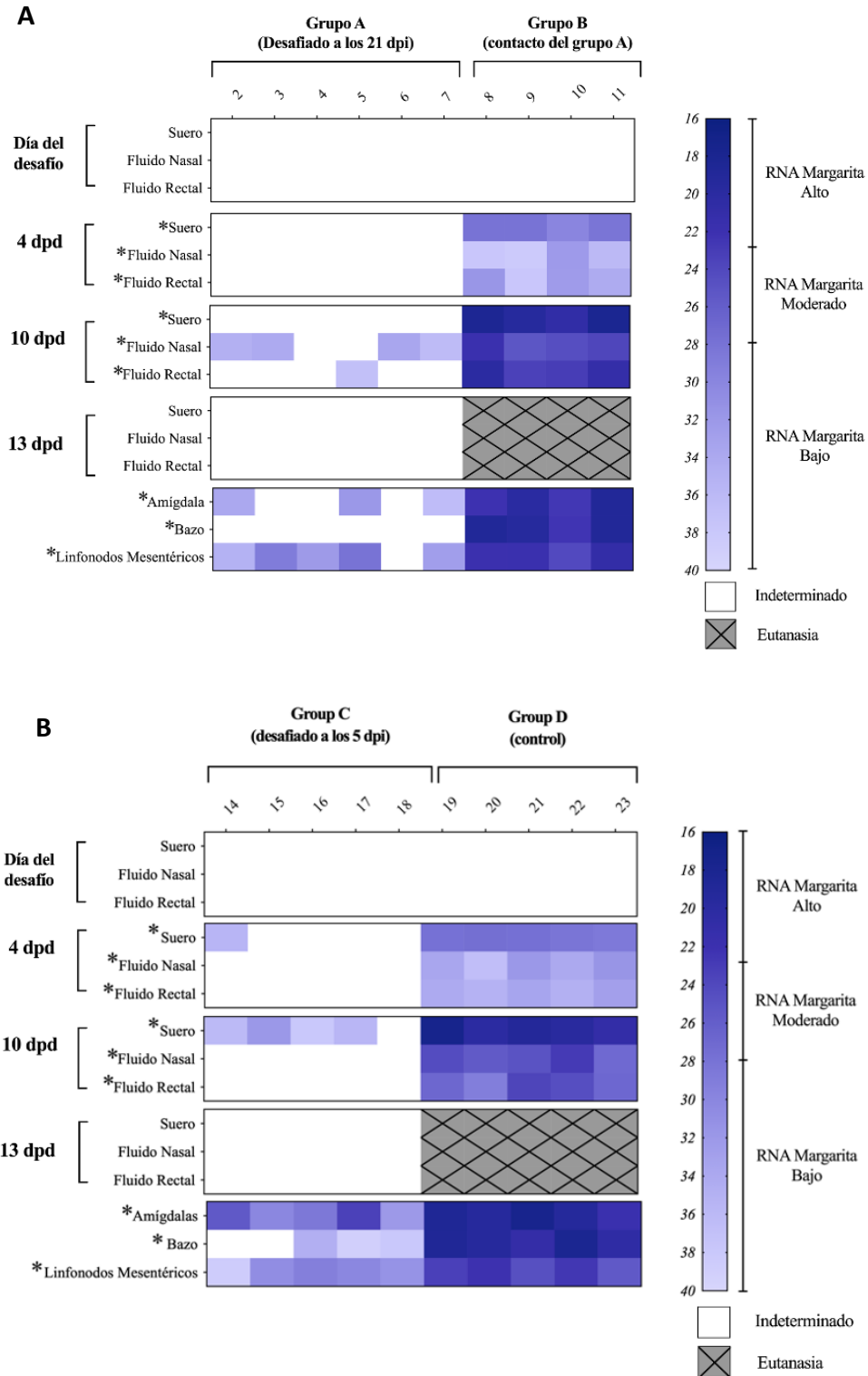


Figura 10. Detección de ARN del virus de la Peste Porcina Clásica en muestras y tejidos a diferentes tiempos después del desafío.

Las muestras fueron analizadas mediante RT-PCR en tiempo real para detectar ARN de la variante Margarita en los grupos A y B (**A**) y C y D (**B**) a diferentes tiempos después del desafío. Las muestras fueron consideradas negativas (áreas en blanco) cuando la

fluorescencia fue indetectable y positivas para valores de Ct ≤ 40 . La carga viral fue considerada baja (Ct > 23), moderada ($23 \leq \text{Ct} \leq 28$) o alta (Ct > 28). El análisis de los tejidos se realizó al momento del sacrificio de cada grupo. Los animales sacrificados están representados con cuadrados grises y cruz. (*) indica diferencias estadísticamente significativas en el valor de Ct entre los grupos ($p \leq 0,05$).

5.2 Evaluación del rol de CD46 durante la entrada de la variante Thiverval a la célula

5.2.1 Obtención de la proteína CD46 porcino

5.2.1.1 Generación de la secuencia génica codificante de una forma secretable del segmento extracelular de la glicoproteína rCD46his porcino

En este trabajo la evaluación de la participación de CD46 en la infección por la variante atenuada Thiverval requirió la generación de un suero hiperinmune. Aunque comercialmente existen disponibles algunos anticuerpos policlonales, los precios de estos son elevados y los volúmenes de presentación bajos. Teniendo en cuenta que la producción de anticuerpos es un proceso ya estandarizado en nuestro laboratorio, decidimos producir la proteína CD46 recombinante y generar un suero hiperinmune contra ella. Adicionalmente, la expresión de la proteína CD46 resulta útil para estudios futuros de interacción.

La secuencia aminoacídica correspondiente al segmento extracelular de la glicoproteína CD46 porcino se obtuvo a través de la base de datos UniprotKB (número de acceso: O02839 (MCP_PIG)). Se realizó la optimización de codones para garantizar una mayor eficiencia en la traducción del gen, y mejorar así sus niveles de expresión en células CHO-K1. El gen codificante de la proteína se

incorporó en un vector que posee un gen de Neomicina que confiere resistencia a G418. G418 es un antibiótico aminoglucósido que bloquea la síntesis peptídica al inhibir el paso de elongación tanto en bacterias como en células eucariotas. Esta modificación permitió realizar una primera selección de aquellas células que incorporaron el vector de interés mediante una selección con G418. Adicionalmente, se realizaron cambios en la secuencia codificante de la proteína CD46 (**Figura 11 A**):

- (i) Se sustituyó el péptido señal incluido en la secuencia original de la proteína CD46 por una señal de secreción de albúmina humana para garantizar su expresión en el sobrenadante de cultivo.
- (ii) En el extremo 3' de la secuencia codificante de CD46 se incluyeron 6 residuos de Histidina con el objetivo de facilitar la purificación posterior de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.
- (iii) Después del gen codificante de la proteína se incluyó una secuencia IRES y una secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (GFP), empleada como gen reportero de expresión. El objetivo de esta modificación es que las proteínas CD46 y GFP se expresen en cantidades proporcionales. Por tanto, en aquellos clones en donde la intensidad del verde es mayor, existe una mayor expresión de la proteína de interés, y los clones son seleccionados mediante citometría.

La secuencia de ADN resultante fue sintetizada e insertada en un vector pCI-neo a través de la empresa Genescript. El vector pCI-neo-CD46 fue digerido con las enzimas *NheI* y *SmaI* y el segmento codificante de la glicoproteína fue insertado en un vector pCMV6-Entry-FSH(ht)-Lgl, en lo adelante pEntry-CD46, que contiene el gen de Neomicina que confiere resistencia a G418 (**Figura 11 B**). Los clones recombinantes derivados de este paso de clonación se detectaron mediante chequeo de restricción con las endonucleasas *SacI*, *HincII* y *SmaI* (**Figura 11 C**).

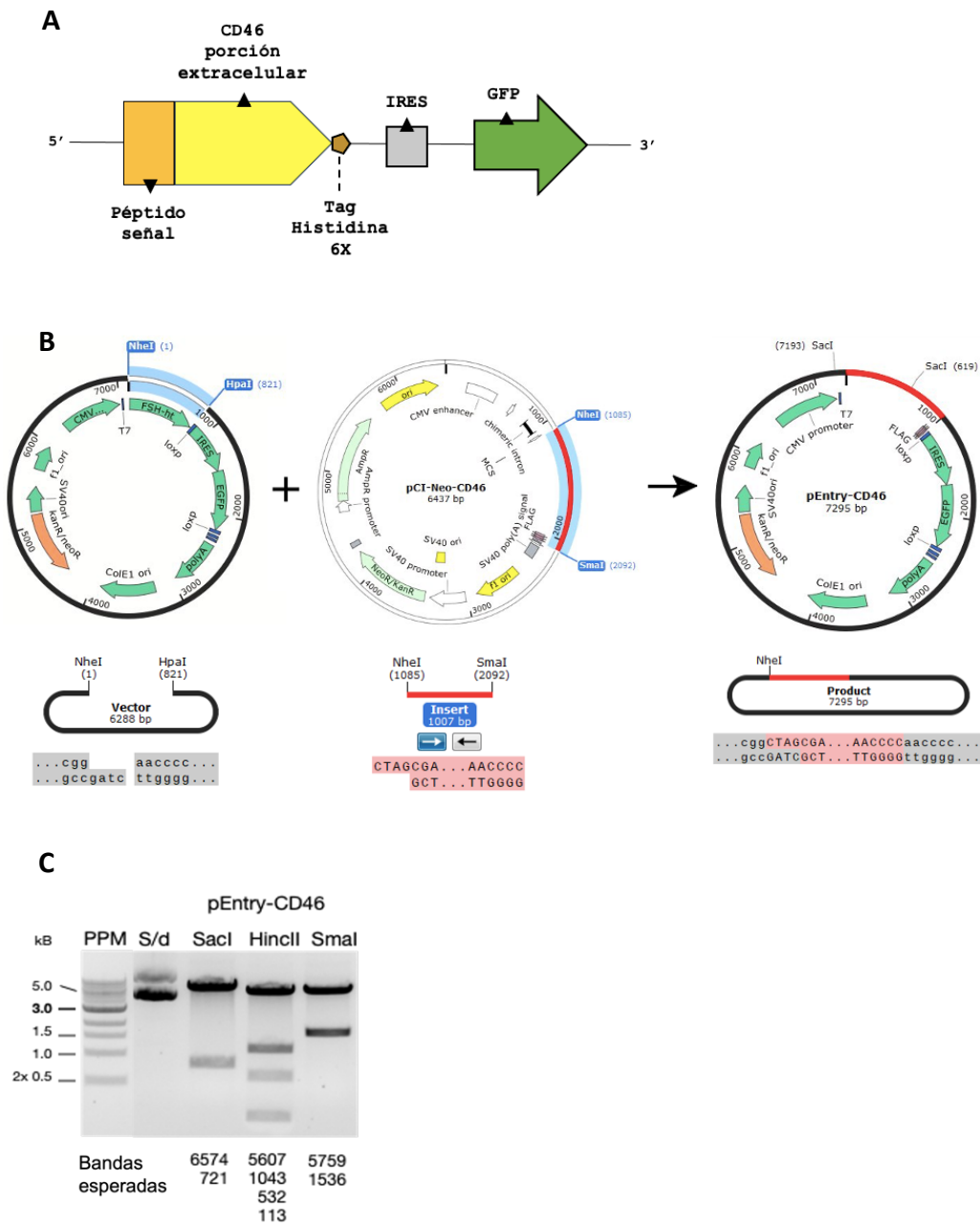


Figura 11. Generación de la secuencia génica codificante de la forma secretable de la proteína rCD46his porcino.

(A) Representación de las modificaciones realizadas en la secuencia codificante de la proteína CD46. **(B)** Representación del proceso de construcción del vector pEntry-CD46 conteniendo la secuencia codificante de la glicoproteína rCD46his porcino. **(C)** Chequeo de restricción del vector plasmídico pEntry-CD46. PPM: patrón de peso molecular; S/d: vector sin digerir.

5.2.1.2 Expresión de la glicoproteína rCD46his porcino en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1)

La línea celular de ovario de hámster chino CHO-K1 fue transfectada con el vector pEntry-CD46. La expresión de GFP se tomó como criterio de transfección. Luego de un primer proceso de selección con G418, se seleccionaron los clones que expresaban la proteína mediante citometría de acuerdo con la intensidad de GFP. Uno de estos clones fue amplificado y se cosechó el sobrenadante de cultivo que contenía la proteína. Esta fue identificada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y Western Blot utilizando anticuerpo anti-Histidina (**Figura 12**). En el Western Blot se observó la presencia de dos bandas inmunorreactivas cuyos pesos molares aproximados fueron de 50 y 55 kDa. Además, se observó la presencia de dos bandas de aproximadamente 40 y 45 kDa que parecieran ser el producto de actividad proteolítica. Se ha observado que en células CHO el tiempo que dura el proceso de producción puede modular la actividad proteolítica. Por tanto, luego de observar esto decidimos reducir el tiempo de producción de la proteína a 3 días en cultivo para minimizar la aparición de productos de degradación.

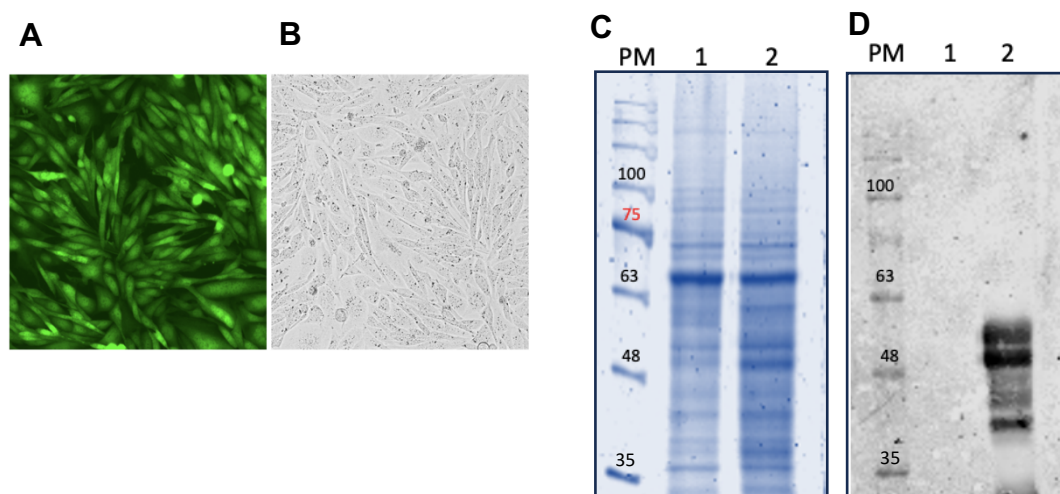


Figura 12. Análisis de la expresión de rCD46his porcino en células establemente transfectadas con el vector pEntry-CD46.

(A) Expresión de GFP en un clon de células CHO-K1 establemente transfectadas con el vector pEntry-CD46. La microfotografía corresponde al campo oscuro con magnificación de 10 X, tomada durante la exposición del cultivo a luz ultravioleta-azul (485 nm) en el microscopio óptico de fluorescencia. **(B)** Micrografía en campo claro del mismo clon descrito en A. **(C)** Electroforesis en gel de acrilamida al 12%, en condiciones no reductoras de sobrenadante de células CHO-K1 no transfectadas (carril 1) y clon establemente transfectado con pEntry-CD46 (carril 2). Tinción con azul de Coomassie. **(D)** Inmunoidentificación de las muestras presentes en la electroforesis, mediante Western Blot con anti-Histidina. PM: peso molecular; carril 1 y 2: ídem SDS-PAGE.

5.2.1.3 Purificación de la glicoproteína rCD46his porcino producida en sobrenadante de cultivo

La purificación de rCD46his porcino se realizó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos en una matriz de agarosa Ni-NTA. La unión específica de la glicoproteína a la matriz se comprobó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y en un ensayo de Western Blot con el anticuerpo anti-Histidina. No se detectó la presencia de rCD46his porcino, en la fracción de proteínas no

retenidas en la matriz, ni en la fracción de proteínas separadas después del lavado en presencia de Imidazol 20 mM (**Figura 13**). Después de la elusión en presencia de diferentes concentraciones de imidazol 40, 80 y 250 mM, se obtuvo en la fracción correspondiente a los 40 mM de imidazol, dos bandas mayoritarias con pesos moleculares aproximados de 50 y 55 kDa y otra, superior alrededor de los 100 kDa, cuyo tamaño se corresponde al peso esperado para un homodímero de la proteína (**Figura 13**). El rendimiento de la proteína fue de 104 mg/L y el nivel de pureza estimado por densitometría óptica fue del 95%.

