

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

Diseño de un sistema biológico para cuantificar Anticuerpos  
Neutralizantes contra la enfermedad de la Peste Porcina Clásica  
(*Pestivirus, Flaviviridae*)

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:  
Guillermo Zamora

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

## **DEDICATORIA**

A todo aquel a cuyas manos se  
acerque este manifiesto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Espol, y sobre todo al Laboratorio para Investigaciones Biomédicas, gracias por todo el conocimiento que no solo se imparte, sino más bien se genera desde ahí.

A Laboratorios Llaguno, sin su apoyo e ideas nada de esto ocurriría.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (*nombre de los participantes*) y doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

---

Guillermo Zamora

# EVALUADORES

---

**Diego Gallardo**

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**Washington B. Cárdenas**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a porcinos y es causada por un virus del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*. Esta enfermedad provoca pérdidas económicas significativas en muchos países, incluyendo Ecuador. Los programas de control y erradicación de la enfermedad incluyen la vacunación, que se genera localmente con virus vivos atenuados de la cepa china, también denominada C-strain. Sin embargo, los organismos de control favorecen el cambio de la vacuna denominada lapinizada, producida en conejos, a las producidas en condiciones *in vitro*, en cultivo celular.

Por otra parte, para medir la efectividad de las vacunas producidas localmente, las autoridades sanitarias exigen la medición de potencia de la vacuna con animales en condiciones controladas. Esto implica gran inversión de recursos técnicos y económicos para mantener un bioterio que cumpla con todas las medidas de calidad y bioseguridad. Dicha inversión se hace insostenible para los productores locales si no existe un mecanismo de selección *in vitro* de vacunas prototipo antes de probar su potencia.

En base a lo expuesto, se presenta una alternativa tecnológica e innovadora que ayude al gremio porcicultor, mediante el diseño de un sistema reportero fluorescente del virus de la PPC que permita la caracterización inicial de vacunas prototipo antes de estimar su potencia. Además, el virus recombinante, con la cepa vacunal (Chinese strain), permitiría también modular la antigenicidad del virus para una protección más efectiva contra cepa silvestres.

El sistema propuesto consta del genoma viral de la cepa vacunal, al cual se le incorpora un gen de fluorescencia adicional: eGFP (*enhanced green fluorescence protein*, siglas en inglés). La fluorescencia emitida por este virus recombinante permitirá identificar rápidamente infecciones en cultivos celulares y su inhibición, cuando se incuba el virus con sueros de animales vacunados, previo a la infección.

**Palabras Clave:** CSFV, Overlapping PCR, Peste Porcina Clásica, Neutralización

## **ABSTRACT**

*Classical Swine Fever is a highly contagious disease affecting swine caused by a positive-sense, single-stranded RNA virus of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. Disease outbreaks cause important economic losses in many countries, including Ecuador. Control programs to eradicate the disease, includes use of an attenuated vaccine derived from a Chinese strain, also denominated C-Strain. Although the vaccine has been produced by local companies for several years, new government policies are in favor of the cell culture production protocols if they want to keep their presence in the market.*

*On the other hand, in order to get approval of locally produced vaccines, health authorities demand a certificate of the vaccine potency. This implies the need for an animal facility with high biological containment, well trained technicians, susceptible experimental pigs and laboratory for sample processing and analysis. Vaccination and infection challenges should be done under these controlled conditions which increase further the economic constrains that local companies have within a regulatory environment that does not offer any assurance of market protection to justify further investments.*

*To cope with this discouraging landscape, the present report proposes an innovative alternative to assess vaccine candidates potency by using a recombinant Classical Swine Fever Virus (CSFV) expressing a green fluorescent protein as a reporter system.*

*This recombinant virus based on the vaccine Chinese strain (C-strain) will allow to assess in vitro conditions the potency of the proposed vaccine before it is tested in challenge experiments. In addition, because the proposed system is based on the construction of a recombinant virus with the vaccine strain, it will also allow the modulation of the virus antigenicity for a better protection against wild strains.*

*Keywords: CSFV, Overlapping PCR, Flaviviridae, Neuralization Test.*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
CAPÍTULO 1 .....	8
1.    Introducción.....	8
1.1    Descripción del problema .....	9
1.2    Justificación del problema.....	9
1.3    Objetivos.....	10
1.3.1    Objetivo General .....	10
1.3.2    Objetivos Específicos .....	10
1.4    Marco teórico .....	10
1.4.1    Historia .....	10
1.4.2    Desarrollo de la Enfermedad.....	10
1.4.3    Estructura molecular del virus .....	11
1.4.3.1    Proteínas Estructurales .....	12
1.4.3.2    Proteínas No Estructurales .....	12
1.4.4    Ciclo Viral .....	13
1.4.5    Vacunas contra la Peste Porcina Clásica.....	17
1.4.1    Subgenoma Viral de Peste Porcina.....	17
1.4.1.1    Región 5' UTR.....	17



1.4.1.2	Región 3' UTR.....	17
1.4.1.3	Proteína No estructural N <sup>pro</sup> .....	18
1.4.1.4	Ribozima Cabeza de Martillo.....	18
1.4.1.5	Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta.....	18
1.4.1.6	eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).....	18
1.4.2	Clonación mediante PCR por solapamiento ( <i>overlapping PCR</i> ).....	19
1.4.3	Plásmido de Expresión.....	20
CAPÍTULO 2.....		22
2.	Metodología.....	22
2.1	Virus y Plásmidos.....	22
2.1.1	Virus.....	22
2.1.2	Plásmidos.....	22
2.2	Alineación y búsqueda de Secuencias.....	22
2.3	Diseño de <i>Primers</i> .....	22
2.4	Clonación en el Vector de Expresión.....	24
2.5	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	24
2.6	Amplificación de fragmentos de interés.....	25
CAPÍTULO 3.....		26
3.	Resultados y Discusión.....	26
3.1	Diseño del subgenoma viral de la Peste Porcina Clásica.....	26
3.1.1	Diagnóstico Molecular del Virus.....	27
3.2	<i>Primers</i> diseñados.....	28
3.2.1	Enhanced Fluorescent Protein eGFP.....	29
3.2.2	Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta.....	30
CAPÍTULO 4.....		32
4.	Conclusiones y Recomendaciones.....	32

4.1	Conclusiones .....	32
4.2	Recomendaciones .....	32
4.2.1	Ensayo de neutralización .....	32
	BIBLIOGRAFÍA .....	34
	ANEXOS .....	39
	Condiciones de amplificación región 3' UTR .....	41
	Condiciones del termociclador 3' UTR .....	41
	Condiciones de amplificación región eGFP .....	41
	Condiciones Termociclador eGFP .....	42
	Condiciones de amplificación región HDV Rz.....	42
	Condiciones del termociclador HDV Rz.....	42

## ABREVIATURAS

PPC	Peste Porcina Clásica
CSFV	Classical Swine Fever Virus
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
AcN	Anticuerpos Neutralizantes
PCR	Polymerase Chain Reaction
5' UTR	5' Untranslated Region
3' UTR	3' Untranslated Region
C-Strain	Cepa China
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
ADNc	ADN complementario
OIE	World Organisation for Animal Health

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Esquema del ciclo viral de la Peste Porcina .....	15
Fig. 1.2 Esquema del genoma de la Peste Porcina Clásica .....	16
Fig. 1.3 Estrategia de clonación de PCR por solapamiento.....	20
Fig. 1.4 Esquema del plásmido de expresión pCAGGS. ....	21
Fig. 2.5 Esquema de diseño de <i>primers</i> .....	23
Fig. 2.6 Esquema del ensamblaje de la construcción. ....	24
Fig. 3.7 Estrategia de Construcción del Sistema Biológico.....	27
Fig. 3.8. Diagnóstico molecular del virus. ....	28
Fig. 3.9. Electroforesis del fragmento eGFP en gel de agarosa al 1%.....	30
Fig. 3.10. Electroforesis de la Ribozima Delta del Virus de Hepatitis HDV Rz en gel de agarosa al 2% .....	31
Fig. 4.11. Ensayo de Neutralización propuesto.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. <i>Primers</i> diseñados en este estudio.....	24
--	----

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La Peste Porcina Clásica PPC, es una enfermedad altamente contagiosa y fatal que afecta principalmente a cerdos, provocando pérdidas económicas significativas en muchos países del mundo, incluido Ecuador. La enfermedad es causada por un virus del género *Pestivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae* [1]. Su presencia también ocasiona restricciones al comercio internacional ya que es de notificación obligatoria para la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) [2].

En el país, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD lanzó en el año 2012 un programa de 6 años destinado al control y erradicación de la enfermedad en el país. El programa contó con un presupuesto mayor a los 38 millones de dólares y exigía estándares internacionales para el uso de vacunas frente a la enfermedad. Debido a que la erradicación en otros países tuvo éxito mediante el uso de vacunas adaptadas a cultivos celulares, las autoridades sanitarias se favorecen la producción de vacunas en estos sistemas in vitro, por lo que las vacunas lapinizadas producidas por empresas nacionales, quedarían descontinuadas [3].

Por otra parte, para medir la eficacia de las vacunas producidas, es usual realizar un ensayo de desafío, en un bioterio, lo que implica gastos económicos elevados para el productor, demanda espacio, animales, alimento, equipo técnico y de soporte, así como medidas de bioseguridad que sean certificados por la organización pertinente [4].

En las últimas décadas, los avances en ingeniería genética y tecnología de ADN recombinante han facilitado la construcción de clones infecciosos de ADNc de virus de ARN [5]. Esta tecnología ha permitido la construcción de replicones y rescate de virus recombinantes de PPC para estudios de interacción huésped-patógenos y para la generación de vacunas inteligentes [6,7,8,9,10].

La manipulación genética de PPC permite que la caracterización de vacunas prototipo no requieran pruebas de potencia con porcinos. De esta manera, se ahorra recursos económicos y se reduce la utilización de animales para vacunas candidatos extensamente estudiadas en condiciones in vitro [11].

En base a lo expuesto, se propone realizar el diseño de un sistema biológico innovador del Virus de la PPC, que exprese un gen reportero fluorescente eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) para la detección directa y rápida de anticuerpos neutralizantes (AcN) contra el virus en un cultivo celular.

### **1.1 Descripción del problema**

La enfermedad ocasiona brotes de tremendo impacto en el sector industrial y alimentario año tras año [8] a pesar de las estrategias de erradicación del virus mediante el uso de vacunas, basadas en virus vivos de cepas atenuadas (p.e. C-Strain) [12]. La vacuna se produce en el país siguiendo protocolos de décadas pasadas, pero ahora los entes reguladores optan por la implementación de métodos *in vitro* más actuales y amigables por parte de la industria para seguir produciendo dicha vacuna.

Las autoridades de control también exigen certificación del funcionamiento de la vacuna (potencia), lo que ocasiona restricciones económicas al productor, por lo que se necesita una herramienta confiable, sostenible e innovadora para llevar a cabo el cometido.

### **1.2 Justificación del problema**

El sector porcícola es un eje importante dentro de la cadena productiva de maíz, soya, balanceados y avicultura del país, que en conjunto tienen una participación estimada del 23% del PIB agropecuario. Ecuador en los últimos años, presenta un crecimiento en la producción de cerdos de alrededor del 4.6% anual y se han planteado planes de control y erradicación de la enfermedad con montos que ascienden a millones de dólares [13].