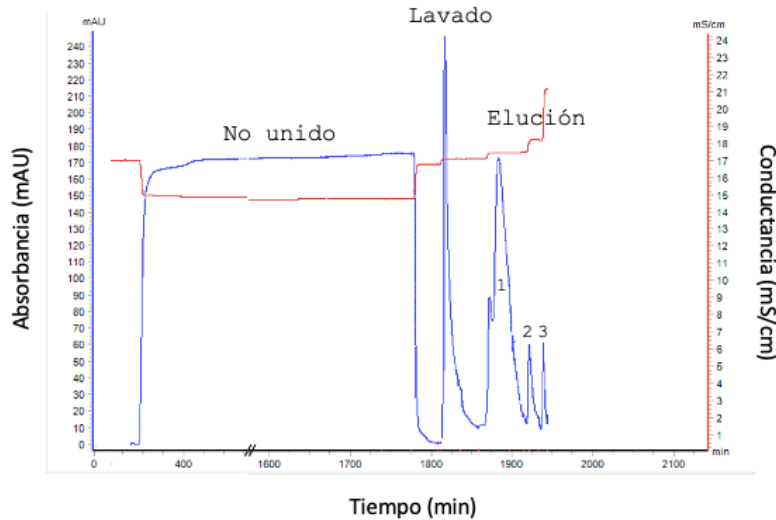
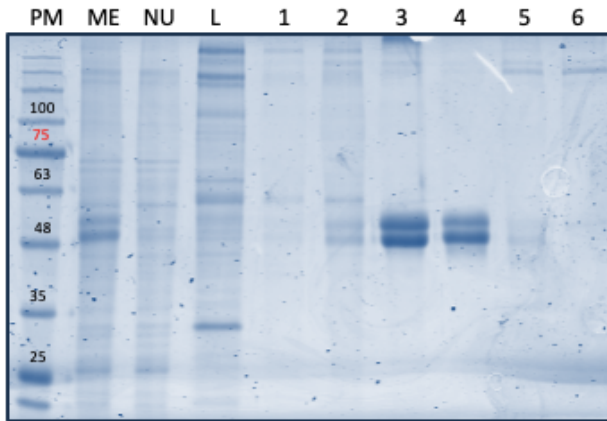
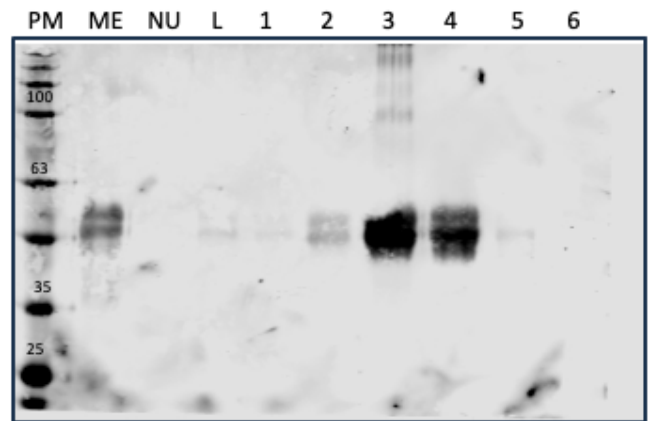
A**B****C**

Figura 13. Purificación de rCD46his porcino mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos en matriz de agarosa Ni-NTA.

(A) Cromatograma de proceso de purificación. *Muestra de entrada:* 5mM Imidazol; *Buffer Equilibrio:* PBS 1X, 5mM Imidazol; *Lavado:* 20 mM Imidazol; *Elución* (pico 1) 40, (pico 2) 80, (pico 3) 250 mM Imidazol. **(B)** SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras, de los diferentes pasos de purificación de rCD46his porcino, tinción con azul de Coomassie. **(C)** Inmunoidentificación de las muestras presentes en la electroforesis, mediante Western Blot con anti-Histidina. **PM:** peso molecular, **ME:** muestra de entrada, **NU:** no unido, **L:** lavado, carriles **1 al 4:** fracciones eluidas con 40mM, 80 mM (carril **5**) o 250 mM (carril **6**) de Imidazol.

5.2.1.4 Caracterización *in vitro* de la proteína rCD46his porcino purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos

Un análisis de la movilidad electroforética en SDS-PAGE permitió determinar que en condiciones no reductoras rCD46his porcino migra a una altura aproximada de 63 kDa (**Figura 14 A**). En condiciones reductoras rCD46his porcino migró como dos bandas cuyas tallas aproximadas se encontraron entre los 50 y 55 kDa (**Figura 14 A**). Estas bandas fueron identificadas mediante Western Blot, empleando anticuerpo anti-Histidina, en donde se pudo observar además la presencia de la forma homodimérica de la proteína a 100 kDa (**Figura 14 B**). Los oligosacáridos N-enlazados a la molécula de rCD46his porcino se liberaron mediante digestión con la endoglicosidasa PNGasa F empleando condiciones desnaturizante y no desnaturizante. El análisis electroforético de las digestiones mostró que en condiciones no desnaturizante la proteína N-desglicosilada migra a una talla aproximada de 55 kDa (**Figura 14 C, carril 4**), mientras que en condiciones desnaturizante se observa una banda única de aproximadamente 46 kDa (**Figura 14 C, carril 1**). La banda de 36.4 kDa en el carril 5 de la **Figura 14 C**, corresponde a la enzima PNGasa F presente en la reacción.

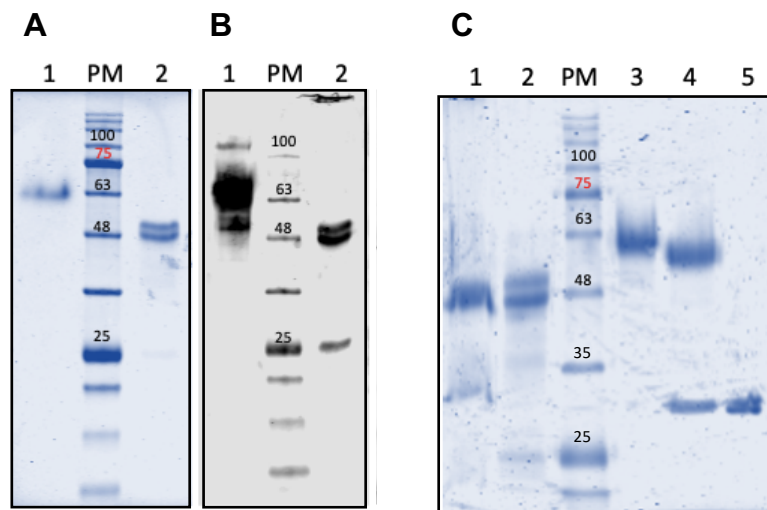


Figura 14. Caracterización de la proteína rCD46his porcino expresada en células CHO-K1.

(A) SDS-PAGE al 12% de la glicoproteína rCD46his porcino purificada, tinción con azul de Coomassie. **(B)** Inmunoidentificación de rCD46his porcino mediante *Western Blot* con anticuerpo anti CD46 comercial. Para (A) y (B): carril 1: 5 µg de rCD46his porcino corrida en condiciones no reductoras; carril 2: 5 µg de rCD46his porcino corrida en condiciones reductoras; PPM: patrón de peso molecular. **(C)** SDS-PAGE al 12% del producto de N-desglicosilación de la rCD46his porcino con la enzima *PNGasa F*, tinción con azul de Coomassie. Carril 1: proteína N-desglicosilada en condiciones desnaturalizantes, carril 2: proteína no tratada en condiciones desnaturalizantes; carril 3: proteína N-desglicosilada en condiciones no desnaturalizantes; carril 4: proteína no tratada en condiciones no desnaturalizantes; carril 5: *PNGasa F*; PM: patrón de peso molecular.

5.2.2 Generación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino

5.2.2.1 Producción y purificación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino

Para la producción de suero hiperinmune antiCD46 porcino, los ratones fueron inmunizados de acuerdo con el esquema descrito en Materiales y Métodos y resumido en la Figura 16. **(Figura 15 A)**. El análisis mediante ELISA de los sueros

obtenidos de cada animal mostró una DO 600 nm mayor a 2 en todos los animales empleando una dilución de 1:5000 de cada suero (**Figura 15 B**).

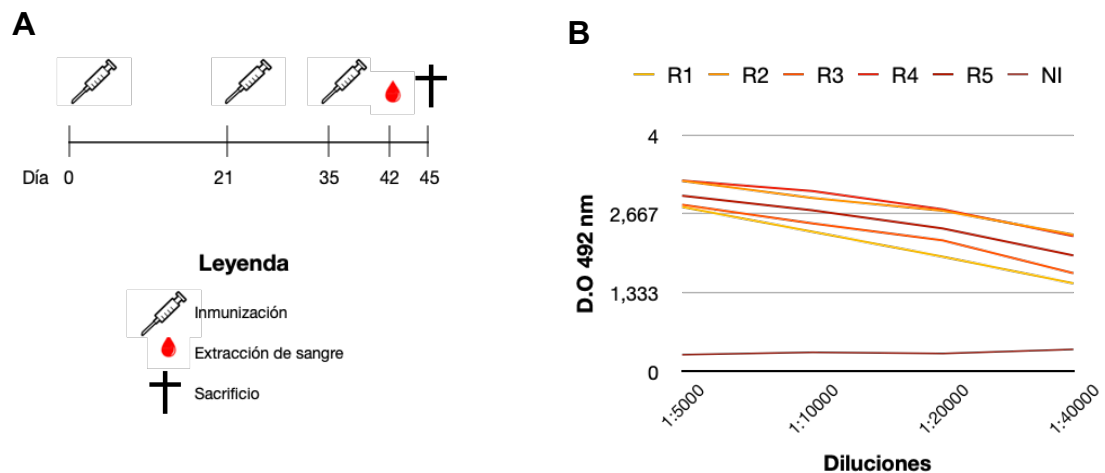


Figura 15. Análisis de la presencia de anticuerpos antiCD46 porcino en sueros de ratones inmunizados con rCD46his porcino.

(A) Esquema de inmunización de ratones C57 inmunizados con 20 µg de rCD46his porcino. **(B)** ELISA indirecto recubriendo con rCD46his porcino (1 µg/pocillo). Luego del bloqueo con Leche (5%)-PBS-T, se añadieron los sueros en las diluciones indicadas y finalmente se añadió antiMouse IgG conjugado HRP. Los resultados se grafican como el promedio de la DO 492 nm de tres réplicas. R: ratón, NI: ratón no inmunizado.

La purificación del suero hiperinmune anti rCD46his porcino se realizó en columna de Proteína A y posteriormente se desalinizó y concentró el eluato (**Figura 16 A**). El análisis de la movilidad electroforética en SDS-PAGE permitió determinar que, en condiciones reductoras, los anticuerpos anti rCD46his porcino presentes en el suero hiperinmune migran como 2 bandas, una entre los 55 kDa

y la otra a los 20 kDa, las cuales se corresponden con las tallas esperadas para las cadenas pesada y ligera de la proteína (**Figura 16 B; carril R**). En condiciones no reductoras se observó un monómero con una talla aproximada de 150 kDa (**Figura 16 B; carril NR**). En un ensayo de Western Blot, empleando anticuerpo antiMouse IgG, se confirmó el patrón de bandas observado en el SDS-PAGE (**Figura 16 C**).

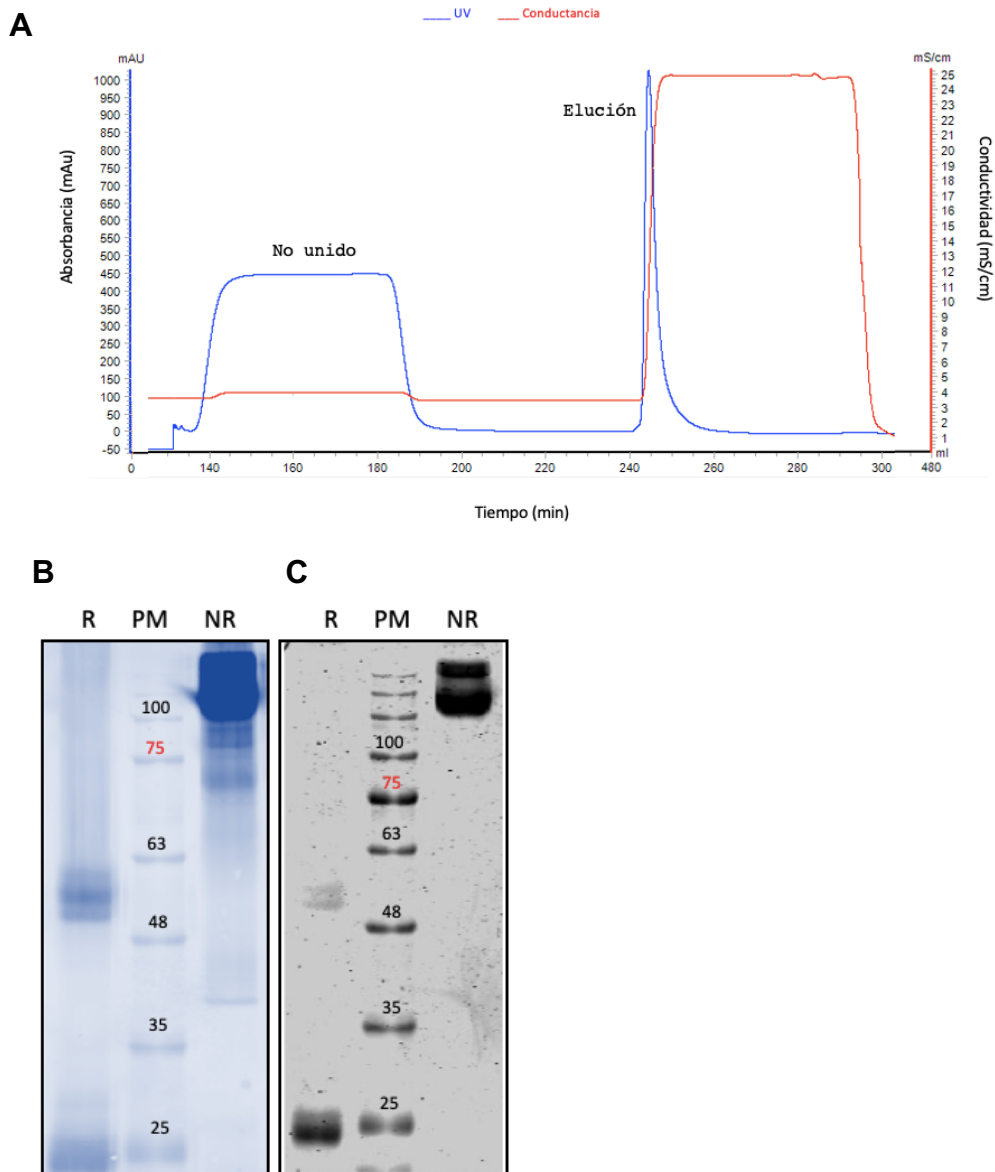


Figura 16. Purificación de suero hiperinmune anti rCD46his porcino en columna de proteína A.

(A) Cromatograma de proceso de purificación. **(B)** SDS-PAGE al 10% y **(C)** Western Blot en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). La inmunodetección se realizó empleando anticuerpo antiMouse Alexa 680.

5.2.2.2 Análisis de la funcionalidad del suero hiperinmune anti rCD46his porcino

El análisis de la funcionalidad del suero hiperinmune antiCD46 generado se realizó mediante ELISA indirecto y citometría de flujo. El ELISA demostró la capacidad del suero hiperinmune de reconocer correctamente a rCD46his porcino hasta la dilución 1:40000 (**Figura 17 A**). Para la citometría de flujo, células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) de origen porcino, fueron incubadas con el suero hiperinmune anti rCD46his o AcM AntiCD46 comercial (**Figura 17 B**). El suero hiperinmune generado durante el presente trabajo reaccionó de forma específica con la proteína rCD46his porcino en condiciones nativas.

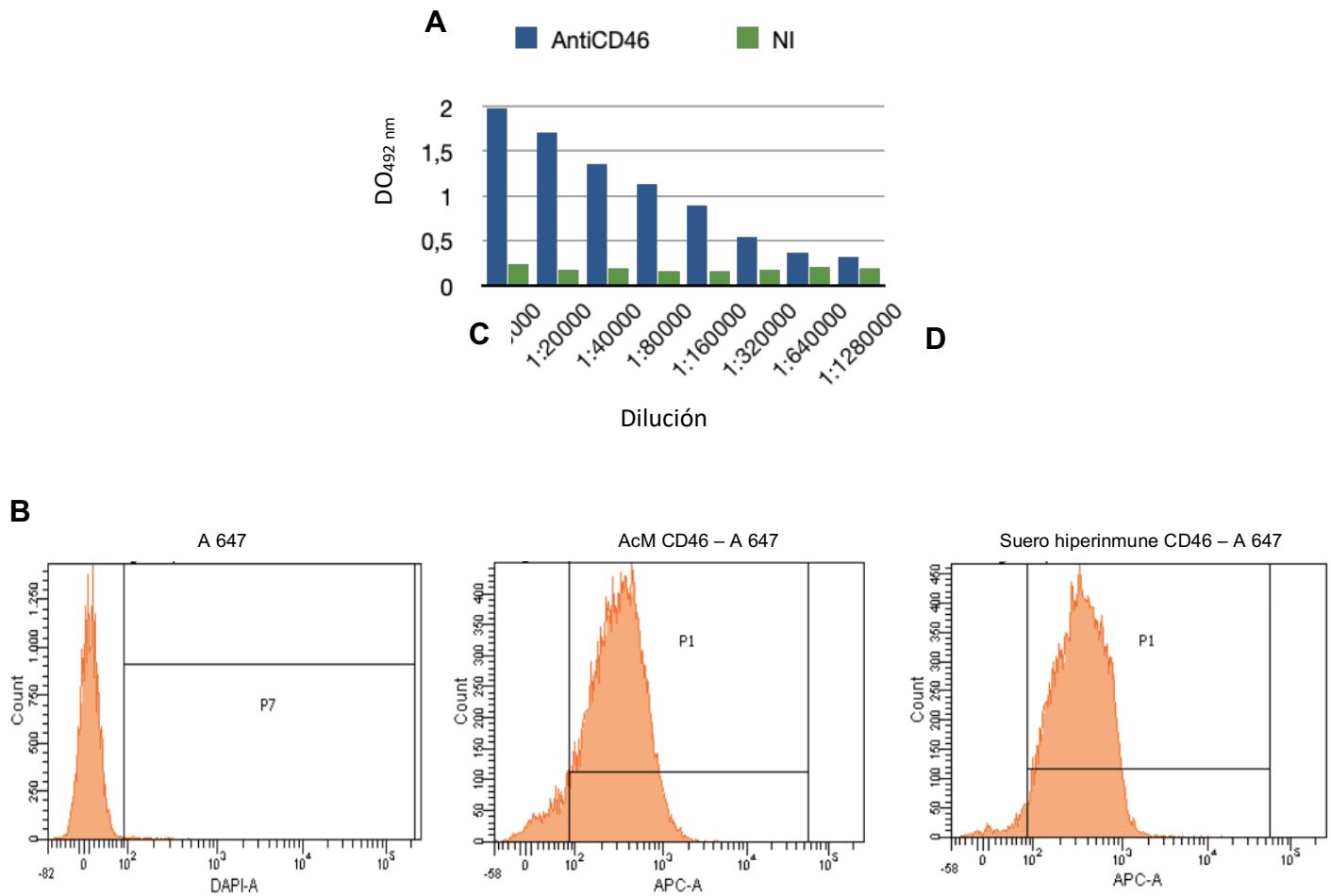


Figura 17. Análisis de la funcionalidad del suero hiperinmune antiCD46 generado.

(A) ELISA indirecto recubriendo con rCD46his porcino (1 µg/pocillo). Luego del bloqueo con Leche (5%)-PBS-T, se añadió el suero hiperinmune purificado en las diluciones indicadas y finalmente se añadió anti-Mouse IgG conjugado HRP. Los resultados se grafican como el promedio de la señal frente a rCD46his porcino de las distintas diluciones del suero hiperinmune o del suero del ratón no inmunizado (NI). **(B, C y D)** Citometría de flujo de células PBMC marcadas con: anti-Mouse-Alexa 647 (A647) **(B)**, anticuerpo monoclonal anti CD46 y A647 (AcM CD46 – A647) **(C)** o suero hiperinmune AntiCD46 y A647 (Suero hiperinmune anti CD46 – A647) **(D)**.

5.2.3 Evaluación del efecto bloqueador de anticuerpos anti-CD46 sobre la infección de variantes de distinta virulencia del virus de la Peste Porcina Clásica

La evaluación de la participación de CD46 porcino como receptor del virus de la Peste Porcina Clásica se realizó mediante un ensayo de bloqueo de la infección viral en células PK15 empleando el suero hiperinmune anti-CD46. Para ello se infectó con la variante Thiverval, atenuada luego de más de 170 pases en cultivo celular. El bloqueo del receptor empleando el suero hiperinmune anti-CD46 porcino redujo la tasa de infección de esta variante de modo dilución dependiente (**Figura 18**). No se observó el bloqueo completo de la infección y al emplear la menor dilución del suero (1:20) alrededor del 15 por ciento de las células resultaron infectadas. Sin embargo, cuando el experimento se realizó infectando con Margarita, variante altamente virulenta y no adaptada a cultivo celular, el bloqueo de CD46 generó una inhibición completa de la infección con una dilución 1:20 (**Figura 19**). El efecto de bloqueo fue igualmente dependiente de la concentración del suero hiperinmune, pero en todos los casos se observó una reducción más marcada de la infección cuando se infectó con Margarita en comparación a lo observado con Thiverval (**Figura 20**).

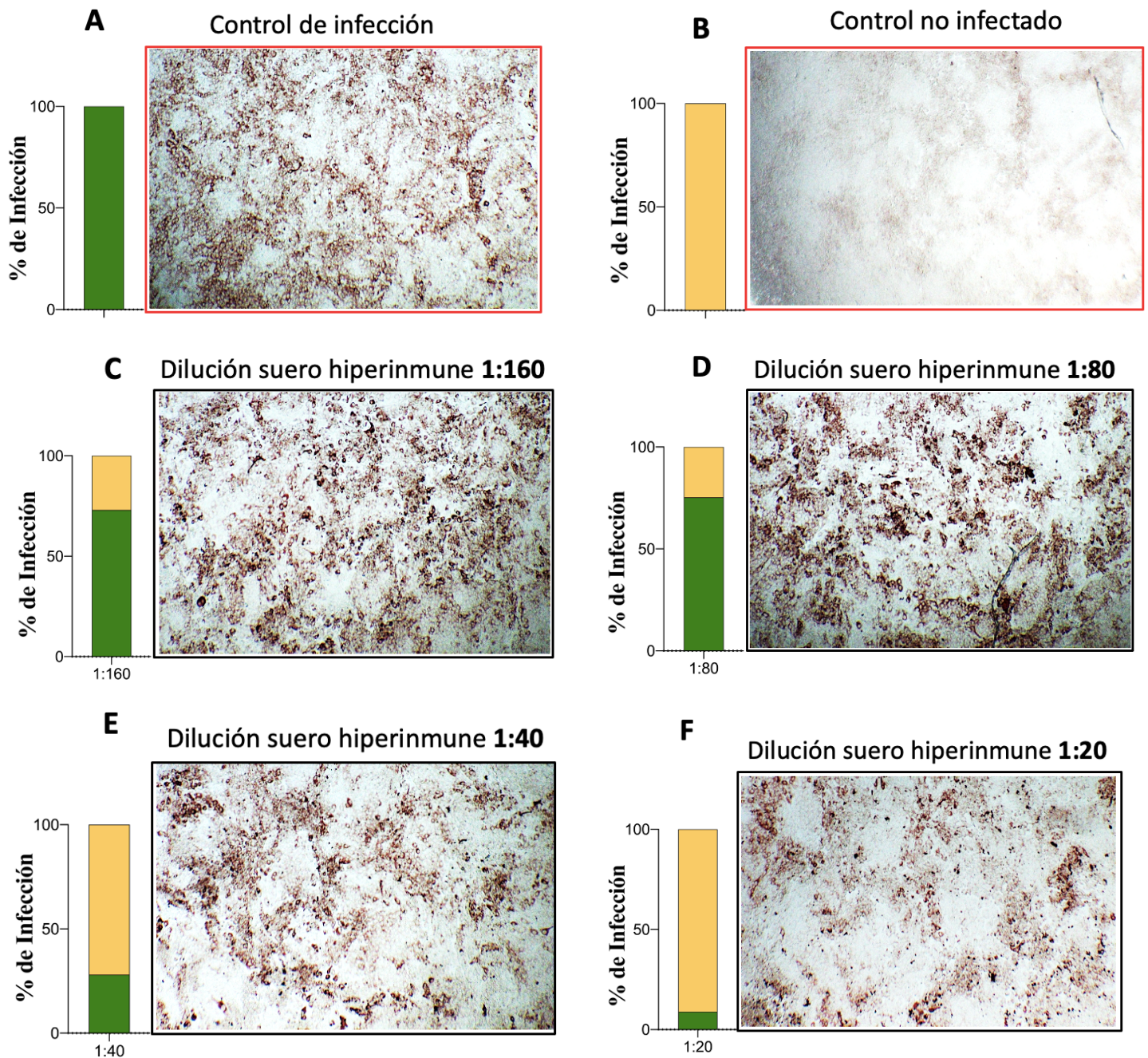


Figura 18. Inhibición de la infección de células PK15 con la variante Thiverval del VPPC en presencia de anticuerpos anti-CD46.

Fotografías representativas del ensayo de inmunoperoxidasa mostrando la inhibición de la infección por Thiverval en células PK15 en presencia de diluciones 1:160 (C), 1:80 (D), 1:40 (E); 1:20 (F) del suero hiperinmune antiCD46. Las células fueron incubadas durante 1 hora con suero hiperinmune anti CD46 y posteriormente infectadas con VPPC

Thiverval a una MOI de 0,1. Se tomó como control positivo del experimento células PK15 infectadas sin incubación previa (**A**) o células sin infectar (**B**). Las células infectadas se visualizan como puntos de color café en las fotografías. Las barras a la izquierda de cada fotografía representan el promedio del porcentaje de células infectadas (verde) con relación al área total (amarillo). Magnificación 40x.

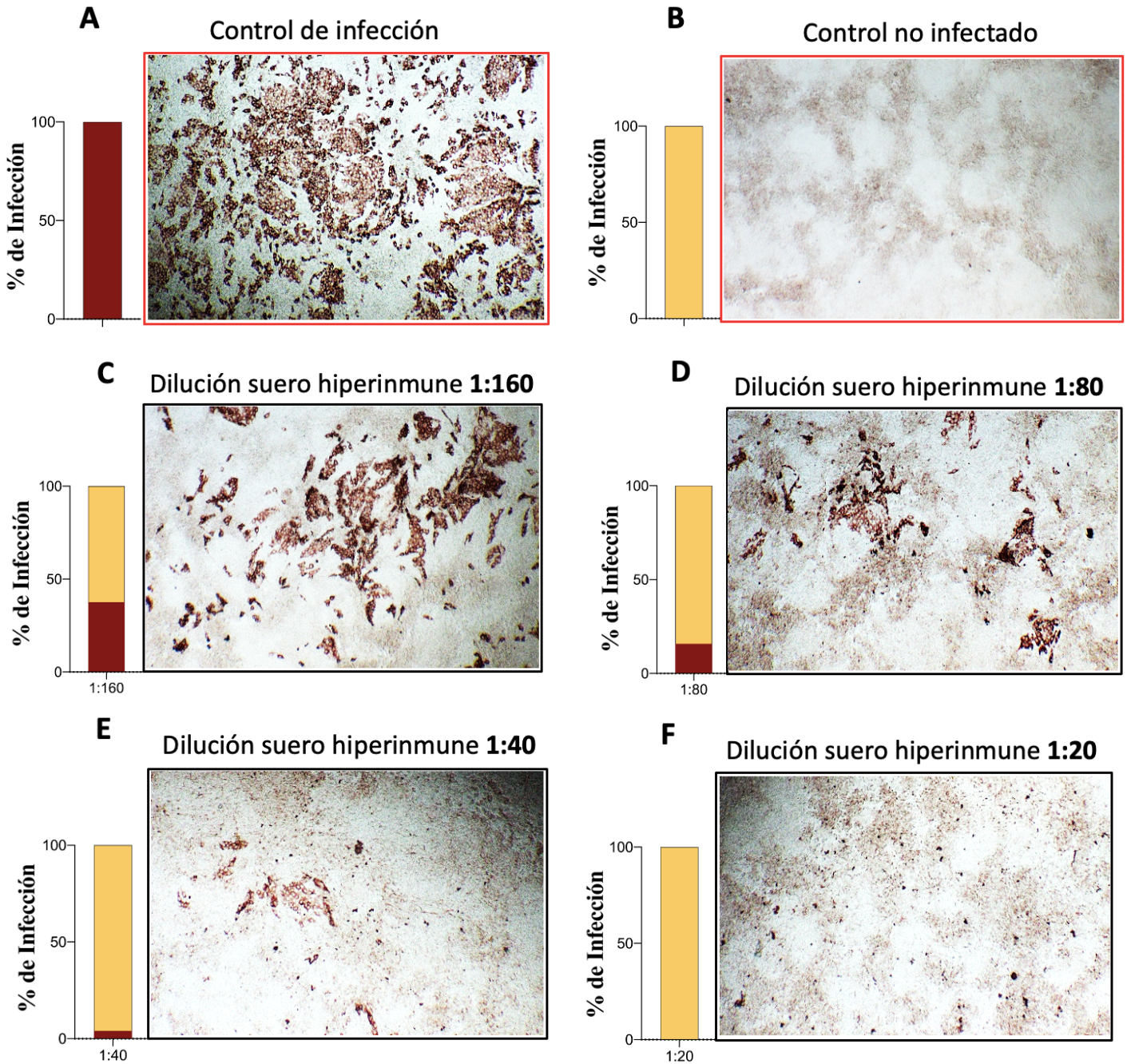


Figura 19. Inhibición de la infección de células PK15 con la variante Margarita del VPPC en presencia de anticuerpos anti-CD46.

Fotografías representativas del ensayo de inmunoperoxidasa mostrando la inhibición de la infección por Margarita en células PK15 en presencia de diluciones 1:160 (C), 1:80 (D), 1:40 (E); 1:20 (F) del suero hiperinmune antiCD46. Las células fueron incubadas durante 1 hora con suero hiperinmune anti CD46 y posteriormente infectadas con VPPC

Margarita a una MOI de 0,1. Se tomó como control positivo del experimento células PK15 infectadas sin incubación previa **(A)** o células sin infectar **(B)**. Las células infectadas se visualizan como puntos de color café en las fotografías. Las barras a la izquierda de cada fotografía representan el promedio del porcentaje de células infectadas (rojo) con relación al área total (amarillo). Magnificación 40x.

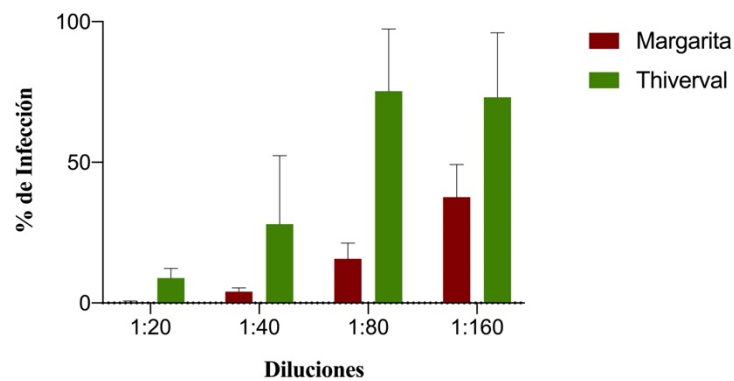


Figura 20. Comparación del porcentaje de infección de las variantes Thival y Margarita en presencia de anticuerpos bloqueadores de CD46.