La industria, presionada por nuevas regulaciones del gobierno que exigen el reemplazo de vacunas lapinizadas por vacunas de cultivo celular, requiere la adaptación del virus a líneas celulares, así como la evaluación de la eficiencia de las vacunas.

Es esencial contar con una prueba confiable para medir la potencia de vacunas, por lo que un virus recombinante de la PPC que exprese un gen reportero fluorescente podría detectar rápidamente AcN en suero de animales vacunados y así mostrar si los animales están produciendo anticuerpos que los protejan frente a la enfermedad, o viceversa, en periodos cortos de tiempo.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Diseñar un modelo de virus recombinante de la vacuna de la Peste Porcina Clásica, para la cuantificación directa de anticuerpos neutralizantes mediante la introducción de un gen reportero fluorescente.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar las secuencias necesarias para el diseño del virus recombinante en base a las cepas vacunales.
- Diseñar *primers* basados en la cepa vacunal para la clonación del genoma mediante la técnica de PCR por solapamiento (*overlapping PCR*).
- Ensamblar el genoma recombinante en un plásmido que permita su replicación en cultivo celular.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Historia**

Los primeros registros de la enfermedad datan de los 1830s en el medio oeste de los Estados Unidos, y su etiología viral se reveló tempranamente en el siglo XX cuando los fluidos de cerdos que presentaban la enfermedad y habían pasado a través de filtros de porcelana, probaron ser infecciosos [14].

En Ecuador, el primer reporte de PPC ocurrió en los 40's, y en 1978 el gobierno empezó con el registro de ocurrencia de la enfermedad como sistema de vigilancia epidemiológica, llevado a cabo por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD [15]. La presencia del virus en el país se encuentra registrada por la Organización Mundial para la Salud Animal a partir del año 2006, donde se reportaron brotes de la enfermedad y ha estado presente desde entonces, como se refleja en el reporte anual de eventos hasta el 2017 de la OIE [16].

### **1.4.2 Desarrollo de la Enfermedad**

La infección producida en cerdos puede resultar en una enfermedad aguda o crónica. El virus de la PPC es inmunosupresivo debido a la reducción de Linfocitos T y B, presentando cuadros de leucopenia y trombocitopenia [17]. Los síntomas clínicos

durante una infección aguda incluyen fiebre, desórdenes gastrointestinales, fallas respiratorias, hemorragias, desórdenes en el sistema nervioso central, y eventualmente pueden resultar en niveles medios y altos de mortalidad [18].

La replicación primordial toma lugar en las amígdalas y nodos linfáticos, el virus alcanza la sangre periférica con un alto nivel de viremia debido a la replicación en diversos órganos (bazo, médula, nodos linfáticos viscerales) [19].

El virus es secretado por medio de excreciones nasales, conjuntivas y orales (saliva) así como también por la orina y las heces [20]. La transmisión se produce vía oral y nasal por contacto directo o indirecto y no se ha reportado contagio por medio de vectores, como es el caso de otros flavivirus [18].

La vía más eficiente de contagio y de diseminación viral es por medio de la transmisión horizontal cuando existe contacto directo cerdo a cerdo, aunque también puede ser transmitido verticalmente de la madre a su descendencia mediante infecciones intrauterinas [21], siendo el resultado de tal transmisión dependiente del estado de gestación; durante el primer trimestre se desencadenan abortos, en tanto que infecciones de los últimos trimestres resultan en óbitos y malformaciones en nacimientos [22].

El periodo de incubación del virus (tiempo desde la transmisión hasta cuando se presentan los primeros signos de la enfermedad) es de 2-7 días y la muerte ocurre alrededor de los 4 días post infección en cepas virulentas, y hasta varias semanas después en cepas moderadamente virulentas [23].

### **1.4.3 Estructura molecular del virus**

El genoma de los *Pestivirus* consiste de una cadena lineal de ARN monocatenario (ssARN), de polaridad positiva (ver Fig.1.2.) con un tamaño aproximado de 12.3 kb [24]. Este genoma representa el único ARN viral encontrado en células infectadas, es decir; no existen ARNs subgenómicos transcritos durante la replicación, implicando que la cadena lineal representa el único ARNm y codifica para todas las proteínas virales [25].

De acuerdo a estos hallazgos, el ARN genómico contiene un solo marco abierto de lectura que codifica una poliproteína de 3900 aminoácidos [12]. El virus posee 4



proteínas estructurales (expresadas en la partícula viral) y 8 proteínas no estructurales (ver Fig.1.2.) con dos regiones no codificantes o UTRs por sus siglas en inglés (*Untranslated Region*) en sus extremos 5´ y 3´ [25].

#### **1.4.3.1 Proteínas Estructurales**

La envoltura viral posee una membrana de fosfolípidos proveniente de la célula infectada, por debajo de la cual se encuentra la cápside, conformada por una proteína encargada de empaquetar al ARN viral hasta formar una nucleocápside que lo protege [26].

La glicoproteína E<sup>ms</sup> juega un rol en el ingreso del virus a la célula huésped. Interactúa con proteínas que sirven como receptores de adherencia para el virus [27]. Posee también actividad ribonucleasa (RNasa) que puede inhibir la producción del Interferón Tipo I y asistir en el desarrollo de infecciones persistentes [28].

Las glicoproteínas E1 y E2 tiene un papel importante en la unión y subsecuente fusión de las membranas viral y celular; son suficientes para completar la entrada del virus [29]. E2 es la proteína inmunodominante, lo que la convierte en un objetivo interesante para el desarrollo de vacunas mediante bio ingeniería [30] y es vital en la clasificación genotípica del virus, que está basada en las secuencias completas de dicha proteína [15].

#### **1.4.3.2 Proteínas No Estructurales**

La proteasa N terminal N<sup>pro</sup> es una autoproteasa que se corta así misma a partir de la nascente poliproteína durante la traducción del ARNm viral aumentando la eficiencia del “sitio interno de entrada ribosomal” (en inglés IRES; *Internal Ribosomal Entry Site*), cuya función se explica en detalle en los capítulos siguientes. Una vez liberada, tiene un rol en la inhibición de la respuesta innata del huésped por la interacción del Interferón Tipo III [31].

El papel exacto de la proteína P7 no ha sido resuelto, pero tiene estructura similar a una viroporina. Es decir, forma poros de iones conductivos que alteran la permeabilidad de la célula, permitiendo el transporte de iones y otras moléculas pequeñas, que actúan en la permeabilización de la membrana y liberación de la progenie infecciosa [32]

NS2 y NS3 están inicialmente fusionadas, pero con la actividad de NS2 (autoproteasa de cisteína) se genera la parte N-terminal de NS3 [33]. NS2 por sí sola pareciera no tener función alguna y por otro lado NS3 tiene actividades enzimáticas esenciales para la replicación viral y es fundamental en el complejo de replicación juntamente con la proteína NS5B.

La helicasa NS3 concretamente desenrolla las hebras positivas como negativas [12] y mejora la actividad traduccional anclándose a sitios específicos del *IRES* [34]. Requiere de un cofactor; NS4A, indispensable para la actividad serina-proteasa de NS3.

Estudios [35] de la proteína NS4B de flavivirus demuestran que los aminoácidos 40 al 69 en la porción N-Terminal son esenciales para la formación del complejo de replicación funcional indicando su papel en el anclaje del complejo al Retículo Endoplasmático.

La proteína NS5A de 497 aminoácidos está involucrada en la replicación viral. Es la única proteína requerida para la replicación del ARN que puede ser complementada en *trans*, lo que muestra su asociación con la membrana post traduccionalmente [36].

Finalmente la proteína NS5B; proteína central del complejo de replicación [37] es de un significado particular en este proceso. Es la más larga de las 12 proteínas maduras conteniendo 718 aminoácidos y su papel es el de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp; *RNA dependent RNA polymerase*, siglas en inglés) la cual ha mostrado capacidad de sintetizar las nuevas hebras de ARN en sentido positivo como negativo [38]

#### **1.4.4 Ciclo Viral**

La unión de las proteínas de envoltura E1, E2 y Erns con receptores de la célula huésped intervienen en la internalización del virus por endocitosis dependiente de clatrina [39] (ver esquema de la Fig.1.1).

Después de la fusión del virus con la membrana del endosoma, el ARN viral es liberado en el citoplasma, dando paso a que la región 5' UTR del genoma cumpla su función de *IRES* e inicie el proceso de traducción, sin necesidad de contar con Cap y polyA, anclándose directamente al complejo ribosomal [40]. El genoma positivo ssRNA es

traducido en su poliproteína, y posteriormente con proteasas virales y del huésped libera las proteínas estructurales y no estructurales [41].

La replicación toma lugar en la superficie del retículo endoplasmático y se genera un ARN bicatenario (dsRNA) a partir de una cadena de ARN positivo monocatenario (ssRNA) [7]. De este modo el dsRNA es transcrito y replicado proveyendo mARNs; nuevos ssRNA de polaridad positiva. El ensamblaje viral ocurre en el retículo endoplasmático, donde el virión se desarrolla y es transportado hacia el aparato de Golgi, para finalmente liberar por exocitosis los nuevos viriones formados [42].