El porcentaje de infección de cada variante fue determinado en relación con control positivo.

5.3 Análisis *in silico* de la influencia de las mutaciones de Thiverval en la interacción con CD46

5.3.1 Análisis comparativo de las secuencias de las variantes Thiverval, Margarita y Alfort/187

La secuencia correspondiente a la variante Thiverval fue resuelta en el año 2008 por Fan y col. [135]. Se realizó un análisis comparativo de la secuencia de E2 de esta variante con la de Margarita con el objetivo de evaluar qué mutaciones pudieran estar involucradas en los cambios observados en los experimentos *in vitro*. La comparación reveló que los aminoácidos Glutamina, Fenilalanina y Prolina en las posiciones 791, 855 y 1059 respectivamente, son exclusivos de Thiverval. Tanto Margarita como Alfort/187, variante a partir de la que surge Thiverval, poseen en estas posiciones Lisina, Ácido Aspártico y Lisina, respectivamente. Por tanto, se decidió evaluar si las mutaciones encontradas en Thiverval pudieran tener influencia en la disminución de la afinidad por CD46 ya que se observó que el bloqueo del receptor no genera inhibición completa de la infección por esta variante.

Existe la estructura tridimensional resuelta experimentalmente de una proteína E2 cristalizada (código PDB 7EGY) a partir de la cual se modeló la proteína de las variantes Thiverval y Margarita. También se incluyó la E2 de la variante Alfort/187 para poder establecer mejores comparaciones. El modelamiento se realizó mediante la técnica de modelamiento comparativo con el software Modeller (<https://salilab.org/modeller/>). La calidad de los modelos generados fue

evaluada mediante ProSA. El servidor ProSA entrega un puntaje global de calidad del modelo, llamado Z-score, y compara el valor del modelo con el rango de valores de Z-score de aquellos cuyas estructuras se encuentran resueltas experimentalmente [152]. Valores de Z-score fuera de este rango, indican una mayor probabilidad de que el modelo no se aproxime correctamente a la estructura nativa. En nuestro análisis se obtuvieron valores de Z-score de -5,75 para Thiverval, -5,74 para Margarita y - 5,4 en el caso de Alfort/187 (**Figura 21**).

Por otro lado, el análisis de calidad local de los modelos en términos de energía de cada residuo fue negativo a lo largo de las tres estructuras, observándose una cierta positividad en el caso de la E2 de Alfort/187 en el modelamiento de los últimos residuos. En este caso, valores negativos de energía se relacionan con un modelo más estable energéticamente para cada residuo. De acuerdo con los resultados obtenidos la calidad de los modelos generados se consideró adecuada.

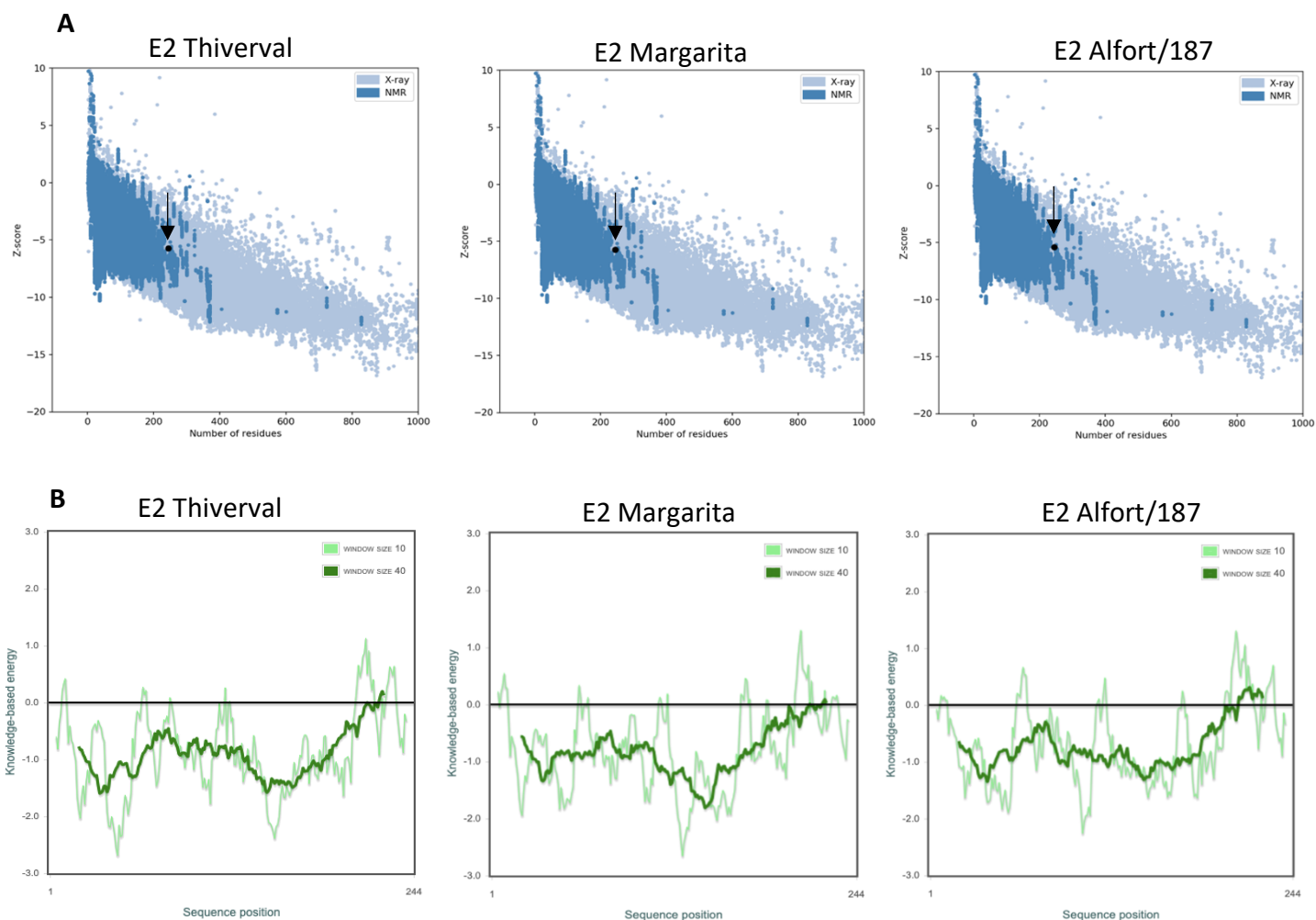


Figura 21. Análisis de calidad con el servidor ProSA de los modelos de estructura tridimensional de E2 generados por Modeller.

(A) Rango de valores de Z-score obtenidos por modelos de estructura tridimensional resueltos experimentalmente mediante cristalografía de rayos x (celeste) y resonancia magnética nuclear (azul). La flecha señala el valor de Z-score obtenido para cada modelo. **(B)** Calidad local de cada modelo determinada por la energía en función de la posición de cada aminoácido en la secuencia.

La superposición de los modelos generados permitió corroborar la alta similitud estructural de la proteína E2 entre estas variantes (**Figura 22**). Aunque no existen diferencias estructurales significativas entre las proteínas modeladas, la mutación D855F, localizada en la zona importante para la interacción con el receptor en la membrana celular, tiene un efecto electrostático importante. Se conoce que las interacciones proteicas son regidas en parte por interacciones electrostáticas. Por tanto, este tipo de cambios en la zona de interacción de la proteína E2 con su receptor podrían dar cuenta de alteraciones en la unión con el receptor de membrana.

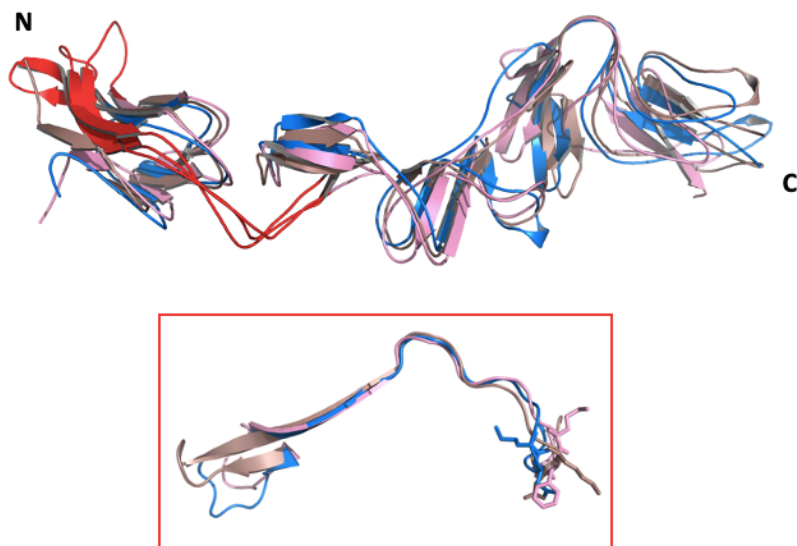


Figura 22. Alineamiento estructural de las glicoproteínas E2 de las variantes Thiverval, Alfort/187 y Margarita.

(A) Superposición de los modelos para E2 de las variantes Thiverval (rosa), Alfort/187 (azul) y Margarita (café) obtenidos empleando como templado la estructura cristalina de E2 de una variante atenuada (PDB 7EGY). Se remarca en rojo la zona importante para la interacción con el receptor de membrana. **(B)** Alineamiento estructural de la zona remarcada en rojo presente en A. En *sticks* se representa el aminoácido 855 cada variante, único motivo mutados en esta región.

Para observar estos efectos, las estructuras modeladas fueron sometidas a un análisis de distribución de carga en la superficie a través el software APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>). Los resultados obtenidos muestran que la distribución de las cargas es diferente entre la variante Thivalval con respecto a Margarita y Alfort/187 (**Figura 23**). Tanto en Margarita como en Alfort/187 en la superficie electrostática de esta zona se encuentra un polo electropositivo y otro electronegativo. Sin embargo, en Thivalval la mutación en el residuo 855 genera la pérdida de carga y de la estructura prominente observada en los demás modelos. Además, cabe destacar que en la variante Thivalval del VPPC la ausencia de la estructura prominente genera una cavidad electropositiva. Estos cambios en el potencial electrostático de la proteína podrían influir en cierto grado en la interacción de E2 con CD46 si en la unión entre ambas las fuerzas electrostáticas desempeñaran un rol preponderante. Por tanto, el cambio electrostático generado por el cambio de Ácido Aspártico por Fenilalanina podría explicar en principio la disminución de la afinidad de E2 por CD46. Sin embargo, las mutaciones en los residuos 791 y 1059, aunque no están dentro de esta zona, también podrían contribuir a este fenómeno. Para evaluar el efecto general de las mutaciones encontradas, se decidió realizar un docking de las proteínas E2 y CD46 de ambas variantes.

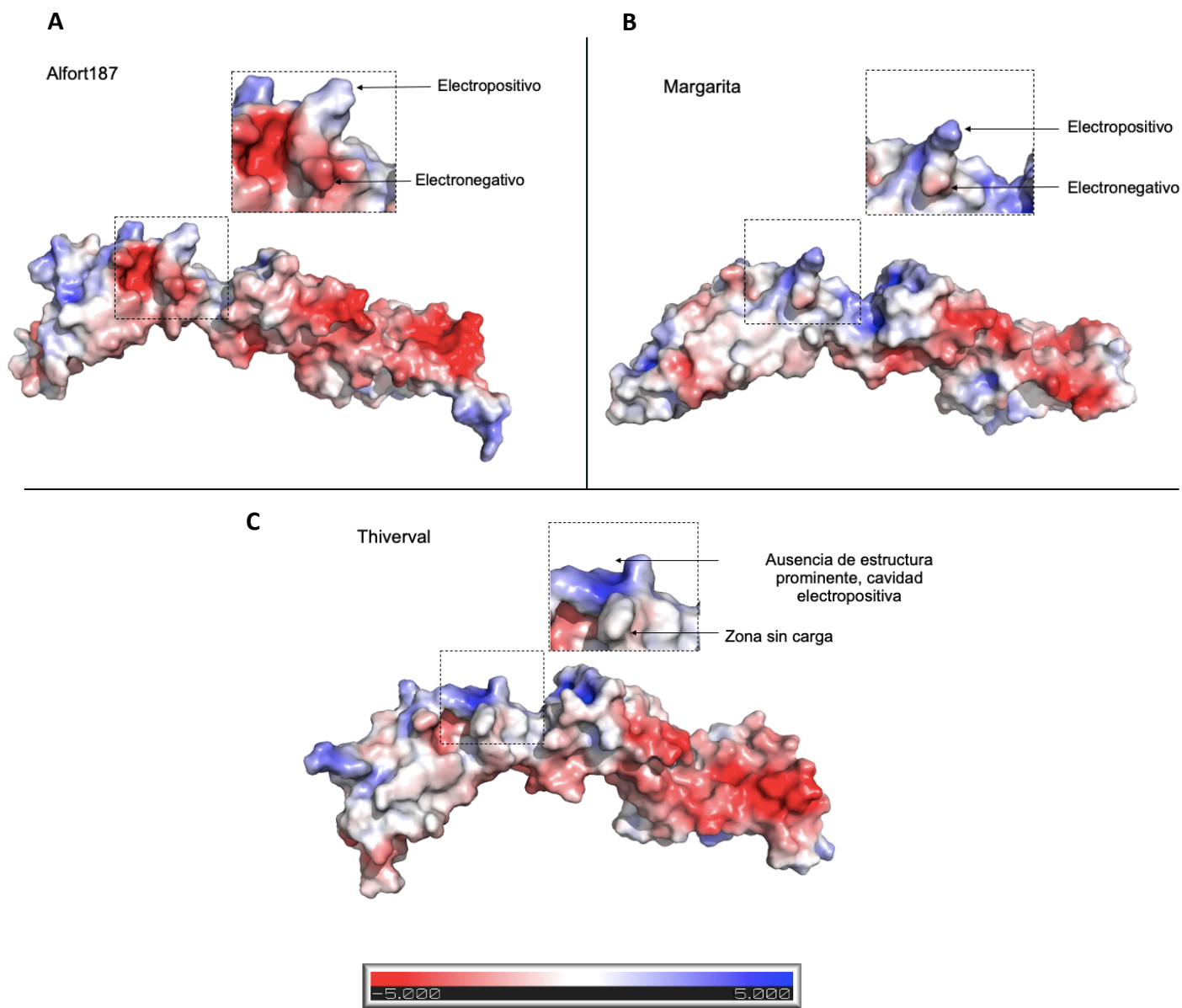


Figura 23. Análisis de potencial electrostático de superficie de las proteínas E2. Las proteínas E2 de las variantes Margarita, Alfort/187 y Thival del VPPC fueron analizadas con el software APBS. Se muestra el potencial electrostático de superficie de las E2 de las variantes destacándose las diferencias entre las variantes virulentas (**A y B**) y Thival (**C**). Se encuentra remarcada la zona en donde se localiza la mutación D855F.

5.3.2 Análisis de docking proteína-proteína entre E2 y CD46 de las variantes Thiverval y Margarita.

Se ha asumido en la literatura que E2 interactúa con la proteína CD46, aunque hasta el momento nadie ha podido caracterizar dicha unión. Esto se debe en parte a que no existe la estructura cristalina del complejo. Por tanto, resulta difícil determinar el grado de participación de CD46 en la infección y el efecto que puedan tener las mutaciones en la proteína E2 en esta interacción. Debido a que se observó en los experimentos *in vitro* un menor efecto del bloqueo en la infección por la variante atenuada y teniendo en cuenta la posible implicación de estas mutaciones en la interacción con el receptor, se decidió realizar un análisis de *docking* proteína-proteína. Para ello la proteína CD46 fue modelada tomando como base la estructura cristalina de su homólogo en humanos. La elevada similitud existente entre ambas proteínas aporta alto grado de confiabilidad en el modelo generado. En el caso de E2 se utilizaron los modelos generados a partir de la estructura tridimensional de la variante atenuada (código PDB 7EGY) resuelta experimentalmente. El docking de las proteínas E2 de las variantes Thiverval y Margarita con CD46 fue realizado mediante el software ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/>). Esta herramienta brinda la alternativa de realizar un docking rígido si se suministran las regiones de probable interacción. Tomando en cuenta la información reportada en la literatura referente a las zonas importantes para la interacción con la membrana en el caso de E2 y con el virus en el caso de CD46, elegimos estas secuencias como aquellas involucradas en

la interacción. Los resultados del docking fueron agrupados por el programa en diferentes modelos que representan *clusters* donde el más poblado de ellos es presentado como el modo de interacción más probable.

Se eligió en cada caso el modelo con mayor probabilidad entre los entregados por el servidor de docking (**Figura 24**) y posteriormente estos fueron analizados con el servidor Prodigy (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>) para conocer la energía libre de unión y predecir los valores de K_d de cada complejo. Prodigy determinó que la energía de libre unión de CD46-E2Thiverval fue de $-10,1$ [kcal/mol] y la K_d de $3,8e-08$, mientras que en el caso de CD46-E2Margarita los valores fueron de $-11,4$ [kcal/mol] y $4,1e-09$, respectivamente. Lo anterior sugiere que los modelos obtenidos pueden ocurrir espontáneamente, aunque es el modelo de CD46-Margarita el de mayor afinidad predicha. La disminución de 1 orden en el valor de la K_d estimada para el modelo de Thiverval, podría en condiciones biológicas pudiera traducirse como una menor eficiencia en la interacción. Por otro lado, las mutaciones en las posiciones 791 y 1059 de E2 podrían estar implicadas en la ganancia de afinidad con algún otro receptor en la membrana.

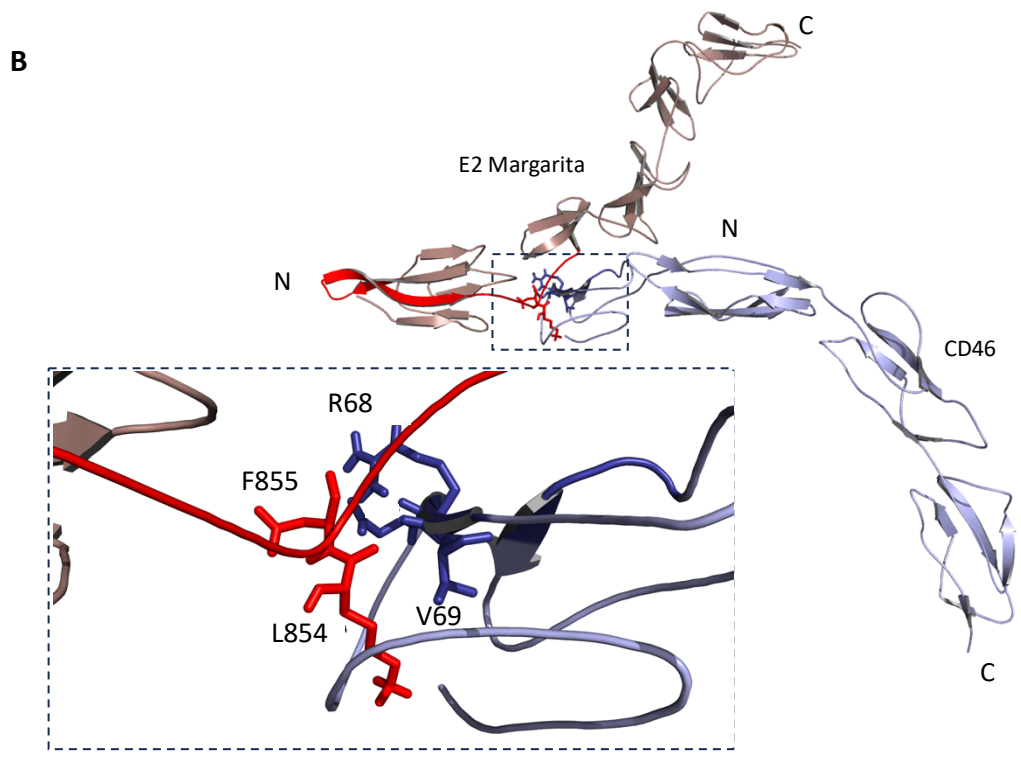
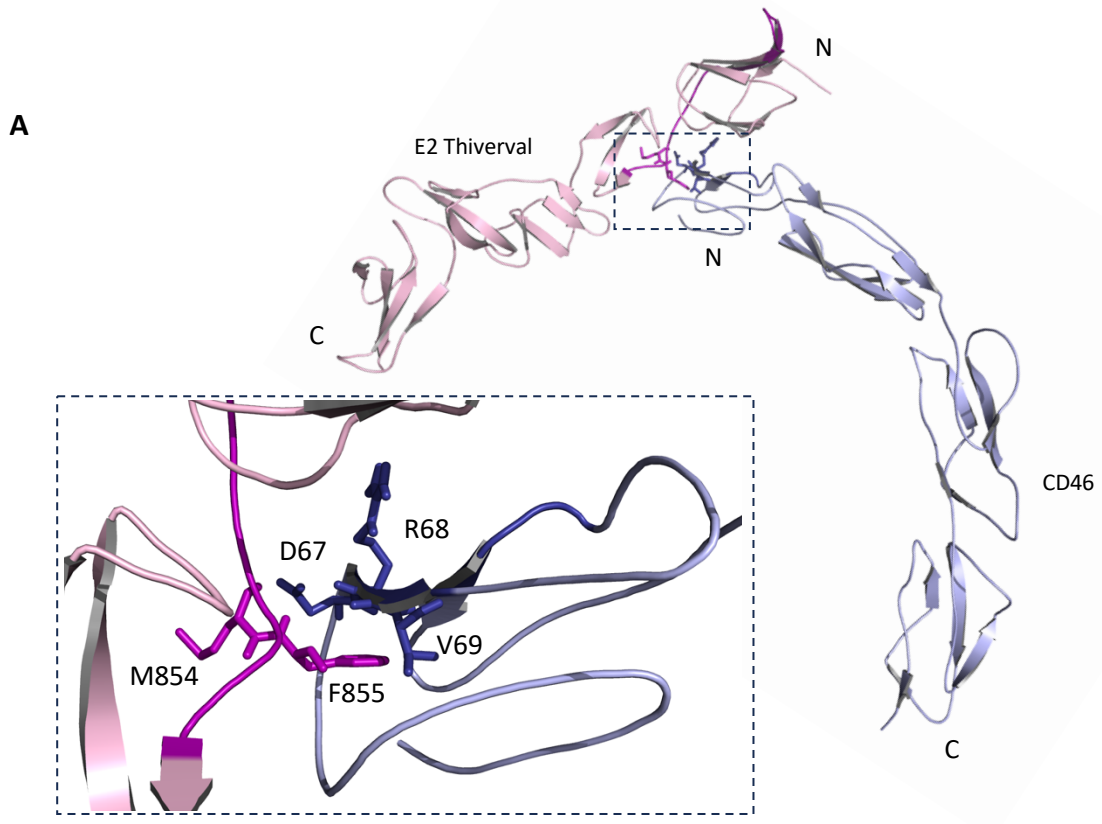


Figura 24. Docking proteína-proteína CD46-E2Thiverval y CD46-E2Margarita generado con ClusPro.

Docking proteína-proteína de las proteínas E2 de Thiverval **(A)** y Margarita **(B)** con CD46. Señalada en rojo o púrpura la zona de E2 reportada como implicada en la interacción.

6. DISCUSIÓN

La Peste Porcina Clásica representa una amenaza para la industria porcina desde el punto de vista sanitario y económico. Además, los riesgos de reemergencia de la enfermedad son altos, tal como se ha observado tras los brotes en países que poseían el estatus de “libres de PPC” desde hacía décadas [2]. La vacunación profiláctica en aquellos lugares donde el virus permanece endémico forma parte de los programas establecidos para prevenir las pérdidas masivas y contener la diseminación del virus. En estos contextos son ampliamente utilizadas las vacunas vivas atenuadas, dentro de las cuales se encuentran las que están basadas en la cepa China. Su administración ha demostrado ser segura y efectiva, sin embargo, el VPPC permanece endémico en muchos países a pesar de los intensos programas de vacunación basados en esta cepa. En los últimos años se ha reportado la aparición de nuevas variantes de mediana y baja virulencia, causantes de formas crónicas y persistentes de la enfermedad que dificultan el diagnóstico y control [127, 157]. Esto se debe probablemente a la presión inmunológica ejercida sobre este tipo de vacunas. Además, en algunos países la producción de esta variante se realiza en conejos, debido principalmente a su baja replicación en células. Esta metodología es controversial, no solo por las implicaciones desde el punto de vista ético y de bioseguridad, sino también por la imposibilidad de predecir el rendimiento y

realizar el escalado de la producción. Por tanto, es conveniente evaluar otras alternativas vacunales obtenidas a través de sistemas estables basados en cultivo celular e igualmente recomendadas por la OIE.

La vacuna atenuada basada en la variante Thiverval del VPPC, ha sido recomendada por la OIE para la vacunación contra el VPPC. Esta ha mostrado una alta eficacia contra la enfermedad. Sin embargo, la información de la que se dispone data de los años 70 y está basada en técnicas desactualizadas. Se desconoce si la variante puede transmitirse, su tasa de replicación en tejidos y órganos y su capacidad de conferir protección en un tiempo menor a 7 días luego de una dosis simple. Desde el punto de vista molecular, no existe información con respecto a si las mutaciones que condujeron a la atenuación de esta variante generan cambios en la interacción con CD46, uno de los receptores que al parecer participa en el proceso de infección del virus. Por tanto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar capacidad de protección temprana de la variante Thiverval del VPPC y el rol de CD46 durante la entrada de ambas variantes a la célula.

6.1 Efecto protector temprano de la variante Thiverval del VPPC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan el uso de la variante Thiverval en la vacunación profiláctica contra el VPPC y en situaciones de emergencia en países donde el virus permanece endémico. En este estudio se demuestran algunas propiedades de esta cepa que son imprescindibles para ser

considerada en los contextos antes mencionados. En primer lugar, la variante Thiverval demostró replicarse eficientemente en órganos linfoides, induciendo a su vez una respuesta inmunológica que puede controlar su replicación en sangre y su excreción en secreciones (**Figura 4**). A los 21 dpi se detectaron cargas virales bajas en los diferentes órganos linfáticos, siendo las amígdalas el sitio principal en el que tiene lugar la replicación inicial de este patógeno [18]. Estudios realizados con la cepa-C reportan la presencia del virus en órganos hasta 2-3 semanas luego de la vacunación [158, 159]. En ningún caso se ha reportado la persistencia del virus vacunal por más de 3 semanas [114]. Por otro lado, la detección de la variante Thiverval en suero y secreciones nasales tiene lugar entre los 4 y 7 días y en todos los casos es baja (**Figura 4**). Estas bajas tasas de replicación favorecen la no transmisión del virus vacunal, lo cual fue evidenciado por la ausencia de carga viral en los animales en contacto (**Figura 4**). Uno de los principales riesgos asociados a las vacunas vivas atenuadas es su transmisión y posible reversión de la virulencia. La transmisión de la variante vacunal LOM, por ejemplo, fue la causa de la reemergencia del VPPC en la isla Jeju en Corea del Sur [160]. En el caso de las vacunas basadas en la cepa-C se ha observado la transmisión del virus vacunal ocasionalmente a animales en contacto, pero no se ha demostrado que este persista en la población [161-163]. Dada la relevancia de esta información, la evaluación de la no-transmisibilidad constituye uno de los requisitos establecidos por la OIE para acreditar la seguridad de las vacunas [5].

La variante Thiverval también demostró la capacidad de proteger a los animales contra la respuesta exacerbada de la enfermedad. Los cuatro grupos de este estudio fueron sometidos al desafío con Margarita, variante altamente virulenta VPPC (**Figura 3**). Esta cepa pertenece al genotipo 1.4 y ha sido utilizada anteriormente en pruebas de eficacia de vacunas anti PPC [110, 141, 164]. Los síntomas clínicos generados por esta variante están clasificados como graves y se manifiestan en un corto período de tiempo, conduciendo a la muerte de los animales con tan solo 7 días después del desafío [141]. Este estudio permitió corroborar lo anterior (**Figura 5**). Sin embargo, los animales vacunados estuvieron protegidos completamente contra los signos clínicos de la enfermedad desde los 5 días post vacunación. Lo anterior disminuye la ventana de tiempo que existe entre la vacunación y el inicio de la protección clínica. Nuestros resultados están en correspondencia con los altos niveles de protección contra los síntomas clínicos luego del desafío que se han reportado para las vacunas basadas en la cepa-C [165, 166]. Entre los 2 y 4 días luego de la vacunación, se ha reportado cierto nivel de protección frente al desafío con variantes virulentas y 7 días después de una vacunación simple esta protección parece ser completa [114]. Cabe mencionar que, en el caso del grupo desafiado a los 21 dpi, además de la protección clínica, los animales estuvieron protegidos de la viremia (**Figura 4**). En el caso de la cepa-C se alcanzan resultados similares una semana después de la vacunación [167].

La variante Thiverval indujo la generación de anticuerpos específicos contra las proteínas E2 y Erns del VPPC a partir del día 14 post vacunación (**Figuras 6, A y 7, A**). Estos resultados están en concordancia con lo reportado para la vacuna China y el candidato vacunal modificado CP7_E2alf [168]. Los anticuerpos generados contra las proteínas E2 y Erns demostraron tener actividad neutralizante (**Figura 8**), la cual está en correspondencia con la robusta protección virológica detectada en los animales desafiados a los 21 dpi. Estos anticuerpos son capaces de neutralizar la infección de la variante empleada en el desafío. La vacunación con la cepa-C induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes que aparece alrededor de las 2 semanas luego de la vacunación y aumenta hasta las 4 a 12 semanas [169]; pueden persistir por muchos años, luego incluso de una dosis simple, pero también se ha observado que en algunos animales la respuesta desaparece [162]. En el caso de los animales desafiados luego de 5 días post vacunación, la respuesta de anticuerpos comienza a detectarse a partir del día 10 posterior al desafío (**Figura 6, B y 7, B**). Sin embargo, el hecho de que los animales estuvieran protegidos de los síntomas clínicos aun en ausencia de anticuerpos es indicativo de que la vacuna basada en la variante Thiverval confiere protección en ausencia de respuesta de anticuerpos. Investigaciones referentes a las reacciones tempranas tras la vacunación sugieren que los anticuerpos neutralizantes no desempeñan un rol en el establecimiento de la inmunidad temprana [170]. Puede suceder que los mecanismos involucrados en la inmunidad celular determinan la inmunidad

desde la primera semana posterior al desafío. Lo anterior también indica que la presencia de anticuerpos neutralizantes al momento del reto no es un requisito para que los animales estén protegidos contra la PPC. Una manera de explicar la sólida protección conferida por la vacuna, así como su eficacia para controlar la replicación viral al poco tiempo de la vacunación, es la activación rápida y transiente de la inmunidad innata, en términos de IFN- α . Los efectos antivirales e inmunomodulatorios de los IFNs tipo I, tales como el IFN- α han demostrado ser muy importantes para controlar la replicación viral [99]. Luego de la vacunación o el desafío, tiene lugar la expresión de genes estimulados por Interferón (ISG; del inglés, *Interferon Stimulated Genes*). Esto ocurre debido a que el VPPC es un fuerte inductor de los interferones de tipo I, siendo la fuente celular principal las células dendríticas plasmocitoides. Se ha demostrado que al menos *in vitro*, la expresión del gen ISG15 tiene lugar en respuesta a variantes virulentas del VPPC. Recientemente también se observó la inducción de este gen en las amígdalas en respuesta a la vacunación con la vacuna China [171]. Estos efectores antivirales se acumulan durante los 5 días post vacunación, generando un estado antiviral en el hospedero e induciendo; por ejemplo, vía RSAD2, una respuesta inmune adaptativa. Si durante esta ventana de tiempo, una cepa virulenta del VPPC intenta infectar al hospedero, la multitud de efectores antivirales ya están presentes dentro de la célula y pueden prevenir inmediatamente la replicación del virus y finalmente asistir en la prevención del establecimiento de la infección. Sin una vacunación previa, se favorece