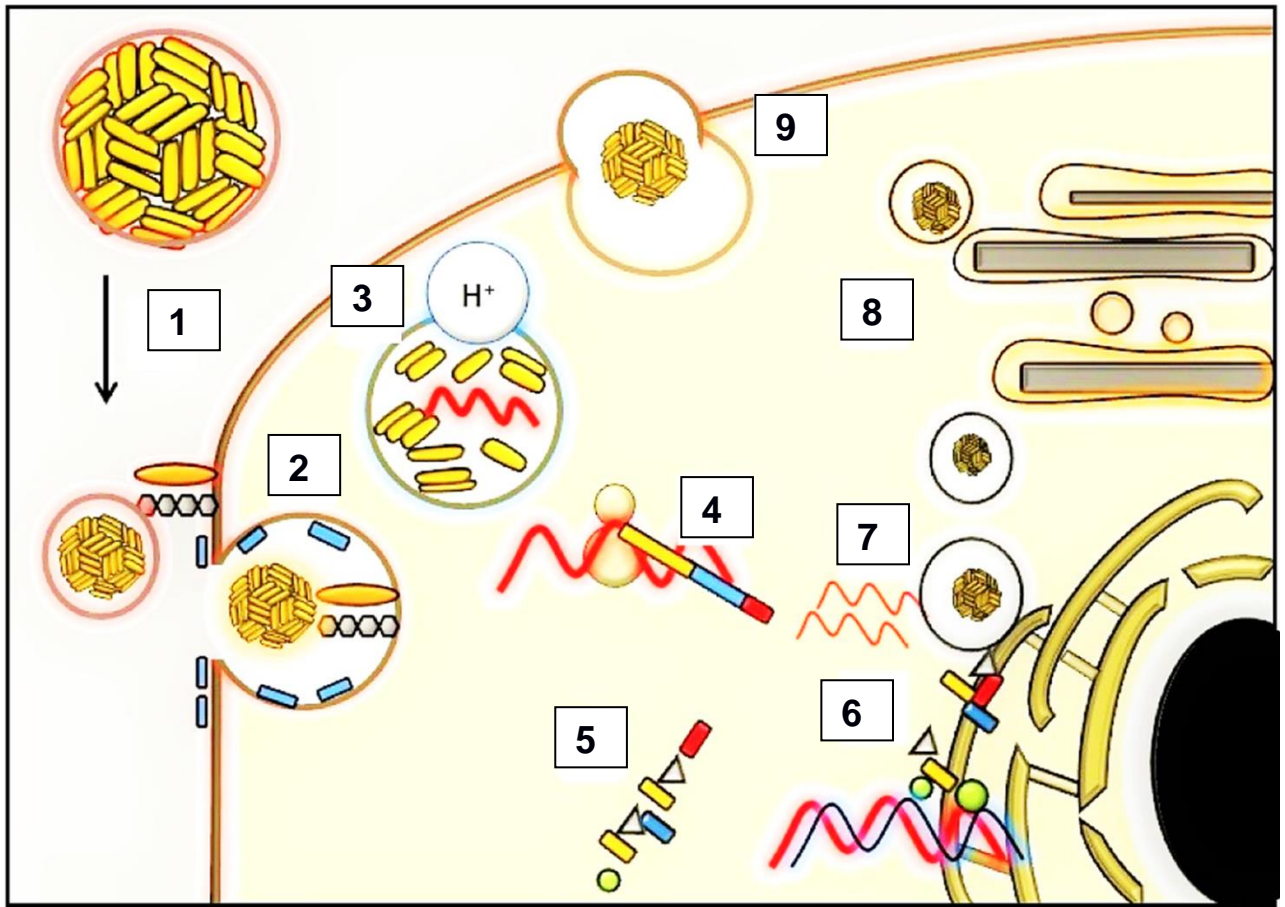
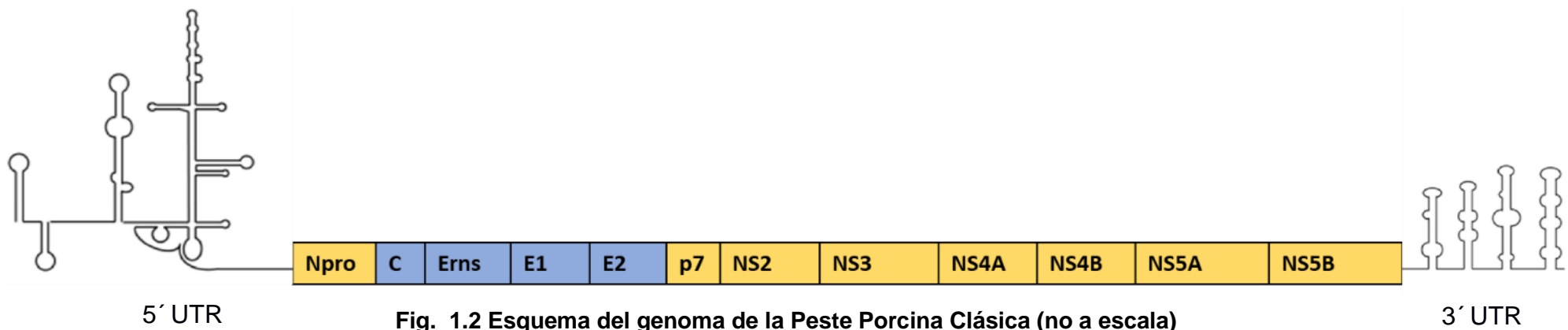


Fig. 1.1 Esquema del ciclo viral de la Peste Porcina.

- 1) Las proteínas de la envoltura en la célula huésped median 2) la internalización, que se produce mediante endocitosis. 3) La fusión de las membranas con los endosomas del huésped y una caída en el pH (acidificación) descubre y libera el genoma (ARN) en el citosol. 4) El ARN positivo ssARN es entonces reconocido por el complejo de traducción ribosomal a través del *IRES* y es traducido en el citosol como una poliproteína. 5) La poliproteína es procesada en sus respectivas proteínas estructurales y no estructurales. 6) Las proteínas no estructurales forman complejos de replicación en el Retículo Endoplasmático e inician la replicación del genoma. Las hebras positivas son usadas como temple para la síntesis de hebras negativas; se pueden traducir en la poliproteína o empaquetar en nuevos viriones. 7) El ensamblaje viral comienza en el lumen del retículo Endoplasmático y los viriones son transportados al 8) aparato de Golgi, para completar la maduración y el empaquetamiento. 9) Nuevos virus son liberados por exocitosis. Adaptado de [18].



**Genoma del virus de la Peste Porcina; organización y estructura. Naranja: proteínas No estructurales. Azul: proteínas Estructurales.**  
**5' UTR: Región no codificante. 3' UTR: Región no codificante; obsérvese la representación de los bucles y estructuras formadas en estas regiones necesarias en el proceso de transcripción. C: Erns: E1: E2**

### **1.4.5 Vacunas contra la Peste Porcina Clásica**

Las vacunas que circulan actualmente el mercado ecuatoriano están basadas en métodos de lapinización usando cepas atenuadas para su producción, desarrolladas en China a mediados de los 50's, generadas al realizar pases de una cepa virulenta parental en conejos, cientos de veces [43].

Estudios [18,19,20] basados en diferencias en las secuencias de nucleótidos entre cepas virulentas y aquellas atenuadas han encontrado que existe una notable inserción de 12-16 nucleótidos de Timinas en la región 3'UTR de las cepas vacunales (atenuadas) que cambiando las estructuras de esta región, disminuyen su función durante el proceso de transcripción y replicación [11], contribuyendo así con su atenuación.

#### **1.4.1 Subgenoma Viral de Peste Porcina**

Previo a la construcción de un virus completo, primero se debe generar un subgenoma, también llamado mini genoma, el cual posee las secuencias mínimas necesarias para la transcripción viral. De este modo en lugar de las proteínas Estructurales y No estructurales (a excepción de N<sup>pro</sup>) de la poliproteína generada del virus de la PPC, se coloca un gen reportero que emita fluorescencia (p.e. eGFP) como en la fig. 2.5.

##### **1.4.1.1 Región 5' UTR**

La región 5' UTR posee elementos *cis* de vital importancia para la replicación y expresión viral [47]. Inicia con una secuencia de nucleótidos capaz de formar estructuras tipo bucle (*stem loop* siglas en inglés, ver figura 1.2 ) cuya función es inducir la traducción eficiente del genoma debido a que conforma el "sitio interno de entrada ribosomal" (*IRES*) que es capaz de directamente reclutar la subunidad pequeña ribosomal y posicionarse en el sitio de inicio traduccional [40].

##### **1.4.1.2 Región 3' UTR**

Como ocurre con la región 5', en la porción 3' UTR del ARN viral, se encuentran elementos *cis* caracterizados por sus estructuras que permiten que el complejo de replicación se ensamble inmediatamente después de la finalización en la traducción en la región 3' C-terminal y así iniciar la producción de la primera hebra de polaridad negativa [48].

#### **1.4.1.3 Proteína No estructural N<sup>pro</sup>**

El procesamiento de la poliproteína ocurre con la liberación de N<sup>pro</sup> que es una autoproteasa, de ahí su nombre. Esta se corta así misma en su región carboxi-terminal, generando así el extremo amino terminal de la proteína Cápside [49]. Se ha observado que la influencia de esta secuencia viral codificante aumenta la eficiencia del *IRES* en la región 5' UTR [26, 27].

#### **1.4.1.4 Ribozima Cabeza de Martillo**

Las ribozimas son secuencias de ARN con capacidad catalizadora [52]. La Ribozima Cabeza de Martillo (en inglés *Hammerhead Ribozyme*), descubierta por primera vez en el virus del mosaico del tabaco [53], en un contexto biológico no es una enzima verdadera, sino más bien, una hebra de ARN con capacidad autocatalítica que genera un corte [54] en sitios específicos de la misma hebra, como parte del proceso de replicación viral [52].

#### **1.4.1.5 Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta**

El virus de la Hepatitis B posee un conjunto de secuencias de auto-corte del ARN genómico y antígenómico. La secuencia de la ribozima escogida para este estudio tiene una actividad eficiente de escisión, con 85 nucleótidos de largo que generan un corte localizado en el final de la porción 3' de la secuencia [55].

#### **1.4.1.6 eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)**

La proteína verde fluorescente de la medusa *Aequorea victoria* fue descubierta por primera vez por Shimomura [56] y desde entonces ha adquirido un valor importante como gen reportero en procariontes y eucariotes, abriendo nuevas perspectivas al estudio de genes y tecnología recombinante [57].

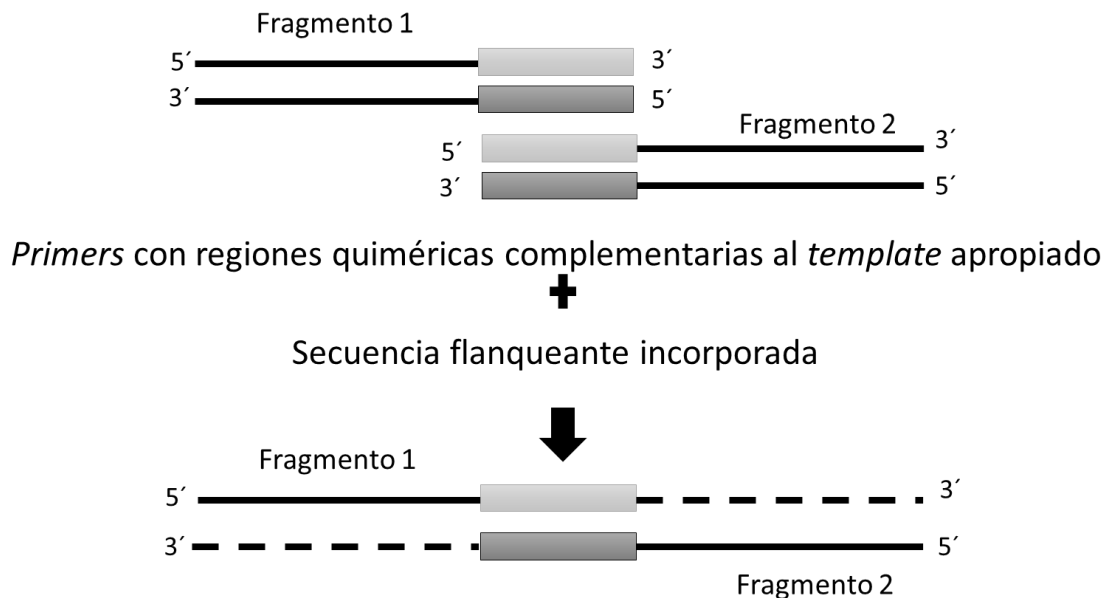
Para la enfermedad de la Peste Porcina Clásica, la Proteína Verde Fluorescente eGFP se ha empleado en el desarrollo de métodos que cuantifican directamente los Anticuerpos Neutralizantes (AcN) contra el virus [4,45], sin necesidad de algún otro método de tinción inmunológica, manteniendo la misma sensibilidad y especificidad. Usando para ello células [59] y virus [1,5,4,2] reporteros que expresan fluorescencia emitida por esta proteína.

#### **1.4.2 Clonación mediante PCR por solapamiento (*overlapping PCR*)**

La PCR por solapamiento (*overlapping* en inglés) usa dos reacciones sucesivas de PCR para unir segmentos de DNA [60]. En la primera PCR, cada segmento es amplificado a partir de un temple apropiado con *primers* que contienen regiones quiméricas complementarias al temple y nucleótidos en las colas 5', que se encuentran flanqueando al momento del anillamiento (ver Fig. 1.3) pero son añadidas al fragmento en las primeras reacciones.

Estas secuencias que son complementarias en ambos fragmentos sirven como *primers* en una segunda reacción de PCR, uniendo las regiones amplificadas de la primera reacción (que se anillan en las regiones complementarias) y permiten el solapamiento. Usando estas regiones (zonas grises de la Fig. 1.3.) como cebadores, finalmente se puede generar una extensión mediante la segunda PCR para obtener la construcción totalmente fusionada [61].





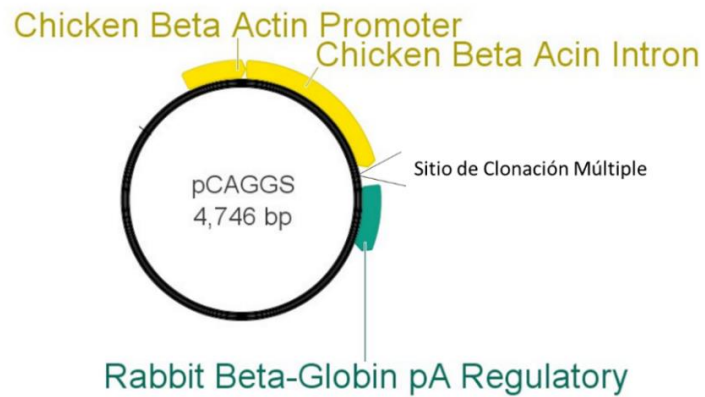
**Fig. 1.3 Estrategia de clonación de PCR por superposición.**

Esta técnica fusiona productos de PCR con extensa área de complementariedad (ver zonas grises) que puedan fungir como *primers* para poder obtener un solo producto amplificado.

### 1.4.3 Plásmido de Expresión.

El plásmido de expresión pCAGGS [62] cuenta con un promotor tipo Polimerasa II, el cual es más eficiente para la transcripción de ARNs virales [63] y no requiere de plásmidos accesorios, como ocurre con el sistema basado en T7 [64].

El esquema del plásmido de la Fig.1.4. muestra los requisitos indispensables de estas moléculas de ADN circular: el iniciador de la Polimerasa II (Chicken Beta Actin promoter) con su respectivo terminador (rabbit beta-globin pA), eficiente señal de poliadenización que permite la terminación de la transcripción [65] y el Sitio de Clonación Múltiple que contiene secuencias diana correspondientes a enzimas de restricción que permiten la inserción de la construcción deseada.



**Fig. 1.4 Esquema del plásmido de expresión pCAGGS.**

**Se muestra el Sitio de Clonación Múltiple y el iniciador de la Polimerasa II (Chicken Beta Actin promoter) con su respectivo terminador (rabbit beta-globin pA), secuencia que posee una señal de poly(A) del gen de la beta-globina de conejo.**

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Virus y Plásmidos

#### 2.1.1 Virus

El virus de la cepa China (*C-Strain*) fue obtenido de diferentes vacunas comerciales proporcionado por Laboratorios Llaguno ® para la amplificación de los genes de interés 5´ UTR, N<sup>pro</sup>, y 3´ UTR. Se confirmó la presencia de ARN viral por RT-PCR semi-anidada (*Heminested-PCR*).

#### 2.1.2 Plásmidos

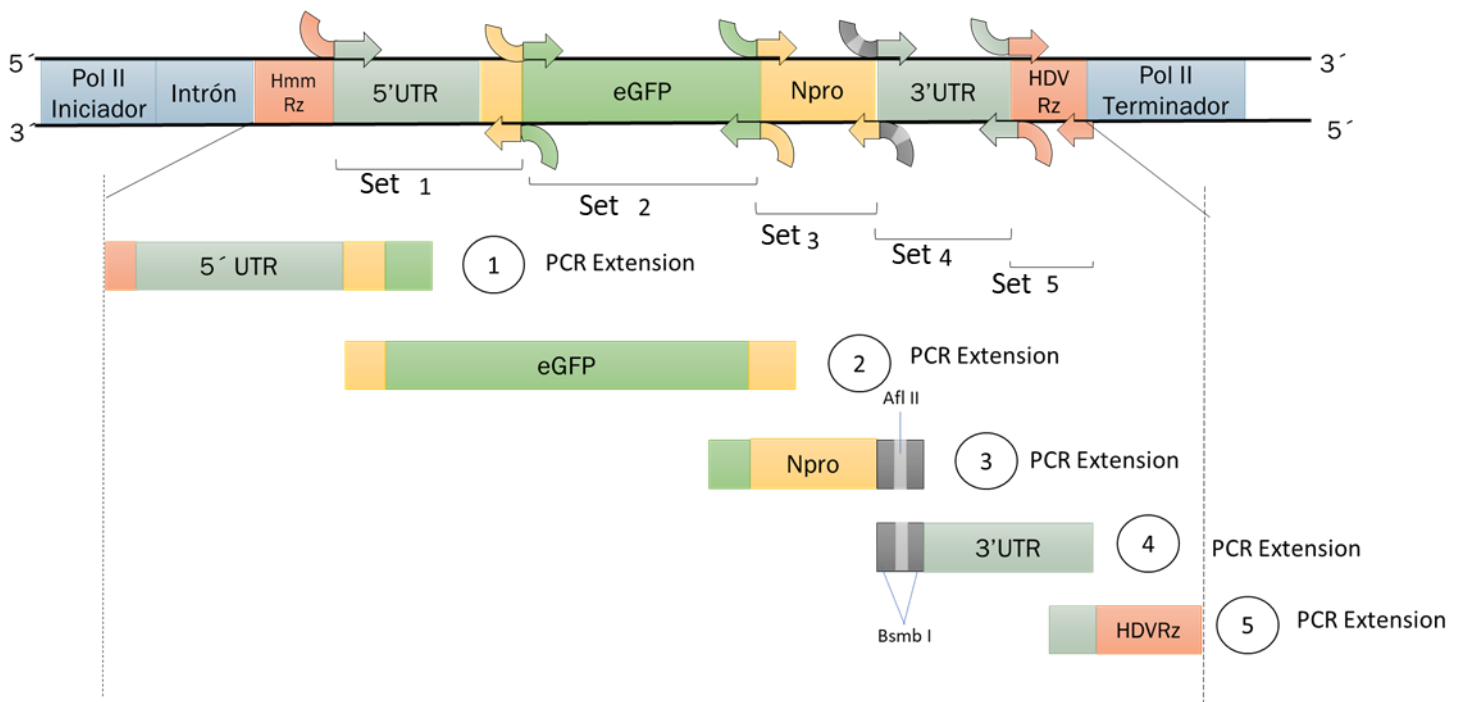
El vector de expresión pCAGGs [62] proporcionado por el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas de la ESPOL posee el iniciador de la Polimerasa II, el cual ha demostrado tener mayor eficiencia en el sistema de rescate de PPC [63]. También se cuenta con un plásmido que posee la secuencia de la proteína eGFP “humanizada” a la que se le han cambiado los nucleótidos codificantes para sus respectivos aminoácidos por nucleótidos comunes en mamíferos que codifican para los mismos aminoácidos, consiguiendo un nivel mayor de expresión en células de mamíferos [57].

### 2.2 Alineación y búsqueda de Secuencias

Se alinearon 32 secuencias publicadas (Anexo A) obtenidas de la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology*, siglas en inglés) que compartían un 97% de identidad con la cepa china para la verificación de nucleótidos a emplearse en el diseño de *primers*.

### 2.3 Diseño de *Primers*

Para obtener la construcción final se diseñaron *primers* con regiones quiméricas complementarias al molde de interés, necesarios para aplicar la técnica de PCR por solapamiento Fig.2.5.



**Fig. 2.5 Esquema de diseño de *primers***

Esquema que muestra el diseño de *primers* u oligonucleótidos sobrelapados. Los *primers* contienen regiones quiméricas complementarias a la secuencia molde de interés, así como regiones que se sobrelapan con las secuencias adyacentes. Los diferentes fragmentos de primera PCR se combinan en una reacción común, donde las regiones que se sobrelapan funcionan como *primers*. Finalmente se utilizan *primers* externos a los fragmentos fusionados para amplificar la construcción quimérica.

Para el set 1, el *primer* Forward cuenta con la secuencia de la ribozima cabeza de martillo y el sitio de reconocimiento de la enzima KpnI, el *primer* reverse contiene la secuencia incorporada complementaria al gen eGFP.

En el set 2, los *primers* Forward y Reverse contienen secuencias complementarias para el gen eGFP y N<sup>pro</sup> como se muestra en la gráfica.

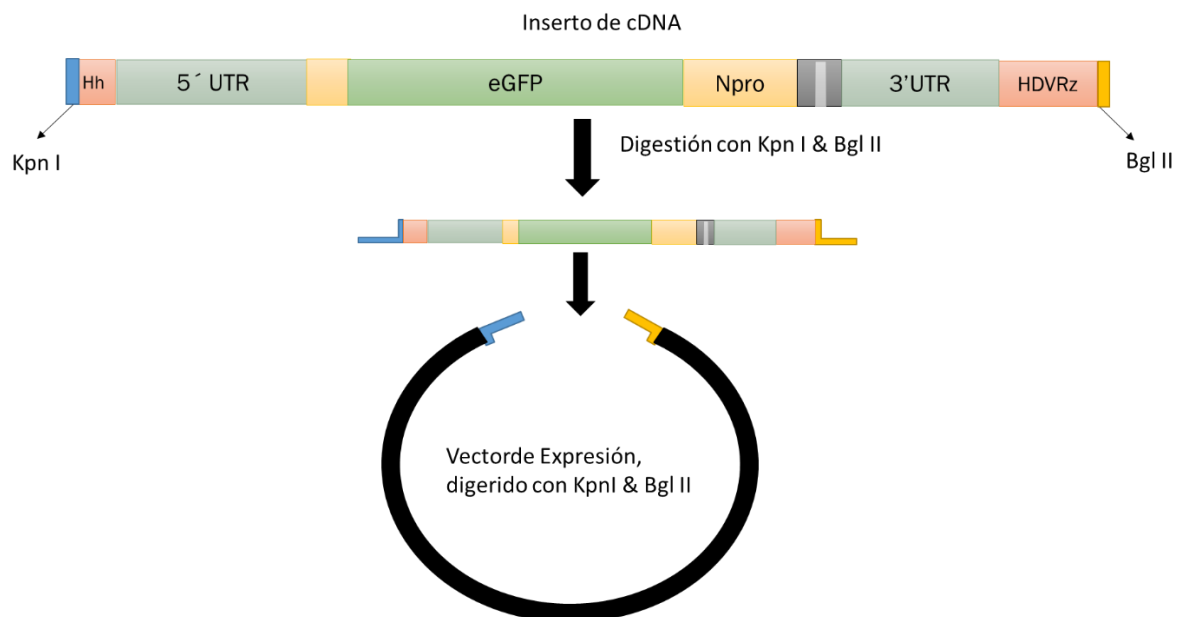
En el set 3 correspondiente a la proteína no estructural N<sup>pro</sup> el *primer* Forward incluye la región de eGFP, y el *primer* reverse posee los sitios de las enzimas de restricción Afl II y BsmB I.