principalmente la replicación de la cepa virulenta del VPPC y aunque también se induce la expresión de los efectores antivirales de interferón y ISG15, estos no pueden competir con la velocidad de replicación del virus y por tanto no son capaces de controlar efectivamente la replicación viral antes que las respuestas adaptativas puedan ser activadas, conduciendo inevitablemente al desarrollo de los síntomas clínicos [114]. En nuestro caso los niveles de IFN- α se incrementaron tras la vacunación alcanzando valores superiores a las 150 unidades/mL (**Figura 9 A**). En el caso de los animales desafiados a los 21 dpi se observó que los niveles de la citoquina regresan a valores normales a partir del día 7 pi, aunque en uno de los animales para el día 21 pi aún permanecían cercanos a las 50 unidades/mL. Creemos que esto pudo deberse a que este animal en particular estuviera atravesando algún proceso infeccioso no relacionado con el estudio. De modo general la activación rápida y transiente de la inmunidad innata en términos de la respuesta de IFN- α contra el VPPC, puede explicar la sólida protección que brinda la vacuna, así como su eficacia para el control de la replicación viral poco tiempo después de la vacunación. Estos resultados aportan evidencia acerca de los mecanismos implicados en la protección de las vacunas contra la PPC en ausencia de una respuesta humoral específica. Sin embargo, aunque es deseable que se produzca una estimulación de la inmunidad celular mediada por los interferones tipo I, reportes previos han demostrado que existe una relación entre los niveles elevados de IFN- α y la severidad de la enfermedad [99]. Niveles elevados de interferón alfa son

característicos de una enfermedad aguda y tienen una relación directa con la virulencia de la cepa [172-174]. Independientemente del rol funcional de los interferones durante la infección viral, la elevación de sus niveles es contraproducente pues no limita la replicación viral y conducen al desarrollo de la inmunopatología asociada a la enfermedad. Este estado se caracteriza por una severa depleción linfocitaria, apoptosis de los linfocitos y trombocitopenia, manifestándose clínicamente como una fiebre hemorrágica viral [171]. Estos síntomas fueron observados en los animales no vacunados de este estudio y se correspondieron con niveles de IFN- α superiores cercanos a las 300 unidades/mL luego de 4 dpd (**Figura 9 B**). Por el contrario, la variante vacunal protegió a los animales contra esta respuesta exacerbada de IFN- α observada en el grupo control.

La variante Thiverval también limitó la replicación del virus del desafío en los animales vacunados (**Figura 10**). Aun cuando algunos animales fueron positivos a la detección de ARN en los fluidos a los 10 dpd, en todos los casos la carga viral fue baja y no se pudo aislar en virus en cultivos celulares. Además, no se detectó replicación viral en las muestras de bazo de los animales vacunados en el caso del grupo desafiado luego de 21 dpi, mientras que fue baja en el caso del grupo desafiado a los 5 dpi. En las amígdalas y los linfonodos mesentéricos, la carga de ARN de Margarita estuvo entre moderada y baja en ambos grupos vacunados. En el caso del grupo desafiado a los 21 dpi es probable que la carga viral sea el resultado de la exposición prolongada al virus del desafío, debido al

contacto estrecho entre los animales vacunados y los contactos que estaban expulsando grandes cantidades de virus. Considerando lo anterior, la variante Thiverval protegió a los animales no solo del desafío inicial sino también del “doble desafío” impuesto por los contactos.

Los resultados obtenidos tras la administración de la vacuna aportan nueva evidencia que favorece su administración especialmente en regiones en las que el VPPC permanece endémico. El grado de protección, en términos clínicos, de inducción de respuesta inmunológica y de inhibición de la replicación viral con solo 5 días post vacunación, no había sido evaluado para esta variante. Para la vacunación de emergencia, la rapidez con la que la vacunación previene la diseminación del virus es de vital importancia. Este conocimiento es crucial para la toma de decisiones con respecto al uso de la vacunación en lugar de las políticas de muerte por sacrificio. Nuestra investigación indica que a los 5 dpi todos los animales están protegidos contra los síntomas clínicos de la enfermedad, la viremia y la cantidad de virus presente en las secreciones y órganos es bajo. La variante vacunal induce una respuesta de anticuerpos capaz de contener la diseminación del virus desde los 14 dpi, pero aún en ausencia de esta respuesta, la vacuna es capaz de proteger a los animales de los síntomas clínicos. Investigaciones futuras deberían evaluar su capacidad de inhibir la transmisibilidad del virus del desafío hacia animales en contacto y la inducción de la respuesta celular. En zonas endémicas, además de la vacunación deben desarrollarse campañas bien diseñadas, sistemáticas e intensivas, que incluyan

métodos diagnósticos eficaces, para lograr la erradicación de la patógeno. Estudios posteriores deberían evaluar la efectividad de la administración oral de esta vacuna para proteger a la población de cerdos salvajes de la enfermedad. La persistencia del VPPC en este grupo es una amenaza continua, y la vacunación oral de esta población de animales puede contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad y por tanto reducir el número de brotes en la población doméstica.

6.2 Rol del receptor CD46 en la infección *in vitro* por la variante Thiverval del virus de la Peste Porcina Clásica.

La motivación para investigar acerca del rol de CD46 en la infección por el VPPC surge de una falta de evidencia clara respecto a este tema. La mayoría de los estudios realizados evalúan la participación de su homólogo durante la infección por el VDVB. En bovinos el proceso *in vitro* implica la siguiente secuencia de eventos: (i) en un inicio la proteína Erns del VDVB interactúa con HS, (ii) luego E2 se une a CD46 bovino, (iii) posteriormente tiene lugar la entrada del virus a la célula a través de endocitosis mediada por receptor y dependiente de clatrina y (iv) para finalizar, la acidificación del endosoma induce la fusión y liberación del patógeno [175]. El VDVB también puede transmitirse a través de las uniones celulares estrechas por mecanismos independientes de CD46, lo cual indica que existen factores adicionales involucrados en su transmisión [176]. Ahora bien, en cuanto a CD46 porcino, la evidencia respecto a su participación en la infección

por el VPPC está sustentada solo por dos estudios, que además reportan resultados contradictorios. Según Dräger y col. [78], CD46 porcino y HS constituyen a nivel *in vitro* los factores principales de unión del virus. Pero, recientemente otro grupo de investigadores negó la participación de la proteína en la infección [93]. En esta tesis decidimos evaluar el efecto del bloqueo de la proteína en la infección por la variante VPPC Thiverval, atenuada y adaptada a cultivo celular, y compararla con Margarita, variante no adaptada a cultivo y empleada en el desafío.

Para los experimentos de bloqueo se empleó un suero hiperinmune anti CD46 generado luego de la inmunización con la proteína CD46 recombinante. El uso de anticuerpos monoclonales tiene la desventaja de que, si el sitio de reconocimiento de la molécula no es el mismo que el del virus, la infección podría no verse afectada, lo cual tiene menos probabilidades de ocurrir cuando se trabaja con anticuerpos policlonales. Previamente se ha reportado la generación de suero anti CD46 bovino para estudios similares [177].

La proteína rCD46his generada en este trabajo se expresó en el sobrenadante de cultivo con rendimiento similar y pureza superior a los reportados para proteínas como la Hormona de Crecimiento humano (107 mg/L y 82% de pureza) en el mismo sistema de expresión [178]. Un factor determinante en estos resultados fue la incorporación del péptido señal de Albúmina humana, el cual se encuentra dentro de los más utilizados para la expresión de proteínas complejas en el sobrenadante [179, 180]. Para la expresión de la proteína se eligieron las

células CHO-K1, por su capacidad de producir proteínas complejas con las correspondientes modificaciones post-traduccionales, incluyendo el correcto plegado de estas y la glicosilación [181]. Hasta donde tenemos conocimiento, nadie ha reportado la expresión de CD46 porcino en el sobrenadante de cultivo de células superiores. La expresión de la proteína también será útil para caracterizar, en experimentos posteriores, su interacción con la proteína E2 del VPPC. Esta caracterización estaba contemplada inicialmente en este trabajo, sin embargo, no se pudo llevar a cabo debido al silenciamiento del constructo que codificaba para la proteína E2 del virus. La purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos a través del tag de Histidina permitió su obtención mayoritaria en la fracción eluida con 40 mM de Imidazol (**Figura 13**). Se esperaba la elución de la proteína a concentraciones de Imidazol superiores a los 100 mM, y el resultado obtenido pareciera ser evidencia de una débil unión de la proteína a la matriz. En el diseño del vector las 6 Histidinas se encuentran en el extremo C-terminal de la secuencia, y aunque es la localización más comúnmente empleada, en el caso de esta proteína en particular, podría ocurrir que durante el plegamiento este tag quede menos expuesto en la superficie y por tanto sea menos accesible al ion inmovilizado. La proteína rCD46his se expresó como 2 glicofomas (**Figura 14**), lo cual también ha sido observado durante la producción en células CHO de proteínas recombinantes como el IFN-gamma [182]. Esto fue comprobado luego de la digestión con PNGasa F al observarse que en condiciones desnaturalizantes la proteína migra

como una banda única (**Figura 14, C**). En ambas condiciones el tratamiento con la enzima redujo el peso molar de la proteína, lo cual es indicativo de la presencia de N-glicosilaciones. Se ha identificado la influencia de aminoácidos como la Asparagina en la generación de estados de transición inestables y variaciones en la ocupancia de los restantes sitios potenciales de glicosilación [183].

La proteína fue empleada para generar un suero hiperinmune de origen murino anti CD46, el cual reconoció a la proteína CD46 en células PBMC de cerdos no infectados, con una eficiencia similar a la del anticuerpo monoclonal comercial (**Figura 17 B**). Esto corroboró adicionalmente la identidad de la proteína recombinante obtenida en este trabajo. Este suero fue empleado en los experimentos de bloqueo de la infección por las variantes Thiverval (**Figura 18**) y Margarita (**Figura 19**) del VPPC. La identificación de las células infectadas sugiere que en el caso de la variante Thiverval, tras la adaptación a cultivo celular esta ha desarrollado mecanismos de ingreso a la célula independientes de CD46. Esto se asemeja a lo observado por Dräger y col. [78], con la variante Roesrath en donde el efecto del bloqueo de la proteína mediante anticuerpos tuvo un menor efecto luego de la adaptación a cultivo celular. El hecho de que el bloqueo de todos modos afecte la infección es indicativo de que CD46 está involucrado en el proceso, aunque no resulta indispensable luego de la adaptación del virus a cultivo celular. Nuestros resultados se contradicen con lo reportado por Cagatay, G.N. y col. [93] quienes en experimentos de infección realizados con un grupo de células knockout para CD46, no encontraron que la proteína estuviera

involucrada en la entrada del VPPC. Sin embargo, en este estudio no quedó claro si las variantes empleadas habían sido adaptadas a cultivo celular, lo cual de acuerdo con lo que se ha visto, tiene una alta incidencia en los mecanismos empleados por el virus para su ingreso a la célula. También se debe tener en cuenta que la proteína CD46 es objeto de empalme alternativo, y que el uso de siRNA puede afectar de diferente modo a las isoformas generadas [184]. De todos modos, dada la existencia de mecanismos de ingreso independientes de esta proteína, no sería ilógico pensar que variantes del VPPC hayan desarrollado mecanismos de ingreso totalmente independientes de CD46.

Otro tema relevante es la participación de CD46 en la infección. ¿Es el receptor del virus, un co-receptor o solo una proteína de unión que facilita la interacción posterior que induce la entrada? En el caso del VPPC no existe una respuesta definitiva al respecto. Lo único que parece estar claro es que la entrada de este pestivirus puede requerir de más de una proteína, y al mismo tiempo ajustarse rápidamente al uso de otras moléculas. El marcaje de CD46 en bovinos ha permitido asociarla a los eventos de entrada del VDVB [175]. Se observó que desempeña un rol importante durante el ingreso del virus, pero no tanto así durante su movilidad en la membrana, lo cual sugiere la presencia de factores adicionales capaces de interactuar con el virus y dirigirlo hacia CD46. Sin embargo, esto no ha sido abordado para el VPPC, aunque de estar ocurriendo algo similar, HS pudiera encontrarse entre los factores que contribuyen a concentrar a algunas variantes del virus en la membrana, facilitando su

interacción con el/los receptores de entrada. En el estudio de Dräger y col. [78], la inhibición fue restaurada al emplear la variante adaptada a cultivo pero realizando la incubación previa con anticuerpos antiCD46 junto a un inhibidor de la unión a HS. Esta hipótesis ha sido corroborada parcialmente por la identificación de mutaciones en las proteínas estructurales tras la adaptación del virus a cultivo celular. En un estudio en donde se realizó un análisis de las secuencias del genoma viral completo de Eystруп, un derivado recombinante del VPPC con 10 pases en cultivo (vEy-37 VP10) se identificaron mutaciones en 2 nucleótidos en la secuencia codificante de Erns [185]. Estas mutaciones generaron un cambio de Serina y Treonina por Arginina e Isoleucina en las posiciones 476 y 477, respectivamente, de la glicoproteína Erns. Previamente se ha reportado la misma mutación del residuo Serina por Arginina en la posición 476 de la poliproteína luego de los pases de un derivado de VPPC Brescia en células SK-6 [58]. Estos autores mostraron que el cambio aminoacídico de Serina por Arginina indujo al virus a emplear HS como un receptor en las células SK-6 [185]. Sin embargo, en el caso de Thiverval el análisis de su secuencia no reveló la introducción de ninguna mutación en Erns. Lo que pudiera indicar que, en el caso de esta variante, no es Erns quien favorece la interacción con otras proteínas de unión.

6.3 Influencia de los cambios conformacionales de la E2 de Thiverval en la interacción con CD46

El análisis *in silico* de las mutaciones que tienen lugar en la proteína E2 nos permite formular una hipótesis que explique los resultados de los experimentos de bloqueo de la infección *in vitro*. Encontramos que estas mutaciones generan una disminución en la K_d de un modelo de interacción E2-CD46 en el caso de Thiverval, en comparación con el modelo generado para Margarita (**Figura 24**). Consideramos que esto podría traducirse en una menor eficiencia de interacción con CD46 y a su vez en el desarrollo de mecanismos de ingreso a la célula independientes a esta proteína. Se ha observado, por ejemplo, en el caso del virus del sarampión, que una mutación de Asparagina por Tirosina es suficiente para explicar la menor afinidad por CD46, receptor empleado por este virus para infectar a las células humanas [186]. En el caso de Thiverval una de las mutaciones encontradas, la D855F, se encuentra en una zona previamente identificada como importante para la interacción del virus con su receptor en la membrana de las células. Por lo que existe la posibilidad que esta mutación, que además genera un cambio importante en el potencial electrostático de la zona (**Figura 23**), pudiera estar implicada en la disminución de la afinidad por CD46. Estudios más detallados han demostrado que los sitios de interacción para los receptores celulares en las glicoproteínas virales se solapan al menos de forma parcial y que la alteración de un solo aminoácido puede ser suficiente para cambiar las preferencias por un determinado receptor [186]. Creemos que la

influencia de esta mutación podría ser evaluada con mayor profundidad empleando herramientas como la mutagénesis sitio dirigida. Las otras dos mutaciones encontradas en la proteína, P791L y L1059Q bien podrían estar relacionadas con la ganancia de afinidad por algún otro receptor. En el caso del virus de la fiebre amarilla (VFA) se ha observado que las mutaciones que tienen lugar luego de la atenuación son responsables de un cambio en la entrada a la célula dependiente de clatrina a un mecanismo independiente de esta a través del uso de un receptor diferente [187]. Se cree que estos mecanismos de entrada diferentes dan cuenta, en el caso del VFA, de las diferencias observadas en la respuesta inmunológica que generan la variante nativa y la atenuada.