Los *primers* del set 4 poseen las secuencias complementarias a la región 3' UTR y finalmente el set 5 es utilizado para la amplificación de la Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta agregando el sitio de reconocimiento para Bgl II en la porción N-Terminal.

Posteriormente estos fragmentos pueden ser empleados para fusionar los fragmentos que se necesitan introducir en el vector de expresión.

## 2.4 Clonación en el Vector de Expresión

Adicionalmente, los oligonucleótidos diseñados 5'UTR NproN-F y HDV RZ-R cuentan con secuencias reconocidas por las endonucleasas de restricción tipo II, KpnI y Bgl II respectivamente, que reconocen secuencias específicas añadidas en los extremos de la construcción (fig.2.6.), necesarias para su inserción en el Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del vector de expresión pCAGGS [62].



**Fig. 2.6 Esquema del ensamblaje de la construcción.**

**Muestra la digestión por las endonucleasas KpnI y Bgl II para su inserción en el Sitio de Clonación Múltiple del vector de expresión.**

## 2.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El protocolo (Anexo C) de extracción de ARN usado fue el método de Trizol-LS (Invitrogen) así como también el kit de extracción Epicentre (Illumina) siguiendo las

especificaciones del fabricante. El ARN se suspendió en 30  $\mu$ l en H<sub>2</sub>O ultrapura y fue almacenado a -80°C.

El ARN total se midió en un NanoDrop2000 (Thermofisher) y la transcripción reversa se realizó usando la enzima ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) con un volumen final de 20  $\mu$ l, usando los *primers* específicos 3' UTR-R y NproC-R (Tabla I).

## **2.6 Amplificación de fragmentos de interés**

Los sitios de solapamiento se añadieron a los segmentos de interés eGFP y HDV Rz como en la Fig. 2.5. siguiendo las condiciones de la Polimerasa Platinum *Pfx* (Thermofisher Scientific, NY, USA) de acuerdo con el protocolo expuesto en el Anexo B usando los *primers* de la Tabla I.

# CAPÍTULO 3

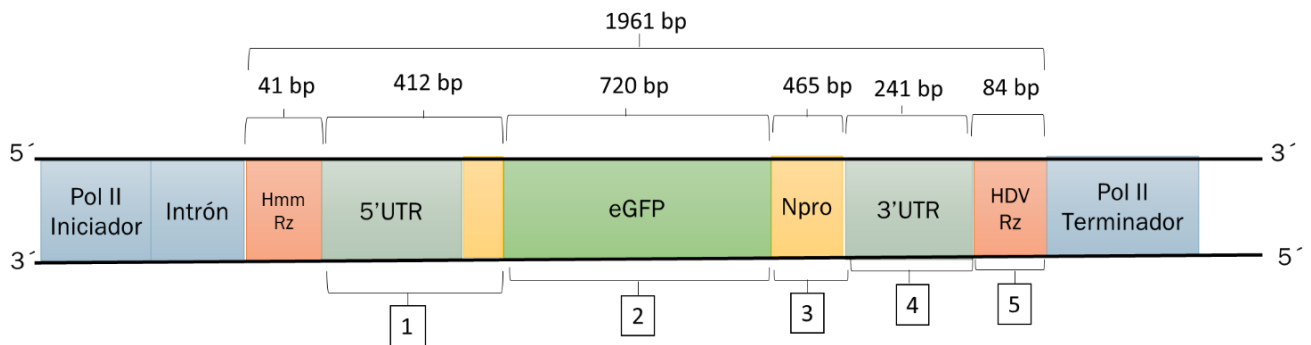
## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Diseño del subgenoma viral de la Peste Porcina Clásica

En la Fig. 3.7. se observa la construcción propuesta, la cual incluye partes del plásmido de expresión; iniciador y terminador de la Polimerasa II. La mínima unidad de transcripción para PPC está formado por las porciones UTRs 5' y 3', más la proteína viral no estructural N<sup>pro</sup> en sentido genómico viral. Flanqueados por las secuencias de las ribozimas Cabeza de Martillo y del Virus de la Hepatitis Delta.

Las secuencias de las Ribozimas colocadas en los extremos de la construcción cumplen con la función auto catalítica de corte en sí mismas; la Ribozima cabeza de Martillo hacia el lado 3', mientras que la ribozima del virus de la Hepatitis Delta hacia el lado 5', de esta manera dejando libre únicamente el subgenoma desde la región 5' UTR hasta la región 3' UTR con el gen reportero insertado dentro de la proteína N<sup>pro</sup>.

Con el subgenoma libre en el citoplasma la región 5'UTR debería cumplir con su función de *IRES* e iniciar el proceso de transcripción anclándose directamente a la subunidad pequeña del ribosoma de la célula huésped sin necesidad de poseer secuencias iniciadoras Cap y terminadoras polyA, transcribiendo el gen Reportero y finalizando la transcripción en la región 3' UTR.



**Fig. 3.7 Estrategia de Construcción del Sistema Biológico.**

**1) Región 5'UTR hasta el aminoácido 13 de N<sup>pro</sup> conteniendo la secuencia de la Ribozima cabeza de martillo. 2) eGFP 3) N<sup>pro</sup> aa 14 C-Terminal 4) Región 3'UTR. 5) Ribozima del virus de la Hepatitis Delta. Hhm Rz:Ribozima Hammerhead. Se muestran los tamaños en pares de bases de cada segmento.**

El gen reportero para probar la actividad en la transcripción del ARN viral se sitúa dentro de la proteína no estructural N<sup>pro</sup>, entre los aminoácidos 13 y 14 siguiendo el modelo de rescate de [4] [1] [2] [41] en los que se insertan dentro de dicha proteína los genes reporteros eGFP, Luc, y CAT ya que la excepcional eficiencia del *IRES* está fuertemente influenciada por las secuencias inmediatas (corriente abajo) del codón de inicio, y es óptima con secuencias virales codificantes en esta posición [51].

### 3.1.1 Diagnóstico Molecular del Virus

Se realizó un diagnóstico molecular de las vacunas comerciales por medio de la técnica de PCR semi-anidada como se observa en la Fig.3.8. usando los *primers* de la Tabla I, detectándose en todas en la segunda reacción de PCR a partir de 100 µl de ARN extraído, indicando baja carga viral.



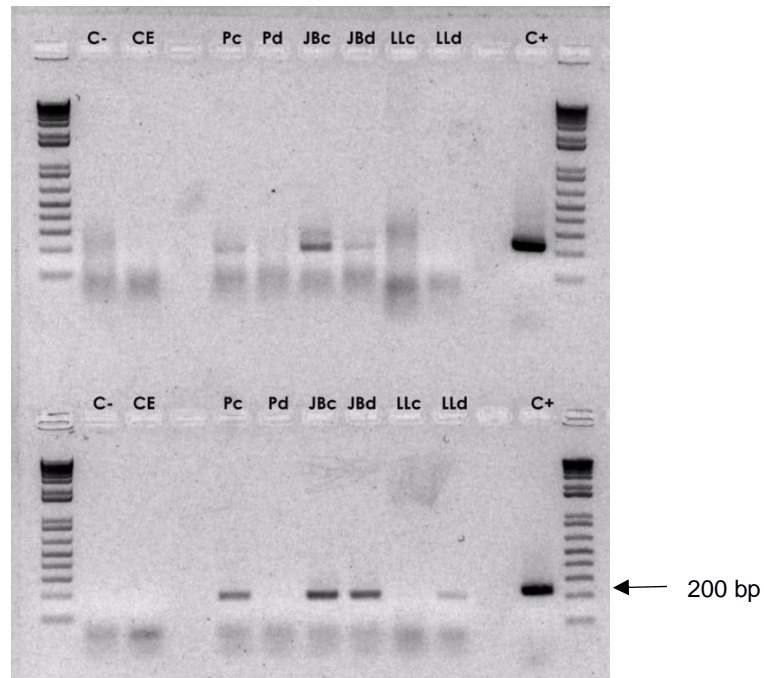


Fig. 3.8. Diagnóstico molecular del virus.

Arriba: Producto de la One-Step RT-PCR. Abajo: Producto de la One-Step RT-PCR 10-1. P: Porcivir® JB: James Brown®, LL: Lab. Llaguno®. C- control negativo, CE: Control de Extracción. El producto esperado se encuentra en 190 bp. C+: al no contar con un control positivo se decidió aplicar los mismos protocolos para una muestra con la cual ya había sido probada cuya banda esperada se encuentra en los 232 bp.

### 3.2 Primers diseñados

Tabla I. *Primers* diseñados en este estudio. Azul: secuencias complementarias al genoma viral, Negrita: Endonucleasas KpnI y Bgl II

Set	Nombre	Secuencia
Set 1	5' UTR-NproN-F	ACGGT <b>TACC</b> CGTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACTCCGTAAGGA GTC <b>GTATACGAGGTTAGTTCATTC</b>
	5' UTR-NproN-R	TCGCCCTTGCTCACCAT <b>GTTTGT</b> TTTGTATAAAAG
Set 2	eGFP-F	<b>TTATACAAAACA</b> AACATGGTGAGCAAGGGCGAG
	eGFP-R	<b>CATTGGTTTTTGT</b> TTATCCTTGTACAGCTCGTC
Set 3	NproC-F	GAGCTGTACAAGGATA <b>AAACAAAACCAATGGGAG</b>
	NproC-R	TGAGACGCTTAAGCGTCTCAG <b>CAACTGGTAACCCACAATG</b>
Set 4	3' UTR-F	TGAGACGCTTAAGCGTCTCAT <b>GAGCGCGGGTAACCCGGGATC</b>
	3' UTR-R	TGGGACCATGCCGGCC <b>GGGCCGTTAGAAATTACC</b>
Set 5	HDV RZ-F	<b>AATTTCTAACGGCCCGGCCGGC</b> CATGGTCCCA
	HDV RZ-R	<b>TAAGATCTGTCC</b> CATTTCGCCATTACC
	CSFV_F1C	CCTGAGYGACAAYGGCAC

<b>Diagnóstico</b>	CSFV_F2C	AACATGGATGGTGTAAGTGG
	CSFV_RA	ATAYAAGATGTCCTCCACGG
	CSFV_RA	CCTTTCTTGCAGCCAGTC

Se diseñaron los *primers* de la Tabla I, que contienen nucleótidos complementarios al temple de interés y nucleótidos flanqueantes en las colas 5´ para añadir las regiones que se sobrelapan unas a otras. Lo que permitió amplificar las secciones 2 y 5 (fig.3.7.) siguiendo las condiciones de la Polimerasa Platinum *Pfx* (Thermofisher Scientific, NY, USA) expuestas en el Anexo B.

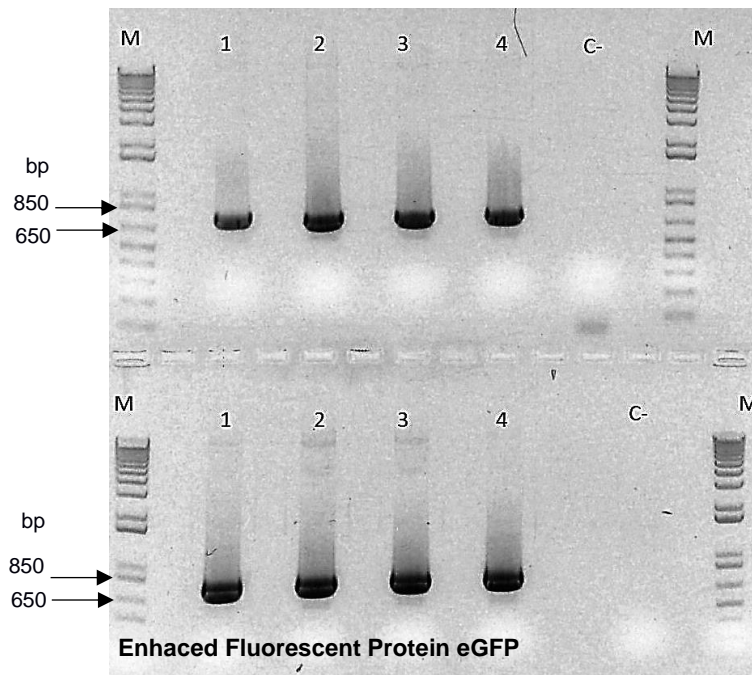
Los fragmentos eGFP y HDV Rz fueron amplificados a partir de plásmidos para la construcción de minigenomas de otros virus de ARN poseedores de dichas secuencias [38, 39].

Por otra parte, para el fragmento viral 3´ UTR no se obtuvieron resultados óptimos posiblemente debido a la baja cantidad viral encontrada en la vacuna utilizada como se visualiza en el gel de la fig.3.8, a la vez otros autores han mencionado que esta región del genoma viral presenta dificultades al retro transcribir la región en ADNc [68].

### **3.2.1 Enhanced Fluorescent Protein eGFP**

Se amplificaron las secuencias de eGFP (Fig 3.9) agregando los sitios quiméricos de los *primers* de la Tabla I siguiendo las condiciones del Anexo B, al mismo tiempo se decidió experimentar dos concentraciones del Buffer de amplificación de la enzima Platinum *Pfx* (Thermofisher) para probar de esta manera si se mejoraba la eficiencia de la reacción.

Se observó que se obtiene una banda más fuerte con la concentración final de 2x, por lo que se decidió trabajar con esta concentración para las demás reacciones.

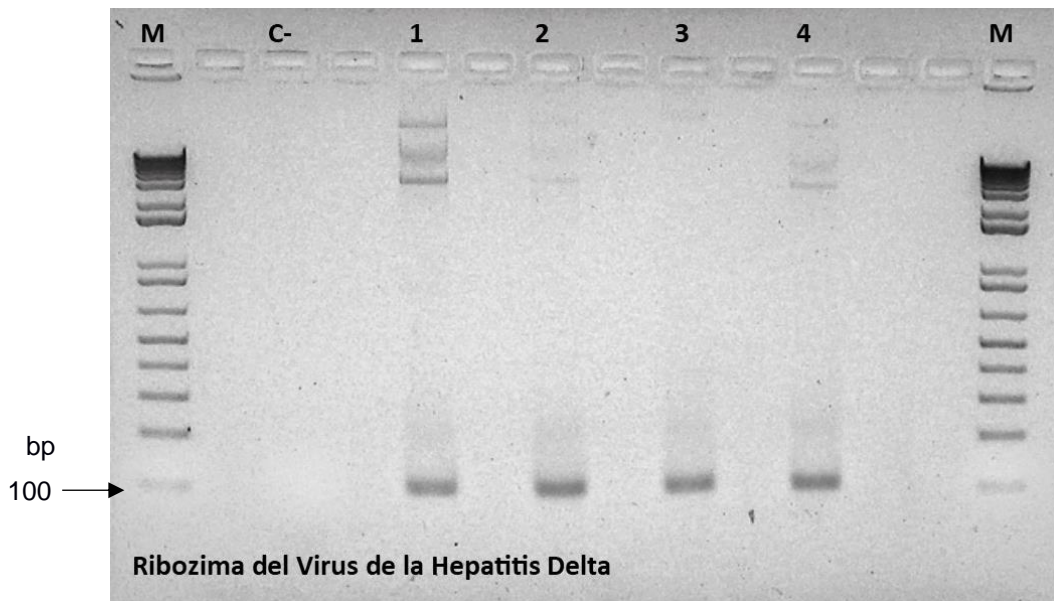


**Fig. 3.9. Electroforesis del fragmento eGFP en gel de agarosa al 1%.**

Se muestra el gel resultado de la amplificación de eGFP con una banda esperada de 750 pares de bases, las diferentes numeraciones representan diferentes concentraciones del plásmido usado según las especificaciones de Platinum Pfx (Thermofisher Scientific, NY, USA). Arriba: concentración final del *Pfx* Amplification Buffer 1x. Abajo: concentración final del *Pfx* Amplification Buffer 2x. M: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1) Plásmido 75ng/μl 2) Plásmido 75ng/l 3) 83 ng/μl 4) 67 ng/μl, C-) Control negativo.

### 3.2.2 Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta

Se amplificaron las secuencias de Ribozima de la Hepatitis Delta Fig.3.10. agregando los sitios quiméricos de los *primers* de la Tabla I con las condiciones del Anexo B, esperándose una banda de 107 pares de bases a diferentes concentraciones del molde usado.



**Fig. 3.10. Electroforesis de la Ribozima Delta del Virus de Hepatitis HDV Rz en gel de agarosa al 2% .**

**Se muestra el resultado de la amplificación del fragmento de la Ribozima del Virus de la Hepatitis Delta (HDV Rz) con una banda esperada de 107 pares de bases. Se probaron diferentes concentraciones del plásmido usado como molde. M) 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen) 1) 100ng/μl 2) 50ng/μl 3) 25 ng/μl, C-) Control negativo.**

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Se diseñó un modelo innovador de virus recombinante de la vacuna de la PPC, el cual es una herramienta para la cuantificación directa de anticuerpos neutralizantes.
- Se identificó las secuencias necesarias para el diseño del subgenoma viral, que incluyen las regiones 5´ UTR, 3´ UTR y la proteína No estructural N<sup>pro</sup>, así como de las secuencias eGFP y HDV Rz obtenidas a partir de plásmidos ya construidos.
- Se diseñaron *primers* con secuencias quiméricas para la clonación de los segmentos de interés por medio de PCR por solapamiento (*overlapping*).
- Se amplificaron las secuencias eGFP, HDV Rz, para su futuro ensamblaje en un plásmido que permita su replicación en cultivo celular

### 4.2 Recomendaciones

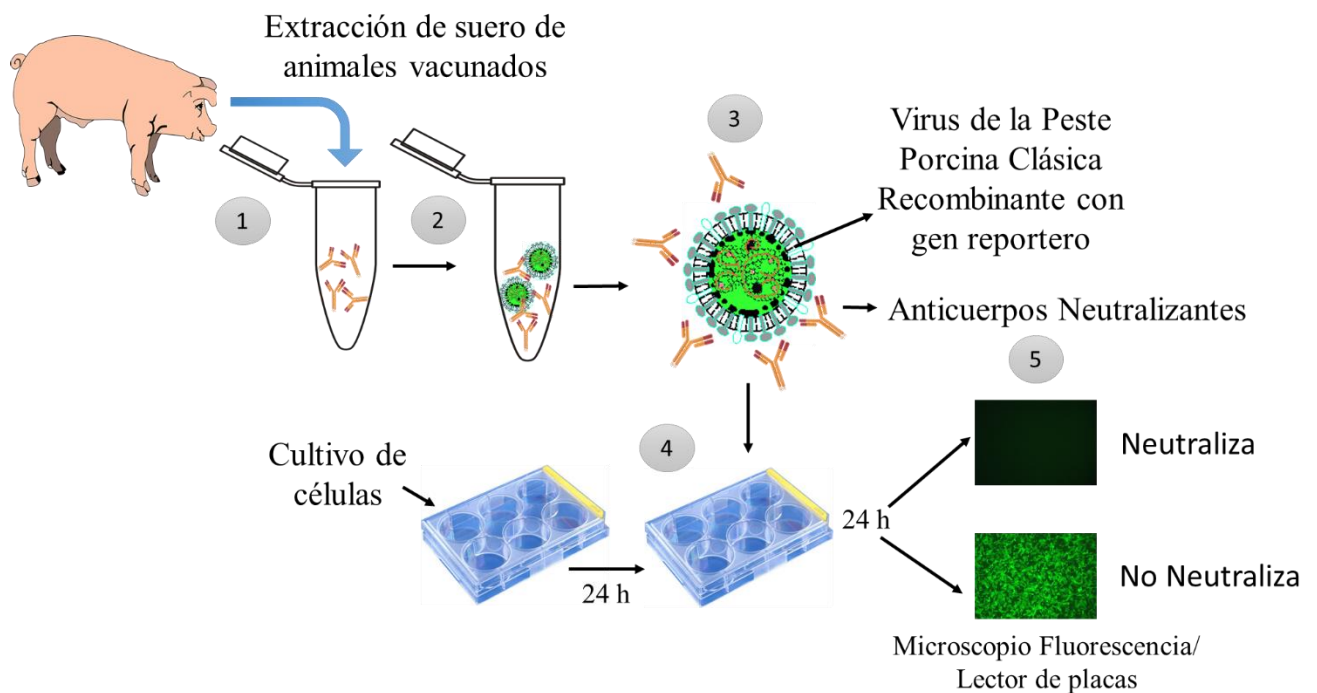
- Se debería mejorar los métodos de titulación de las vacunas del mercado ecuatoriano.
- Continuar con la optimización de protocolos de laboratorio, basados en la construcción propuesta, para obtener el virus recombinante y llevar a cabo el ensayo de Neutralización

#### 4.2.1 Ensayo de neutralización

Se propone probar la eficacia de la vacuna como en la fig.4.11 donde a partir de suero de animales vacunados se obtienen los AcN desarrollados por el animal, para luego de una incubación con el virus recombinante, transfectar en células permisivas para la infección del virus (p.e. línea celular PK-15) y así al cabo de varias horas (16h-24h) observar la respuesta del crecimiento del virus en presencia de los anticuerpos del suero.

Si se observa bajo el microscopio fluorescencia emitida, significa que el virus tiene la capacidad de crecer, es decir, el virus recombinante no ha sido neutralizado por los

anticuerpos presentes en el suero. Por otra parte, si no se observa coloración verde, el virus no ha podido infectar las células; ha sido neutralizado, por lo que no existen partículas virales que emitan fluorescencia.