Los resultados obtenidos *in vitro* e *in silico* constituyen una base para profundizar en cómo las mutaciones en las proteínas virales involucradas en el proceso de entrada podrían modificar este evento y eventualmente, estar relacionadas con la atenuación viral. Los análisis *in silico* aquí realizados constituyen tan solo una aproximación primaria al estudio de los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en la atenuación de esta variante. El marcaje de las proteínas virales y del receptor y la introducción de mutaciones sitio dirigidas en los dominios implicados en la interacción virus-receptor, son algunos de los métodos que podrían ayudar a dilucidar mejor los eventos moleculares que permiten la entrada del VPPC a la célula. La existencia de mecanismos de entrada independientes de CD46 demuestran que el proceso de entrada de los pestivirus es más diverso de lo que se alcanza a imaginar y que el VPPC puede haber

desarrollado mecanismos de infección que difieren de los descritos hasta el momento para otros miembros del género Pestivirus.

7. CONCLUSIONES

1. La formulación vacunal basada en la variante Thiverval del virus de la Peste Porcina Clásica confiere protección contra los signos clínicos de la enfermedad y la viremia cuando se administra 5 días antes del desafío con 10^5 TCID₅₀ de Margarita, variante altamente virulenta del VPPC.
2. La variante Thiverval se replica preferentemente en los órganos linfáticos primarios y no genera viremia ni es detectada en el suero, secreciones o tejidos de los animales en contacto.
3. La variante Thiverval emplea CD46 como receptor durante la entrada a la célula pero al mismo posee mecanismos de ingreso independientes de esta proteína.
4. La mutación de D855F en la E2 de Thiverval parece ser responsable de la reducción en la afinidad por el receptor CD46.

8. RECOMENDACIONES

- 1.** Estudiar y caracterizar la inmunidad celular inducida por la variante Thiverval del VPPC.
- 2.** Caracterizar la interacción de las proteínas E2 de las variantes Thiverval y Margarita con CD46.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Postel, A., et al., *Reemergence of classical swine fever, Japan, 2018*. Emerging infectious diseases, 2019. **25**(6): p. 1228.
2. Ganges, L., et al., *Classical swine fever virus: The past, present and future*. Virus research, 2020. **289**: p. 198151.
3. Cole, C.G. and S.N. Brooks, *History of hog cholera research in the US Dept. of Agriculture, 1884-1960*. 1949: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
4. Birch, R., *Chapter I: History and economic importance*. Hog Cholera It s Nature and Control. The Macmillan Company, New York, NY, USA, 1922: p. 1-7.
5. OIE, *Chapter 15.2: Infection with Classical Swine Fever Virus*. Terrestrial Animal Health Code, 2021. **1**.
6. WOA. *Official Disease Status in Classical Swine Fever*. 2022 [cited 2022 30/09/2022]; Available from: <https://www.woah.org/en/disease/classical-swine-fever/#ui-id-2>.
7. Garrido Haro, A., et al., *Phylogenetics of classical swine fever virus with emphasis on Ecuadorian strains*. Transboundary and emerging diseases, 2018. **65**(3): p. 782-790.
8. Pineda, P., et al., *Descriptive epidemiology of classical swine fever outbreaks in the period 2013-2018 in Colombia*. PloS one, 2020. **15**(6): p. e0234490.
9. Silva, M.N., et al., *Identification and genetic characterization of classical swine fever virus isolates in Brazil: a new subgenotype*. Archives of virology, 2017. **162**: p. 817-822.
10. Choe, S., et al., *Rapid spread of classical swine fever virus among South Korean wild boars in areas near the border with North Korea*. Pathogens, 2020. **9**(4): p. 244.
11. Isoda, N., et al., *Dynamics of classical swine fever spread in wild boar in 2018–2019, Japan*. Pathogens, 2020. **9**(2): p. 119.
12. Anonymous, *COUNCIL DIRECTIVE 2001/89/EC of 23 October 2001 on Community measures for the control of classical swine fever*. Off. J. Eur. Communities, 2001: p. 5–35.
13. Fernández-Carrión, E., et al., *Implementation and validation of an economic module for the epidemiological model Be-FAST to predict the costs generated by livestock diseases epidemics. Application to the Classical Swine Fever case in Spain*. 2015.

14. Elbers, A., *Local and global impact of disease outbreaks*. Adv Pork Prod, 2002. **13**: p. 17-27.
15. Terán, M.V., N.C. Ferrat, and J. Lubroth, *Situation of classical swine fever and the epidemiologic and ecologic aspects affecting its distribution in the American continent*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1026**(1): p. 54-64.
16. Coronado, L., et al., *Positive selection pressure on E2 protein of classical swine fever virus drives variations in virulence, pathogenesis and antigenicity: Implication for epidemiological surveillance in endemic areas*. Transboundary and emerging diseases, 2019. **66**(6): p. 2362-2382.
17. Kümmerer, B.M., et al., *The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses*. Veterinary Microbiology, 2000. **77**(1): p. 117-128.
18. Blome, S., et al., *Classical Swine Fever—An Updated Review*. Viruses, 2017. **9**(4): p. 86.
19. Vilček, Š. and P.F. Nettleton, *Pestiviruses in wild animals*. Veterinary Microbiology, 2006. **116**(1): p. 1-12.
20. Muasya, D., et al., *Evaluation of antibody and antigen cross-reaction in Kenyan dairy cattle naturally infected with two pestiviruses: Bovine viral diarrhea virus and classical swine fever virus*. Veterinary World, 2022. **15**(5): p. 1290.
21. Rügenapf, T., et al., *Hog cholera virus—characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones*. Virology, 1989. **171**(1): p. 18-27.
22. Thiel, H., et al., *Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus*. Journal of virology, 1991. **65**(9): p. 4705-4712.
23. Rügenapf, T., et al., *N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis*. Journal of virology, 1998. **72**(3): p. 2544-2547.
24. Ji, W., et al., *Studying classical swine fever virus: making the best of a bad virus*. Virus research, 2015. **197**: p. 35-47.
25. Sun, S.Q., et al., *Genetic typing of classical swine fever virus isolates from China*. Transboundary and Emerging Diseases, 2013. **60**(4): p. 370-375.
26. Li, S., et al., *Complex Virus–Host Interactions Involved in the Regulation of Classical Swine Fever Virus Replication: A Minireview*. Viruses, 2017. **9**(7): p. 171.
27. Shi, B.-J., et al., *Entry of classical swine fever virus into PK-15 cells via a pH-, dynamin-, and cholesterol-dependent, clathrin-mediated endocytic pathway that requires Rab5 and Rab7*. Journal of virology, 2016. **90**(20): p. 9194-9208.
28. Wang, Z., et al., *Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry*. Virology, 2004. **330**(1): p. 332-341.
29. Hulst, M. and R. Moormann, *Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E (rns) and E2 of classical swine fever virus: E (rns) and E2 interact with different receptors*. Journal of General Virology, 1997. **78**(11): p. 2779-2787.

30. Fernández-Sainz, I.J., et al., *Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on Classical Swine Fever Virus replication*. *Virology*, 2014. **456-457**: p. 121-130.
31. Poole, T.L., et al., *Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry*. *Virology*, 1995. **206**(1): p. 750-754.
32. Donis, R.O., *Molecular Biology of Bovine Viral Diarrhea Virus and its Interactions with the Host*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1995. **11**(3): p. 393-423.
33. David, M. and P.H. Knipe, *Flaviviridae: Hepatitis C viruses: features of the nonstructural proteins*. *Fields Virology* (sixth ed.), 2013: p. 733.
34. Ruggli, N., et al., *Npro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction*. *Virology*, 2005. **340**(2): p. 265-276.
35. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. *Nucleic acids research*, 2014. **42**(D1): p. D503-D509.
36. Tratschin, J.-D., et al., *Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture*. *Journal of virology*, 1998. **72**(9): p. 7681-7684.
37. Fiebach, A.R., et al., *Classical swine fever virus Npro limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7*. *Journal of virology*, 2011. **85**(16): p. 8002-8011.
38. Johns, H.L., et al., *The classical swine fever virus N-terminal protease Npro binds to cellular HAX-1*. *Journal of general virology*, 2010. **91**(11): p. 2677-2686.
39. Wong, M.-L., et al., *Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of 3' -Terminal Region of Classical Swine Fever Virus LPC Vaccine Strain*. *Virus Genes*, 1998. **17**(3): p. 213-218.
40. Elbers, K., et al., *Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7*. *Journal of virology*, 1996. **70**(6): p. 4131-4135.
41. Gladue, D.P., et al., *Classical swine fever virus p7 protein is a viroporin involved in virulence in swine*. *Journal of virology*, 2012. **86**(12): p. 6778-6791.
42. Lin, Z., et al., *Classical swine fever virus and p7 protein induce secretion of IL-1 β in macrophages*. *Journal of General Virology*, 2014. **95**(12): p. 2693-2699.
43. Moulin, H.R., et al., *Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation*. *Virology*, 2007. **365**(2): p. 376-389.
44. Lamp, B., et al., *Autocatalytic cleavage within classical swine fever virus NS3 leads to a functional separation of protease and helicase*. *Journal of virology*, 2013. **87**(21): p. 11872-11883.
45. Lackner, T., H.-J. Thiel, and N. Tautz, *Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(5): p. 1510-1515.

46. Sheng, C., et al., *Characterization of interaction of classical swine fever virus NS3 helicase with 3' untranslated region*. *Virus research*, 2007. **129**(1): p. 43-53.
47. Rau, H., et al., *Immunological properties of recombinant classical swine fever virus NS3 protein in vitro and in vivo*. *Veterinary research*, 2006. **37**(1): p. 155-168.
48. Gladue, D.P., et al., *Identification of an NTPase motif in classical swine fever virus NS4B protein*. *Virology*, 2011. **411**(1): p. 41-49.
49. Sheng, C., et al., *Characterization of NS3, NS5A and NS5B of classical swine fever virus through mutation and complementation analysis*. *Veterinary microbiology*, 2010. **140**(1-2): p. 72-80.
50. Pei, J., et al., *Autophagy enhances the replication of classical swine fever virus in vitro*. *Autophagy*, 2014. **10**(1): p. 93-110.
51. Xiao, M., et al., *Characterization of the N-terminal domain of classical swine fever virus RNA-dependent RNA polymerase*. *Journal of general virology*, 2006. **87**(2): p. 347-356.
52. Gottipati, K., et al., *The structure of classical swine fever virus Npro: a novel cysteine Autoprotease and zinc-binding protein involved in subversion of type I interferon induction*. *PLoS pathogens*, 2013. **9**(10): p. e1003704.
53. Li, W., Y. Zhang, and C.C. Kao, *The classic swine fever virus (CSFV) core protein can enhance de novo-initiated RNA synthesis by the CSFV polymerase NS5B*. *Virus Genes*, 2014. **49**: p. 106-115.
54. Rumenapf, T., et al., *Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses*. *Journal of virology*, 1993. **67**(6): p. 3288-3294.
55. Branza-Nichita, N., et al., *Role of N-glycan trimming in the folding and secretion of the pestivirus protein Erns*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. **319**(2): p. 655-662.
56. Krey, T., et al., *Crystal Structure of the Pestivirus Envelope Glycoprotein Erns and Mechanistic Analysis of Its Ribonuclease Activity*. *Structure*, 2012. **20**(5): p. 862-873.
57. Hulst, M.M. and R.J.M. Moormann, *Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors*. *Journal of General Virology*, 1997. **78**(11): p. 2779-2787.
58. Hulst, M., H. Van Gennip, and R. Moormann, *Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein Erns*. *Journal of virology*, 2000. **74**(20): p. 9553-9561.
59. Weiland, E., et al., *A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus*. *Journal of Virology*, 1992. **66**(6): p. 3677-3682.
60. Chen, J., et al., *The laminin receptor is a cellular attachment receptor for classical swine fever virus*. *Journal of virology*, 2015. **89**(9): p. 4894-4906.

61. Li, X., et al., *Identification of host cell binding peptide from an overlapping peptide library for inhibition of classical swine fever virus infection*. *Virus Genes*, 2011. **43**(1): p. 33-40.
62. Thiel, H.J., et al., *Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus*. *Journal of Virology*, 1991. **65**(9): p. 4705-4712.
63. El Omari, K., et al., *Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry*. *Cell Reports*, 2013. **3**(1): p. 30-35.
64. Li, Y., et al., *Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(17): p. 6805-6810.
65. Bintintan, I. and G. Meyers, *A New Type of Signal Peptidase Cleavage Site Identified in an RNA Virus Polyprotein**. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(12): p. 8572-8584.
66. Weiland, E., et al., *Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer*. *Journal of Virology*, 1990. **64**(8): p. 3563-3569.
67. Branza-Nichita, N., et al., *Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers*. *Journal of Virology*, 2001. **75**(8): p. 3527-3536.
68. Paton, D.J., et al., *Genetic typing of classical swine fever virus*. *Veterinary microbiology*, 2000. **73**(2-3): p. 137-157.
69. Van Gennip, H., et al., *Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of Erns or E2 of CSFV*. *Vaccine*, 2002. **20**(11-12): p. 1544-1556.
70. Risatti, G.R., et al., *The E2 Glycoprotein of Classical Swine Fever Virus Is a Virulence Determinant in Swine*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(6): p. 3787-3796.
71. Zhang, H., et al., *Enhanced protective immunity to CSFV E2 subunit vaccine by using IFN- γ as immunoadjuvant in weaning piglets*. *Vaccine*, 2018. **36**(48): p. 7353-7360.
72. Beer, M., et al., *Novel marker vaccines against classical swine fever*. *Vaccine*, 2007. **25**(30): p. 5665-5670.
73. Reimann, I., et al., *An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus*. *Virology*, 2004. **322**(1): p. 143-157.
74. Van Rijn, P., et al., *Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus*. *Journal of Virology*, 1994. **68**(6): p. 3934-3942.
75. Van Rijn, P.d., et al., *Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia*. *Journal of general virology*, 1993. **74**(10): p. 2053-2060.
76. Zhang, F.-q., et al., *Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and E rns using phage-displayed random peptide library*. *Archives of virology*, 2006. **151**: p. 37-54.

77. Yuan, F., et al., *ADAM17 is an essential attachment factor for classical swine fever virus*. PLOS Pathogens, 2021. **17**(3): p. e1009393.
78. Dräger, C., M. Beer, and S. Blome, *Porcine complement regulatory protein CD46 and heparan sulfates are the major factors for classical swine fever virus attachment in vitro*. Archives of virology, 2015. **160**: p. 739-746.
79. Li, W., et al., *Integrin $\beta 3$ is required in infection and proliferation of classical swine fever virus*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110911.
80. Yang, Z., et al., *Annexin 2 is a host protein binding to classical swine fever virus E2 glycoprotein and promoting viral growth in PK-15 cells*. Virus research, 2015. **201**: p. 16-23.
81. Zheng, G., et al., *MERTK is a host factor that promotes classical swine fever virus entry and antagonizes innate immune response in PK-15 cells*. Emerging Microbes & Infections, 2020. **9**(1): p. 571-581.
82. Maurer, K., et al., *CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus*. Journal of virology, 2004. **78**(4): p. 1792-1799.
83. Riley-Vargas, R.C., et al., *CD46: expanding beyond complement regulation*. Trends in immunology, 2004. **25**(9): p. 496-503.
84. Seya, T., et al., *Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(11): p. 1255-1260.
85. Liszewski, M.K., et al., *Control of the complement system*. Advances in immunology, 1996. **61**: p. 201-283.
86. Van den Berg, C., et al., *Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP)*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1997. **158**(4): p. 1703-1709.
87. Persson, B.D., et al., *Structure of the extracellular portion of CD46 provides insights into its interactions with complement proteins and pathogens*. PLoS pathogens, 2010. **6**(9): p. e1001122.
88. Toyomura, K., et al., *Molecular cloning of a pig homologue of membrane cofactor protein (CD46)*. International immunology, 1997. **9**(6): p. 869-876.
89. Pérez de la Lastra, J.M., S.M. Hanna, and B.P. Morgan, *Distribution of membrane cofactor protein (MCP/CD46) on pig tissues. Relevance To xenotransplantation*. Immunology, 1999. **98**(1): p. 144-51.
90. Schelp, C., et al., *Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection*. Archives of virology, 1995. **140**: p. 1997-2009.
91. Krey, T., et al., *Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1*. Journal of Virology, 2006. **80**(8): p. 3912-3922.

92. Klimstra, W.B., K.D. Ryman, and R.E. Johnston, *Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor*. Journal of virology, 1998. **72**(9): p. 7357-7366.
93. Cagatay, G.N., et al., *Porcine complement regulatory protein CD46 is a major receptor for atypical porcine pestivirus but not for classical swine fever virus*. Journal of virology, 2021. **95**(9): p. e02186-20.
94. Floegel, G., et al., *Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars*. Veterinary microbiology, 2000. **77**(1-2): p. 109-116.
95. Ressang, A., *Studies on the pathogenesis of hog cholera: II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response*. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, 1973. **20**(4): p. 272-288.
96. Trautwein, G., *Pathology and pathogenesis of the disease*, in *Classical Swine Fever and related viral infections*. 1988, Springer. p. 27-54.
97. Liu, J., et al., *Dynamic distribution and tissue tropism of classical swine fever virus in experimentally infected pigs*. Virology Journal, 2011. **8**(1): p. 1-10.
98. Muñoz-González, S., et al., *Postnatal persistent infection with classical swine fever virus and its immunological implications*. PloS one, 2015. **10**(5): p. e0125692.
99. Summerfield, A. and N. Ruggli, *Immune responses against classical swine fever virus: between ignorance and lunacy*. Frontiers in veterinary science, 2015. **2**: p. 10.
100. Sanchez-Cordon, P., et al., *Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines*. Veterinary pathology, 2005. **42**(4): p. 477-488.
101. Summerfield, A., et al., *High IFN- α responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever*. Journal of interferon & cytokine research, 2006. **26**(4): p. 248-255.
102. Ganges, L., et al., *Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection*. The Veterinary Journal, 2008. **177**(2): p. 169-177.
103. Pauly, T., H. Thiel, and A. Saalm, *Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes*. Journal of general virology, 1998. **79**(1): p. 31-40.
104. Summerfield, A., et al., *Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells*. Virology, 2000. **272**(1): p. 50-60.
105. Moennig, V., G. Floegel-Niesmann, and I. Greiser-Wilke, *Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge*. The Veterinary Journal, 2003. **165**(1): p. 11-20.
106. Donahue, B.C., et al., *Analysis of clinical samples for early detection of classical swine fever during infection with low, moderate, and highly virulent strains in*

- relation to the onset of clinical signs.* Journal of virological methods, 2012. **179**(1): p. 108-115.
107. Petrov, A., et al., *Comparative analyses of host responses upon infection with moderately virulent classical swine fever virus in domestic pigs and wild boar.* Virology Journal, 2014. **11**: p. 1-6.
 108. Floegel - Niesmann, G., et al., *Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs.* Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2003. **50**(5): p. 214-220.
 109. Floegel-Niesmann, G., et al., *Virulence of classical swine fever virus isolates from Europe and other areas during 1996 until 2007.* Veterinary microbiology, 2009. **139**(1-2): p. 165-169.
 110. Tarradas, J., et al., *The impact of CSFV on the immune response to control infection.* Virus research, 2014. **185**: p. 82-91.
 111. Lamothe-Reyes, Y., et al., *Early and solid protection afforded by the thiverval vaccine provides novel vaccination alternatives against classical swine fever virus.* Vaccines, 2021. **9**(5): p. 464.
 112. Kaden, V., et al., *Classical swine fever (CSF) in wild boar: the role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF.* Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2005. **52**(4): p. 161-164.
 113. Muñoz-González, S., et al., *Efficacy of a live attenuated vaccine in classical swine fever virus postnatally persistently infected pigs.* Veterinary research, 2015. **46**(1): p. 1-9.
 114. Van Oirschot, J., *Vaccinology of classical swine fever: from lab to field.* Veterinary microbiology, 2003. **96**(4): p. 367-384.
 115. Wei, Q., Y. Liu, and G. Zhang, *Research Progress and Challenges in Vaccine Development against Classical Swine Fever Virus.* Viruses, 2021. **13**(3): p. 445.
 116. Huang, Y.-L., et al., *The challenges of classical swine fever control: Modified live and E2 subunit vaccines.* Virus Research, 2014. **179**: p. 1-11.
 117. Coronado, L., et al., *A Critical Review about Different Vaccines against Classical Swine Fever Virus and Their Repercussions in Endemic Regions.* Vaccines, 2021. **9**(2): p. 154.
 118. Blome, S., et al., *Classical swine fever vaccines—State-of-the-art.* Veterinary Microbiology, 2017. **206**: p. 10-20.
 119. Blome, S., et al., *A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf (Suvaxyn® CSF Marker): a review of vaccine properties.* Veterinary Research, 2017. **48**(1): p. 51.
 120. Wehrle, F., et al., *Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines.* Journal of General Virology, 2007. **88**(8): p. 2247-2258.

121. Lim, S.-i., et al., *Assessment of the efficacy of an attenuated live marker classical swine fever vaccine (Flc-LOM-BERns) in pregnant sows*. *Vaccine*, 2019. **37**(27): p. 3598-3604.
122. Postel, A., et al., *Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: Recent developments and future challenges*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018. **65**(S1): p. 248-261.
123. Qiu, H.-j., R.-x. Shen, and G.-z. Tong, *The Lapinized Chinese Strain Vaccine Against Classical Swine Fever Virus: A Retrospective Review Spanning Half A Century*. *Agricultural Sciences in China*, 2006. **5**(1): p. 1-14.
124. Zhou, W., et al., *Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIVViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever*. *Vaccine*, 2014. **32**(49): p. 6639-6642.
125. Dong, X.-N. and Y.-H. Chen, *Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines*. *Vaccine*, 2007. **25**(2): p. 205-230.
126. Suradhat, S., S. Damrongwatanapokin, and R. Thanawongnuwech, *Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas*. *Veterinary Microbiology*, 2007. **119**(1): p. 1-9.
127. Coronado, L., et al., *Investigation of chronic and persistent classical swine fever infections under field conditions and their impact on vaccine efficacy*. *BMC veterinary research*, 2019. **15**(1): p. 1-13.
128. Launais, M., et al., *INNOCUITÉ VIS-A-VIS DES TRUIES EN GESTATION DE LA SOUCHE " THIVERVAL " DU VIRUS DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE*. *Annales de zootechnie*, 1974. **23** (3): p. 372-373.
129. Launais, M., J. Aynaud, and G. Corthier, *Hog cholera virus: active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of colostral passive immunity*. *Veterinary Microbiology*, 1978. **3**(1): p. 31-43.
130. Corthier, G., *[Comparison of 2 in vitro methods of titration of antibodies neutralizing the classic swine plague virus]*. *Ann Rech Vet*, 1976. **7**(4): p. 349-60.
131. Corthier, G., et al. *Comparison of the immune response in serum and buccopharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain)*. in *Annales de Recherches Veterinaires*. 1977.
132. Satra, J., A. Nakapaksin, and S. Kongthon, *Early protection after vaccinated with various kinds of swine fever vaccine*. *Warasan Chiwa Phalittaphan*, 1995.
133. Leifer, I., N. Ruggli, and S. Blome, *Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence*. *Virology*, 2013. **438**(2): p. 51-55.
134. Risatti, G., et al., *The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine*. *Journal of virology*, 2005. **79**(6): p. 3787-3796.
135. Fan, Y., et al., *Complete genome sequence of attenuated low-temperature Thiverval strain of classical swine fever virus*. *Virus genes*, 2008. **36**(3): p. 531-538.

136. Björklund, H., et al., *Molecular characterization of the 3' noncoding region of classical swine fever virus vaccine strains*. *Virus Genes*, 1998. **16**: p. 307-312.
137. Wu, H., et al., *Attenuated lapinized Chinese strain of classical swine fever virus: complete nucleotide sequence and character of 3' noncoding region*. *Virus Genes*, 2001. **23**: p. 69-76.
138. Moormann, R., et al., *Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus*. *Journal of Virology*, 1996. **70**(2): p. 763-770.
139. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989: Cold spring harbor laboratory press.
140. Education, G., *Cell culture basics handbook*. Thermo Fisher Scientific, 2016. **541**.
141. Muñoz-González, S., et al., *Classical swine fever virus vs. classical swine fever virus: the superinfection exclusion phenomenon in experimentally infected wild boar*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0149469.
142. Wang, M., et al., *A polyuridine insertion in the 3' untranslated region of classical swine fever virus activates immunity and reduces viral virulence in piglets*. *Journal of virology*, 2020. **94**(2): p. e01214-19.
143. Tarradas, J., et al., *The impact of CSFV on the immune response to control infection*. *Virus Research*, 2014. **185**: p. 82-91.
144. Terpstra, C., M. Bloemraad, and A.L.J. Gielkens, *The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus*. *Veterinary Microbiology*, 1984. **9**(2): p. 113-120.
145. Muñoz-González, S., et al., *Classical Swine Fever Virus vs. Classical Swine Fever Virus: The Superinfection Exclusion Phenomenon in Experimentally Infected Wild Boar*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0149469.
146. Wang, M., et al., *A Polyuridine Insertion in the 3' Untranslated Region of Classical Swine Fever Virus Activates Immunity and Reduces Viral Virulence in Piglets*. *J Virol*, 2020. **94**(2).
147. Longo, P.A., et al., *Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)*, in *Methods in enzymology*. 2013, Elsevier. p. 227-240.
148. Kruger, N.J. and J. Walker, *The protein protocols handbook*. 2009, Humana Press Totowa, NJ, USA:.
149. Webb, B. and A. Sali, *Comparative protein structure modeling using MODELLER*. *Current protocols in bioinformatics*, 2016. **54**(1): p. 5.6. 1-5.6. 37.
150. Abraham, M.J., et al., *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers*. *SoftwareX*, 2015. **1**: p. 19-25.
151. Kozakov, D., et al., *The ClusPro web server for protein-protein docking*. *Nature protocols*, 2017. **12**(2): p. 255-278.

152. Wiederstein, M. and M.J. Sippl, *ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Nucleic acids research, 2007. **35**(suppl_2): p. W407-W410.
153. Xue, L.C., et al., *PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes*. Bioinformatics, 2016. **32**(23): p. 3676-3678.
154. DeLano, W.L., *Pymol: An open-source molecular graphics tool*. CCP4 Newsl. Protein Crystallogr, 2002. **40**(1): p. 82-92.
155. Mirdita, M., et al., *ColabFold: making protein folding accessible to all*. Nature methods, 2022. **19**(6): p. 679-682.
156. Jurrus, E., et al., *Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite*. Protein Science, 2018. **27**(1): p. 112-128.
157. Yoo, S., et al., *Genetic evolution of classical swine fever virus under immune environments conditioned by genotype 1 - based modified live virus vaccine*. Transboundary and emerging diseases, 2018. **65**(3): p. 735-745.
158. Lorena, J., et al., *Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets*. Veterinary Microbiology, 2001. **81**(1): p. 1-8.
159. Terpstra, C., *AANTONEN VAN C-VIRUS IN VARKENS NA VACCINATIE TEGEN VARKENSPEST*. 1978.
160. Jang, G., et al., *Pathogenicity of a novel classical swine fever LOM vaccine - derived virus isolated on Jeju Island, South Korea*. Veterinary Medicine and Science, 2022. **8**(6): p. 2434-2443.
161. Bogнар, K. and J. Meszaros, *EXPERINECES WITH A LAPINIZED HOG CHOLERA VIRUS STRAIN OF DECREASED VIRULENCE*. ACTA VETERINARIA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE, 1963. **13**(4): p. 429-&.
162. Terpstra, C. and M. Tielen, *Antibody response against swine fever following vaccination with C - strain virus*. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, 1976. **23**(10): p. 809-821.
163. van Bekkum, J. *Experience in the Netherlands with the lapinised so-called Chinese (C) strain of vaccine [for swine fever]*. in *Hog cholera/classical swine fever and African swine fever. Hannover (Germany, FR). 6 Sep 1976*. 1977.
164. Toledo, J.R., et al., *Highly protective E2–CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats*. Journal of biotechnology, 2008. **133**(3): p. 370-376.
165. Aynaud, J., *Classical swine fever and related viral infections*. Martinus Nijhoff, Boston, 1988: p. 165-180.
166. Vandeputte, J., et al., *Adsorption of colostral antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs*. American journal of veterinary research, 2001. **62**(11): p. 1805-1811.
167. Dewulf, J., *Epidemiology and control of classical swine fever: experimental assessment of virus transmission and potential benefits of emergency vaccination*. 2002: Ghent University.

168. Leifer, I., et al., *Modified live marker vaccine candidate CP7_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization*. *Vaccine*, 2009. **27**(47): p. 6522-6529.
169. Dahle, J. and B. Liess, *Assessment of safety and protective value of a cell culture modified strain "C" vaccine of hog cholera/classical swine fever virus*. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 1995. **108**(1): p. 20-25.
170. Suradhat, S., M. Intrakamhaeng, and S. Damrongwatanapokin, *The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2001. **83**(3-4): p. 177-189.
171. McCarthy, R.R., et al., *Head Start Immunity: Characterizing the Early Protection of C Strain Vaccine Against Subsequent Classical Swine Fever Virus Infection*. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
172. Durand, S.V.M., et al., *Activation and modulation of antiviral and apoptotic genes in pigs infected with classical swine fever viruses of high, moderate or low virulence*. *Archives of Virology*, 2009. **154**(9): p. 1417-1431.
173. Renson, P., et al., *Acute induction of cell death-related IFN stimulated genes (ISG) differentiates highly from moderately virulent CSFV strains*. *Veterinary research*, 2010. **41**(1).
174. Durand, B., et al., *Comparison of viraemia-and clinical-based estimates of within- and between-pen transmission of classical swine fever virus from three transmission experiments*. *Veterinary microbiology*, 2009. **135**(3-4): p. 196-204.
175. Riedel, C., et al., *Real Time Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection and Its Dependence on Bovine CD46*. *Viruses*, 2020. **12**(1): p. 116.
176. Merwaiss, F., C. Czibener, and D.E. Alvarez, *Cell-to-cell transmission is the main mechanism supporting bovine viral diarrhea virus spread in cell culture*. *Journal of Virology*, 2019. **93**(3): p. e01776-18.
177. Krey, T., et al., *Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1*. *Journal of virology*, 2006. **80**(8): p. 3912-3922.
178. Catzel, D., et al., *Purification of recombinant human growth hormone from CHO cell culture supernatant by Gradiflow preparative electrophoresis technology*. *Protein Expression and Purification*, 2003. **32**(1): p. 126-134.
179. Knappskog, S., et al., *The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide*. *Journal of biotechnology*, 2007. **128**(4): p. 705-715.
180. Srila, W., et al., *Codon and signal peptide optimization for therapeutic antibody production from Chinese hamster ovary (CHO) cell*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022. **622**: p. 157-162.

181. Tejwani, V., et al., *Glycoengineering in CHO cells: advances in systems biology*. Biotechnology Journal, 2018. **13**(3): p. 1700234.
182. PM, C., et al., *The macroheterogeneity of recombinant human interferon - gamma produced by Chinese - hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium*. Biotechnology and applied biochemistry, 1995. **21**(1): p. 87-100.
183. Devasahayam, M., *N-Glycosylation sequon Asn residue causes variable site occupancy in recombinant soluble Thy-1*. Current Science, 2007: p. 1087-1092.
184. Fuchs, A., et al., *Targeting alternative splicing by RNAi: from the differential impact on splice variants to triggering artificial pre-mRNA splicing*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(2): p. 1133-1151.
185. Mayer, D., et al., *Establishment and characterisation of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent*. Virus Research, 2003. **98**(2): p. 105-116.
186. Hsu, E.C., et al., *A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells*. Journal of Virology, 1998. **72**(4): p. 2905-2916.
187. Fernandez-Garcia, M.D., et al., *Vaccine and wild-type strains of yellow fever virus engage distinct entry mechanisms and differentially stimulate antiviral immune responses*. MBio, 2016. **7**(1): p. 10.1128/mbio. 01956-15.