**Fig. 4.11. Ensayo de Neutralización propuesto.**

**1) Extracción de suero de animales vacunados para ser 2) incubado con el virus recombinante y así 3) enfrentarlo al virus contra los AcN, para luego 4) transfectarlo a un cultivo celular que permita la infección y así observar el resultado final. 5) Si existen AcN el virus no podrá infectar las células y no podrá crecer, lo que significa que existe neutralización y no se observaría fluorescencia. Caso contrario el virus recombinante que expresa el gen reportero podrá crecer y el cultivo celular bajo microscopio de fluorescencia presentaría la coloración verde.**

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. MOSER, J.-D. TRATSCHIN, y M. A. HOFMANN, «A Recombinant Classical Swine Fever Virus Stably Expresses a Marker Gene», *J VIROL*, vol. 72, p. 5, 1998.
- [2] L. Shen *et al.*, «Generation of a recombinant classical swine fever virus stably expressing the firefly luciferase gene for quantitative antiviral assay», *Antiviral Res.*, vol. 109, pp. 15-21, sep. 2014.
- [3] A. Acosta, «CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA POR ZONIFICACIÓN EN EL ECUADOR». 2012.
- [4] Y. Li *et al.*, «Simplified Serum Neutralization Test Based on Enhanced Green Fluorescent Protein-Tagged Classical Swine Fever Virus», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, n.º 8, pp. 2710-2712, ago. 2013.
- [5] A. Kamboj, M. Saini, L. S. Rajan, C. L. Patel, V. K. Chaturvedi, y P. K. Gupta, «Construction of infectious cDNA clone derived from a classical swine fever virus field isolate in BAC vector using in vitro overlap extension PCR and recombination», *J. Virol. Methods*, vol. 226, pp. 60-66, dic. 2015.
- [6] H. R. Moulin *et al.*, «Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation», *Virology*, vol. 365, n.º 2, pp. 376-389, sep. 2007.
- [7] P. C. Risager, U. Fahnøe, M. Gullberg, T. B. Rasmussen, y G. J. Belsham, «Analysis of classical swine fever virus RNA replication determinants using replicons», *J. Gen. Virol.*, vol. 94, n.º Pt 8, pp. 1739-1748, ago. 2013.
- [8] S. Edwards *et al.*, «Classical swine fever: the global situation», *Vet. Microbiol.*, vol. 73, n.º 2-3, pp. 103-119, abr. 2000.
- [9] S.-W. Huang, M.-Y. Chan, W.-L. Hsu, C.-C. Huang, y C.-H. Tsai, «The 3'-Terminal Hexamer Sequence of Classical swine fever virus RNA Plays a Role in Negatively Regulating the IRES-Mediated Translation», *PLOS ONE*, vol. 7, n.º 3, p. e33764, mar. 2012.
- [10] I. Greiser-Wilke, S. Blome, y V. Moennig, «Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus—Status quo and new developments», *Vaccine*, vol. 25, n.º 30, pp. 5524-5530, jul. 2007.
- [11] H. X. Wu *et al.*, «Attenuated Lapinized Chinese Strain of Classical Swine Fever Virus: Complete Nucleotide Sequence and Character of 3'-Noncoding Region», *Virus Genes*, vol. 23, n.º 1, pp. 69-76, ago. 2001.
- [12] N. Tautz, B. A. Tews, y G. Meyers, «The Molecular Biology of Pestiviruses», en *Advances in Virus Research*, vol. 93, Elsevier, 2015, pp. 47-160.
- [13] «Agrocalidad – La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario», *Agrocalidad*. [En línea]. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec/>. [Accedido: 23-ago-2018].
- [14] V. Moennig, «Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy», *Vet. Microbiol.*, vol. 73, n.º 2-3, pp. 93-102, abr. 2000.
- [15] A. D. Garrido Haro, M. Barrera Valle, A. Acosta, y F. J Flores, «Phylodynamics of classical swine fever virus with emphasis on Ecuadorian strains», *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 65, n.º 3, pp. 782-790, jun. 2018.
- [16] «OIE World Animal Health Information System». [En línea]. Disponible en: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/semestrial/review?year](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/semestrial/review?year)

=2017&semester=2&wild=0&country=ECU&this\_country\_code=ECU&detailed=1.  
[Accedido: 13-oct-2018].

- [17] T. Pauly, M. König, H. J. Thiel, y A. Saalmüller, «Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes», *J. Gen. Virol.*, vol. 79 ( Pt 1), pp. 31-40, ene. 1998.
- [18] P. C. Risager, *Identification of the determinants of efficient pestivirus replication: Ph. D. thesis*. Lindholm: Technical University of Denmark, National Veterinary Institute, 2013.
- [19] J. Dewulf, H. Laevens, F. Koenen, K. Mintiens, y A. D. Kruif, «An Experimental Infection With Classical Swine Fever Virus in Pregnant Sows: Transmission of the Virus, Course of the Disease, Antibody Response and Effect on Gestation», *J. Vet. Med. Ser. B*, vol. 48, n.º 8, pp. 583-591, oct. 2001.
- [20] G. Trautwein, «Pathology and Pathogenesis of the Disease», en *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*, B. Liess, Ed. Boston, MA: Springer US, 1988, pp. 27-54.
- [21] H. Meyer, B. Liess, H.-R. Frey, W. Hermanns, y G. Trautwein, «Experimental Transplacental Transmission of Hog Cholera Virus in Pigs\*», *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, vol. 28, n.º 8, pp. 659-668, oct. 1981.
- [22] V. R. Brown y S. N. Bevins, «A Review of Classical Swine Fever Virus and Routes of Introduction into the United States and the Potential for Virus Establishment», *Front. Vet. Sci.*, vol. 5, mar. 2018.
- [23] S. Ribbens, J. Dewulf, F. Koenen, H. Laevens, y A. de Kruif, «Transmission of classical swine fever. A review», *Vet. Q.*, vol. 26, n.º 4, pp. 146-155, dic. 2004.
- [24] *The Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution*. Elsevier, 2003.
- [25] P. Becher, M. Orlich, y H.-J. Thiel, «Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep», *J. Virol.*, vol. 72, n.º 6, pp. 5165-5173, jun. 1998.
- [26] M. Heimann, G. Roman-Sosa, B. Martoglio, H.-J. Thiel, y T. Rügenapf, «Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase», *J. Virol.*, vol. 80, n.º 4, pp. 1915-1921, feb. 2006.
- [27] X. Luo, D. Ling, T. Li, C. Wan, C. Zhang, y Z. Pan, «Classical swine fever virus Erns glycoprotein antagonizes induction of interferon-beta by double-stranded RNA», *Can. J. Microbiol.*, vol. 55, n.º 6, pp. 698-704, jun. 2009.
- [28] B. A. Tews, E.-M. Schürmann, y G. Meyers, «Mutation of cysteine 171 of pestivirus Erns RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus», *J. Virol.*, vol. 83, n.º 10, pp. 4823-4834, may 2009.
- [29] Z. Wang, Y. Nie, P. Wang, M. Ding, y H. Deng, «Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry», *Virology*, vol. 330, n.º 1, pp. 332-341, dic. 2004.
- [30] M. Beer, I. Reimann, B. Hoffmann, y K. Depner, «Novel marker vaccines against classical swine fever», *Vaccine*, vol. 25, n.º 30, pp. 5665-5670, jul. 2007.
- [31] N. Ruggli *et al.*, «Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of Npro», *J. Virol.*, vol. 83, n.º 2, pp. 817-829, ene. 2009.
- [32] T. Harada, N. Tautz, y H. J. Thiel, «E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies», *J. Virol.*, vol. 74, n.º 20, pp. 9498-9506, oct. 2000.



- [33] T. Lackner *et al.*, «Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus», *J. Virol.*, vol. 78, n.º 19, pp. 10765-10775, oct. 2004.
- [34] Z. Zhu, Y. Wang, J. Yu, L. Wan, J. Chen, y M. Xiao, «Classical swine fever virus NS3 is an IRES-binding protein and increases IRES-dependent translation», *Virus Res.*, vol. 153, n.º 1, pp. 106-112, oct. 2010.
- [35] J. Gouttenoire *et al.*, «Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B», *J. Virol.*, vol. 83, n.º 12, pp. 6257-6268, jun. 2009.
- [36] C. W. Grassmann, O. Isken, N. Tautz, y S. E. Behrens, «Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans», *J. Virol.*, vol. 75, n.º 17, pp. 7791-7802, sep. 2001.
- [37] V. Lohmann, H. Overton, y R. Bartenschlager, «Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS5B RNA polymerase activity by GTP», *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n.º 16, pp. 10807-10815, abr. 1999.
- [38] M. Xiao *et al.*, «Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome», *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, n.º 19, pp. 3888-3896, oct. 2004.
- [39] B.-J. Shi *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», *J. Virol.*, vol. 90, n.º 20, pp. 9194-9208, 15 2016.
- [40] T. L. Poole, C. Wang, P. R.A, L. N. D. Potgieter, A. Siddiqui, y M. S. Collett, «Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry», *Virology*, vol. 206, n.º 1, pp. 750-754, ene. 1995.
- [41] S.-E. Behrens, C. W. Grassmann, H.-J. Thiel, G. Meyers, y N. Tautz, «Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon», *J. Virol.*, vol. 72, n.º 3, pp. 2364-2372, mar. 1998.
- [42] S. Li, J. Wang, Q. Yang, M. Naveed Anwar, S. Yu, y H.-J. Qiu, «Complex Virus–Host Interactions Involved in the Regulation of Classical Swine Fever Virus Replication: A Minireview», *Viruses*, vol. 9, n.º 7, jul. 2017.
- [43] «The Lapinized Chinese Strain Vaccine Against Classical Swine Fever Virus: A Retrospective Review Spanning Half A Century», *Agric. Sci. China*, vol. 5, n.º 1, pp. 1-14, ene. 2006.
- [44] H. X. Wu *et al.*, «Attenuated Lapinized Chinese Strain of Classical Swine Fever Virus: Complete Nucleotide Sequence and Character of 3'-Noncoding Region», *Virus Genes*, vol. 23, n.º 1, pp. 69-76, ago. 2001.
- [45] M. L. Wong, B. Y. Peng, J. J. Liu, y T. J. Chang, «Cloning and sequencing of full-length cDNA of classical swine fever virus LPC strain», *Virus Genes*, vol. 23, n.º 2, pp. 187-192, 2001.
- [46] M. Xiao *et al.*, «Influence of a 12-nt insertion present in the 3' untranslated region of classical swine fever virus HCLV strain genome on RNA synthesis», *Virus Res.*, vol. 102, n.º 2, pp. 191-198, jun. 2004.
- [47] S. P. Fletcher y R. J. Jackson, «Pestivirus Internal Ribosome Entry Site (IRES) Structure and Function: Elements in the 5' Untranslated Region Important for IRES Function», *J. Virol.*, vol. 76, n.º 10, pp. 5024-5033, may 2002.
- [48] H. Yu, O. Isken, C. W. Grassmann, y S.-E. Behrens, «A Stem-Loop Motif Formed by the Immediate 5' Terminus of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome Modulates

- Translation as well as Replication of the Viral RNA», *J. Virol.*, vol. 74, n.º 13, pp. 5825-5835, jul. 2000.
- [49] R. Stark, G. Meyers, T. Rumenapf, y H. J. Thiel, «Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus», *J. Virol.*, vol. 67, n.º 12, pp. 7088-7095, dic. 1993.
- [50] S. L. Hunt, A. Kaminski, y R. J. Jackson, «The influence of viral coding sequences on the efficiency of internal initiation of translation of cardiovirus RNAs», *Virology*, vol. 197, n.º 2, pp. 801-807, dic. 1993.
- [51] S. P. Fletcher, I. K. Ali, A. Kaminski, P. Digard, y R. J. Jackson, «The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes.», *RNA*, vol. 8, n.º 12, pp. 1558-1571, dic. 2002.
- [52] R. H. Symons, «Small catalytic RNAs», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 641-671, 1992.
- [53] G. A. Prody, J. T. Bakos, J. M. Buzayan, I. R. Schneider, y G. Bruening, «Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA», *Science*, vol. 231, n.º 4745, pp. 1577-1580, mar. 1986.
- [54] K. R. Birikh, P. A. Heaton, y F. Eckstein, «The structure, function and application of the hammerhead ribozyme», *Eur. J. Biochem.*, vol. 245, n.º 1, pp. 1-16, abr. 1997.
- [55] M. D. Been y G. S. Wickham, «Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA», *Eur. J. Biochem.*, vol. 247, n.º 3, pp. 741-753, ago. 1997.
- [56] O. Shimomura, F. H. Johnson, y Saiga, «Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*», *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 59, pp. 223-239, jun. 1962.
- [57] S. Zolotukhin, M. Potter, W. W. Hauswirth, J. Guy, y N. Muzyczka, «A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells», *J. Virol.*, vol. 70, n.º 7, pp. 4646-4654, jul. 1996.
- [58] Y. Li *et al.*, «Generation and evaluation of a chimeric classical swine fever virus expressing a visible marker gene», *Arch. Virol.*, vol. 161, n.º 3, pp. 563-571, mar. 2016.
- [59] F. Chen *et al.*, «A dark-to-bright reporter cell for classical swine fever virus infection», *Antiviral Res.*, vol. 117, pp. 44-51, may 2015.
- [60] A. V. Bryksin y I. Matsumura, «Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids», *BioTechniques*, vol. 48, n.º 6, pp. 463-465, jun. 2010.
- [61] N. Harrison, B. Cavinder, J. Townsend, y F. Trail, «Optimized primers and other critical conditions for efficient fusion PCR to generate knockout vectors in filamentous fungi.», *Fungal Genet. Rep.*, vol. 60, n.º 1, pp. 1-10, dic. 2013.
- [62] N. Hitoshi, Y. Ken-ichi, y M. Jun-ichi, «Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector», *Gene*, vol. 108, n.º 2, pp. 193-199, dic. 1991.
- [63] C. Li *et al.*, «Efficient and stable rescue of classical swine fever virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II system», *Arch. Virol.*, vol. 158, n.º 4, pp. 901-907, abr. 2013.
- [64] H. G. van Gennip, P. A. van Rijn, M. N. Widjoatmodjo, y R. J. Moormann, «Recovery of infectious classical swine fever virus (CSFV) from full-length genomic cDNA clones by a swine kidney cell line expressing bacteriophage T7 RNA polymerase», *J. Virol. Methods*, vol. 78, n.º 1-2, pp. 117-128, mar. 1999.

- [65] J. Lanoix y N. H. Acheson, «A rabbit beta-globin polyadenylation signal directs efficient termination of transcription of polyomavirus DNA.», *EMBO J.*, vol. 7, n.º 8, pp. 2515-2522, ago. 1988.
- [66] V. Hinojosa y W. Cárdenas, «Plasmid-driven Minigenome Rescue System for Influenza B Virus: A Reverse Genetics Approach for Antiviral Research and Vaccine Production», *Viruses*, 2016.
- [67] Y. Melgar y J. Dario, «Diseño de Minigenoma de Virus Rabico como base para Formulación de Vacunas de Nueva Generacion», 2014.
- [68] H. Li *et al.*, «Differentiation of virulent Shimen and vaccine C strains of classical swine fever virus by duplex reverse-transcription polymerase chain reaction», *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 31, n.º 5, pp. 880-885, sep. 2017.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

<b>Número de Accesión</b>	<b>Autor (principal)</b>	<b>Organismo</b>	<b>Origen</b>	<b>Cepa</b>
AF352565	Chang, T.-J.	Classical swine fever virus	Taiwan	-
AF091507	Wang, J.-F.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
AF091661	Kyle, J, et al	Classical swine fever virus	Switzerland	Brescia
U45478	Mueller, H.M.	Classical swine fever virus	Germany	Glentorf
X96550	Tratschin, J.D.	Classical swine fever virus	Switzerland	CAP
KC503764	Tomar, N	Classical swine fever virus	India	C-Strain
KM262189	Kamboj, A	Classical swine fever virus	India	CSFV/IVRI/VB-131
DQ127910	Li, X	Classical swine fever virus	China	SWH
AF092448	Wang, J.F.	Classical swine fever virus	China	Shimen
AF333000	Mingxiao, D	Classical swine fever virus	China	cF114
LC374604	Tran, H. T	Classical swine fever virus	Vientam	VN91
HQ380231	Shen, H	Classical swine fever virus	China	CSFV-GZ-2009
EU497410	Qiu, H.-J.	Classical swine fever virus	China	JL1
AY775178	Zhao, J. J	Classical swine fever virus	China	C-Strain
D49533 (HCVPOLYP2)	Nagai, H.	Classical swine fever virus	Japan	GPE-
KY860615	Tomar, N.	Classical swine fever virus	India	CSFV212L-13
EU789580	Park, G.	Classical swine fever virus	Korea	LOM
EU915211	Park, G.	Classical swine fever virus	Korea	LOM
EU490425	Fan, Y.F.	Classical swine fever virus	China	Thiverval
X87939	Ruggli, N	Classical swine fever virus	Switzerland	Alfort/187
D49532 (HCVPOLYP1)	Ishikawa, K.	Classical swine fever virus	Japan	C-Strain
HM237795	Leifer, I.	Classical swine fever virus	Germany	Koslov
EU857642	Gupta, P.K.	Classical swine fever virus	India	C-Strain
Z46258	Moormann, R.J.	Classical swine fever virus	Netherlands	C-Strain
AY259122	Mayer, D.	Classical swine fever virus	Switzerland	Riems
U45477 (HCU45477)	Mueller, H.M	Classical swine fever virus	Germany	Riems
AF091507	Wang, J.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
AY663656	Qian, P.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
AY382481	He, C.-Q.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
HM175885	Chen, N.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
AF531433	Yu, X.	Classical swine fever virus	China	C-Strain
AY805221	Qiu, H.	Classical swine fever virus	China	C-Strain

## ANEXO B

### Condiciones de amplificación región 3' UTR

Componentes	Vol	Concentración final
10 X <i>Pfx</i> Amplification Buffer	5	2x
10 mM dNTP mix	0.75	0.3mM
50mM MgSO <sub>4</sub>	0.5	1mM
10 um Primer Forward 3' UTR-F	0.75	0.3uM
10 um Primer Reverse 3' UTR-R	0.75	0.3uM
Platinum <i>Pfx</i> Polymerase	0.2	1 U
H <sub>2</sub> O	16.05	-
Template cDNA	1	10 pg - 200ng
Total	25	2x

### Condiciones del termociclador 3' UTR

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30s
Anillación	58°C	30s
Extensión	68° C	30s
Extensión Final	68°C	5 min
Hold		∞

### Condiciones de amplificación región eGFP

Componentes	Vol	Concentración final
10 X <i>Pfx</i> Amplification Buffer	5	2x
10 mM dNTP mix	0.75	0.3mM
50mM MgSO <sub>4</sub>	0.5	1mM
10 um Primer Forward 3' UTR-F	0.75	0.3uM
10 um Primer Reverse 3' UTR-R	0.75	0.3uM
Platinum <i>Pfx</i> Polymerase	0.2	1 U
H <sub>2</sub> O	16.05	-
Template cDNA	1	10 pg - 200ng
	25	

### Condiciones Termociclador eGFP

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30s
Anillación	60°C	30s
Extensión	68° C	1 min
Extensión Final	68°C	5 min
Hold	15°C	∞

### Condiciones de amplificación región HDV Rz

Componentes	Vol	Concentración final
10 X <i>Pfx</i> Amplification Buffer	5	2x
10 mM dNTP mix	0.75	0.3mM
50mM MgSO4	0.5	1mM
10 um Primer Forward 3' UTR-F	0.75	0.3uM
10 um Primer Reverse 3' UTR-R	0.75	0.3uM
Platinum <i>Pfx</i> Polymerase	0.2	1 U
H2O	16.05	-
Template cDNA	1	10 pg - 200ng
	25	

### Condiciones del termociclador HDV Rz

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30s
Anillación	58°C	30s
Extensión	68° C	30s
Extensión Final	68°C	5 min
Hold	15°C	∞

## **ANEXO C**

### **Protocolo de Extracción de ARN: Trizol-LS**

#### **INACTIVACIÓN DE LA MUESTRA**

1. Agregar 750 µl de TRI Reagent® LS en un tubo estéril de 1.5 ml.
2. Añadir entre 250 µl de muestra, homogenizar la muestra 2 veces mediante pipeteo, evitando formar burbujas durante el proceso. La relación entre volumen de trizol y la muestra es 3:1, en este parte del proceso se puede guardar las muestras y mantenerlas a -60°C ó -80°C hasta un mes.

#### **FASE DE SEPARACIÓN**

3. Incubar la muestra por 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 200 µl de cloroformo, rápidamente mezclar invirtiendo el tubo.
5. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 14.000 g por 15 min a 4°C (se debe formar 2 fases).
7. Paralelamente, en tubo estéril de 1.5 ml agregar 4 µl de glucógeno (5 mg/ml ambion) y 50 µl de Acetato de sodio 3M.
8. Al finalizar la centrifugación, remover la fase acuosa 500ul (evitando absorber la interfase) y colocarla en el tubo del paso 7. Vortex rápido.

\*En la fase acuosa se encuentra el ARN, en la interfase el ADN (de color blanco), seguida en la parte inferior de la fase orgánica con proteínas y otras moléculas.

\*El acetato de sodio y el glucógeno ayudan a la visualización del pellet durante la precipitación con isopropanol.

#### **PRECIPITACIÓN DE ARN**

9. Agregar 500 µl de isopropanol, mezclar con Vortex
10. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
11. Centrifugar a 14.000 g por 10 min a 4°C

#### **LAVADO DE ARN**



12. Remover el sobrenadante con cuidado para no absorber el pellet. Si es necesario dejar 50  $\mu$ l.
  13. Agregar 1 ml de etanol 75% frío. Vortex rápido
- \*Aquí se puede guardar las muestras por 1 año a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o por 1 semana a  $4^{\circ}\text{C}$
14. Centrifugar a 14.000 g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
  15. Repetir los pasos del 12 y 13 para un segundo lavado.
  16. Descartar todo el sobrenadante, si es necesario usar la pipeta de 10  $\mu$ l para retirar todo residuo de etanol 75% dejando completamente seco el pellet.
  17. Secar completamente el tubo y el pellet, colocando el tubo abierto sobre papel toalla (previamente esterilizada con UV) en la cámara de flujo laminar (CFL) por 5-10 min.
  18. Suspender el pellet en 30  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNase y DNase (ultra pura), otra opción es suspender en Buffer TE (10mM Tris HCl; 0.1mM EDTA; pH=7.5).
  19. Dejar 10-30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , antes de usar el ARN. Esto ayuda a disolver el pellet.
  20. Conservar el ARN restante en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .