



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON EL VIRUS DE  
DIARREA VIRAL BOVINA**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
ANA GABRIELA REYES MONTELLANO**

**TUTOR PRINCIPAL  
M en C JOSÉ RAMÍREZ LEZAMA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:  
DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**DRA. OLIVIA RODRÍGUEZ MORALES  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**MARZO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres Armando y Sandra**

Porque son mis dos pilares que me han dado todo para lograr este objetivo, son mi ejemplo de fortaleza, perseverancia y trabajo duro, demostrándome siempre que todo se puede lograr.

Sin ustedes no hubiera sido posible, gracias por todo su amor y por confiar en mí. Los amo.

### **A mis hermanas Lorena y Alicia**

Porque son mi mejor equipo, por estar conmigo en cada momento, gracias por siempre tener las palabras adecuadas para hacerme sentir bien y darme ánimo de seguir hasta el final. Las amo.

### **A mis sobrinos David, Camila y Mariano**

Porque son el regalo más noble y bonito que tengo. Los amo.

### **A Misael**

Por compartir conmigo este trayecto de principio a fin, por estar conmigo en los buenos y no tan buenos momentos, por ser mi apoyo, mi ejemplo de dedicación y disciplina, por motivarme siempre. Te admiro y te amo.

### **A mis abuelos Licha, Pepe y Chelita**

Porque a pesar de la distancia, siempre me acompañaron con sus oraciones. Por tanto amor y ser un ejemplo de vida.

### **A mi Olis**

Por ser la mejor amiga que pude tener, porque siempre recibí de ti buenos consejos y mucho ánimo, eres una persona que admiro mucho y que eres para mí un gran ejemplo. Te quiero muchísimo.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) Proyectos IT-201516 y IN-2017919**

Por el financiamiento para la realización de este proyecto.

### **A CONACyT**

Por el apoyo económico para sustentar este grado académico.

### **A LA FMVZ-UNAM**

Por mi formación académica, pero sobre todo por que aquí conocí a los mejores maestros, amigos y compañeros de trabajo.

### **Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

Por permitirme desarrollar parte de mis trabajos de investigación

### **Al Dr. Francisco Basurto**

Por ser más que un maestro, por preocuparse siempre, pero sobre todo por confiar en mí. Lo admiro y lo quiero mucho.

**A la M en C Ninnet Gomez Romero** por ser para mí un gran ejemplo, por compartir todos tus conocimientos, por todas tus aportaciones, y por ser un gran apoyo en todo este proyecto.

### **Al Dr. José Ramírez Lezama y la Dra. Larisa**

Por sus enseñanzas y por todo su apoyo durante el proyecto.

### **A la Dra. Olivia Rodríguez Morales**

Por formar parte de mi comité, por todas sus aportaciones, por recibirme en su laboratorio y compartir conmigo todos sus conocimientos.

### **Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez**

Por sus aportaciones, enseñanzas y por permitirme terminar una parte del proyecto en el laboratorio de Microbiología Molecular.

### **A la Dra. Yolanda López Vidal**

Por su apoyo y revisión de escritura de tesis.

### **Al Dr. Jorge Tórtora Pérez**

Por su apoyo y revisión de escritura de tesis.

**A la Dra Laura Romero Romero**

Por su colaboración con la parte de patología del proyecto.

**Al MMVZ Juan Miguel Perez Enriquez**

Por su apoyo en la interpretación de las pruebas de patología clínica.

**A la Dra. Minerva Arce Fonseca y la M en C Silvia Carrillo**

Por recibirme en el laboratorio, por sus aportaciones, por enseñarme a trabajar nuevas técnicas y por la oportunidad de formar parte de los seminarios de cardiología.

**Al Dr. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

Por su apoyo en el sangrado de ratones, por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos.

**Dr. Gerado Aristi Urista**

Por permitirme trabajar en el Hospital General en el laboratorio de IHQ y enseñarme el proceso y estandarización de nuevas técnicas.

**A Armando y Liz**

Por compartir conmigo sus conocimientos en el área de IHQ en el hospital General.

**A Eduardo Miranda, Alfredo , Maribel Nieto y todo el personal de preparación de Medios**, por su apoyo en la preparación de materiales, preparación de cortes histológicos, cuidado de los animales y desarrollo de necropsias.

**A Silvia, Vic, Joce, Adolfo y Lazaro** por todo su apoyo, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias dentro del laboratorio, por ser un gran equipo de trabajo y por hacer cada día muy especial.

**A Erika, Narda, Naye y Eli**

Porque fueron la familia que encontré en la Ciudad de México, por siempre apoyarme y compartir conmigo parte de sus vidas, estaré siempre agradecida con ustedes. Las quiero mucho.

**A mis amigos y familia de Torreón**

Que no terminaría de mencionar a cada uno, pero que son una parte fundamental de mi vida, por no olvidarse de mi y recibirme como si el tiempo nunca hubiera pasado.

## RESUMEN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un patógeno que disminuye la productividad del ganado; causa abortos, infertilidad, malformaciones congénitas, aumento de la mortalidad neonatal y nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI).

Actualmente, la información sobre infecciones experimentales con el VDVB en animales de laboratorio es limitada. Establecer un modelo murino de infección proporcionaría información sobre la propagación del VDVB en dicho modelo y su potencial uso en la evaluación de la calidad de vacunas elaboradas con este virus. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de infección con el VDVB en ratones mediante la inoculación de la cepa NADL (VDVB-1a biotipo CP) por la vía intraperitoneal y orogástrica en dosis baja ( $1 \times 10^{5.7}$ ) y dosis alta ( $1 \times 10^{6.7}$ ) para evaluar la capacidad de propagación del virus y los cambios producidos por la infección en tejidos (hígado, riñón, bazo, intestino y estómago), a través de ELISA, RT-PCR, evaluación histopatológica, hematología y bioquímica clínica.

Los hallazgos histopatológicos mas relevantes fueron atrofia de la pulpa blanca y focos de apoptosis en bazo y necrosis coagulativa multifocal en hígado de ratones inoculados con dosis baja; con dosis alta por vía IP únicamente se encontraron focos de apoptosis en hígado, y atrofia de la pulpa blanca en bazo. En los resultados obtenidos mediante RT-PCR de ratones inoculados con la cepa NADL en dosis baja se observaron positivos 4/8 ratones centinela y 4/8 ratones infectados. Utilizando dosis alta se observaron positivos 4/8 ratones centinela y 3/8 ratones infectados.

Estos datos nos permiten concluir que los ratones tienen la capacidad de replicar el virus y transmitirlo a otros ratones por contacto directo con secreciones sin la manifestación de signos clínicos.

## **ABSTRACT**

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a viral pathogen that causes a decrease in cattle productivity by causing abortions, infertility, congenital malformations, increased neonatal mortality and birth of persistently infected calves (PI).

Currently, information on experimental infections in laboratory animals is limited, therefore the development of a murine model of infection would provide information regarding BVDV tissue distribution and spread in that model and its potential use in assessing the BVDV vaccine quality. The aim of this work was to develop an infection model using BVDV in mice by inoculating the NADL strain (BVDV-1a biotype CP) using intraperitoneal and orogastric route in low dose ( $1 \times 10^{5.7}$ ) and high dose ( $1 \times 10^{6.7}$ ) to evaluate the BVDV tissue distribution and changes in liver, kidney, spleen, intestine and stomach produced after inoculation. The latter using ELISA, RT-PCR, histopathological evaluation, hematology and clinical biochemistry.

The main histopathological findings in animals inoculated with low dose were white pulp atrophy, spleen apoptosis and coagulative necrosis in liver; with the high dose via IP, only liver apoptosis was found, and spleen white pulp atrophy. RT-PCR of inoculated animals with low dose showed 4/8 positive of sentinel mice and 4/8 positives of infected mice; animals inoculated with high dose showed 4/8 sentinel mice and 3/8 positives of infected mice. These data reveal that mice can replicate the BVDV and transmit it to other mice by direct contact with secretions without the manifestation of clinical signs.

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIAS.....</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>X</b>
<b>ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>VIRUS.....</b>	<b>2</b>
MORFOLOGÍA.....	2
ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	3
<b>REPLICACIÓN VIRAL.....</b>	<b>4</b>
<b>PROTEÍNAS VIRALES.....</b>	<b>5</b>
ESTRUCTURALES.....	5
NO ESTRUCTURALES.....	6
<b>RESPUESTA INMUNE.....</b>	<b>8</b>
<b>INTERACCIÓN DEL VDV B Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....</b>	<b>9</b>
<b>PERSISTENCIA E INMUNIDAD INNATA.....</b>	<b>10</b>
<b>PRESENTACIÓN CLÍNICA.....</b>	<b>11</b>
INFECCIÓN AGUDA.....	11
INFECCIÓN GRAVE.....	11
SÍNDROME HEMORRÁGICO.....	11
ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI).....	12
ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM).....	12
<b>CEPAS DE VDV B PRESENTES EN MÉXICO.....</b>	<b>12</b>
<b>ESTUDIOS EXPERIMENTALES CON VDV B.....</b>	<b>14</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
Animales.....	19
Cultivo celular.....	19
Titulación de cepa viral de referencia.....	20
Hematología.....	21

Bioquímica .....	21
Necropsia e histopatología .....	21
Extracción de ARN .....	22
Transcripción reversa – Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	23
Serología (ELISA IDEXX) .....	24
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>Presencia de signos clínicos en el modelo murino de infección con VDVB .....</b>	<b>26</b>
<b>DOSIS BAJA .....</b>	<b>26</b>
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BASAL Y POSTINFECCIÓN.....	26
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA POR VÍAS DE INOCULACIÓN .....	28
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA A LOS DÍAS 7 Y 15 POST INFECCIÓN .....	31
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE RATONES INFECTADOS Y CENTINELA.....	33
<b>HISTOPATOLOGÍA.....</b>	<b>36</b>
<b>DOSIS ALTA .....</b>	<b>38</b>
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA .....	38
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BASAL Y POSTINFECCIÓN.....	38
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA POR VÍAS DE INOCULACIÓN .....	40
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA A LOS DÍAS 7 Y 15 POST INFECCIÓN .....	42
HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE RATONES INFECTADOS Y CENTINELA.....	45
CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EN DOSIS ALTA.....	47
<b>ELISA .....</b>	<b>49</b>
<b>RT-PCR .....</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>PROSPECTIVA .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>65</b>
<b>BASE DE DATOS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO II METODOLOGÍAS.....</b>	<b>79</b>
<b>EXTRACCIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO III CUADROS COMPARATIVOS.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características básicas de los pestivirus.....	3
<b>Figura 2.</b> Organización del genoma de pestivirus .....	4
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético basado en un fragmento de la región 5UTR.....	13
<b>Figura 4.</b> Extracción de ARN a partir de una muestra de hígado de un ratón infectado con la cepa NADL .....	22
<b>Figura 5.</b> Fotografías del cultivo celular (línea MDBK) .....	25
<b>Figura 6.</b> Perfil hematológico basal y post infección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis baja .....	27
<b>Figura 7.</b> Perfil bioquímico dirigido basal y postinfección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis baja. ....	28
<b>Figura 8.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis baja .....	29
<b>Figura 9.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis baja .....	30
<b>Figura 10.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis baja.....	32
<b>Figura 11.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis baja .....	33
<b>Figura 12.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL y ratones centinela a dosis baja .....	34
<b>Figura 13.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL y los ratones centinela a dosis baja.....	35
<b>Figura 14.</b> Microfotografías de hígado y bazo en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP, al día 15 post infección en dosis baja.....	36
<b>Figura 15.</b> Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía OG a dosis baja en los días 7 y 15 post infección .....	37
<b>Figura 16.</b> Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP a dosis baja en los días 7 y 15 post infección .....	37

<b>Figura 17.</b> Perfil hematológico basal y post infección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis alta .....	39
<b>Figura 18.</b> Perfil bioquímico dirigido basal y postinfección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis alta .....	40
<b>Figura 19.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis alta .....	41
<b>Figura 20.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis alta .....	42
<b>Figura 21.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis alta .....	43
<b>Figura 22.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis alta .....	44
<b>Figura 23.</b> Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL y ratones centinela a dosis alta .....	45
<b>Figura 24.</b> Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL y los ratones centinela a dosis alta.....	46
<b>Figura 25.</b> Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB por vía IP en dosis alta .....	47
<b>Figura 26.</b> Microfotografías de hígado y bazo en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP, al día 15 post infección en dosis alta.....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Iniciadores utilizados en la RT-PCR para la amplificación del fragmento 5UTR .....	23
<b>Cuadro 2.</b> Constantes utilizadas en el termociclador para amplificar el producto	23
<b>Cuadro 3.</b> Resultados de la prueba de ELISA de ratones inoculados con VDVB cepa NADL a dosis baja .....	49
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de la prueba de ELISA de ratones inoculados con VDVB cepa NADL a dosis alta .....	49
<b>Cuadro 5.</b> Resultado de los ratones infectados positivos mediante RT-PCR a dosis baja .....	50
<b>Cuadro 6.</b> Resultado de los ratones centinela positivos mediante RT-PCR a dosis baja.....	50
<b>Cuadro 7.</b> Resultado de los ratones infectados positivos mediante RT-PCR a dosis alta .....	51
<b>Cuadro 8.</b> Resultado de los ratones centinela positivos mediante RT-PCR a dosis alta.....	51
<b>Cuadro 9.</b> Pruebas basales bioquímica.....	65
<b>Cuadro 10.</b> Pruebas basales de hematología línea roja.....	67
<b>Cuadro 11.</b> Pruebas basales de hematología línea blanca .....	69
<b>Cuadro 12.</b> Pruebas bioquímicas a dosis baja .....	71
<b>Cuadro 13.</b> Pruebas de hematología línea roja a dosis baja.....	72
<b>Cuadro 14.</b> Pruebas de hematología línea blanca a dosis baja .....	73
<b>Cuadro 15.</b> Pruebas bioquímicas a dosis alta .....	75
<b>Cuadro 16.</b> Pruebas de hematología línea roja a dosis alta.....	76
<b>Cuadro 17.</b> Pruebas de hematología línea blanca a dosis alta .....	77
<b>Cuadro 18.</b> Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica por las vías OG e IP en dosis baja y alta.....	80
<b>Cuadro 19.</b> Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica a los días 7 y 15 post infección en dosis baja y alta.....	80

**Cuadro 20.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica de los infectados y centinela en dosis baja y alta .....81

**Cuadro 21.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica basal y post infección en dosis baja y alta.....81

## ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ALT	alanino aminotransferasa
ARN	ácido ribonucleico
AST	aspartato aminotransferasa
BDV	border disease virus (virus de la enfermedad de las fronteras)
C terminal	Extremo carboxilo terminal de una proteína
CINVESTAV-IPN	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CP	citopático
CSFV	<i>classical swine fever virus</i> (virus de la fiebre porcina clásica)
DC	<i>dendritic cell</i> (célula dendrítica)
dNTPs	<i>deoxynucleotide triphosphates</i> (desoxinucleótidos trifosfato)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
EM	enfermedad de las mucosas
h	hora
H&E	hematoxilina & eosina
IFN-1	interferón tipo 1
IL-15	interleucina-15
IL-6	interleucina-6
IL-1	interleucina-1
IP	intraperitoneal
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> (sitio interno de entrada al ribosoma)
kDa	kilodaltones
LDLr	<i>Low-density lipoprotein receptor</i> (receptor de lipoproteínas de baja densidad)

Log	Logaritmo
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i> (células de riñón de bovino Madin-Darby)
Mg+	magnesio
min	minutos
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> (medio de cultivo mínimo esencial)
mL	mililitros
n	Número
N terminal	Extremo amino terminal de una proteína
NCP	no citopático
NK	<i>Natural Killer</i> (células asesinas naturales)
°C	grados celsius
OG	orogástrico
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (marco de lectura abierto)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a patógenos)
pb	pares de bases
pH	potencial de hidrógeno
PI	persistentemente infectado
P.I.	post infección
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo
SCHA	Sin cambios histológicos aparentes
SFB	suero fetal bovino
TCID	<i>Tissue Culture Infective Dose</i> (dosis infectiva en cultivo de tejidos)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor tipo Toll)
UTR	<i>untranslated region</i> (región no traducible)
VDVB	virus de diarrea viral bovina
VDVB-1	virus de diarrea viral bovina tipo 1

VDVB-2	virus de diarrea viral bovina tipo 2
μL	microlitros
%	por ciento

## INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un patógeno que disminuye la productividad del ganado generando pérdidas económicas que ascienden hasta los 46 millones de dólares por millón de partos en Reino Unido o bien desde los 0.50 a 687.80 dólares por animal calculados en 15 países de Europa. (Bennett, Christiansen and Clifton-Hadley, 1999; Richter *et al.*, 2017). Estas pérdidas son consecuencia de infecciones prenatales que causan abortos, infertilidad, malformaciones congénitas, aumento de la mortalidad neonatal y nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI) (Behera *et al.*, 2011).

El VDVB tiene un ARN monocatenario y pertenece a la familia *Flaviviridae*, dentro del género *Pestivirus*, junto con el virus de la enfermedad de la frontera (BDV por sus siglas en inglés *border disease virus*) y el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV por sus siglas en inglés: *classic swine fever virus*).

Se han descrito nuevas especies dentro del género pestivirus: “el virus de jirafa” proveniente de una jirafa en Kenia que provoca signos similares a los que causa la enfermedad de las mucosas (Becher *et al.*, 2014), el “virus de Pronghorn” aislado en un antílope de Estados Unidos (Vilcek *et al.*, 2005), el “virus de Bunhowannah” aislado de cerdos en Australia (Kirkland *et al.*, 2015) y los “virus atípicos “tipo HoBi” detectados en sueros y muestras de ovino y búfalo (Stalder *et al.*, 2005; Yeşilbağ, Alpaya and Becher, 2017).

El VDVB se clasifica en tres especies distintas: virus de la diarrea viral bovina tipo 1, tipo 2 y recientemente se ha descrito el tipo 3 (Liu *et al.*, 2009). Todas las especies incluyen dos biotipos: citopático (CP) y no citopático (NCP) (Seong *et al.*, 2015). La citopatogenicidad no se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, la mayoría de las infecciones por VDVB involucran cepas NCP (Fulton *et al.*, 2005).

La virulencia de las cepas de VDVB y el estado inmunológico y fisiológico de los hospedadores son factores determinantes para la presentación de las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad (Bachofen C., *et al* 2014) . Los signos asociados con la infección del VDVB pueden variar de una enfermedad leve a grave con altas tasas de mortalidad. Las cepas de baja virulencia que causan infección

subclínica pueden circular sin ser detectadas durante períodos prolongados. Se ha descrito que el número de casos graves y agudos en Norteamérica son predominantes del genotipo 2 (Liebler-Tenorio, Ridpath and Neill, 2003).

La ruta más frecuente de entrada del VDVB es por vía oronasal; la replicación viral comienza en tonsilas palatinas de donde migra a linfonodos regionales, posteriormente el VDVB se puede encontrar en diversos tejidos y órganos como placas de Peyer, bazo, timo, tracto gastrointestinal, respiratorio y reproductivo (Lanyon *et al.*, 2014).

Los modelos animales de experimentación son herramientas indispensables en la investigación biomédica. Han sido utilizados desde los primeros tiempos del avance científico y continúan siendo utilizados hoy en día para entendimiento de las funciones individuales de los genes, los mecanismos de diferentes enfermedades, la efectividad y toxicidad de diversos fármacos, entre otros. El ratón es el animal de laboratorio más empleado; las cepas de ratón más utilizadas son la C57BL/6 y BALB/c (Johnson M., 2012). Se ha demostrado que la cepa BALB/c es susceptible a infecciones con el VDVB (Grigera *et al.*, 2000; Seong *et al.*, 2015).

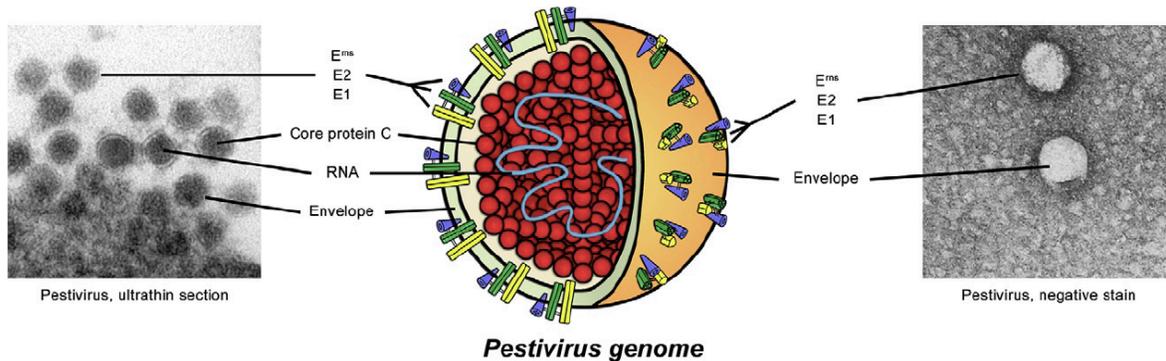
Actualmente, los estudios sobre infecciones experimentales con VDVB en animales de laboratorio son limitados (Seong, Lee, Lee and Choi, 2016; Seong, Lee, Lee, Shin, *et al.*, 2016). Establecer un modelo murino de infección proporcionaría información adicional sobre la propagación del VDVB en dicho modelo.

## **VIRUS**

### **MORFOLOGÍA**

El VDVB es un virus envuelto por una capa lipídica que recubre la cápside viral, de simetría icosaédrica constituida por la proteína C. Contiene cuatro proteínas estructurales: la proteína básica de nucleocápside, C (14 kDa), y tres glicoproteínas

de envoltura, Erns (gp44 / 48), E1 (gp33) y E2 (gp55). Las tres glicoproteínas existen como complejos intermoleculares unidos (Fig. 1) (Tautz, Tews and Meyers, 2015).



**Figura 1.** Características básicas de los pestivirus

Se muestra un diagrama de una partícula pestiviral flanqueada por imágenes de microscopía electrónica (VDVB a la izquierda, CSFV en tinción negativa a la derecha) (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

## ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma del VDVB es de tipo ARN lineal, con polaridad positiva de aproximadamente 12.3 kb de longitud. (Tautz, Tews and Meyers, 2015). Para la mayoría de las cepas del VDVB CP se han descrito genomas considerablemente más grandes (Behrens *et al.*, 1998). El único marco de lectura (ORF por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*) del genoma del VDVB está flanqueado por regiones no traducibles, llamadas UTR (por sus siglas en inglés *untranslated regions*). El ORF codifica para la síntesis de una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es procesada por las proteasas celulares y virales en cuatro proteínas estructurales y ocho no estructurales. Estas proteínas maduras son N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ms</sup>, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. La primera de ellas es la poliproteína, N<sup>pro</sup>, una autoproteasa viral no estructural (Fig. 2). La proteína C de la nucleocápside y las tres glicoproteínas de la envoltura: E<sup>ms</sup>, E1 y E2 representan las proteínas estructurales del VDVB. E2 es una glicoproteína altamente variable e inmunológicamente dominante en los pestivirus y el blanco principal de anticuerpos neutralizantes (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

Las proteínas maduras restantes son no estructurales. La 5'UTR consiste en un fragmento del genoma viral altamente conservado y contiene un sitio interno de entrada al ribosoma implicado esencialmente en la traducción de la poliproteína viral (Yeşilbağ, Alpay and Becher, 2017).

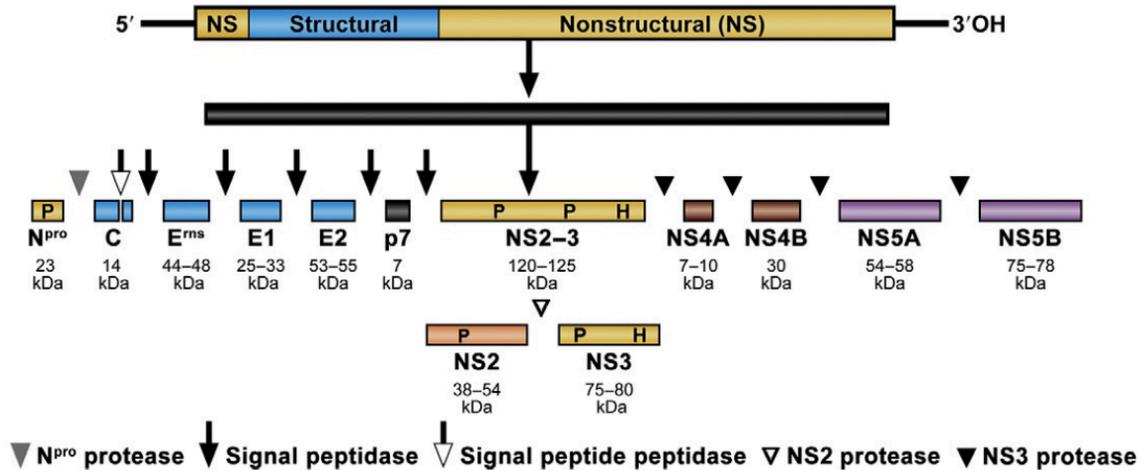


Figura 2. Organización del genoma de pestivirus

El ARN tiene un tamaño de 8,9 - 11,3 kb que comprende un 5'-UTR (por sus siglas en inglés non-coding region), un único ORF de aproximadamente 11,7 kb y el 3'-UTR e 185-273 nucleótidos. Las proteínas virales no estructurales se indican como NS (por sus siglas en inglés non-structural). Los símbolos P y H indican el dominio de proteasa y helicasa, respectivamente (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

## REPLICACIÓN VIRAL

La replicación viral inicia por endocitosis mediada por clatrina; se lleva a cabo mediante la unión de las glicoproteínas de envoltura  $E^{rns}$ , E1 y E2 y un receptor de superficie celular (CD46) y un receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr por sus siglas en inglés *low-density lipoprotein receptor*) de células del hospedador (Iqbal, McCauley and Flick-Smith, 2000) (Maurer *et al.*, 2004). Después del reconocimiento de los receptores celulares con el virus, la membrana de la vesícula endocítica se fusiona con la envoltura viral, la cápside es removida por proteasas celulares mediante una disminución de pH endosomal, el genoma de ARN se libera en el citoplasma en donde actúa como ARN mensajero.

La replicación tiene lugar en el citoplasma, donde un genoma de ARN bicatenario se sintetiza a partir de un genoma de ARN de cadena sencilla. El ARN genómico de sentido positivo se traduce en una poliproteína que se divide en todas las proteínas estructurales y no estructurales que forman parte del complejo de replicación. El inicio de la traducción se produce mediante un mecanismo de iniciación interna IRES (por sus siglas en inglés *internal ribosome entry site*) (Lozano and Martínez-Salas, 2015). El procesamiento de la poliproteína se produce de forma co y postraduccional, tanto por proteasas celulares como virales (Tautz, Tews and Meyers, 2015). La translocación de la glicoproteína al retículo endoplásmico ocurre por una secuencia señal interna dentro de la región C-terminal de la proteína C (Elbers *et al.*, 1996). Dependiendo del biotipo de pestivirus, NS2-3 permanece prácticamente intacta o se encuentra a niveles reducidos junto con altas cantidades de sus productos N y C terminales NS2 y NS3 (Lackner *et al.*, 2004). La síntesis de la proteína NS3 en los pestivirus biotipo CP se debe a diversos eventos, tales como: a inserciones, deleciones, duplicaciones o reordenamientos genéticos (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

El ensamblaje del virus ocurre en el retículo endoplásmico y adquieren su envoltura a partir de las membranas intracelulares. La liberación la progenie viral es mediante exocitosis (Schmeiser *et al.*, 2014).

## **PROTEÍNAS VIRALES**

### **ESTRUCTURALES**

**PROTEÍNA C.** (14 kDa). Es la primera proteína estructural en la poliproteína de los pestivirus. Su extremo N-terminal se genera a través de la escisión autocatalítica de N<sup>pro</sup> y es liberado por una proteasa celular. (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

**PROTEÍNA E<sup>rns</sup>.** (44 a 48 kDa). Es la primera de las glicoproteínas de la envoltura en ser sintetizada y exhibe características inusuales, incluido su anclaje de membrana, el equilibrio entre la proteína unida a la membrana y su actividad de RNasa (Lindenbach and Rice, 2013; Tautz, Tews and Meyers, 2015). Tiene una

longitud de 227 aminoácidos y contiene de ocho a nueve cisteínas conservadas que forman enlaces disulfuro.

**PROTEÍNA E1.** (25-33 kDa). Es una proteína con un sitio de anclaje transmembranal. Forma heterodímeros con E2 que está presente en la partícula viral unidos por enlaces disulfuro. La división entre E<sup>ms</sup> y E1 es más lenta que entre E1 y E2, lo que conduce a la presencia detectable de E<sup>ms</sup>-E1 en células infectadas (Tautz, Tews and Meyers, 2015) . Al igual que las otras dos proteínas de la envoltura, E1 contiene varios residuos de cisteína, la mayoría están conservados en todos los pestivirus (Fernández-Sainz *et al.*, 2014). E1 interactúa transitoriamente con calnexina (proteína implicada en el plegamiento de las proteínas que llegan a retículo endoplásmico rugoso) (> 30 min), y la formación de heterodímeros E1-E2 comienza después del plegamiento correcto y la liberación de E1 de calnexina. La interacción con calnexina depende de la glicosilación de E1 (Parkinson *et al.*, 2011) (Branza-Nichita *et al.*, 2001).

**PROTEÍNA E2.** (53-55 kDa). Representa la proteína del VDVB que se une al receptor, y es la proteína blanco, que induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Weiland *et al.*, 1990; Deregt and Loewen, 1995); E1 y E2 son proteínas transmembranales tipo I con un ectodominio N-terminal y una hélice C-terminal anclada en la membrana viral (El O. *et al.*, 2013).

## NO ESTRUCTURALES

**PROTEÍNA N<sup>pro</sup>.** (23 kDa). Es una proteína que se libera autocatalíticamente de la poliproteína. N<sup>pro</sup> representa la primera proteína codificada por el genoma pestiviral; tiene una longitud de 168 aminoácidos. La actividad de la N<sup>pro</sup> puede proteger las células de la apoptosis bloqueando la respuesta del interferón tipo I celular del huésped a la infección por virus (Bauhofer *et al.*, 2007).

**PROTEÍNA p7.** (7kDa). La proteína p7 libre se requiere para la generación de progenie viral infecciosa. Debido a sus características como una proteína

hidrofóbica con una región central cargada se sugiere que p7 podría ser una viroporina (Harada, Tautz and Thiel, 2000). Se ha reportado también que la proteína p7 participa en la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias de macrófagos infectados, lo que indica que además de tener un papel en la formación del virión también participa en funciones celulares (Lin *et al.*, 2014).

**PROTEÍNA NS2.** (53 kDa). Es una cisteína proteasa responsable del procesamiento de NS2-3 para dar lugar a NS2 y NS3 (Lackner, Thiel and Tautz, 2006). NS2 tiene una longitud de 453 aminoácidos y es 40% hidrofóbica (Lackner, Thiel and Tautz, 2006; Tautz, Tews and Meyers, 2015).

**PROTEÍNA NS2-3.** (120 kDa). Es una proteína multifuncional, cuyo autoprosesamiento es necesario para la infectividad del VDVb porque NS3 libre comprende un componente esencial del complejo de replicación de ARN viral y no puede ser reemplazado funcionalmente por NS2-3 sin escindir. Participa también en el ensamblaje de partículas virales.

**NS3.** (80 kDa). Actúa como una serina proteasa implicada en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación de ARN (Tautz, Kaiser and Thiel, 2000). NS3 se expresa en cepas CP, su dominio de proteasa abarca aproximadamente 209 aminoácidos y es responsable de la escisión de las proteínas NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (Tautz, Kaiser and Thiel, 2000; Tautz, Tews and Meyers, 2015).

**NS4A.** (7 kDa). Actúa como un cofactor de la actividad de la proteasa NS3 (Tautz *et al.*, 2000). NS4A contiene una región N-terminal hidrofóbica que abarca la membrana y un dominio citosólico C-terminal (Liang *et al.*, 2003).

**NS4B.** (33 kDa). Es una proteína hidrofóbica que ejerce una función esencial pero no bien caracterizada en la replicación del ARN (Grassmann *et al.*, 2001).

**NS5A.** (58 kDa). Desempeña funciones adicionales en la replicación del ARN y la morfogénesis del virión (Chen *et al.*, 2012).

**NS5B.** (75 kDa). Tiene actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) RdRp es una enzima necesaria para la replicación del genoma de ARN de cadena positiva y es capaz de unirse a su 3'UTR afín e inicia la replicación del genoma (Xiao *et al.*, 2004). NS5B transcribe el genoma en cadenas de sentido negativo, que sirven como moldes para producir ARN de sentido positivo para su empaquetamiento en cápsides virales de la progenie viral. (Gong *et al.*, 1996).

## **RESPUESTA INMUNE**

El VDVB se ha asociado con una amplia variedad de signos clínicos y modulación inmune que resultan en infecciones bacterianas secundarias e interacciones con las células inmunes como: depleción de linfocitos, efectos en neutrófilos, y una menor activación de células NK (asesinas naturales por sus siglas en inglés *natural killer*) (Chase *et al.*, 2015).

La infección por el VDVB es detectada por moléculas especializadas como receptores de tipo RIG-I o receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *Toll-like receptor*) que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Estos PAMP's son estructuras moleculares específicas para detectar componentes de agentes patógenos como el ARN monocatenario o bicatenario (Dixit and Kagan, 2013). La unión de tales estructuras a los receptores de la célula hospedera inicia una señal que se transfiere al núcleo y activa la transcripción de los genes de Interferón-1 (IFN-1).

Estudios recientes han proporcionado información sobre mecanismos de control de la inmunidad innata y adaptativa mediada por TLR's. Los TLR's se expresan en diferentes tipos de células incluidos los monocitos y los progenitores mieloides de

las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés *dendritic cells*). Diversos TLR's como TLR3, TLR7 y TLR8 participan en el reconocimiento de componentes virales y distinguen entre diferentes estructuras de ácidos nucleicos virales. En particular, TLR3 puede reconocer el ARN bicatenario producido en el curso de una infección viral. La señalización a través de TLR generalmente culmina en la producción de citocinas proinflamatorias que incluyen IFN-1, quimiocinas y moléculas coestimuladoras que activan a las células T para tener un efecto citolítico (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha descrito que el virus tiene la capacidad de evasión de la respuesta por TLR dependiendo de su biotipo, genotipo y virulencia (Schaut, Ridpath and Sacco, 2016).

## **INTERACCIÓN DEL VDVB Y CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**

En infecciones *in vitro* se ha demostrado que los monocitos producen inicialmente virus, pero dentro de las primeras 48 h el rendimiento del virus se reduce y cesa por completo a las 120 h (Rajput *et al.*, 2014).

Las citocinas liberadas por los macrófagos pueden variar pero tienen el potencial de inducir apoptosis linfocítica bajo ciertas circunstancias; en la infección por VDVB, el macrófago puede eliminar linfocitos que de otro modo serían activados, mecanismo conocido como efecto "*hitman*" (Chase *et al.*, 2015). Las citocinas involucradas en la apoptosis linfocítica son la Interleucina-1 (IL-1), la Interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Bowen *et al.*, 2004; Choi, Hwang and Chae, 2004).

En estudios posteriores se ha demostrado que la exposición de los neutrófilos a VDVB NCP y CP *in vitro* no desencadenó en apoptosis, sino que disminuyó la expresión de CD18 (receptor de adhesión de leucocitos) y aumentó la expresión de CD14 (receptor de membrana poliespecífico, reconoce LPS, y forma parte del complejo TLR-4) lo que indica que el VDVB tiene la capacidad de inhibir la migración de neutrófilos (Chase *et al.*, 2015).

Por otra parte, un estudio en bovinos infectados con cepa de VDVB-2 altamente virulenta demostró que había una disminución de los niveles de IL-15 en linfonodos bronquiales, lo que sugiere una menor activación de NK (Palomares, Brock and Walz, 2014).

En general, las células NK tienen un gran número de receptores celulares, algunos de estos son activadores y otros son inhibitorios (Boysen and Storset, 2009), y su activación es igualmente variable con estimulación del VDVB.

## **PERSISTENCIA E INMUNIDAD INNATA**

Los virus usan dos estrategias diferentes para permanecer en el hospedero. La primera causa una infección persistente y la segunda es una infección de corta duración en el hospedero y una transferencia rápida al siguiente hospedero susceptible (Peterhans, Jungi and Schweizer, 2003).

Solo los biotipos NCP del VDVB de ambos genotipos son capaces de establecer infección persistente; mientras que las infecciones transitorias pueden ser causadas por ambos biotipos NCP y CP (Peterhans, Jungi and Schweizer, 2003).

Se ha demostrado que en los fetos bovinos ocurre el desarrollo linfoide del timo, bazo y algunos linfonodos periféricos, durante el primer trimestre de gestación, día 42, día 55 y día 60, respectivamente (Schultz, Dunne and Heist, 1973). Si la hembra gestante se infecta con el biotipo CP antes de los 150 días se establece una inmunotolerancia, en donde los animales PI son incapaces de sintetizar anticuerpos contra el VDVB, el virus no afecta el desarrollo y la maduración fetal, por lo tanto puede producir una infección persistente; la inmunocompetencia fetal bovina se establece en el segundo trimestre de la gestación (después de día 150) (Brock, 2003). Sin embargo, se desconoce el mecanismo inmunológico del feto que da como resultado la infección persistente del VDVB (Morarie-Kane *et al.*, 2018).

La modulación inmune del vDVB puede ocurrir en muchos niveles; por tanto el efecto de las infecciones por VDVB y el mecanismo de evasión inmune en la infección persistente son objetivos críticos para comprender la patogénesis de la diarrea viral bovina (Chase *et al.*, 2015).

## **PRESENTACIÓN CLÍNICA**

### **INFECCIÓN AGUDA**

En infecciones agudas los signos pueden ser transitorios; estos incluyen leucopenia, fiebre moderada, diarrea, descarga nasal y respiración anormal. La inmunosupresión por el VDVB implica un riesgo para infecciones secundarias de virus o bacterias (Brackenbury, Carr and Charleston, 2003).

### **INFECCIÓN GRAVE**

Esta presentación se caracteriza por tener alta mortalidad en donde los animales afectados presentan hemorragia severa y trombocitopenia; en la mayoría de los casos de enfermedad grave es causada por el genotipo 2 del VDVB (Jenckel *et al.*, 2014)

### **SÍNDROME HEMORRÁGICO**

Presentación clínica asociada a infecciones agudas por una trombocitopenia relacionada con la replicación en megacariocitos, lo que desencadena una depleción en este linaje celular, que conlleva a hemorragias localizadas con petequias en la mucosa oral y en diversos órganos como rumen y tracto gastrointestinal (Corapi, French and Dubovi, 1989). Los animales afectados presentan una alta mortalidad. Inicialmente, las cepas del genotipo VDVB-2 se consideraban más virulentas que las cepas de VDVB-1 y se indicaba que este último no podía inducir enfermedad hemorrágica; sin embargo, análisis más detallados revelaron que la infección del ganado con el VDVB-2 puede ser inaparente o

acompañada de signos leves y viceversa, VDVB-1 es capaz de producir enfermedad hemorrágica. (Corapi, French and Dubovi, 1989; Vilček *et al.*, 2001).

### **ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)**

Se presenta cuando una hembra se infecta con el VDVB del biotipo NCP entre el día 18 y 125 de la gestación; en este periodo el organismo no reconoce el virus como extraño y no produce anticuerpos contra él; sin embargo, el ternero tiene la capacidad de replicarlo y excretarlo durante toda su vida.

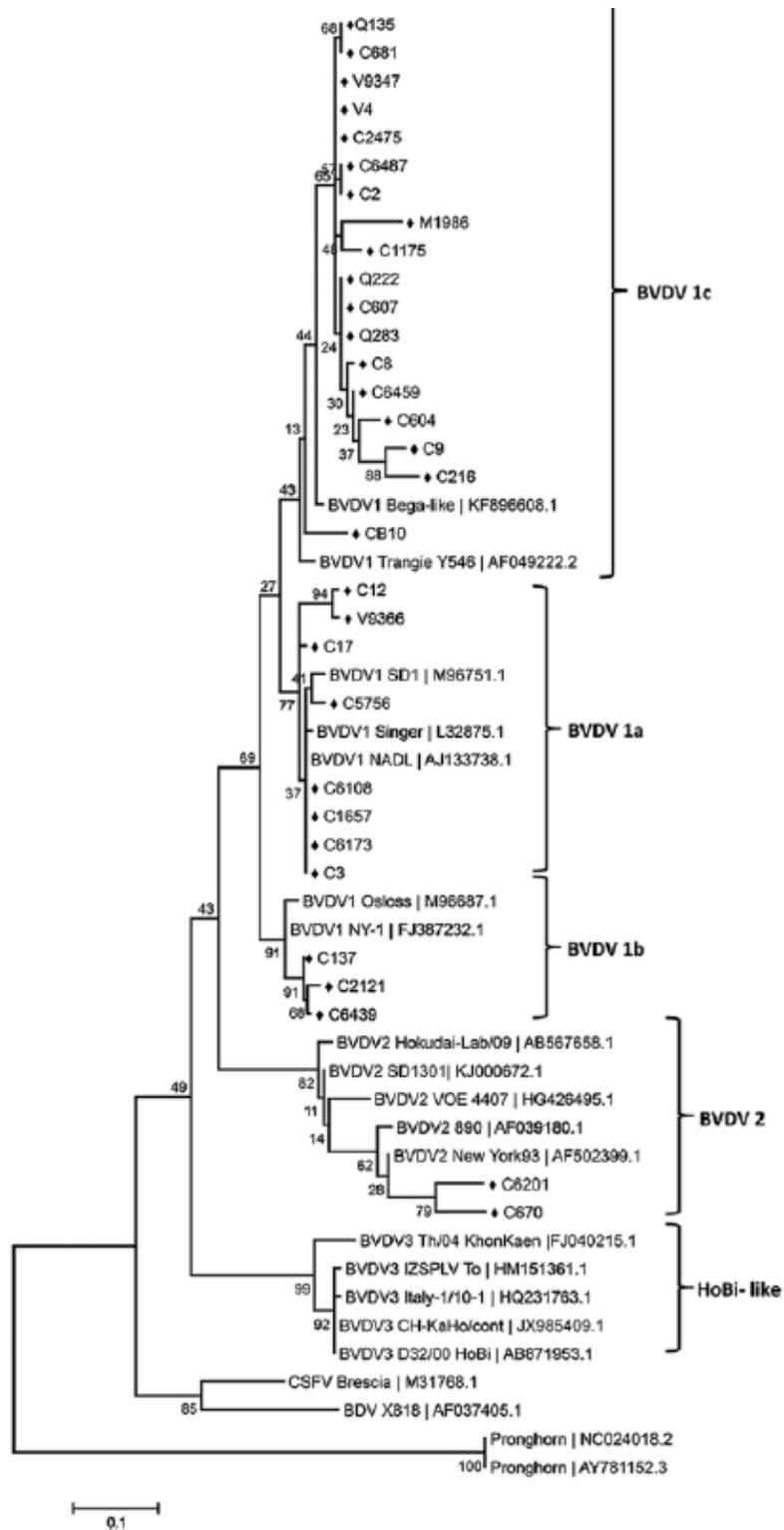
### **ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS (EM)**

Se presenta solo en animales PI, co-infectados con una cepa del biotipo CP generalmente de los seis a los 24 meses de edad; los signos asociados con la EM son diarrea sanguinolenta, fiebre, anorexia y ataxia, así como estomatitis, úlceras en el tracto digestivo y tejido linfoide asociado a intestino (Tautz, Tews and Meyers, 2015).

En algunos casos el desarrollo de la EM es consecuencia de una nueva variante de tipo CP generada del virus NCP persistente, implica que un solo virus CP resultante de un evento de mutación-recombinación tiene que replicarse en grandes cantidades para ser detectado en el animal enfermo (Lanyon *et al.*, 2014).

### **CEPAS DE VDVB PRESENTES EN MÉXICO**

En un estudio reciente se tipificaron genéticamente 62 cepas de VDVB de México con base en la comparación de secuencias de la región 5'UTR del genoma viral. Los análisis filogenéticos indicaron que 60 de las muestras pertenecían al genotipo VDVB-1 y dos al genotipo VDVB-2 (Fig. 3). La comparación de las secuencias 5'UTR parciales agruparon 49 muestras dentro de VDVB-1c, ocho dentro de VDVB-1a, tres dentro de VDVB-1b y dos con los subgenotipos VDVB-2a (Gómez-Romero *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en un fragmento de la región 5'UTR  
(Gómez-Romero et al., 2017)

## ESTUDIOS EXPERIMENTALES CON VDVB

Se han reportado cuatro estudios en donde se inoculó el VDVB de manera experimental en ratones BALB/C (Seong *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Seong, Lee, Lee and Choi, 2016; Seong, Lee, Lee, Shin, *et al.*, 2016). Tres de ellos demuestran que el ratón tiene la capacidad de replicar el virus, sin mostrar signos clínicos aparentes con las cepas de VDVB 1, VDVB 2, NCP 1, NCP 2 (Seong *et al.*, 2015; Seong, Lee, Lee and Choi, 2016; Seong, Lee, Lee, Shin, *et al.*, 2016). Sin embargo Seong Lee *et al.* (2016) reporta que la infección con la cepa NADL CP1 si muestra signos clínicos por vía oral.

Seong *et al.* (2015) han demostrado que el VDVB tiene la capacidad de replicarse en bazo, linfonodos mesentéricos, y pulmón; Seong Lee *et al.* (2016) lo detectó en linfonodos mesentéricos, riñón, intestino, corazón y médula osea, mediante inmunohistoquímica y PCR en sangre periférica.

En estudios mas recientes de infección con un pestivirus atípico cepa HN1507 se evidenció mediante inmunohistoquímica en pulmón y traquea (Shi *et al.*, 2018).

Estos estudios demuestran que el virus tiene la capacidad de replicarse en ratón, y pudieran utilizarse como modelos de experimentación.

## JUSTIFICACIÓN

Uno de los requisitos de control de calidad para la producción de vacunas es realizar pruebas que demuestren la inmunogenicidad y potencia de los biológicos; para esto es recomendable utilizar la especie destino y conocer si los bovinos están libres de la infección, y con ello poder precisar si la vacuna es capaz de generar respuesta; sin embargo, los altos costos que implica la evaluación de bovinos para este fin lo hace una prueba inoperante.

Por tal motivo, se propone trabajar en el desarrollo de un modelo murino que permita evaluar la capacidad que tiene el virus para replicarse en el ratón y que sea capaz de evidenciar la respuesta inmune contra este virus para poder utilizarlo como parte de los modelos de control de calidad en la evaluación de vacunas.

Estudios realizados previamente han demostrado que el VDVB es capaz de infectar ratones; sin embargo, son pocas las investigaciones sobre el modelo murino de infección con este virus. Por otro lado, si bien se sabe que puede infectar al ratón, se desconocen sus efectos hematológicos y las lesiones histológicas que se producen tras la infección con el VDVB careciendo de una valoración total sobre el proceso de replicación.

Por lo anterior, se propuso desarrollar un modelo murino donde haya una valoración integral del proceso de replicación del virus y determinar las lesiones y los cambios en la funcionalidad de diversos órganos ocasionados por la cepa NADL (CP1) a dosis alta y dosis baja presente en México.

## **HIPÓTESIS**

El establecimiento de la infección del virus de diarrea viral bovina en ratones con la cepa citopática tipo 1 de mayor distribución en México, permitirá contar con un modelo animal para la evaluación de la replicación viral, la patogenia y la respuesta inmune contra el virus.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un modelo de infección con el Virus de Diarrea Viral Bovina en ratones BALB/c mediante la inoculación por diferentes vías de una cepa del VDVB-1 biotipo CP a dosis alta y dosis baja, para evaluar la capacidad de propagación del virus y los cambios producidos por la infección viral en diversos tejidos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la dosis infectante de la cepa del Virus de Diarrea Viral Bovina-1 biotipo CP en el ratón.
2. Evaluar la presencia de signos clínicos en el modelo murino de infección con el VDVB.
3. Evaluar hallazgos en hematología y bioquímica sanguínea de acuerdo a las vías de inoculación intraperitoneal (IP) y orogástrica (OG), a las diferentes dosis (alta y baja) y los tiempos de infección (7 y 15 días) en el modelo murino de infección con el VDVB.
4. Comparar la infección entre las vías de inoculación intraperitoneal (IP) y orogástrica (OG), las diferentes dosis (alta y baja) y los tiempos de infección (7 y 15 días) por medio de la evaluación de las lesiones histológicas.
5. Detectar anticuerpos presentes en los ratones mediante ELISA como método alternativo para corroborar el establecimiento de la infección.
6. Detectar RNA viral en órganos de ratones infectados con el VDVB mediante RT-PCR y evaluar la transmisión horizontal entre ratones mediante el contacto directo de ratones infectados con ratones centinela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 40 ratones hembras, cepa BALB/c, de 20 semanas de edad, libres de patógenos específicos adquiridos en el CINVESTAV-IPN. Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se manejaron en estricta conformidad con las directrices y protocolos aprobados para este tipo de experimentos (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se clasificaron en dos lotes correspondientes a dosis baja y dosis alta, respectivamente, cada uno con cuatro grupos como se describen a continuación.

**Lote #1** (n=20). DOSIS BAJA ( $1 \times 10^{5.7}/0.4\text{ml TCID}_{50}$ ): cuatro ratones inoculados vía OG con la cepa NADL, cuatro ratones inoculados vía IP con la cepa NADL ocho ratones centinela (en contacto con los infectados de cada vía de inoculación), cuatro ratones testigo negativo (inoculados con solución salina fisiológica).

**Lote #2** (n=20). DOSIS ALTA ( $1 \times 10^{6.7}/0.4\text{ml TCID}_{50}$ ): cuatro ratones inoculados vía OG con la cepa NADL, cuatro ratones inoculados vía IP, ocho ratones centinela y cuatro ratones testigo negativo (inoculados con solución salina fisiológica).

Todos los experimentos se repitieron dos veces para confirmar su reproducibilidad.

### Cultivo celular

Para replicar la cepa viral de referencia NADL (CP) se infectaron monoestratos de células epiteliales de riñón de bovino, línea celular MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) en botellas de  $75\text{ cm}^2$  con 80% de confluencia. Una vez inoculadas las botellas, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en agitación por una hora; después de transcurrido el tiempo de incubación se decantó el inóculo y se adicionaron 13 mL de medio fresco *Minimun Essential Medium Eagle* (MEM) suplementado con 10% de suero Fetal Equino ATCC.

Posteriormente, las botellas fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Se realizó revisión diaria para determinar el efecto CP, el cual se observó a las 72h. Después se realizó lisis celular por congelación a -80 °C y descongelación. Una vez realizado lo anterior, el cultivo fue centrifugado a 1200 rpm por 10 min para retirar detritus celulares. Se cosechó el virus contenido en el sobrenadante para hacer alícuotas de 1.5 mL, y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

### **Titulación de cepa viral de referencia**

El título de la cepa viral NADL se determinó en cultivo de células epiteliales MDBK. Las células se desprendieron de las botellas de cultivo celular por medio de tripsina y posteriormente se cultivaron en placas de 96 pozos con aproximadamente 20,000 células por cada pozo en 50 µL de MEM suplementado.

Se obtuvieron ocho alícuotas de 900 µL de MEM suplementado. Se hicieron diluciones décuples seriadas al adicionar a la primer alícuota 100 µL de la cepa viral a titular y se homogeneizó mediante una pipeta automática. Posteriormente, de dicha suspensión viral, se tomaron 100 µL y se transfirieron a la segunda alícuota con su respectiva homogeneización. Este paso se repitió en cada alícuota hasta llegar a una dilución final de 10<sup>-8</sup>. En la fila A de la placa se llenaron los primeros cinco pozos con 100 µL de la dilución 10<sup>-1</sup>; en la fila B se llenaron cinco pozos con 100 µL de la dilución 10<sup>-2</sup>; y así sucesivamente hasta la fila H.

Este ensayo se realizó por triplicado; las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> por cinco días.

Se realizó la revisión de la placa para determinar el punto final en cada serie de diluciones y por la posición del último pozo en donde se observó el efecto CP (vacuolización y muerte celular), el título se determinó utilizando el método de Reed-Muench con la siguiente ecuación (Reed and Muench, 1938).

$$\text{TÍTULO} = \left( \frac{\%>50\% - 50}{\%>50\% - \%<50\%} \times \text{Log del factor de dilución} \right) + \text{Log de la dilución } \%<50\%$$

### **Signos clínicos**

Par determinar si los animales infectados presentarían alguna signología, se llevó a cabo la observación diaria de los ratones, consistencia de heces, presencia de secreción nasal, y medición de temperatura corporal (termómetro láser).

### **Hematología**

Para el análisis hematológico, se recolectaron 300  $\mu\text{L}$  de sangre para la muestra basal y para la muestra final, se llevó a cabo en tubos de *microtainer* que contenían EDTA con el fin de prevenir la coagulación. Se contaron los leucocitos totales (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), así como los trombocitos utilizando un sistema hematológico (Método: Impedancia).

### **Bioquímica**

Para el análisis bioquímico se recolectaron 500  $\mu\text{L}$  sangre para la muestra basal e y para la muestra final, se llevó a cabo en tubos de *microtainer* que contenían heparina de litio.

Se procesó un perfil basal, al día 7 y 15 pi dirigido: urea, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y albúmina para evaluar hígado y riñón (método: espectrofotometría).

### **Necropsia e histopatología**

Al día siete postinfección (P.I.), cuando se esperaba una replicación viral activa en animales infectados con VDVB, y al día 15 P.I. cuando se esperaba detectar la presencia de anticuerpos contra VDVB, los ratones de cada grupo experimental

(infectados con NADL dosis alta y dosis baja) se sacrificaron con gas CO<sub>2</sub> para obtener muestras de sangre (en tubos *microtainer* con heparina) y órganos (hígado, bazo, riñón, intestino y estómago). La técnica de necropsia se llevó a cabo de acuerdo con la descrita por Parkinson *et al.*, 2011. La mitad de cada órgano se mantuvo a 4 °C y posteriormente se congeló a -70 °C para la amplificación de una región del genoma del VDVB por RT-PCR; la otra mitad del tejido se fijó en formalina al 10% con un pH de 7.2 para ser teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y ser observadas en un microscopio fotónico con el fin de realizar su revisión e interpretación.

### Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN a partir de la mitad de cada órgano (0.3 cm<sup>2</sup> aproximadamente) por el método de Trizol (Anexo II) (Fig. 4). El ARN obtenido obtenido se almacenó a -70 °C hasta su uso.



**Figura 4.** Extracción de ARN a partir de una muestra de hígado de un ratón infectado con la cepa NADL

Se observa el momento de la extracción después de haber sido macerado y centrifugado con trizol y cloroformo en donde se aprecia la separación de las fases orgánica, interfase y acuosa.

## Transcripción reversa – Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se realizó la mezcla de reacción para la RT-PCR utilizando los iniciadores 5UTR/START (Mahony *et al.*, 2005) (Cuadro 1) y los siguientes reactivos: amortiguador de Mg<sup>++</sup>, dNTP's, iniciador sentido y antisentido, Taq polimerasa (Roche), inhibidor de RNasas (Invitrogen) y agua.

**Cuadro 1.** Iniciadores utilizados en la RT-PCR para la amplificación del fragmento 5UTR

INICIADOR	SENTIDO	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO	AUTOR
5UTR/STAR-T MAHONY	FORWARD	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA	292	(Mahony <i>et al.</i> , 2005)
	REVERSE	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA		

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador (Select Bio Products) con las siguientes condiciones de temperatura y ciclos:

**Cuadro 2.** Constantes utilizadas en el termociclador para amplificar el producto

5UTR/STAR-T
56 °C- 1h (desnaturalización)
94 °C- 4 min (desnaturalización)
94 °C- 30s (desnaturalización)
56.2 °C - 30s (alineamiento)
72 °C - 30s 35 ciclos (extensión)
72 °C -10 min (extensión)

### **Serología (ELISA IDEXX)**

Se empleó un estuche comercial para detección de la proteína p80 (NS3) del VDVB por método de ELISA (BVDV p80 (NS3) Ab marca IDEXX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta prueba serológica detecta el anticuerpo generado por el hospedero susceptible contra la proteína P80 que es producida por la escisión de la proteína NS2-3 y se expresa en todas las cepas CP.

Se atemperaron los reactivos hasta que adquirieron 18-20°C antes de ser utilizados y homogenizados. Se marcaron las posiciones de las muestras en las placas tapizadas, se colocó el tampón de dilución en cada pozo, se incubó 1 hora a 18-20°C (la solución tampón en cada pozo con 50 µl de testigo negativo, 50 µl de testigo positivo, y 50 µl de cada muestra (un pozo por muestra, se homogenizaron los pozos, se cubrieron y se incubaron a una hora a 18-20°C. Se eliminó el contenido de cada pozo y se lavó aproximadamente con 300 µl de solución de lavado de 3 a 5 veces. Después del último lavado se eliminó el contenido residual en material absorbente. Se colocaron 10µl de conjugado en cada pozo, se cubrió la placa con aluminio y se incubó 30 minutos a 18-20°C. Posteriormente se eliminó el contenido líquido de cada pozo y se lavó con aproximadamente 300 µl de solución de lavado. Se colocaron 20 minutos a 18-20°C lejos de la luz directa. Finalmente se colocaron 100µl de solución de paro nº3 por pozo y se realizó la lectura a una longitud de onda a 450 nm (OD.450) por densidad óptica.

## RESULTADOS

### Título viral

De acuerdo con la fórmula, el título de dosis media infecciosa del cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>, por sus siglas en inglés *Tissue Culture Infectious Dose 50%*) que se utilizó fue de  $1 \times 10^{5.7} / 0.4 \text{ mL TCID}_{50}$  (dosis baja) y de  $1 \times 10^{6.7} / 0.4 \text{ mL TCID}_{50}$  (dosis alta) por cada ratón. Dicho inóculo se mantuvo a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta la inoculación vía OG y vía IP (Figura 5).

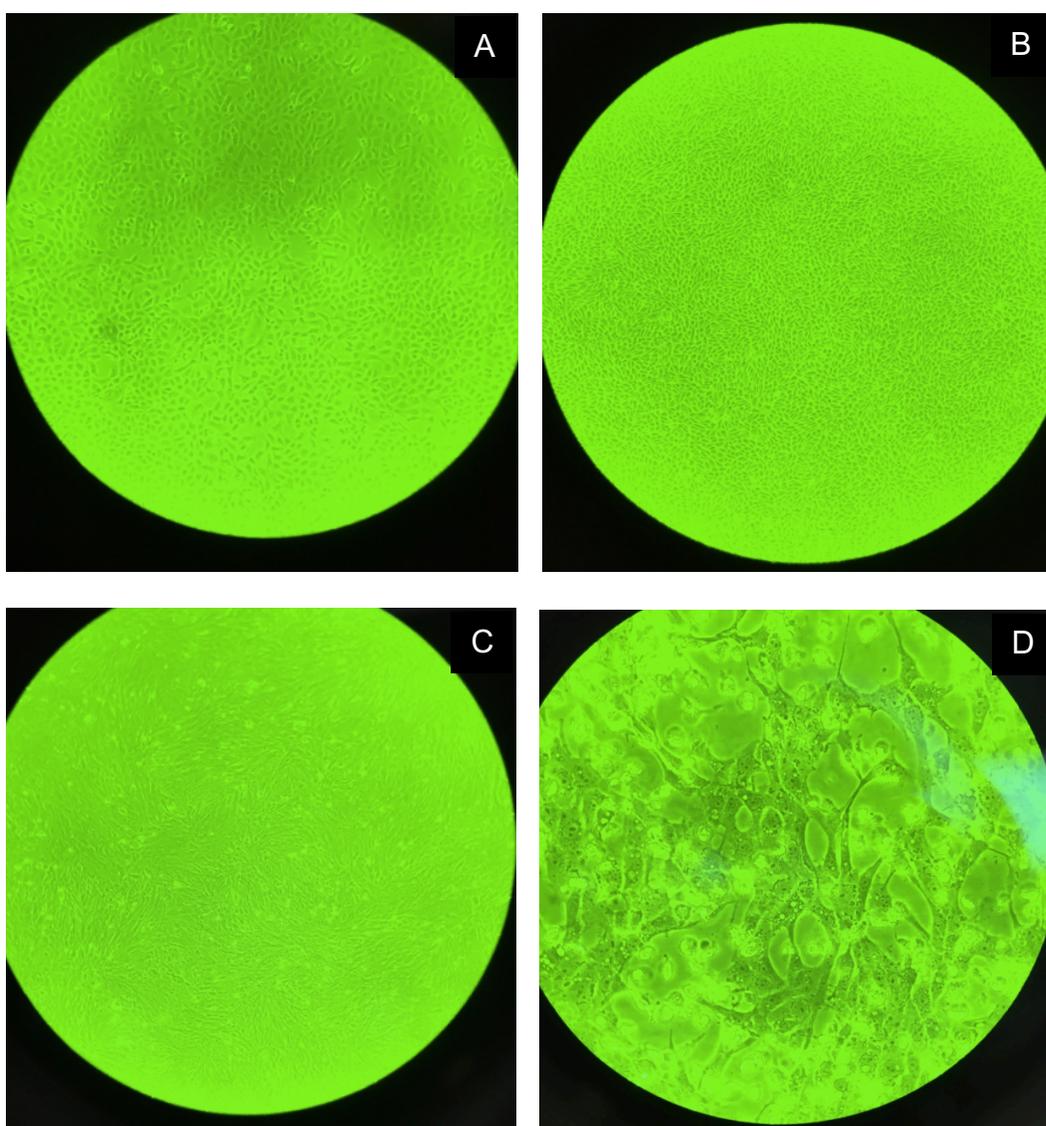


Figura 5. Fotografías del cultivo celular (línea MDBK)

A) Antes de infectar, al 70% de confluencia en aumento 40x. B) 24 h post infección, al 90% de confluencia en aumento 40x. C) 48 h post infección, al 100% de confluencia en aumento 40x D) 72 h post infección evidenciando efecto CP en aumento 100x.

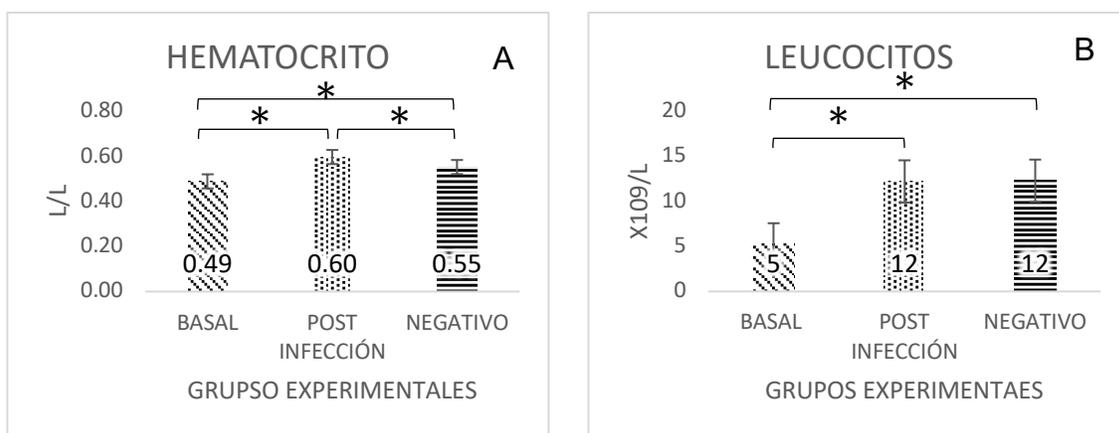
### Presencia de signos clínicos en el modelo murino de infección con VDVB

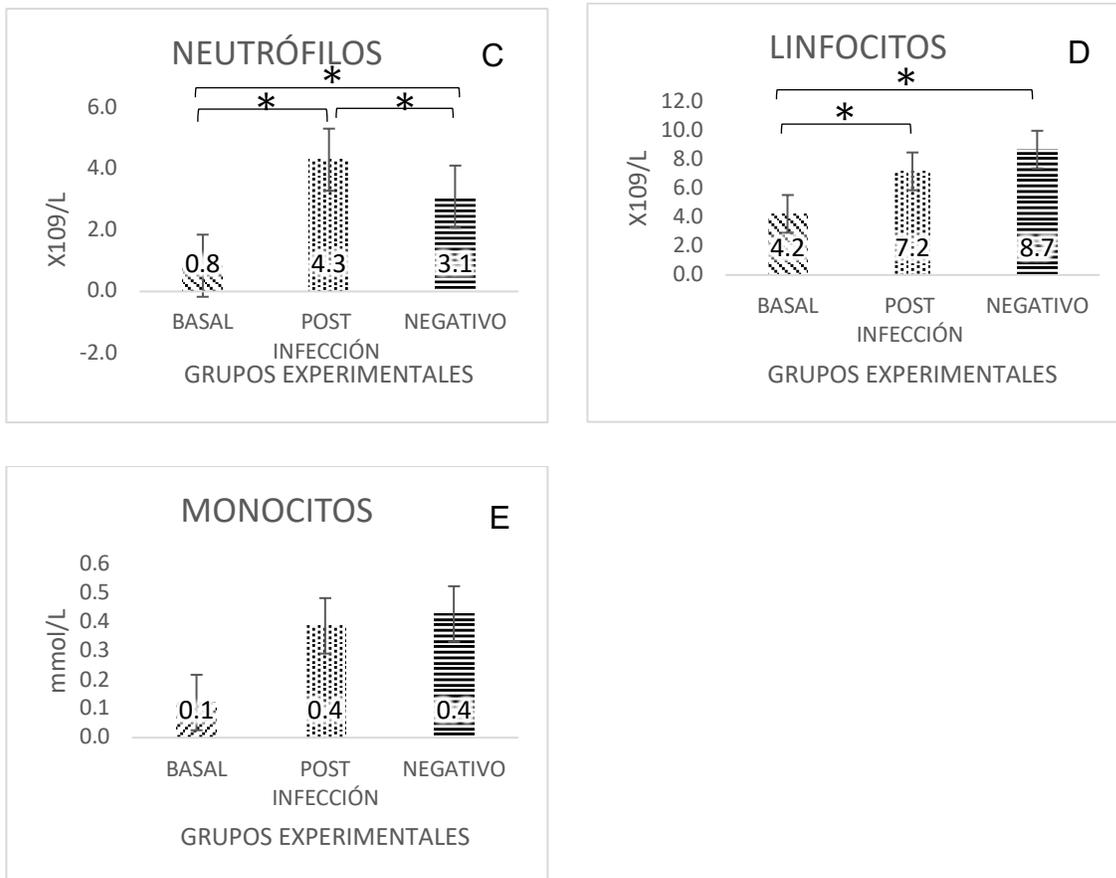
No se observaron signos clínicos del día 1 al día 14 post infección, manteniendo un rango de temperatura de los 37 °C - 38.5°C.

### DOSIS BAJA

#### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BASAL Y POSTINFECCIÓN

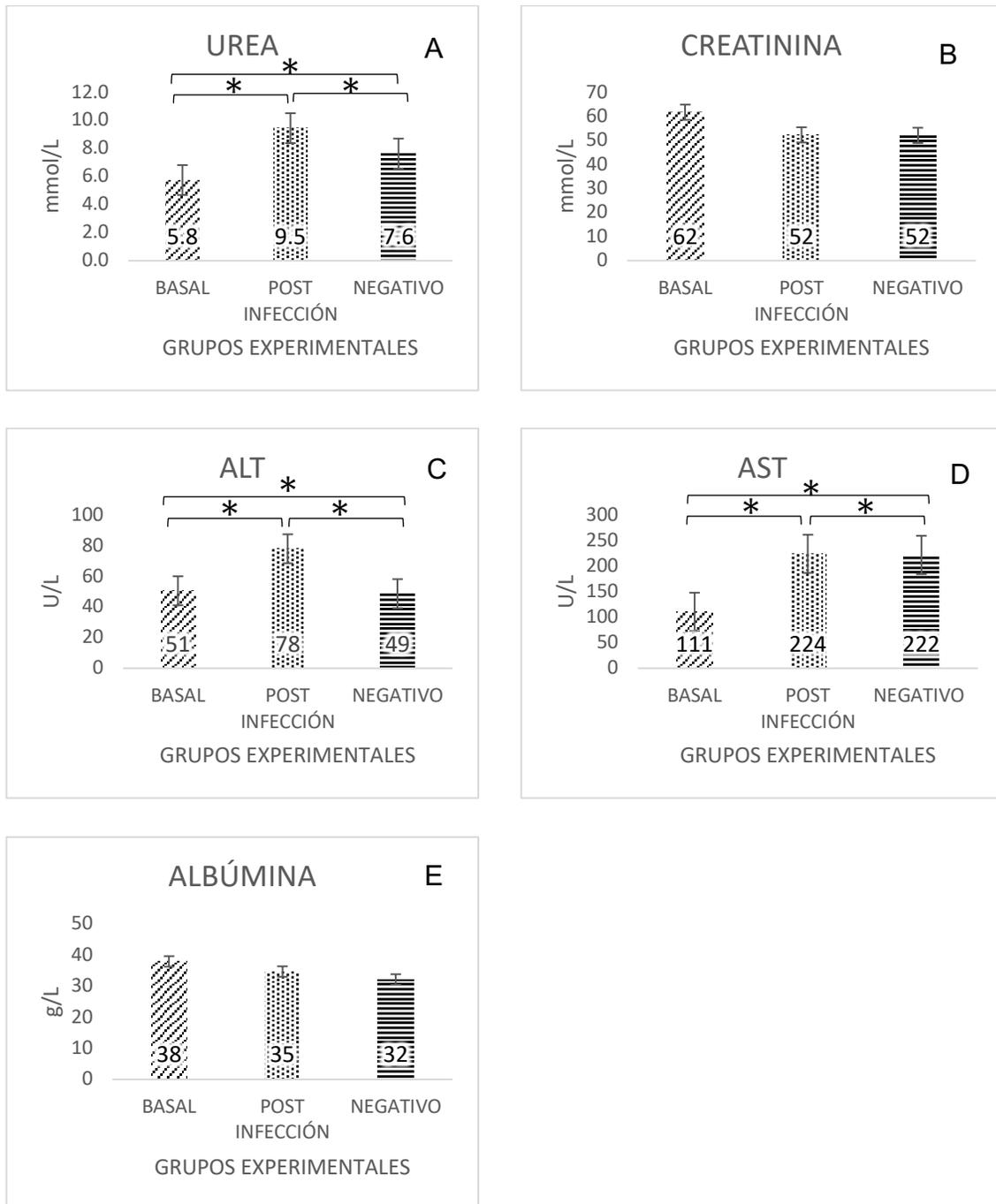
El perfil hematológico de los ratones infectados a dosis baja con el VDVB cepa NADL mostró diferencias significativas ( $P<0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de hematocrito y eritrocitos posiblemente asociado a esplenocntracción por efecto de catecolaminas. Se observó también leucocitosis por neutrofilia y presencia de neutrófilos tóxicos asociado a inflamación. La linfocitosis no es representativa ya que no sobrepasa el valor de referencia (Figura 6A, 6B, 6C, 6D). Estos resultados sugieren que la infección con el VDVB no provoca cambios en el perfil hematológico a dosis baja de la cepa NADL en comparación con los ratones control.





**Figura 6.** Perfil hematológico basal y post infección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis baja

El perfil bioquímico dirigido en muestras de ratones infectados con el VDVB cepa NADL a dosis baja, mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de Urea (Figura 7A), ALT (Figura 7C) y AST (Figura 7D). El incremento de urea podía asociarse a hiperazotemia pre-renal por hemoconcentración tomando en cuenta el valor de los eritrocitos y hematocrito. El incremento de ALT y AST sugiere degeneración hepatocelular asociada a la necrosis coagulativa multifocal observada en el estudio histopatológico (Figura 14) en ratones infectados con el VDVB, los demás analitos no sugieren algún daño ya que no sobrepasan el valor de referencia.

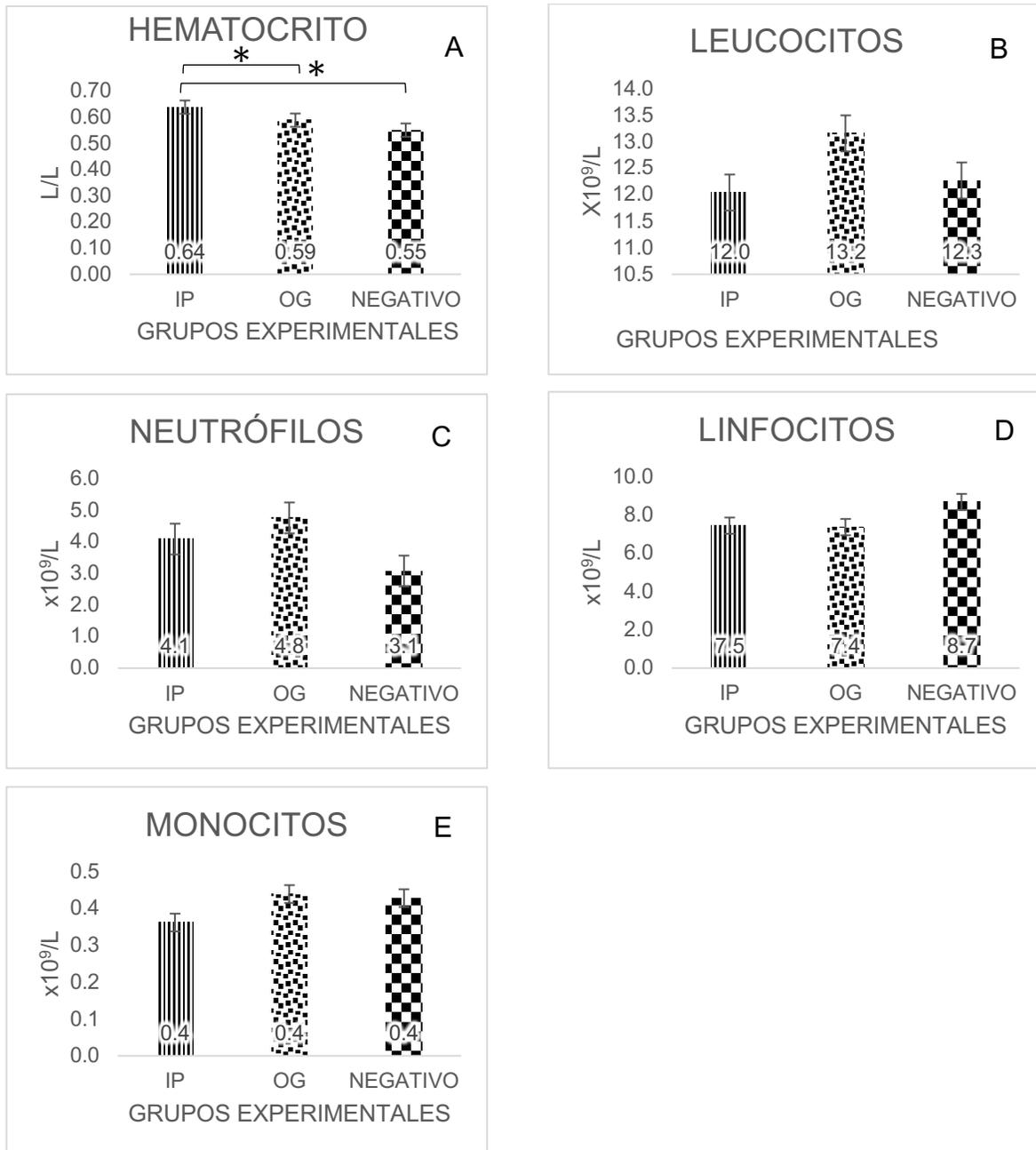


**Figura 7.** Perfil bioquímico dirigido basal y postinfección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis baja.

## HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA POR VÍAS DE INOCULACIÓN

El perfil hematológico de los ratones infectados a dosis baja con el VDVB cepa NADL por las vías OG e IP mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95%

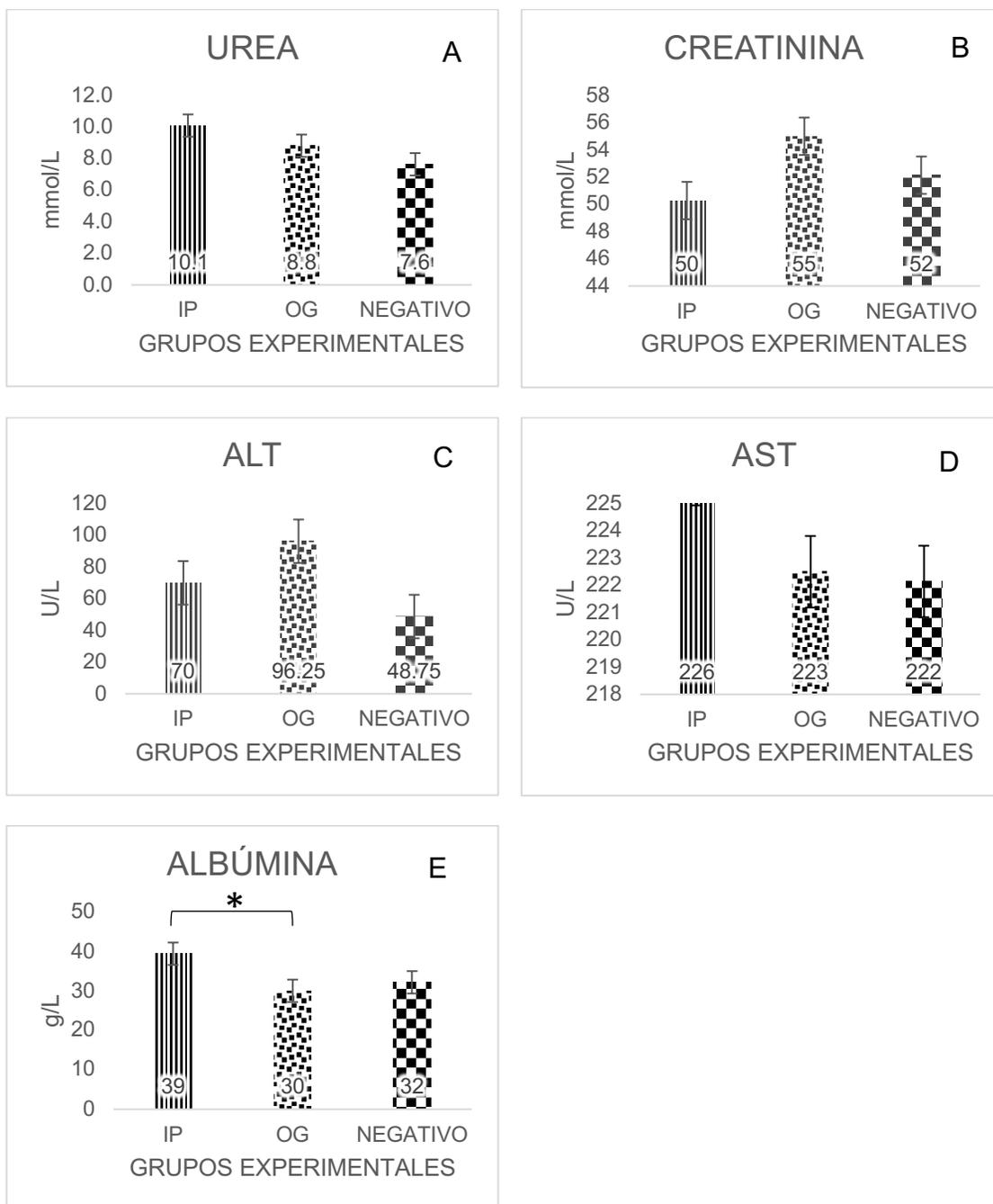
de confianza en la concentración de hematocrito y eritrocitos posiblemente asociado a esplenocotricción por efecto de catecolaminas (Figura 8A).



**Figura 8.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis baja

En la comparación de las vías de inoculación únicamente se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de albúmina

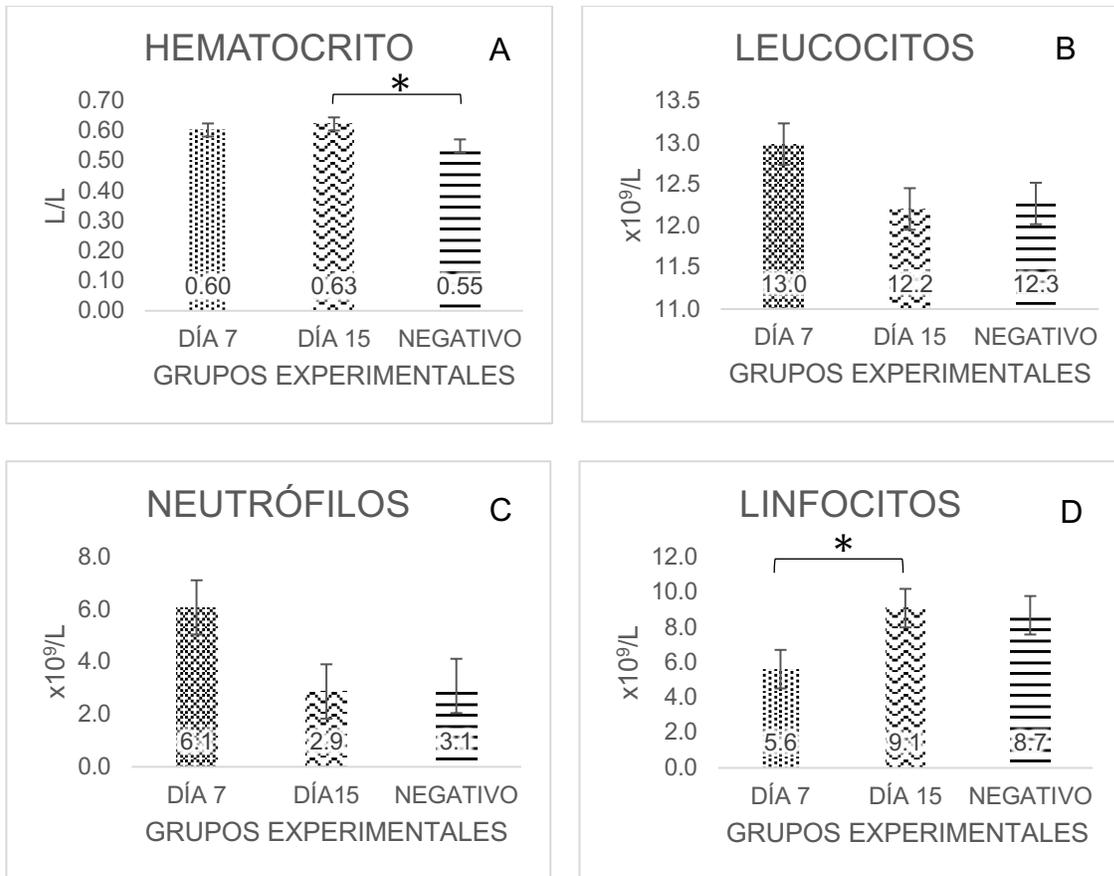
asociado a hemoconcentración, lo cual se correlaciona con el hemograma (Figura 9E).

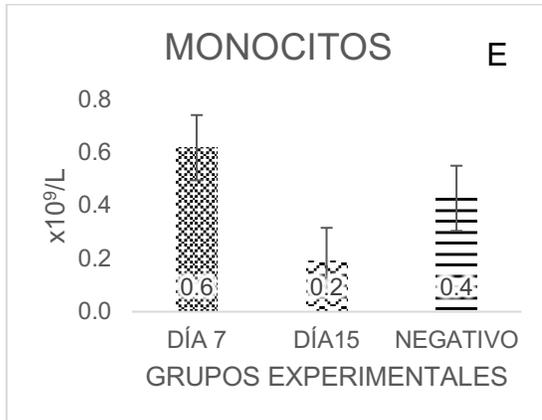


**Figura 9.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis baja

## HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA A LOS DÍAS 7 Y 15 POST INFECCIÓN

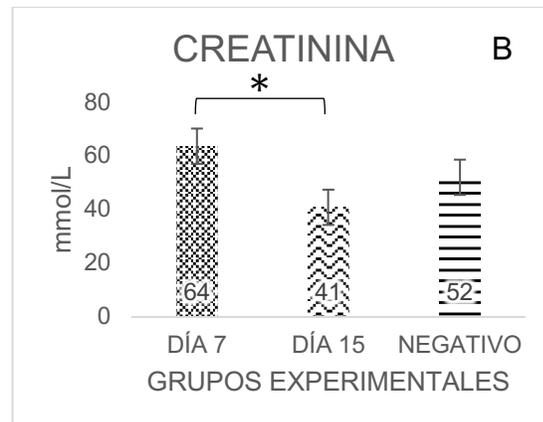
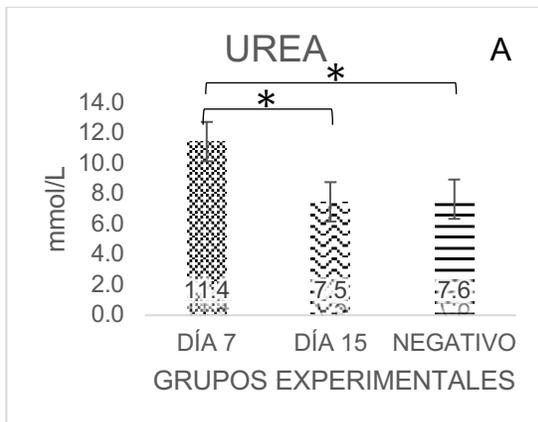
En la comparación de los días post infección se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de hematocrito (Figura 10A) y al día 15 por encima del valor de referencia asociado a eritrocitosis transitoria por efecto de catecolaminas así como una linfocitosis asociada a estimulación antigénica al día 15 pi (Figura 10D). Los demás analitos no muestran cambios estadísticamente significativos; Sin embargo se observa un incremento en leucocitos, neutrófilos y linfocitos posiblemente asociado a inflamación.

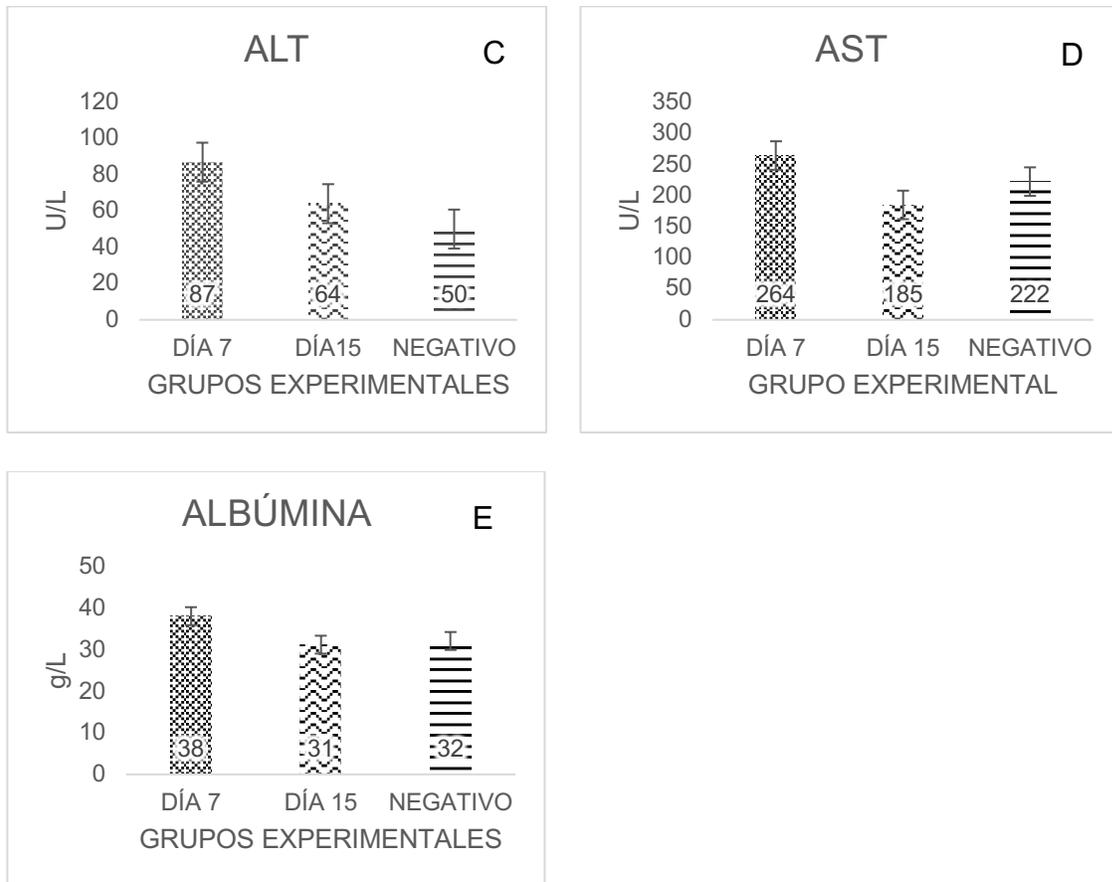




**Figura 10.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis baja

En la comparación de los días post inoculación se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de urea (Figura 11A) y creatinina (Figura 11B) por encima del valor de referencia al día 7 asociado a hiperazotemia pre-renal por hemoconcentración tomando en cuenta el valor de los eritrocitos; por lo tanto esta diferencia entre los días 7 y 15 pi no es representativa. Sin embargo se observa también un incremento de ALT al día 7 y 15 en comparación con el valor de referencia asociado a degeneración hepatocelular.

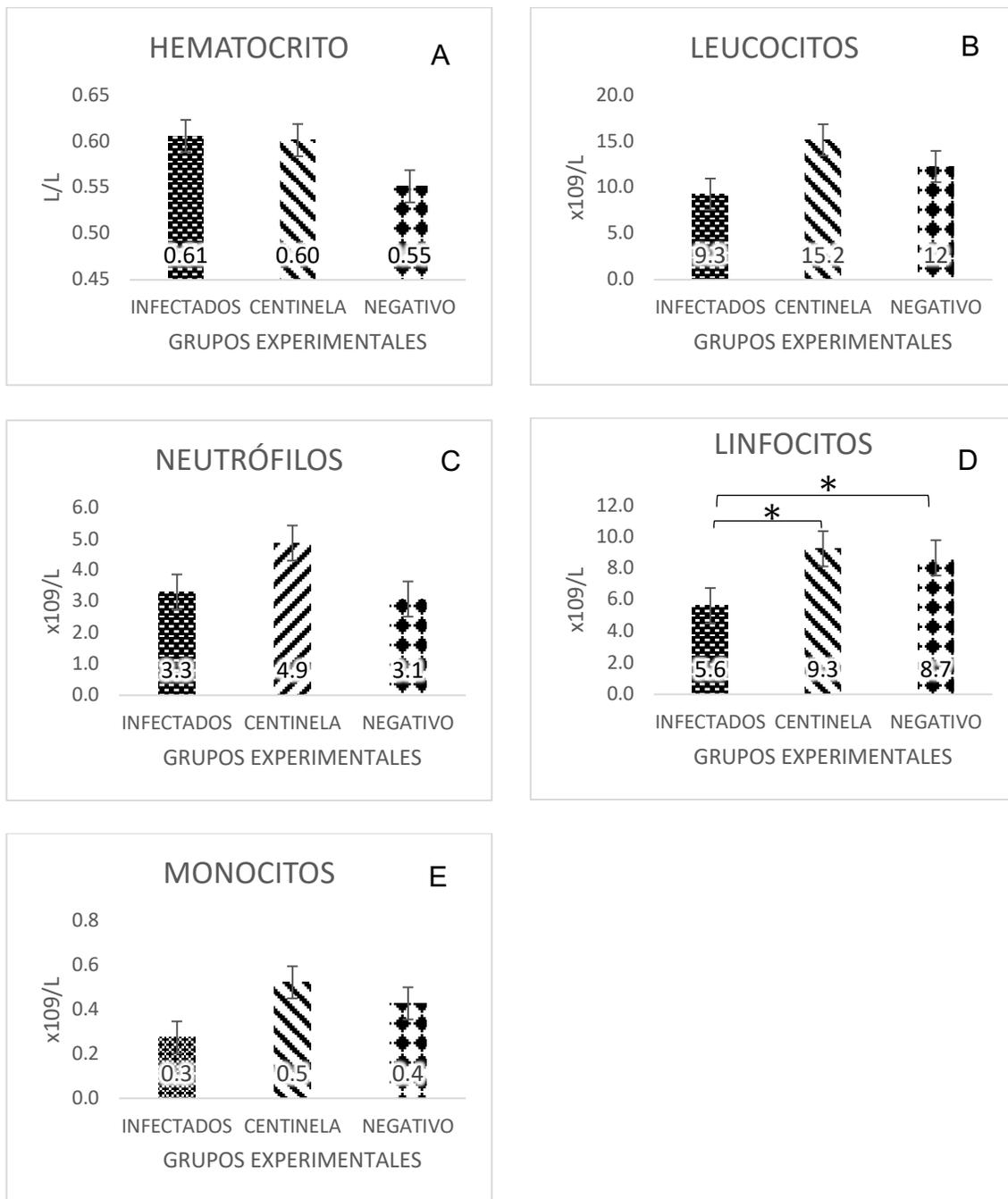




**Figura 11.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis baja

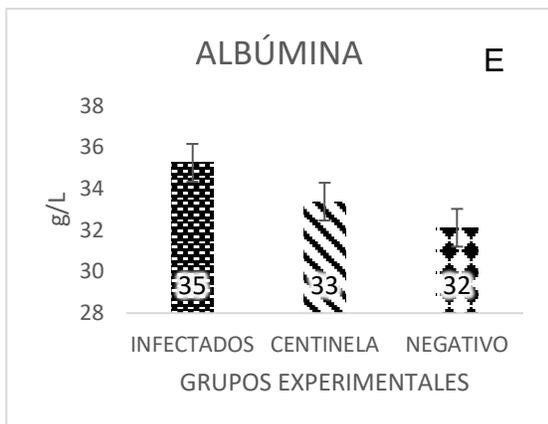
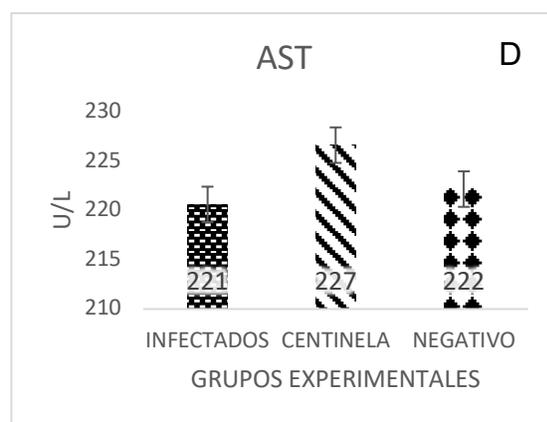
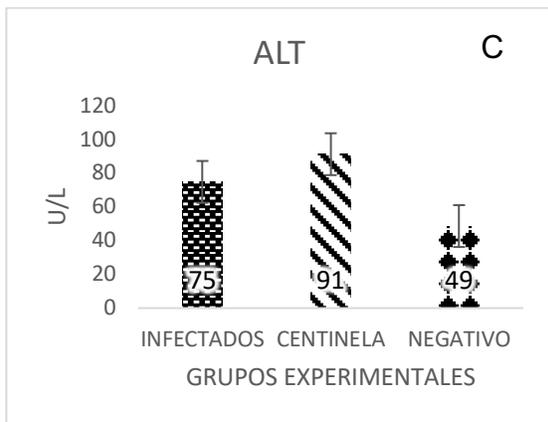
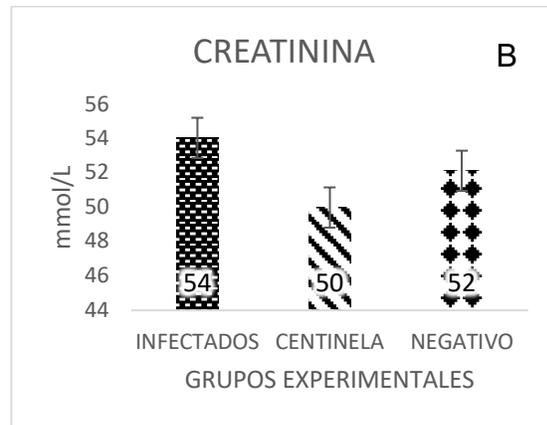
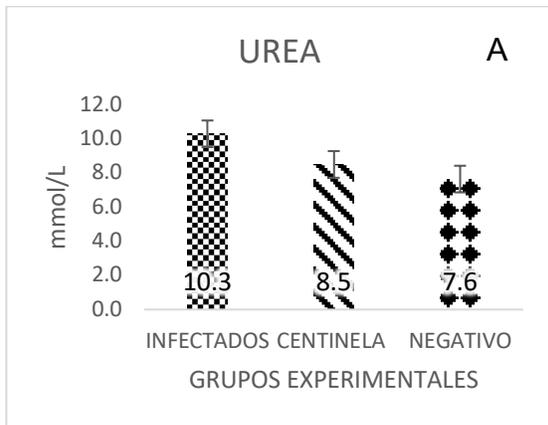
### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE RATONES INFECTADOS Y CENTINELA

En la comparación de los ratones infectados con los centinela se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de linfocitos por encima del valor de referencia en los centinela posiblemente asociada a estimulación antigénica (Figura 12D).



**Figura 12.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL y ratones centinela a dosis baja

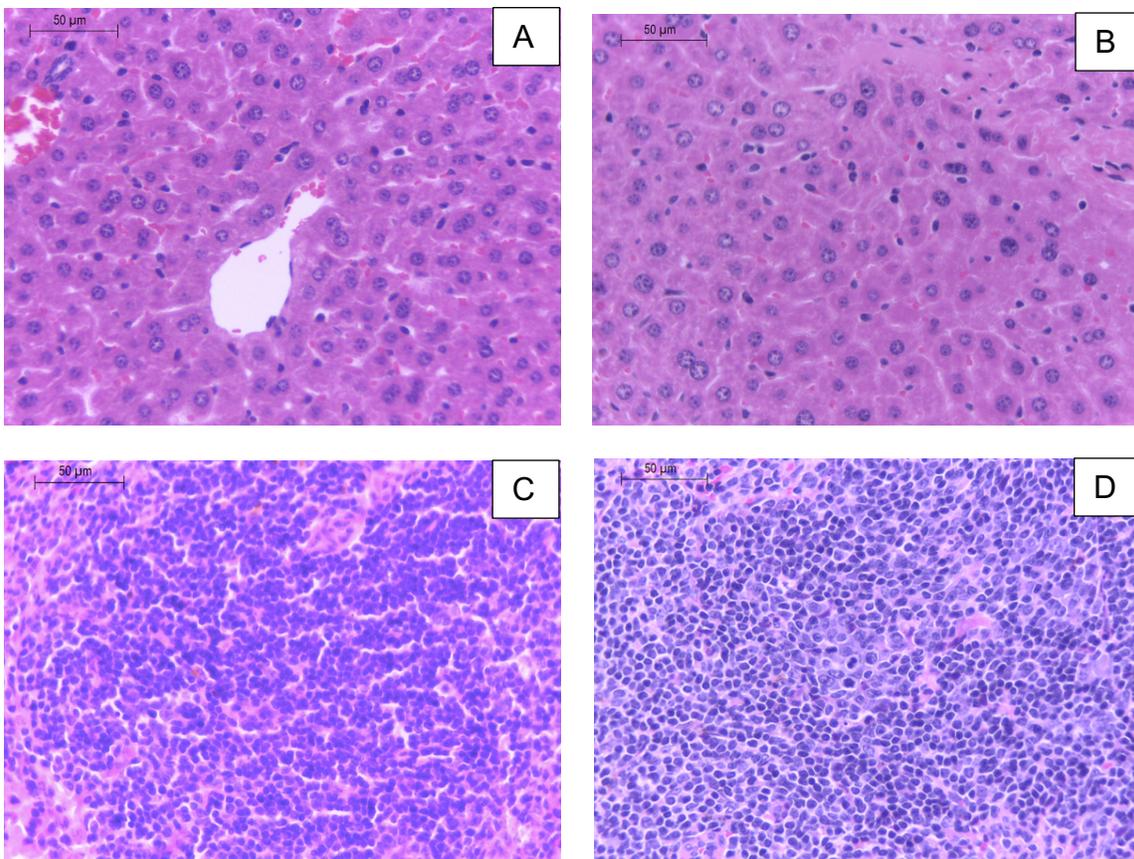
En la comparación de los ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis baja con los ratones centinela no se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en ninguno de los analitos evaluados entre ambos grupos (Figura 13) Sin embargo se observa un incremento de ALT y AST asociado a posible degeneración hepatocelular.



**Figura 13.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL y los ratones centinela a dosis baja

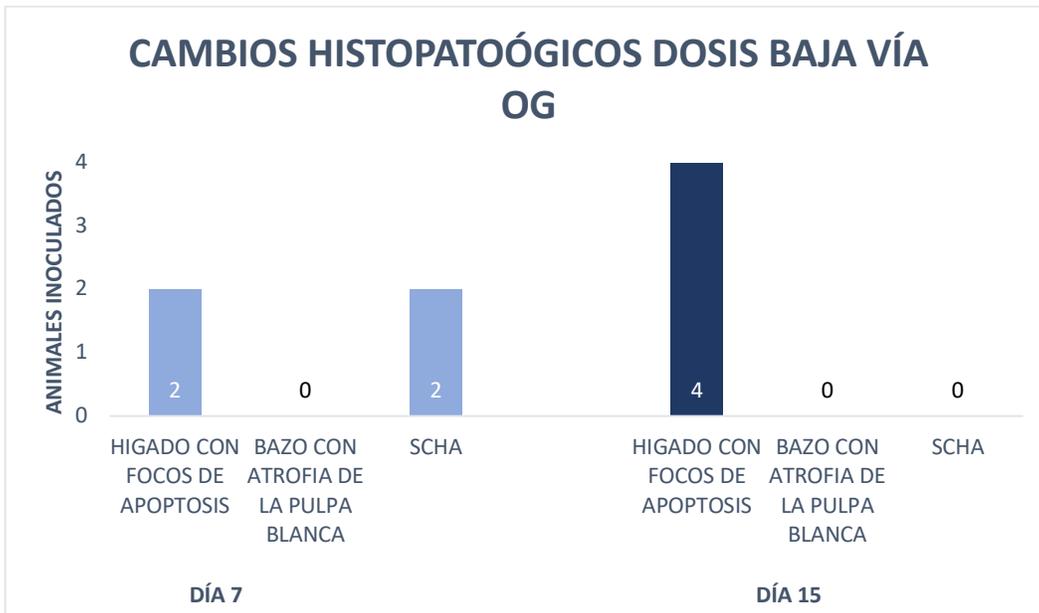
## HISTOPATOLOGÍA

Las alteraciones histológicas observadas en las muestras de órganos de los animales infectados con VDVB cepa NADL por vía OG e IP a dosis baja fueron necrosis coagulativa multifocal en hígado, células apoptóticas en bazo e hiperplasia de la pulpa blanca esplénica (Figuras 14, 15 y 16). Estos resultados demuestran que la infección con el VDBV por ambas vías probadas a dosis baja de la cepa NADL en el modelo murino es capaz de causar efecto citotóxico en estas células, tal y como lo hace en el hospedero natural.

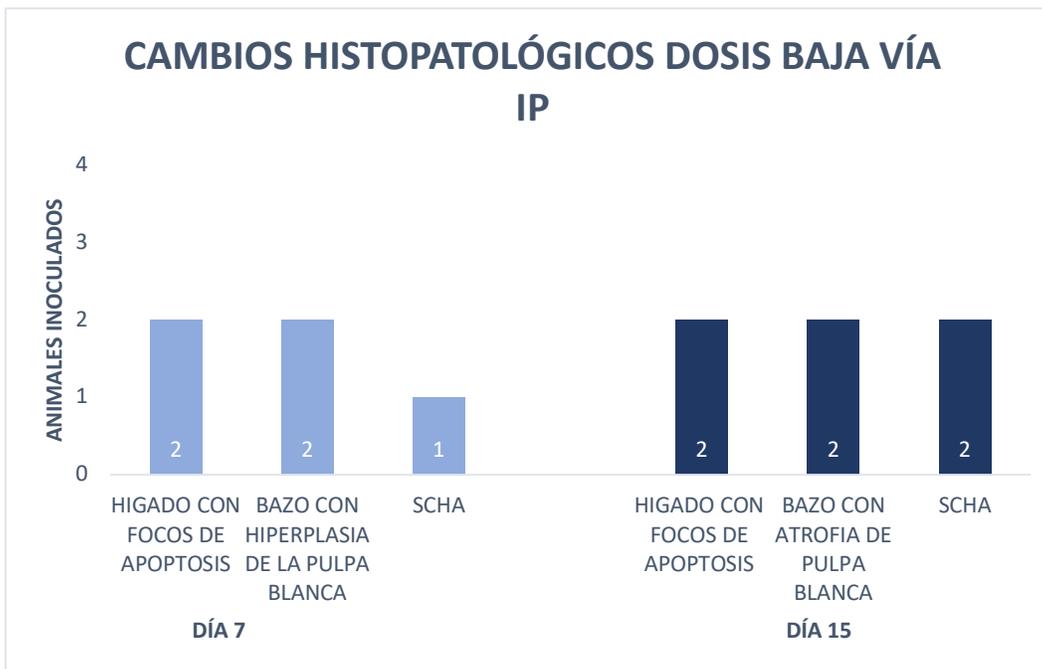


**Figura 14.** Microfotografías de hígado y bazo en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP, al día 15 post infección en dosis baja

A) Hígado sin alteraciones del grupo control, B) Necrosis coagulativa multifocal hepática, C) Folículo linfoide esplénico sin alteraciones del grupo control, D) Folículo linfoide esplénico con apoptosis linfoide en grupo infectado. 400x H&E.



**Figura 15.** Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía OG a dosis baja en los días 7 y 15 post infección



**Figura 16.** Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP a dosis baja en los días 7 y 15 post infección

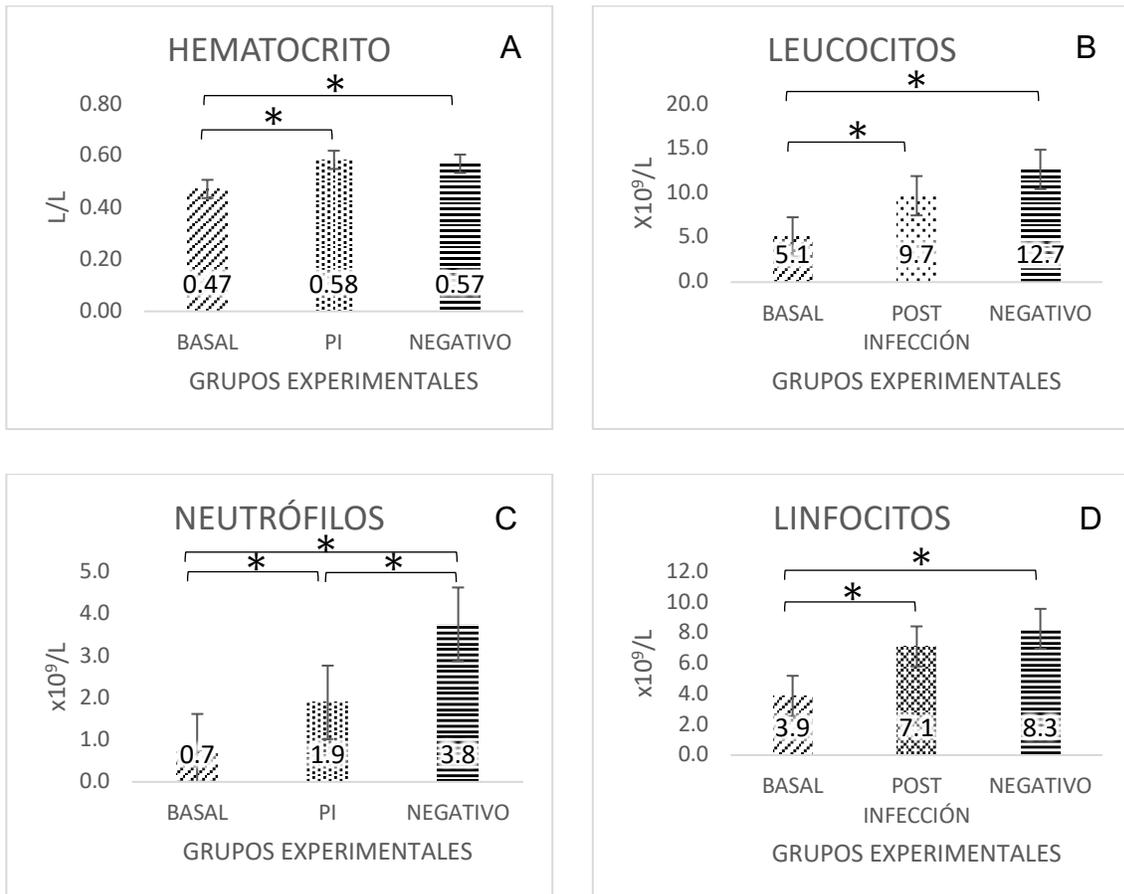
## DOSIS ALTA

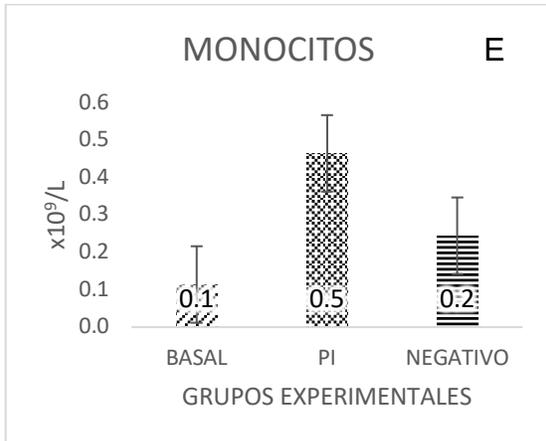
### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

A continuación se muestran los parámetros hematológicos y bioquímicos basales y post infección en ratones infectados con el VDVB (cepa NADL dosis alta).

### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA BASAL Y POSTINFECCIÓN

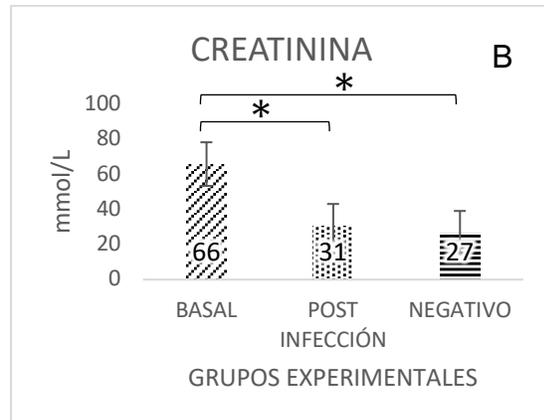
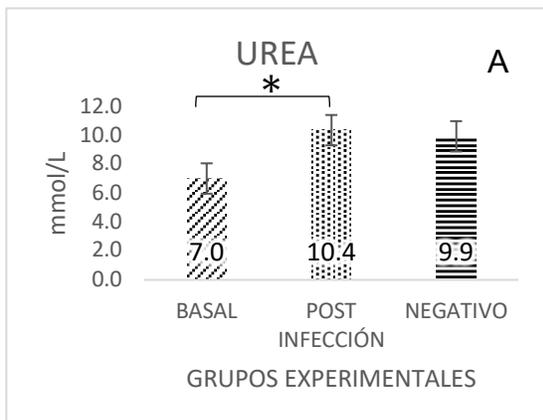
El perfil hematológico mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de hematocrito y eritrocitos posiblemente por efecto de catecolaminas (Figura 17A), leucocitosis por neutrofilia y monocitosis asociado a inflamación crónica (Figura 17B, 17C), y linfocitosis no es representativa porque no se encuentra por encima del valor de referencia.

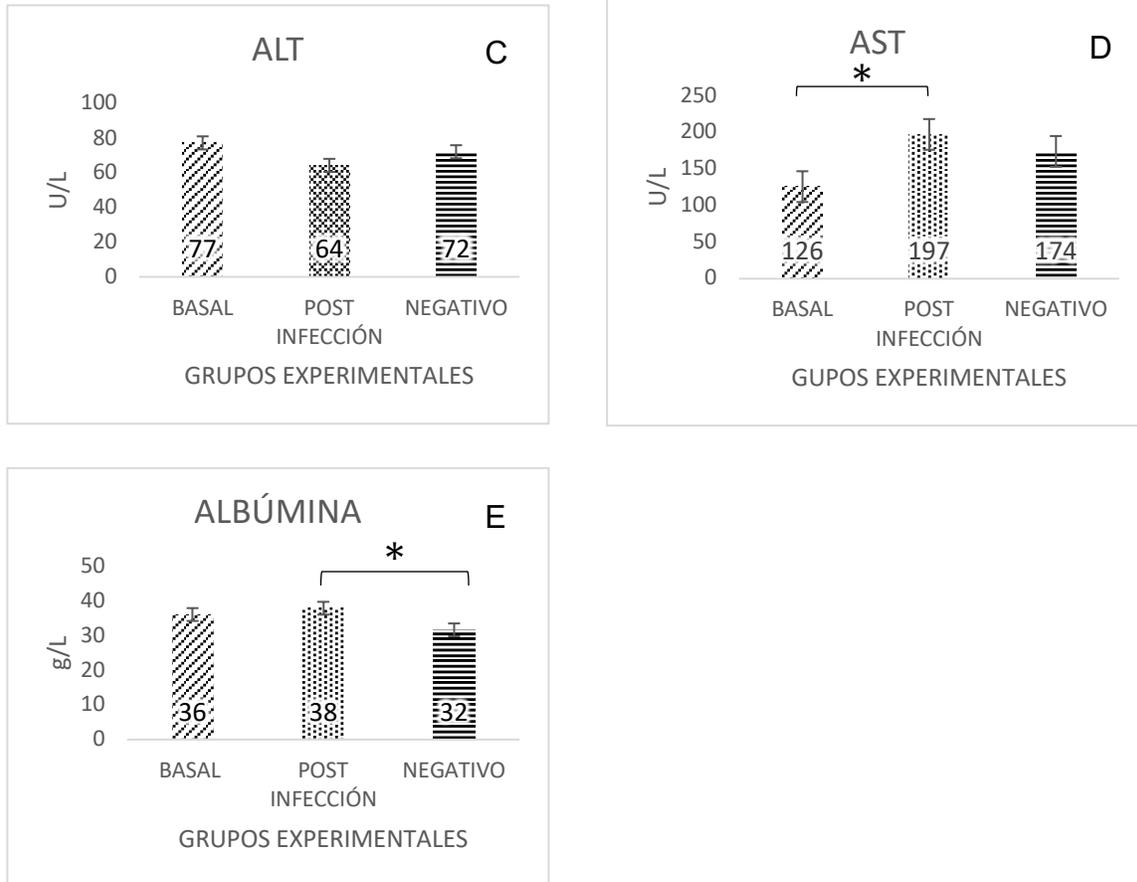




**Figura 17.** Perfil hematológico basal y post infección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis alta

El perfil bioquímico dirigido mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en urea y creatinina asociado a hiperazotemia pre-renal por hemoconcentración tomando en cuenta el valor de los eritrocitos y hematocrito (Figura 18A y 18B), en AST en la comparación basal y post infección lo cual sugiere un daño hepatocelular (Figura 18D), y en Albúmina asociado a hemoconcentración, lo cual se correlaciona con el hemograma (Figura 18E).

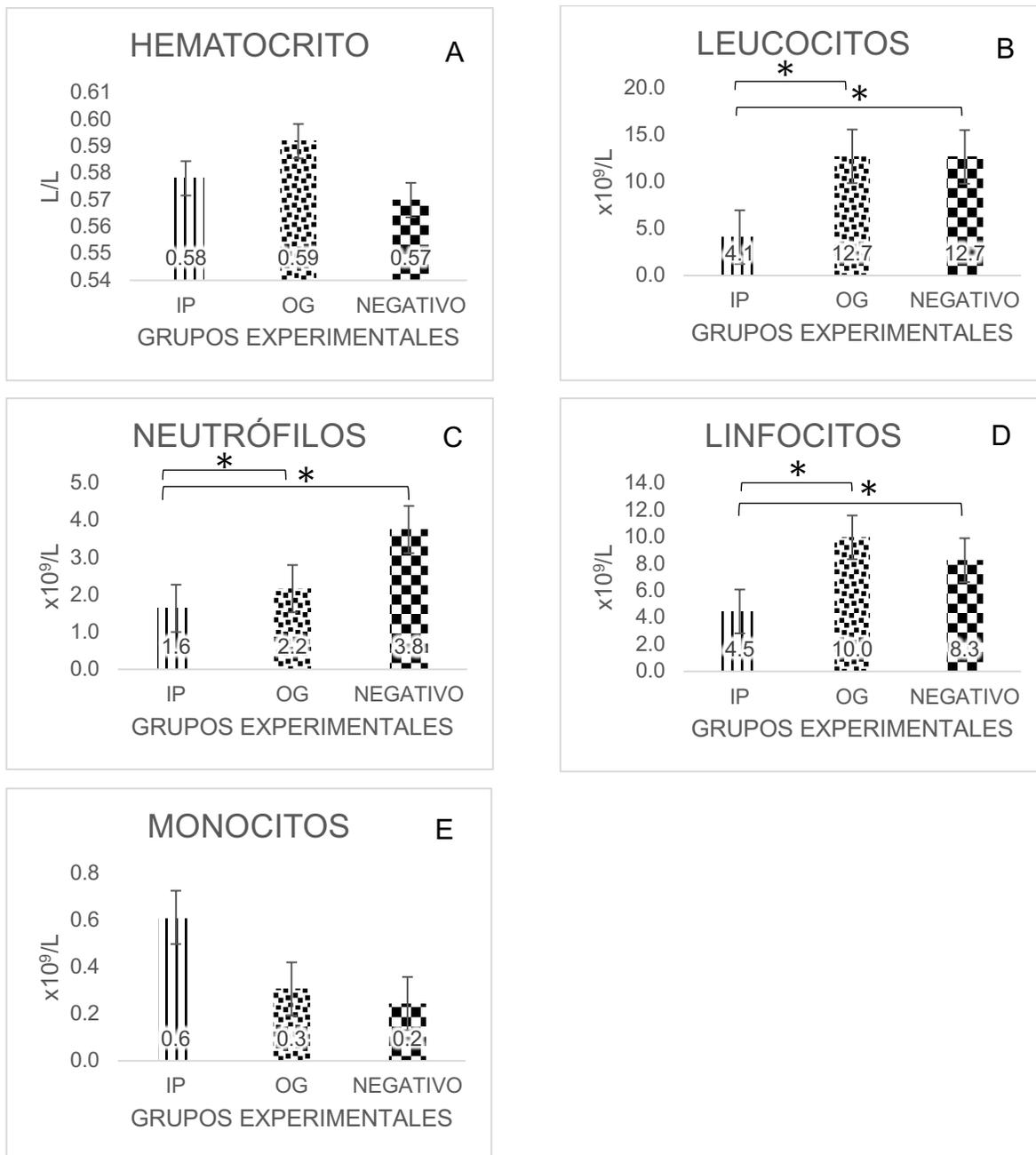




**Figura 18.** Perfil bioquímico dirigido basal y postinfección de ratones infectados con VDVB cepa NADL a dosis alta

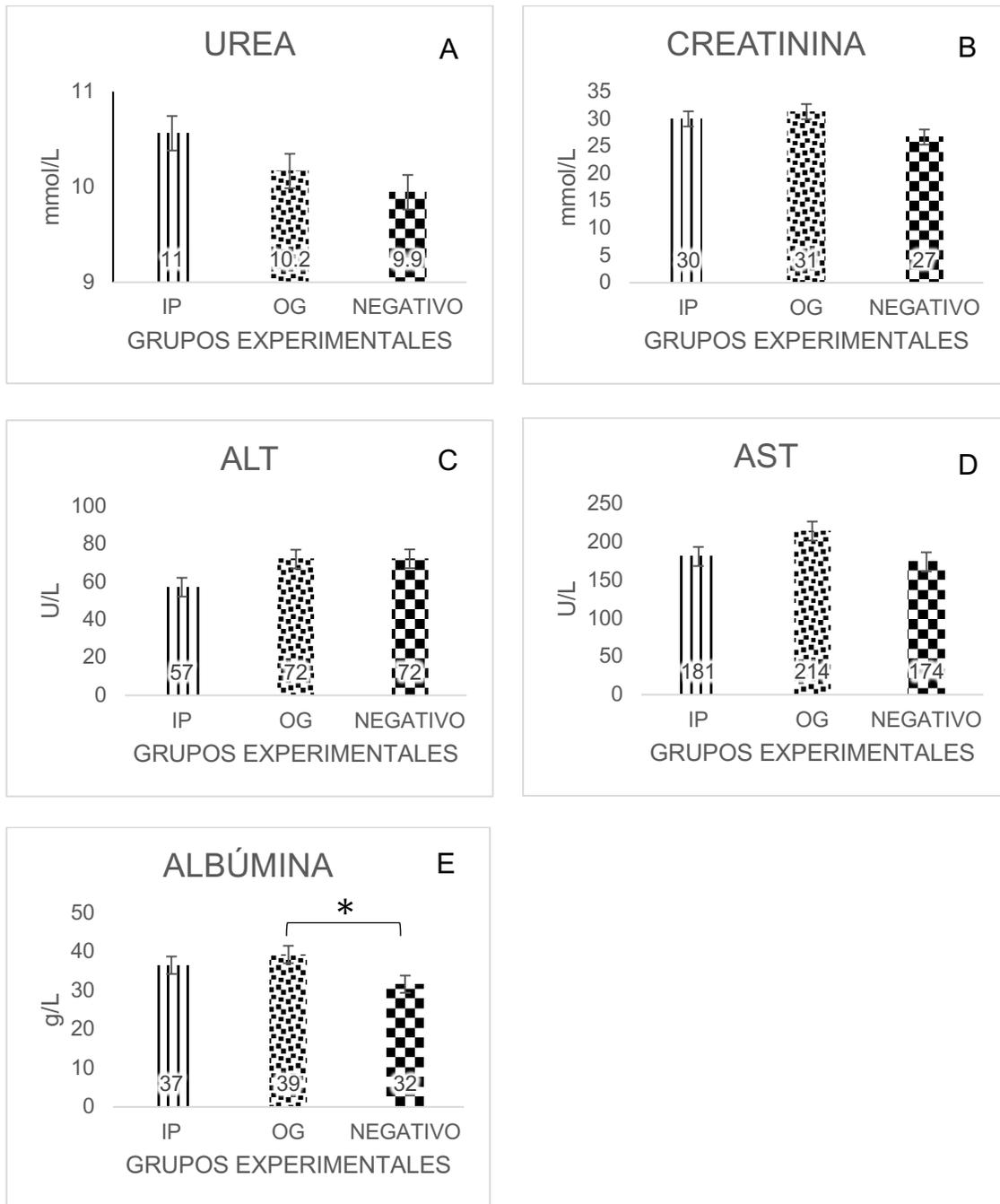
## HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA POR VÍAS DE INOCULACIÓN

El perfil hematológico mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en leucocitos y neutrófilos mostrando una leucopenia por neutropenia en vía IP tomando en cuenta los valores basales asociado a inflamación no compensada. Las alteraciones con linfocitos son secundarias (Figura 19).



**Figura 19.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis alta

En la comparación de las vías de inoculación únicamente se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en albúmina asociado a hemoconcentración, lo cual se correlaciona con el hemograma (Figura 20).

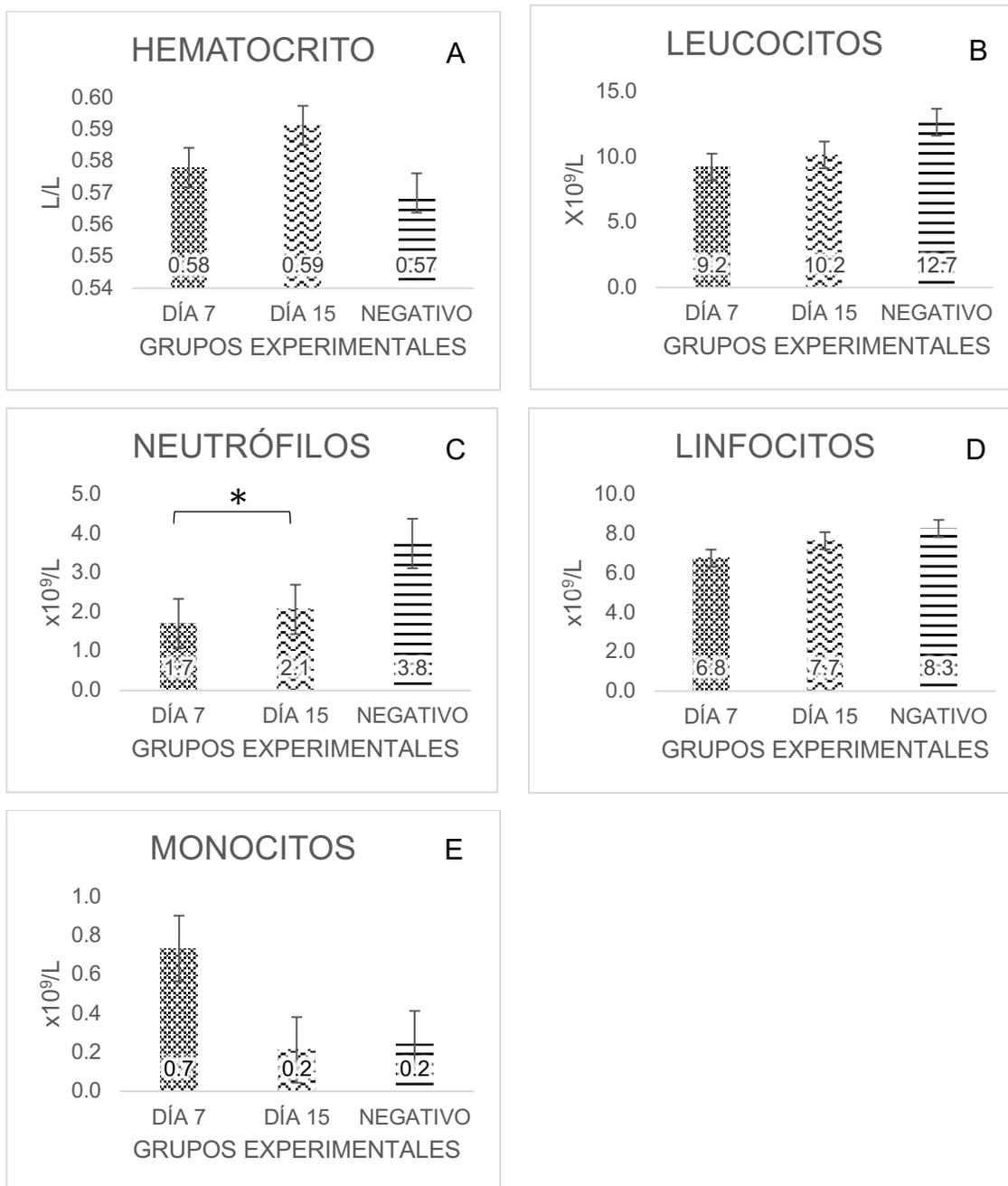


**Figura 20.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL por las vías de inoculación IP y OG a dosis alta

### HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA A LOS DÍAS 7 Y 15 POST INFECCIÓN

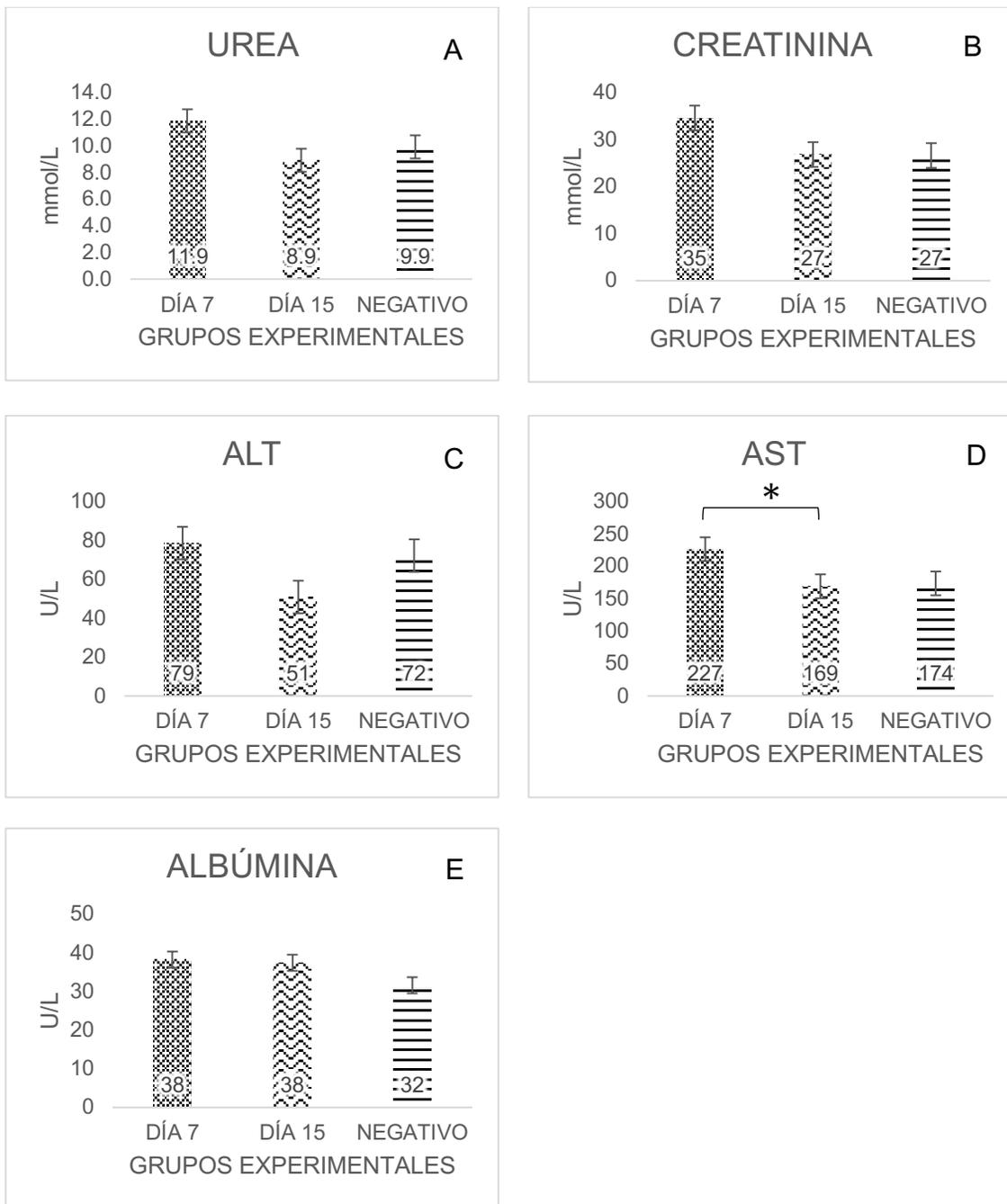
En la comparación de los días post infección se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en la concentración de neutrófilos mostrando

una neutropenia por inflamación no compensada siendo mas evidente al día 7 que al día 15 (Figura 21C) .



**Figura 21.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVb cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis alta

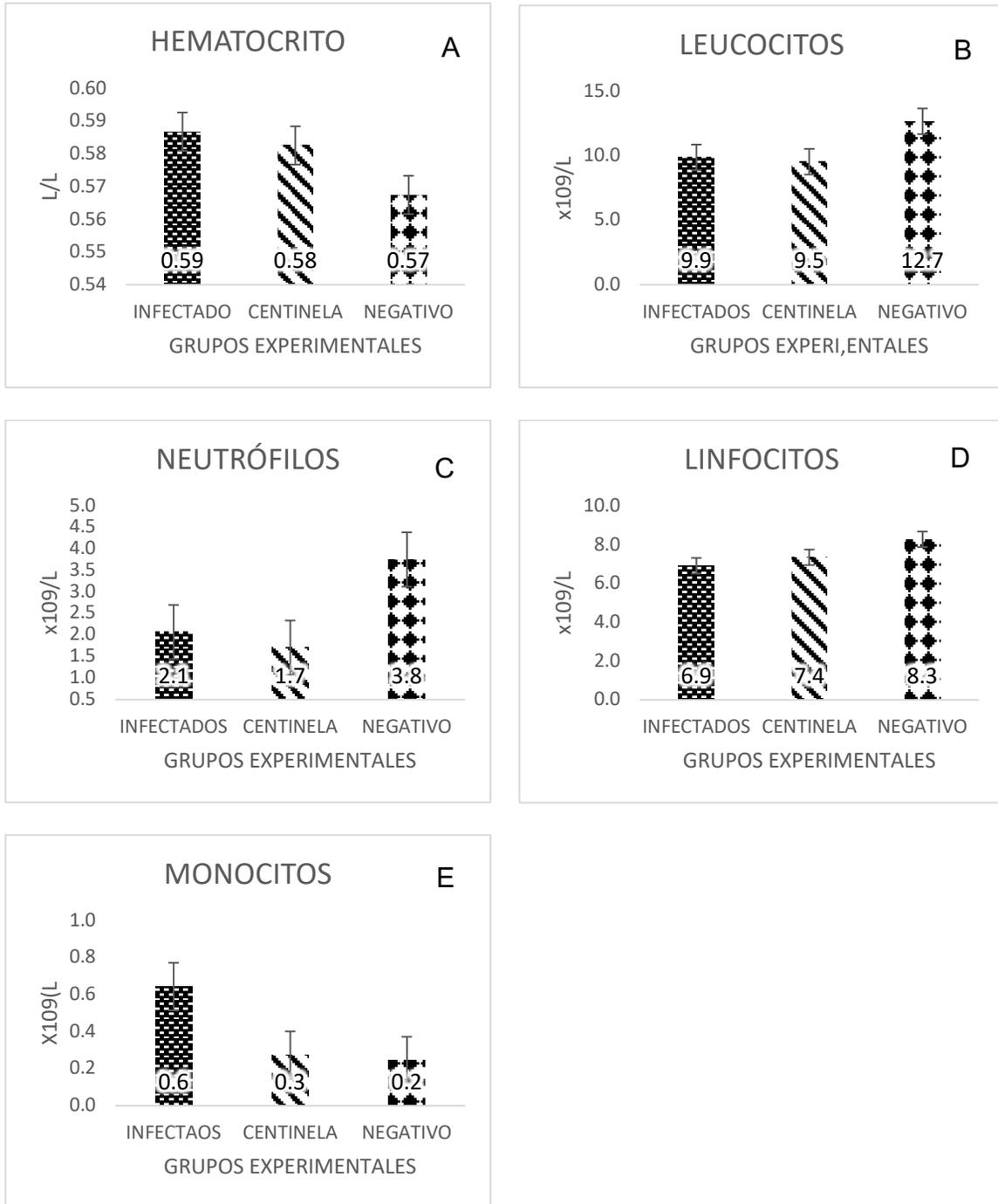
En la comparación de los días post inoculación se observa diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza en AST asociado a daño hepatocelular (Figura 22).



**Figura 22.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVb cepa NADL a los días 7 y 15 post infección a dosis alta

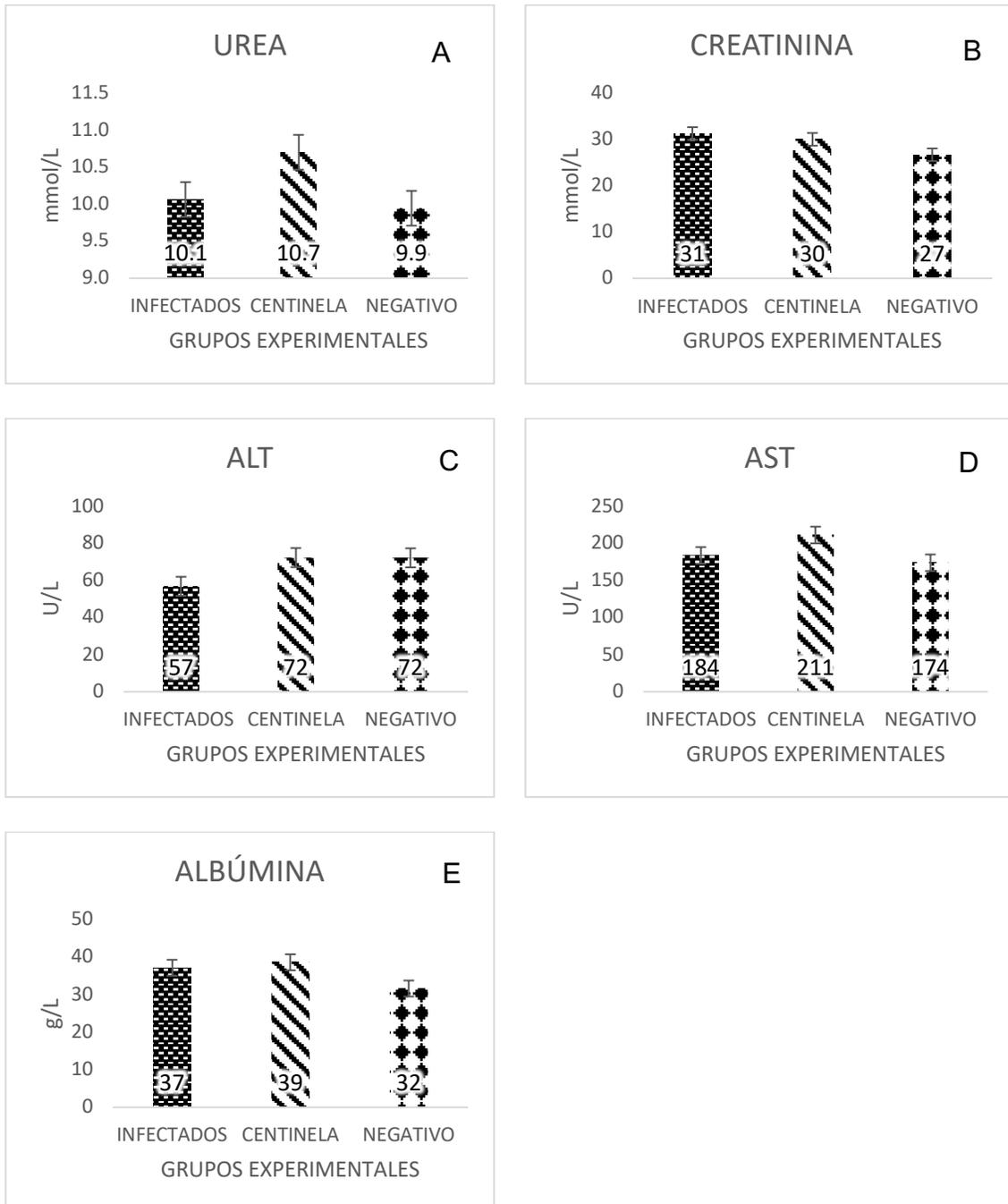
## HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE RATONES INFECTADOS Y CENTINELA

En la comparación de los infectados con los centinela no se observa diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza (Figura 23).



**Figura 23.** Perfil hematológico de ratones infectados con VDVB cepa NADL y ratones centinela a dosis alta

En la comparación de los infectados con los centinela no se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con un 95% de confianza (Figura 24).



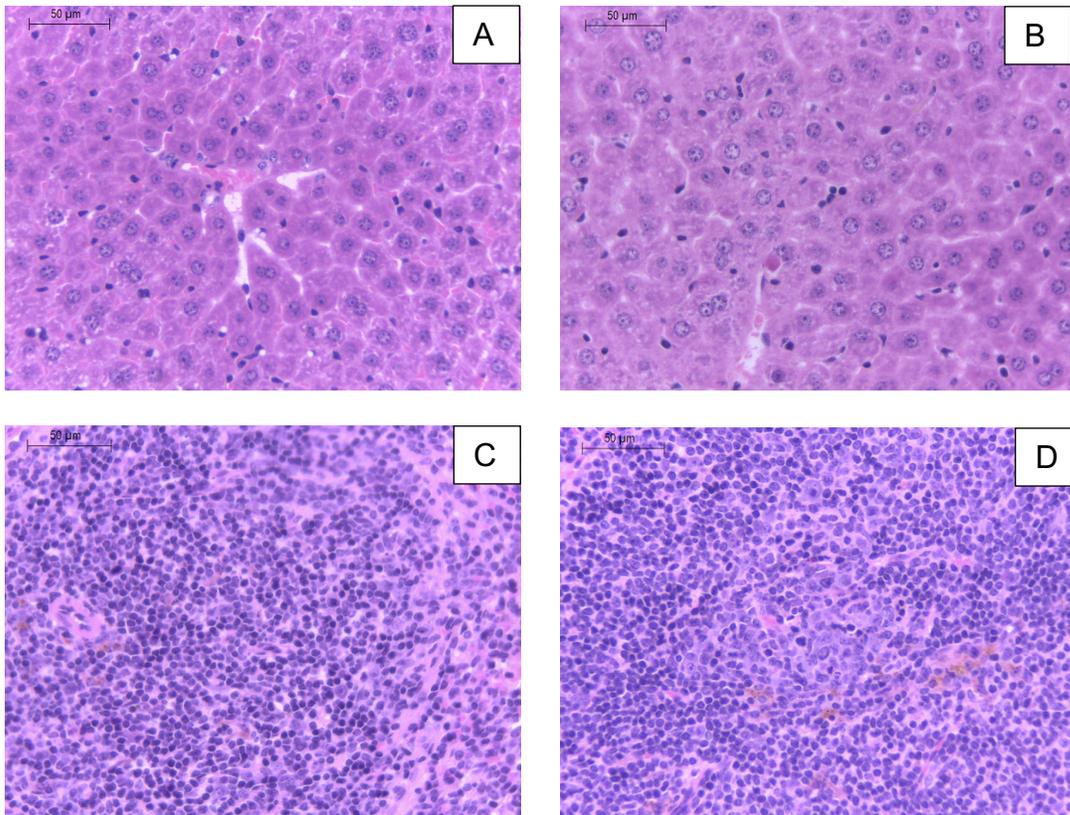
**Figura 24.** Perfil bioquímico dirigido de ratones infectados con VDVB cepa NADL y los ratones centinela a dosis alta

## CAMBIOS HISTOPATOLOGICOS EN DOSIS ALTA

Las alteraciones histológicas observadas en las muestras de órganos de los animales infectados por vía IP a dosis alta fueron focos de apoptosis en hígado, y atrofia de la pulpa blanca en bazo (Figura 25). Por vía OG no se mostraron cambios histopatológicos en dosis alta.



**Figura 25.** Alteraciones histopatológicas en ratones infectados con VDVB por vía IP en dosis alta



**Figura 26.** Microfotografías de hígado y bazo en ratones infectados con VDVB cepa NADL por vía IP, al día 15 post infección en dosis alta

A) Hígado sin alteraciones del grupo control, B) Necrosis coagulativa multifocal hepática, C) Folículo linfoide esplénico sin alteraciones del grupo control, D) Folículo linfoide esplénico con apoptosis linfoide en grupo infectado. 400x H&E

## ELISA

En los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA (IDEXX) P80 de los sueros de ratones infectados con el VDVB cepa NADL, a dosis alta y baja, no se observó la presencia de anticuerpos contra la proteína p80 en ninguno de las muestras séricas evaluadas.

**Cuadro 3.** Resultados de la prueba de ELISA de ratones inoculados con VDVB cepa NADL a dosis baja

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.548	1.439	1.492	1.465	1.538	1.432	1.520	1.546	1.548	1.545	1.510	0.079
B	1.538	1.493	1.453	1.415	1.464	1.386	1.396	1.451	1.394	1.430	1.452	0.071
C	1.535	1.545	1.437	1.435	1.380	1.368	1.433	1.449	1.411	1.369	1.441	1.423
D	1.587	1.559	1.451	1.458	1.427	1.415	1.486	1.495	1.454	1.399	1.452	1.390
E	1.567	1.528	1.481	1.463	1.428	1.197	1.414	1.448	1.500	1.514	1.389	1.428
F	1.533	1.497	1.478	1.406	1.439	1.407	1.426	1.467	1.467	1.485	1.370	1.418
G	1.540	1.604	1.442	1.433	1.422	1.401	1.486	1.399	1.399	1.360	1.374	1.530
H	1.616	1.621	1.492	1.514	1.455	1.403	1.528	1.535	1.535	1.387	1.449	1.523

Los resultados se consideran positivos ( <0.20 ) (color gris control positivo), y negativos por arriba del ( >0.800 ) (color rojo control negativo) (color amarillo resultados negativos de las muestras) (color azul blancos).

**Cuadro 4.** Resultados de la prueba de ELISA de ratones inoculados con VDVB cepa NADL a dosis alta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.659	1.569	1.49	1.551	1.582	1.472	1.594	1.629	1.559	1.571	1.448	0.068
B	1.592	1.462	1.475	1.417	1.466	1.397	1.436	1.496	1.44	1.507	1.43	0.067
C	1.491	1.484	1.46	1.443	1.471	1.43	1.491	1.464	1.456	1.432	1.447	1.452
D	1.544	1.557	1.468	1.46	1.527	1.467	1.561	1.545	1.524	1.475	1.432	1.446
E	1.543	1.53	1.441	1.52	1.485	1.608	1.519	1.502	1.465	1.477	1.476	1.452
F	1.512	1.522	1.462	1.443	1.429	1.485	1.438	1.449	1.424	1.446	1.41	1.491
G	1.511	1.488	1.425	1.409	1.426	1.433	1.414	1.421	1.426	1.382	1.437	1.526
H	1.636	1.561	1.473	1.455	1.412	1.469	1.466	1.448	1.552	1.503	1.566	1.536

Los resultados se consideran positivos ( <0.20 ) (color gris control positivo), y negativos por arriba del ( >0.800 ) (color rojo control negativo) (color amarillo resultados negativos de las muestras) (color azul blancos).

## RT-PCR

En los resultados obtenidos mediante RT-PCR de muestras de tejidos de ratones inoculados con la cepa NADL del VDVB a dosis baja se observó la presencia de una banda de 293 pb en el 50% (4/8) de los ratones centinela y en el 50% (4/8) de los ratones infectados, que corrobora la presencia del genoma viral.

Los órganos en los que se detectó la presencia de la banda de 293 pb fueron: 75% intestino (6/8), 25% riñón (2/8) y 12.5% estómago y bazo (1/8, para cada uno). El análisis del hígado no mostró la presencia de la banda de 293 kb en ningún animal infectado a dosis baja ni centinela.

**Cuadro 5.** Resultado de los ratones infectados positivos mediante RT-PCR a dosis baja

RATONES	DOSIS BAJA	ÓRGANO
1	INFECTADO	INTESTINO
2	INFECTADO	INTESTINO
3	INFECTADO	INTESTINO
4	INFECTADO	RIÑÓN, INTESTINO

**Cuadro 6.** Resultado de los ratones centinela positivos mediante RT-PCR a dosis baja

RATONES	DOSIS BAJA	ÓRGANO
1	CENTINELA	INTESTINO
2	CENTINELA	INTESTINO
3	CENTINELA	RIÑÓN, ESTOMAGO
4	CENTINELA	BAZO

En los resultados obtenidos mediante RT-PCR de muestras de ratones inoculados con el VDVB cepa NADL a dosis alta, se observó la presencia de una banda de 293 kb, en el 50% (4/8) de los animales centinela y en el 37.5% (3/8) de los infectados. Los órganos que registraron la presencia del genoma viral por la amplificación de un fragmento de 293 pb fueron: 50% riñón (4/8), 37.5 % hígado (3/8) y 25% intestino y estómago (2/8 para cada uno). El análisis del bazo en todos los animales infectados y centinela no mostró la presencia de la banda de 293 pb.

**Cuadro 7.** Resultado de los ratones infectados positivos mediante RT-PCR a dosis alta

<b>RATONES</b>	<b>DOSIS ALTA</b>	<b>ÓRGANO</b>
1	INFECTADO	RIÑÓN
2	INFECTADO	RIÑÓN
3	INFECTADO	ESTÓMAGO
4	INFECTADO	INTESTINO, HÍGADO

**Cuadro 8.** Resultado de los ratones centinela positivos mediante RT-PCR a dosis alta

<b>RATONES</b>	<b>DOSIS ALTA</b>	<b>ÓRGANO</b>
1	CENTINELA	RIÑÓN
2	CENTINELA	HÍGADO
3	CENTNELA	INTESTINO, HÍGADO, RIÑON, ESTÓMAGO

## DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló un modelo murino de infección con el VDVB cepa NADL inoculado por vía intraperitoneal y orogástrica a una dosis baja de  $1 \times 10^{5.7} \text{TCID}_{50}$  y a una dosis alta de  $1 \times 10^{6.7} \text{TCID}_{50}$ .

Los resultados obtenidos son concordantes con los reportados por Seong y colaboradores (2015), quienes a la misma dosis que utilizamos en concentración baja encontraron replicación del virus y lesiones similares a las observadas en este estudio (necrosis focal en hígado).

Este estudio es el primero en el que se evidencian los valores hematológicos y bioquímicos basales a los 7 y 15 días post infección con el VDVB en ratón. Con el inóculo de infección a dosis baja de  $1 \times 10^{5.7} \text{TCID}_{50}$  el perfil bioquímico mostró un incremento en AST asociado a una degeneración hepatocelular correlacionada en los cortes histopatológicos; La AST es una enzima que se encuentra predominante en citoplasma de hepatocitos y fibras musculares, lo que resulta en un incremento cuando hay un daño o lesión en estos órganos (Thrall's *et al* 2012). Se observó también leucocitosis por neutrofilia y presencia de neutrófilos tóxicos asociado a una inflamación así como lo reporta Weiss y colaboradores (2010) en respuesta inflamatoria; de la misma forma se detectó linfocitosis posiblemente asociada a estimulación antigénica similar a lo reportado por Stockham y colaboradores (2002), ya que la presencia del virus en el organismo desencadena una estimulación de citosinas lo cuál promueve el incremento de los niveles de leucocitos (McGavin M.D., 2007).

De manera muy similar, en los ratones inoculados con dosis alta de  $1 \times 10^{6.7} \text{TCID}_{50}$  se encontró leucocitosis por neutrofilia y monocitosis asociada a inflamación crónica y linfocitosis por estimulación antigénica en la comparación basal y post infección. En los hallazgos bioquímicos únicamente se encontró incremento en AST por degeneración hepatocelular. Al comparar los días de inoculación se observó que al día 7 hay una leucopenia por neutropenia por vía IP asociado a una inflamación no compensada como se reporta por Stockham y colaboradores (2002), lo que sugiere

que en este momento el virus ha llegado al nivel mas alto de replicación (Sagar M.G. and Ridpath J.F., 2009) y el organismo está tratando de regenerar su población celular, logrando llegar a sus niveles óptimos al día 15.

Los hallazgos histológicos observados por vía IP y OG a dosis baja fue necrosis coagulativa multifocal, células apoptóticas en bazo e hiperplasia de la pulpa blanca como lo reportan Seong y colaboradores (2015) en sus estudios con dosis de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> 0.4mL por vía intraperitoneal e intranasal. En dosis alta se encontraron dos ratones (12.5%) con las mismas lesiones histopatológicas (atrofia de la pulpa blanca en bazo y focos de apoptosis en hígado); sin embargo, se demostró la presencia del antígeno viral mediante RT-PCR a dosis baja en el 50% (4/8) de los ratones centinela y en el 50% (4/8) de los ratones infectados, que corrobora la presencia del antígeno viral lo cual nos permite asociar la leión con la presencia del VDVB. y a dosis alta en el 50% (4/8) de los animales centinela y en el 37.5% (3/8) de los infectados, respectivamente, confirmando que con ambas dosis el ratón tiene la capacidad de replicar el VDVB cepa NADL.

No se evidenció la presencia de pirexia ni de signos clínicos en ninguna dosis al igual que en los estudios reportados por Seong y colaboradores (2015), Han y colaboradores (2016) y Seong, Lee y Choi (2016) quienes emplearon dosis baja y dosis alta, cepa NADL, BVDV2, NCP1, NCP2, vía oral, intraperitoneal e intranasal, a los días 0, 2, 4, 5, 7, 9 y 14.

La distribución del genoma viral se detectó mediante RT-PCR en intestino, bazo, riñón e hígado. Esto es un hallazgo novedoso, ya que no hay estudios en donde se haya hecho extracción de ARN a partir de órganos de animales infectados con VDVB. Sin embargo, Seong y colaboradores (2016) reportan positividad en muestras sanguíneas en un 50% (6/12) de ratones infectados con VDVB utilizando la dosis baja que se utilizó en este experimento.

De los órganos en los cuales se realizó detección mediante RT-PCR, el intestino y riñón fueron los que tuvieron mayor numero de positividad, a diferencia de lo reportado por Seong y colaboradores (2015) quienes encontraron el bazo con

mayores registros positivos a la infección mediante inmunohistoquímica en comparación con los otros órganos positivos.

No hay estudios en ratones infectados experimentalmente en donde se evalúe la presencia de anticuerpos contra VDVB; sin embargo, Bachofen C. y colaboradores (2014) realizan un estudio en conejos infectados demostrando un pico de producción de anticuerpos al día 15 postinfección. Al contrario de estos estudios, en nuestro trabajo no se detectó la presencia de anticuerpos contra la proteína P80 (de VDVB CP) al día 7 ni al día 15, probablemente debido al tiempo de toma de muestra, el cual no fue suficiente para evaluar anticuerpos contra éste virus. Se podrían realizar mediciones a partir del día 21 en experimentos posteriores para confirmar la presencia de anticuerpos y poder evaluar la respuesta humoral en ratones infectados.

Un hallazgo importante de éste trabajo fue demostrar el establecimiento de la capacidad de transmisión horizontal en ratones infectados con el VDVB. Lo anterior, debido a que en animales centinela sometidos a un estrecho contacto con animales infectados se detectó la presencia del genoma viral en diversos tejidos.

Por lo tanto, éste es el primer trabajo que describe la capacidad de transmisión que tiene el VDVB en ratones, y sugiere que dicha transmisión se establece mediante el contacto directo con secreciones como orina, heces o saliva, mismos que requieren ser evaluados en estudios posteriores. Estos resultados son objeto de estudios futuros para la evaluación de la presencia del virus en roedores silvestres, los cuales pueden estar desempeñando un papel como portadores del VDVB al tener la capacidad de replicarlo y diseminarlo mediante fluidos corporales; esto implica un riesgo al estar en contacto con bovinos domésticos y silvestres ya que representan una fuente de propagación viral.

Los aspectos inmunológicos y la fisiopatología de la infección del VDVB en ratones no están del todo descritos; sin embargo, en este estudio se confirmó que el ratón podría ser un buen modelo de experimentación para la prueba de potencia y de inmunogenicidad de biológicos.

## **CONCLUSIÓN**

1. El Virus de diarrea viral bovina se replica en ratón por ambas vías de inoculación.
2. En los ratones infectados con el VDVB no se observaron signos clínicos.
3. Las vías de inoculación en ambas dosis indujeron cambios histológicos. A dosis menor se observó mayor daño.
4. La replicación viral del VDVB fue evidente a dosis baja y alta.
5. Se evidenció la transmisión horizontal del virus en un modelo de experimentación mediante RT-PCR en animales centinela.

## PROSPECTIVA

- Evaluar lesiones histopatológicas de tracto respiratorio.
- Inocular hembras gestantes para evaluar la transmisión vertical.
- Incrementar el número de días post infección para comparar y determinar los días óptimos de infección de manera experimental.
- Evaluar cepas no citopáticas biotipo 2, esperando encontrar mayores lesiones como se observa a nivel de campo en bovinos.
- Evaluar la presencia de anticuerpos en ratones infectados en un periodo mayor a 21 días y utilizar anticuerpos IgM.
- Incrementar la dosis alta tres logaritmos de la que ya fue probada.

## REFERENCIAS

1. Bauhofer, O. et al. (2007) 'Classical Swine Fever Virus Npro Interacts with Interferon Regulatory Factor 3 and Induces Its Proteasomal Degradation', *Journal of Virology*, 81(7), pp. 3087–3096. doi: 10.1128/jvi.02032-06.
2. Becher, P. et al. (2014) 'Complete Genome Sequence of Bovine Pestivirus Strain PG-2, a Second Member of the Tentative Pestivirus Species Giraffe', *Genome Announcements*, 2(3), pp. 3–4. doi: 10.1128/genomea.00376-14.
3. Behera, S. P. et al. (2011) 'Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from cattle in India', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 34(2), pp. 189–196. doi: 10.1016/j.cimid.2010.11.002.
4. Behrens, S.-E. et al. (1998) 'Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon', *J. Virol.*, 72(3), pp. 2364–2372. Available at: <http://jvi.asm.org/content/72/3/2364.long>.
5. Bennett, R. M., Christiansen, K. and Clifton-Hadley, R. S. (1999) 'Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle', *Journal of Dairy Research*, 66(3), pp. 455–459. doi: 10.1017/S0022029999003684.
6. Bowen, D. G. et al. (2004) 'The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity', *Journal of Clinical Investigation*, 114(5), pp. 701–712. doi: 10.1172/JCI200421593.
7. Boysen, P. and Storset, A. K. (2009) 'Bovine natural killer cells', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130(3–4), pp. 163–177. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.02.017.
8. Brackenbury, L. S., Carr, B. V. and Charleston, B. (2003) 'Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV', *Veterinary Microbiology*, 96(4), pp. 337–344. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.09.004.
9. Branza-Nichita et al. (2001) '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, 75(Apr), pp. 3527–3536. doi: 10.1128/JVI.75.8.3527.
10. Brock, K. V. (2003) 'The persistence of bovine viral diarrhea virus', *Biologicals*, 31(2), pp. 133–135. doi: 10.1016/S1045-1056(03)00029-0.
  11. Chase, C. C. L. et al. (2015) 'Immune response to bovine viral diarrhea virus—looking at newly defined targets', *Animal Health Research Reviews*, 16(1), pp. 4–14. doi: 10.1017/s1466252315000110.
  12. Chen, Y. et al. (2012) 'Classical swine fever virus NS5A regulates viral RNA replication through binding to NS5B and 3'UTR', *Virology*. Elsevier, 432(2), pp. 376–388. doi: 10.1016/j.virol.2012.04.014.
  13. Choi, C., Hwang, K. K. and Chae, C. (2004) 'Classical swine fever virus induces tumor necrosis factor- $\alpha$  and lymphocyte apoptosis', *Archives of Virology*, 149(5), pp. 875–889. doi: 10.1007/s00705-003-0275-6.
  14. Corapi, W. V, French, T. W. and Dubovi, E. J. (1989) 'Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus.', *Journal of virology*, 63(9), pp. 3934–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548007> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC250990>.
  15. Deregt, D. and Loewen, K. G. (1995) 'Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease.', *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 36(6), pp. 371–378.
  16. Dixit, E. and Kagan, J. C. (2013) 'Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors', *Advances in Immunology*, 117, pp. 99–125. doi: 10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9.
  17. El Omari, K. et al. (2013) 'Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry', *Cell Reports*. The Authors, 3(1), pp. 30–35. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.001.
  18. Elbers, K. et al. (1996) 'Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7', *J Virol*, 70(6), pp. 4131–4135.
  19. Fernández-Sainz, I. J. et al. (2014) 'Effect of specific amino acid substitutions in the putative fusion peptide of structural glycoprotein E2 on Classical Swine

- Fever Virus replication', *Virology*, 456–457(1), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.virol.2014.03.005.
20. Fulton, R. W. et al. (2005) 'Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes', *Veterinary Microbiology*, 111(1–2), pp. 35–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.002.
  21. Gómez-Romero, N. et al. (2017) 'Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in cattle from Mexico', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(3), pp. 362–365. doi: 10.1177/1040638717690187.
  22. Gong, Y. et al. (1996) 'Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus', *Journal of General Virology*, 77(11), pp. 2729–2736. doi: 10.1099/0022-1317-77-11-2729.
  23. Grassmann, C. W. et al. (2001) 'Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans.', *Journal of virology*, 75(17), pp. 7791–802. doi: 10.1128/JVI.75.17.7791.
  24. Grigera, P. R. et al. (2000) 'Presence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice', *Virus Research*, 69(1), pp. 3–15. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00164-7.
  25. Harada, T., Tautz, N. and Thiel, H.-J. (2000) 'E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies', *Journal of Virology*, 74(20), pp. 9498–9506. doi: 10.1128/jvi.74.20.9498-9506.2000.
  26. Iqbal, M., McCauley, J. W. and Flick-Smith, H. (2000) 'Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans', *Journal of General Virology*, 81(2), pp. 451–459. doi: 10.1099/0022-1317-81-2-451.
  27. Jenckel, M. et al. (2014) 'Mixed Triple: Allied Viruses in Unique Recent Isolates of Highly Virulent Type 2 Bovine Viral Diarrhea Virus Detected by Deep Sequencing', *Journal of Virology*, 88(12), pp. 6983–6992. doi:

- 10.1128/jvi.00620-14.
28. Johnson M., (2012) 'Ratones y Ratas de laboratorio' Synatom Research. doi.org/10.13070/mm.es.2.113
  29. Kirkland, P. D. et al. (2015) 'Bungowannah virus – a probable new species of pestivirus – what have we found in the last 10 years?', *Animal Health Research Reviews*, 16(1), pp. 60–63. doi: 10.1017/s1466252315000031.
  30. Lackner, T. et al. (2004) 'Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus', *Journal of Virology*, 78(19), pp. 10765–10775. doi: 10.1128/jvi.78.19.10765-10775.2004.
  31. Lackner, T., Thiel, H.-J. and Tautz, N. (2006) 'Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), pp. 1510–1515. doi: 10.1073/pnas.0508247103.
  32. Lanyon, S. R. et al. (2014) 'Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 199(2), pp. 201–209. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.07.024.
  33. Lee, S. R. et al. (2008) 'Bovine viral diarrhea viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(5), pp. 403–418. doi: 10.1016/j.cimid.2007.06.006.
  34. Liang, D. et al. (2003) 'The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses', *Journal of General Virology*, 84(5), pp. 1269–1274. doi: 10.1099/vir.0.18557-0.
  35. Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. F. and Neill, J. D. (2003) 'Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2', *Biologicals*, 31(2), pp. 119–122. doi: 10.1016/S1045-1056(03)00026-5.
  36. Lin, Z. et al. (2014) 'Classical swine fever virus and p7 protein induce secretion of IL-1 $\beta$  in macrophages', *Journal of General Virology*, 95(2014), pp. 2693–2699. doi: 10.1099/vir.0.068502-0.

37. Lindenbach and Rice (2013) 'The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly', *Nat Rev Microbiol.*, 71(2), pp. 233–236. doi: 10.1038/mp.2011.182.doi.
38. Liu, L. et al. (2009) 'Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses', *Virology*. Elsevier Inc., 385(2), pp. 351–357. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.004.
39. Lozano, G. and Martínez-Salas, E. (2015) 'Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms', *Current Opinion in Virology*, 12, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.coviro.2015.04.008.
40. Mahony, T. J. et al. (2005) 'Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia', *Veterinary Microbiology*, 106(1–2), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.10.024.
41. Maurer, K. et al. (2004) 'CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus', *Journal of Virology*, 78(4), pp. 1792–1799. doi: 10.1128/jvi.78.4.1792-1799.2004.
42. McGavin M.D. et al. (2007) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Fourth Edition. Edited by Elsevier. St. Louis Missouri. Available at: <http://evolve.elsevier.com/McGavin/vetdisease%0AEvolve>.
43. Morarie-Kane, S. et al. (2018) 'Fetal Hepatic Response to Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Utero', *Pathogens*, 7(2), p. 54. doi: 10.3390/pathogens7020054.
44. Palomares, R. A., Brock, K. V. and Walz, P. H. (2014) 'Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during experimental infection with low or high virulence bovine viral diarrhoea virus in beef calves', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 157(3–4), pp. 149–154. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.12.002.
45. Parkinson, C. M. et al. (2011) 'Diagnostic Necropsy and Selected Tissue and Sample Collection in Rats and Mice', *Journal of Visualized Experiments*, (54), pp. 1–6. doi: 10.3791/2966.
46. Peterhans, E., Jungi, T. W. and Schweizer, M. (2003) 'BVDV and innate immunity', *Biologicals*, 31(2), pp. 107–112. doi: 10.1016/S1045-

1056(03)00024-1.

47. Rajput, M. K. et al. (2014) 'The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains on bovine monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) phenotype and capacity to produce BVDV', *Virology Journal*. *Virology Journal*, 11(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1743-422X-11-44.
48. Reed, L. J. and Muench, H. (1938) 'American Journal of Hygiene', 27(3), pp. 435–469.
49. Richter, V. et al. (2017) 'A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 220(June 2016), pp. 80–87. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.01.005.
50. Sagar M.G. and Ridpath J.F. (2009) Bovine Viral Diarrhoea Virus, *Current Veterinary Therapy*. doi: 10.1016/B978-141603591-6.10024-7.
51. Schaut, R. G., Ridpath, J. F. and Sacco, R. E. (2016) 'Bovine viral diarrhoea virus type 2 impairs macrophage responsiveness to toll-like receptor ligation with the exception of toll-like receptor 7', *PLoS ONE*, 11(7), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0159491.
52. Schmeiser, S. et al. (2014) 'Morphogenesis of Pestiviruses: New Insights from Ultrastructural Studies of Strain Giraffe-1', *Journal of Virology*, 88(5), pp. 2717–2724. doi: 10.1128/jvi.03237-13.
53. Schultz, R. D., Dunne, H. W. and Heist, C. E. (1973) 'Ontogeny of the Bovine Immune Response 1', *Infection and Immunity*, 7(6), pp. 981–991.
54. Seong, G. et al. (2015) 'Experimental infection of mice with bovine viral diarrhoea virus', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 160(6), pp. 1565–1571. doi: 10.1007/s00705-015-2412-4.
55. Seong, G., Lee, J. S., Lee, K. H. and Choi, K. S. (2016) 'Experimental infection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus in mice induces megakaryopoiesis in the spleen and bone marrow', *Archives of Virology*. Springer Vienna, 161(2), pp. 417–424. doi: 10.1007/s00705-015-2649-y.
56. Seong, G., Lee, J. S., Lee, K. H., Shin, S. U., et al. (2016) 'Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus 2 impairs virus control in a mouse model', *Archives*

- of Virology. Springer Vienna, 161(2), pp. 395–403. doi: 10.1007/s00705-015-2665-y.
57. Stalder, H. P. et al. (2005) 'Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland', *Preventive Veterinary Medicine*, 72(1–2), pp. 37–41. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.020.
  58. Stockham S.L., Scott M.A., (2002) 'Veterinary Clinical Pathology' Second Edition, Black Publishing.
  59. Tautz, N., Kaiser, A. and Thiel, H. J. (2000) 'NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: Characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions', *Virology*, 273(2), pp. 351–363. doi: 10.1006/viro.2000.0425.
  60. Tautz, N., Tews, B. A. and Meyers, G. (2015) *The Molecular Biology of Pestiviruses*. 1st edn, *Advances in Virus Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.aivir.2015.03.002.
  61. Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W., Campbell T.W., (2012) 'Veterinary Hematology and Clinical Chemistry' Second Edition Wiley-Blackwell.
  62. Vilcek, S. et al. (2005) 'Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope', *Virus Research*, 108(1–2), pp. 187–193. doi: 10.1016/j.virusres.2004.09.010.
  63. Vilček, Š. et al. (2001) 'Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups', *Archives of Virology*, 146(1), pp. 99–115. doi: 10.1007/s007050170194.
  64. Weiland, E. et al. (1990) 'Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer.', *Journal of virology*, 64(8), pp. 3563–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2370675> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC249648>.
  65. Weiss D.J, Wardrop K.J., (2010) 'Veterinary hematology' Sixth Edition Wiley-Blackwell
  66. Xiao, M. et al. (2004) 'Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome', *European Journal of Biochemistry*,

271(19), pp. 3888–3896. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04325.x.

67. Yeşilbağ, K., Alpay, G. and Becher, P. (2017) 'Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus', *Viruses*, 9(6). doi: 10.3390/v9060128.

## ANEXO I

### BASE DE DATOS

#### PRUEBAS BASALES BIOQUÍMICA

Cuadro 9. Pruebas basales bioquímica

IPC	IDENTIFICACIÓN	UREA	CREATININA	ALT	AST	ALBÚMINA
IPC18-0899	1	5	21	30	90	35
IPC18-0900	2	5.5	17	35	95	35
IPC18-0901	3	4.5	17	90	145	35
IPC18-0902	4	2	15	30	130	25
IPC18-0903	5	2.5	60	70	100	35
IPC18-0904	6	7.5	ND	65	70	35
IPC18-0905	7	5	ND	35	50	35
IPC18-0906	8	6.5	ND	35	60	35
IPC18-0907	9	9	ND	30	90	35
IPC18-0908	10	10	ND	50	105	35
IPC18-0909	11	6	ND	35	100	35
IPC18-0910	12	8.5	ND	70	135	30
IPC18-0911	13	5.5	ND	50	65	35
IPC18-0912	14	5.5	ND	120	90	35
IPC18-0913	15	5.5	ND	30	65	35
IPC18-0914	16	4.5	ND	35	90	35
IPC18-0915	17	4.5	ND	40	80	35
IPC18-0916	18	5.5	ND	50	100	35
IPC18-0917	19	5	ND	50	65	35
IPC18-0918	20	8.5	ND	240	145	35
IPC18-0919	21	4.5	ND	50	90	30
IPC18-0920	22	4.5	ND	50	95	35
IPC18-0921	23	4	ND	30	90	35
IPC18-0922	24	5.5	ND	35	65	55
IPC18-0923	25	7	ND	100	210	50
IPC18-0924	26	4	ND	75	230	45
IPC18-0925	27	4	ND	35	150	35
IPC18-0926	28	4	ND	40	215	55
IPC18-0927	29	4	ND	35	125	40
IPC18-0928	30	4.5	ND	50	110	35
IPC18-1049	31	12.5	60	70	150	35
IPC18-1050	32	7	70	45	185	50
IPC18-1051	33	6	50	60	110	35
IPC18-1052	34	5	75	90	85	25
IPC18-1053	35	5.5	85	65	95	50

IPC18-1054	36	5.5	65	65	85	55
IPC18-1055	37	5.5	65	65	150	45
IPC18-1056	38	4	50	65	85	45
IPC18-1057	39	4.5	65	90	160	40
IPC18-1058	40	9	75	135	225	45
IPC18-1059	41	7	55	95	175	35
IPC18-1060	42	5	75	90	200	45
IPC18-1061	43	6	55	70	155	35
IPC18-1062	44	4.5	85	190	225	25
IPC18-1063	45	6.5	75	120	165	35
IPC18-1064	46	5	75	60	90	35
IPC18-1065	47	6.5	85	85	150	30
IPC18-1066	48	4.5	45	70	60	25
IPC18-1067	49	6	30	65	115	35
IPC18-1068	50	6	30	235	230	40
IPC18-1069	51	7	45	85	135	40
IPC18-1070	52	7	90	30	120	45
IPC18-1071	53	3.2	95	80	150	25
IPC18-1072	54	4.5	70	60	85	45
IPC18-1073	55	5.5	55	50	105	35
IPC18-1074	56	4	65	55	120	35
IPC18-1075	57	4.5	35	65	110	35
IPC18-1076	58	5	35	70	125	35
IPC18-1077	59	5.5	25	70	120	35
IPC18-1078	60	7	45	65	110	35
IPC18-1365	61	9	100	60	140	35
IPC18-1366	62	8	85	40	150	35
IPC18-1367	63	5.5	95	125	165	35
IPC18-1368	64	8	65	80	190	35
IPC18-1369	65	7	75	85	105	35
IPC18-1370	66	7	75	40	105	30
IPC18-1371	67	9.5	65	50	120	35
IPC18-1372	68	7	95	50	100	30
IPC18-1373	69	14.5	95	65	135	40
IPC18-1374	70	6	75	40	115	30
IPC18-1375	71	6.5	75	45	100	35
IPC18-1376	72	8	75	35	65	30
IPC18-1377	73	7.5	85	35	105	35
IPC18-1378	74	8.5	95	85	45	30
IPC18-1379	75	7.5	85	120	105	35
IPC18-1380	76	11	85	235	145	35
IPC18-1381	77	10.5	75	35	65	35
IPC18-1382	78	9	75	80	140	35
IPC18-1383	79	8.5	75	55	100	35

IPC18-1384	80	6	60	50	80	35
IPC18-1385	81	4	75	25	65	30
IPC18-1386	82	11	100	50	135	35
IPC18-1387	83	9.5	75	40	105	35
IPC18-1388	84	12.5	100	50	180	35
IPC18-1389	85	10	55	85	90	35

**Cuadro 10.** Pruebas basales de hematología línea roja

**PRUEBAS BASALES HEMATOLOGÍA**

IPC	HEMATOCRITO	HEMOGLOBINA	ERITROCITOS	VGM	CGMH	PLAQUETAS
IPC18-0899	0.53	160	10.1	52	301	368
IPC18-0900	0.52	161	9.5	55	309	325
IPC18-0901	0.48	144	10	48	300	594
IPC18-0902	0.51	154	9.4	54	301	359
IPC18-0903	0.48	143	9.1	53	298	367
IPC18-0904	0.54	163	10	54	302	458
IPC18-0905	0.51	156	9.6	53	306	379
IPC18-0906	0.53	159	9.9	53	300	409
IPC18-0907	0.47	144	8.8	53	306	390
IPC18-0908	0.48	144	9.1	53	300	361
IPC18-0909	0.47	142	8.6	54	302	387
IPC18-0910	0.44	135	8.3	53	307	129
IPC18-0911	0.5	150	9.1	55	300	430
IPC18-0912	0.52	155	9.5	55	298	397
IPC18-0913	0.54	158	10.1	53	292	444
IPC18-0914	0.49	149	9.2	53	304	411
IPC18-0915	0.55	165	10.2	54	300	422
IPC18-0916	0.51	153	9.5	54	300	380
IPC18-0917	0.47	144	8.8	53	306	361
IPC18-0918	0.46	141	8.6	53	306	289
IPC18-0919	0.55	165	10.2	54	300	433
IPC18-0920	0.47	144	8.6	55	306	432
IPC18-0921	0.56	170	10.3	54	303	426
IPC18-0922	0.49	150	9.2	53	306	473
IPC18-0923	0.47	143	8.8	53	304	379
IPC18-0924	0.53	155	9.9	53	293	413
IPC18-0925	0.51	152	9.5	53	298	372
IPC18-0926	0.54	164	10	54	304	384
IPC18-0927	0.49	151	9.2	53	308	418
IPC18-0928	0.5	157	9.3	54	314	527
IPC18-1049	0.37	109	6.9	54	294	SUFICIENTES
IPC18-1050	0.5	150	9.2	54	300	SUFICIENTES

IPC18-1051	0.54	157	9.6	56	291	447
IPC18-1052	0.53	155	9.7	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1053	0.5	146	8.9	56	292	SUFICIENTES
IPC18-1054	0.49	144	8.8	56	294	SUFICIENTES
IPC18-1055	0.49	145	8.9	55	296	SUFICIENTES
IPC18-1056	0.5	149	9.2	54	298	392
IPC18-1057	0.52	152	9.4	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1058	0.52	153	9.5	55	294	SUFICIENTES
IPC18-1059	0.53	151	9.8	54	285	347
IPC18-1060	0.52	158	9.5	55	304	SUFICIENTES
IPC18-1061	0.48	142	9.1	53	296	SUFICIENTES
IPC18-1062	0.38	109	8.8	43	287	SUFICIENTES
IPC18-1063	0.49	143	8.8	56	292	SUFICIENTES
IPC18-1064	0.47	142	8.7	54	302	1140
IPC18-1065	0.49	146	8.9	55	298	SUFICIENTES
IPC18-1066	0.54	154	9.5	57	285	SUFICIENTES
IPC18-1067	0.51	148	9.3	55	290	396
IPC18-1068	0.52	149	9.5	55	286	SUFICIENTES
IPC18-1069	0.51	149	9.2	55	292	545
IPC18-1070	0.46	133	8.5	54	289	SUFICIENTES
IPC18-1071	0.49	145	8.9	55	296	SUFICIENTES
IPC18-1072	0.53	156	9.6	52	294	ADECUADAS
IPC18-1073	0.49	146	8.7	56	298	868
IPC18-1074	0.51	14	9	57	288	384
IPC18-1075	0.53	152	9.4	56	287	400
IPC18-1076	0.55	161	10.1	54	293	SUFICIENTES
IPC18-1077	0.52	151	9.5	55	290	SUFICIENTES
IPC18-1078	0.5	146	9	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1365	0.4	123	7.3	55	307	354
IPC18-1366	0.39	120	7.1	55	308	308
IPC18-1367	0.39	120	7.3	53	308	362
IPC18-1368	0.36	115	6.9	52	319	351
IPC18-1369	0.33	105	6	55	318	352
IPC18-1370	0.4	130	7.5	53	325	371
IPC18-1371	0.36	117	6.7	54	325	419
IPC18-1372	0.37	119	6.9	54	322	363
IPC18-1373	0.44	136	8.4	52	309	453
IPC18-1374	0.45	140	8.3	54	311	540
IPC18-1375	0.44	135	7.9	56	307	414
IPC18-1376	0.43	135	8.2	52	314	446
IPC18-1377	0.42	133	8	52	317	335
IPC18-1378	0.46	138	8.7	53	300	440
IPC18-1379	0.35	110	6.4	55	314	278
IPC18-1380	0.48	149	9.1	53	310	387

IPC18-1381	0.41	132	7.7	54	322	445
IPC18-1382	0.4	123	7.6	53	307	390
IPC18-1383	0.41	130	7.7	53	317	433
IPC18-1384	0.4	124	7.8	51	310	409
IPC18-1385	0.52	154	9.8	53	296	525
IPC18-1386	0.43	134	8.3	52	312	429
IPC18-1387	0.38	119	7.2	53	313	366
IPC18-1388	0.42	132	7.9	53	314	135
IPC18-1389	0.36	113	6.6	54	314	363

**Cuadro 11.** Pruebas basales de hematología línea blanca

LEUCOCITOS	NEUTRÓFILOS	BANDAS	LINFOCITOS	MONOCITOS	EOSINOFILOS	BASOFILOS
7.2	0.5	0	6.7	0	0	0
6.1	0.8	0	5.2	0.1	0	0
6	1.1	0	4.6	0.3	0	0
6	1.3	0	4.4	0.2	0.1	0
5.8	0.3	0	5.4	0.1	0	0
5.7	0.6	0	5	0.1	0	0
6.3	0.9	0	5.1	0.2	0.1	0
8.5	1.1	0	7.2	0.2	0	0
4.7	0.4	0	4.3	0	0	0
4.1	0.7	0	3.2	0.2	0	0
4.2	0.7	0	3.5	0	0	0
2.5	0.2	0	2.3	0	0	0
3.9	0.2	0	3.6	0.1	0	0
5.7	0.7	0	4.9	0.1	0	0
5.2	0.6	0	4.6	0	0	0
4.1	0.6	0	3.5	0	0	0
6.4	0.4	0	6.2	0	0	0
5.4	0.2	0	4.9	0.2	0.1	0
3	0.5	0	2.5	0	0	0
3.5	0.5	0	3	0	0	0
5.4	0.8	0	4.5	0.1	0	0
3.9	0.5	0	3.2	0.2	0	0
5.9	0.7	0	4.9	0.2	0.1	0
5.5	0.7	0	4.8	0	0	0
3.4	0.4	0	3	0	0	0

3.4	0.4	0	3	0	0	0
5.3	0.3	0	4.8	0.2	0	0
5.7	0.7	0	4.9	0.1	0	0
1.7	0.4	0	1.2	0.1	0	0
2.6	0.6	0	1.9	0.1	0	0
7.4	0.3	0	6.9	0.2	0	0
11.9	1.2	0	10.7	0	0	0
5.1	0.7	0	4.3	0.1	0	0
4.1	0.4	0	3.6	0.05	0.1	0
7.1	0.6	0	6.4	0.1	0	0
7.5	1.6	0	5.8	0.1	0	0
7	0.6	0.1	6.1	0.1	0.1	0
4	0.6	0	3.2	0.2	0	0
4.5	0.2	0	4	0.2	0.1	0
5.6	0.5	0	4.9	0.1	0.1	0
6	0.4	0.1	5.5	0	0	0
5.5	0.6	0	4.6	0.2	0.1	0
4.8	0.3	0	4.4	0.1	0	0
7.3	4.2	0	2.3	0.5	0.2	0.1
3.8	0.8	0	2.8	0.1	0.1	0
5.2	1	0	4.1	0.1	0	0
4.9	0.4	0	4.4	0.1	0	0
5.6	0.4	0	5.1	0.1	0	0
5.4	0.7	0	4.7	0	0	0
5.9	0.9	0	4.8	0.1	0.1	0
6.1	0.4	0	5.4	0.2	0	0.1
3.6	0.5	0	3	0.1	0	0
5	0.8	0	3.9	0.2	0.1	0
5.9	0.7	0	4.9	0.3	0	0
4.6	0.5	0	4	0.1	0	0
3.9	0.2	0	3.6	0.1	0	0
4.9	0.6	0.1	4	0.1	0.1	0
6.4	1.3	0	4.9	0.2	0.2	0
6.1	0.9	0	0.2	0	0	0
4.7	0.6	0	0.2	0	0	0
2.6	0.9	0	1.5	0.1	0.1	0
4.9	0.9	0	3.9	0.1	0	0
3.9	0.4	0	3.3	0.2	0	0
4.7	0.9	0	3.3	0.2	0.3	0

4.8	0.9	0	3.4	0.3	0.2	0
4.2	1.1	0	3	0.1	0	0
3.8	1	0	2.7	0.1	0	0
2.5	0.7	0	1.7	0.1	0	0
4.9	1	0	3.6	0.2	0.1	0
4.4	0.8	0	3.5	0.1	0	0
3.9	0.7	0	3.1	0	0.1	0
4.4	1.2	0	3	0.1	0.1	0
6.9	1.7	0	5	0.1	0.1	0
4.3	1.1	0	3	0.1	0.1	0
1.8	0.4	0	1.2	0.1	0.1	0
3.5	0.5	0	2.8	0.1	0.1	0
3	0.9	0	2	0.1	0	0
4.5	0.7	0	3.6	0.1	0.1	0
3.7	0.5	0	3	0.1	0.1	0
2.6	0.9	0	1.4	0.2	0.1	0
5.8	2.7	0	2.9	0.2	0	0
4.6	3.7	0	0.7	0.1	0.1	0
4.1	0.9	0	2.9	0.3	0	0
2.5	0.4	0	1.9	0.1	0.1	0
3.3	0.5	0	2.6	0.1	0.1	0

### BASE DE DATOS DOSIS BAJA

Cuadro 12. Pruebas bioquímicas a dosis baja

IPC	IDENTIFICACIÓN	UREA	CREATININA	ALT	AST	ALBÚMINA
IPC18-1449	1	6	60	40	175	30
IPC18-1450	2	12	75	85	190	35
IPC18-1451	3	5.5	65	50	130	45
IPC18-1452	4	10.5	60	75	160	40
IPC18-1476	5	10.5	35	45	165	40
IPC18-1477	6	13	40	115	415	50
IPC18-1478	7	8.5	30	60	230	40
IPC18-1479	8	7	30	50	150	40
IPC18-2434	9	12	75	380	420	40
IPC18-1464	11	4.5	60	*	160	20
IPC18-1465	12	5	60	*	95	20

1PC18-1439	15	9	60	55	205	40
1PC18-1440	16	9	45	20	165	35
1PC18-1441	17	11	60	45	155	45
1PC18-1442	18	9.5	60	320	450	40
IPC18-1474	19	9	15	60	375	45
IPC18-1475	20	9.5	30	65	190	40
1PC18-1466	21	5.5	45	30	110	20
1PC18-1467	22	5.5	45	*	105	25
1PC18-1468	23	5.5	50	*	105	20
1PC18-1469	24	5.5	60	*	145	20
IPC18-1480	25	10.5	30	110	265	45
IPC18-1481	26	9	35	75	235	40
IPC18-1482	27	10.5	30	95	170	40
IPC18-1483	28	8	20	45	205	30
IPC18-1447	29	4.5	65	25	180	25
IPC18-1448	30	9	60	45	135	35
IP18-1470	35	4.5	45	*	70	20
IP18-1471	36	5.5	60	15	350	25
IP18-1472	37	5.5	40	*	90	25
IP18-1473	38	5	60	*	145	20
IPC18-1456	68	11.5	85	50	235	45
IPC18-1435	78	19	60	80	280	40
IPC18-1436	79	14.5	50	180	530	35
IPC18-1437	80	14.5	75	45	275	35
IPC18-1438	81	12	60	55	380	35
IPC18-1454	82	14	60	100	395	35
IPC18-1455	83	12	80	80	230	35
IPC18-1456	84	13	65	110	270	40

**Cuadro 13.** Pruebas de hematología línea roja a dosis baja

HEMATOCRITO	HEMOGLOBINA	ERITROCITOS	VGM	CGMH	PLAQUETAS
0.63	161	10.8	58	255	suficientes
0.60	158	10.5	57	23	suficientes
0.70	180	11.9	59	257	suficientes
0.64	163	11.3	57	255	suficientes
0.61	166	10.6	57	272	suficientes

0.68	180	11.7	58	265	suficientes
0.61	162	10.5	58	265	suficientes
0.67	178	11.8	57	266	suficientes
0.57	138	11.3	50	242	suficientes
0.59	156	10.4	57	264	suficientes
0.51	134	9.1	56	263	suficientes
0.59	149	9.8	60	252	suficientes
0.47	122	8.9	53	260	538
0.61	156	10.2	60	256	suficientes
0.53	131	9.9	53	247	suficientes
0.59	158	10.1	58	268	suficientes
0.48	129	7.9	61	269	suficientes
0.50	128	10.1	49	256	suficientes
0.64	174	11.5	56	272	suficientes
0.61	168	10.7	57	275	suficientes
0.61	169	10.9	56	277	suficientes
0.65	165	11.2	58	254	suficientes
0.61	162	10.5	58	266	suficientes
0.60	161	10.2	59	268	suficientes
0.64	167	10.9	59	261	suficientes
0.57	144	9.2	62	256	suficientes
0.55	148	9.2	60	269	suficientes
0.69	191	12.6	55	277	suficientes
0.61	166	10.7	57	272	suficientes
0.63	167	10.8	58	265	suficientes
0.64	173	11	58	265	suficientes
0.65	167	11.3	57	257	suficientes
0.60	150	11.1	54	267	suficientes
0.52	140	9.9	52	269	suficientes
0.59	153	10.8	55	259	suficientes
0.71	184	13.3	53	259	suficientes
0.60	157	10.6	57	262	suficientes
0.63	166	11.9	53	263	suficientes

**Cuadro 14.** Pruebas de hematología línea blanca a dosis baja

LEUCOCITOS	NEUTRÓFILOS	BANDAS	LINFOCITOS	MONOCITOS	EOSINOFILOS	BASOFILOS
6.6	2.2	0	4.4	0	0	0

11.4	5.3	0	4.6	1.4	0	0
15.6	6.7	0.2	7.6	1.1	0	0
20.3	7	0	12.8	0.4	0.1	0
4.7	0.8	0	3.8	0.1	0	0
9.5	3.6	0	5.9	0	0	0
13.1	1.7	0	11.4	0	0	0
9.9	2.1	0	7.8	0	0	0
12.2	3.2	0	8.3	0.6	0.1	0
14.2	2.5	0	11.4	0.3	0	0
18.2	7.6	0	8.7	1.5	0.4	0
5.5	0.9	0	4.5	0	0.1	0
50.1	29.5	8	9	3.6	0	0
7.3	0.8	0	6.3	0.2	0	0
8.7	1.2	0	7.2	0.1	0.2	0
9.4	2.3	0	7.1	0	0	0
8	1.3	0	6.6	0.1	0	0
7.9	3.9	0	3.5	0.5	0	0
17.4	2.3	0	15.1	0	0	0
7.2	2.2	0	5	0	0	0
13.5	4.1	0	8.9	0.4	0.1	0
16.4	2.1	0.2	13.3	0.5	0.3	0
9.6	1.7	0.1	7.3	0.5	0	0
13.7	4.5	0	9.2	0	0	0
14.1	2.8	0	11.3	0	0	0
9.6	2.9	0	6.7	0	0	0
14.3	1.8	0	12	0.5	0	0
27.2	7.4	0	19	0.8	0	0
4.8	1.2	0	3.6	0	0	0
9.6	1.8	0	7.7	0.1	0	0
16.7	3.8	0	12.7	0.2	0	0
12.9	3.9	0	8.7	0.3	0	.
5.2	2.3	0	2.5	0.2	0.1	0
6.9	4.6	0	2	0.3	0	0
9.4	5.6	0	3.6	0.2	0	0
0	0	0	0	0	0	0
12.8	7.8	0.4	4	0.6	0	0
8.6	5	0.2	2.8	0.5	0.1	0
13.5	8.4	0.3	4.3	0.4	0.1	0

## BASE DE DATOS DOSIS ALTA

**Cuadro 15.** Pruebas bioquímicas a dosis alta

IPC	IDENTIFICACIÓN	UREA	CREATININA	ALT	AST	ALBÚMINA
IPC18-1049	31	12.5	60	70	150	35
IPC18-1050	32	7	70	45	185	50
IPC18-1051	33	6	50	60	110	35
IPC18-1052	34	5	75	90	85	25
IPC18-1369	65	7	75	85	105	35
IPC18-1370	66	7	75	40	105	30
IPC18-1371	67	9.5	65	50	120	35
IPC18-1373	69	14.5	95	65	135	40
IPC18-1374	70	6	75	40	115	30
IPC18-1375	71	6.5	75	45	100	35
IPC18-1376	72	8	75	35	65	30
IPC18-1377	73	7.5	85	35	105	35
IPC18-1378	74	8.5	95	85	45	30
IPC18-1379	75	7.5	85	120	105	35
IPC18-1380	76	11	85	235	145	35
IPC18-1381	77	10.5	75	35	65	35
IPC18-1057	39	4.5	65	90	160	40
IPC18-1058	40	9	75	135	225	45
IPC18-1059	41	7	55	95	175	35
IPC18-1060	42	5	75	90	200	45
IPC18-1075	57	4.5	35	65	110	35
IPC18-1076	58	5	35	70	125	35
IPC18-1077	59	5.5	25	70	120	35
IPC18-1078	60	7	45	65	110	35
IPC18-1067	49	6	30	65	115	35
IPC18-1068	50	6	30	235	230	40
IPC18-1069	51	7	45	85	135	40
IPC18-1070	52	7	90	30	120	45
IPC18-1071	53	3.2	95	80	150	25
IPC18-1072	54	4.5	70	60	85	45
IPC18-1073	55	5.5	55	50	105	35
IPC18-1074	56	4	65	55	120	35
IPC18-1365	61	9	100	60	140	35
IPC18-1366	62	8	85	40	150	35
IPC18-1367	63	5.5	95	125	165	35

IPC18-1368	64	8	65	80	190	35
IPC18-1061	43	6	55	70	155	35
IPC18-1062	44	4.5	85	190	225	25
IPC18-1063	45	6.5	75	120	165	35
IPC18-1064	46	5	75	60	90	35
IPC18-1065	47	6.5	85	85	150	30

**Cuadro 16.** Pruebas de hematología línea roja a dosis alta

IPC	HEMATOCRITO	HEMOGLOBINA	ERITROCITOS	VGM	CGMH	PLAQUETAS
IPC18-1049	0.37	109	6.9	54	294	SUFICIENTES
IPC18-1050	0.5	150	9.2	54	300	SUFICIENTES
IPC18-1051	0.54	157	9.6	56	291	447
IPC18-1052	0.53	155	9.7	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1369	0.33	105	6	55	318	352
IPC18-1370	0.4	130	7.5	53	325	371
IPC18-1371	0.36	117	6.7	54	325	419
IPC18-1373	0.44	136	8.4	52	309	453
IPC18-1374	0.45	140	8.3	54	311	540
IPC18-1375	0.44	135	7.9	56	307	414
IPC18-1376	0.43	135	8.2	52	314	446
IPC18-1377	0.42	133	8	52	317	335
IPC18-1378	0.46	138	8.7	53	300	440
IPC18-1379	0.35	110	6.4	55	314	278
IPC18-1380	0.48	149	9.1	53	310	387
IPC18-1381	0.41	132	7.7	54	322	445
IPC18-1057	0.52	152	9.4	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1058	0.52	153	9.5	55	294	SUFICIENTES
IPC18-1059	0.53	151	9.8	54	285	347
IPC18-1060	0.52	158	9.5	55	304	SUFICIENTES
IPC18-1075	0.53	152	9.4	56	287	400
IPC18-1076	0.55	161	10.1	54	293	SUFICIENTES
IPC18-1077	0.52	151	9.5	55	290	SUFICIENTES
IPC18-1078	0.5	146	9	55	292	SUFICIENTES
IPC18-1067	0.51	148	9.3	55	290	396
IPC18-1068	0.52	149	9.5	55	286	SUFICIENTES
IPC18-1069	0.51	149	9.2	55	292	545
IPC18-1070	0.46	133	8.5	54	289	SUFICIENTES

IPC18-1071	0.49	145	8.9	55	296	SUFICIENTES
IPC18-1072	0.53	156	9.6	52	294	ADECUADAS
IPC18-1073	0.49	146	8.7	56	298	868
IPC18-1074	0.51	14	9	57	288	384
IPC18-1365	0.4	123	7.3	55	307	354
IPC18-1366	0.39	120	7.1	55	308	308
IPC18-1367	0.39	120	7.3	53	308	362
IPC18-1368	0.36	115	6.9	52	319	351
IPC18-1061	0.48	142	9.1	53	296	SUFICIENTES
IPC18-1062	0.38	109	8.8	43	287	SUFICIENTES
IPC18-1063	0.49	143	8.8	56	292	SUFICIENTES
IPC18-1064	0.47	142	8.7	54	302	1140
IPC18-1065	0.49	146	8.9	55	298	SUFICIENTES

**Cuadro 17.** Pruebas de hematología línea blanca a dosis alta

LEUCOCITOS	NEUTRÓFILOS	BANDAS	LINFOCITOS	MONOCITOS	EOSINOFILOS	BASOFILOS
7.4	0.3	0	6.9	0.2	0	0
11.9	1.2	0	10.7	0	0	0
5.1	0.7	0	4.3	0.1	0	0
4.1	0.4	0	3.6	0.05	0.05	0
4.8	0.9	0	3.4	0.3	0.2	0
4.2	1.1	0	3	0.1	0	0
3.8	1	0	2.7	0.1	0	0
4.9	1	0	3.6	0.2	0.1	0
4.4	0.8	0	3.5	0.1	0	0
3.9	0.7	0	3.1	0	0.1	0
4.4	1.2	0	3	0.1	0.1	0
6.9	1.7	0	5	0.1	0.1	0
4.3	1.1	0	3	0.1	0.1	0
1.8	0.4	0	1.2	0.1	0.1	0
3.5	0.5	0	2.8	0.1	0.1	0
3	0.9	0	2	0.1	0	0
4.5	0.2	0	4	0.2	0.1	0
5.6	0.5	0	4.9	0.1	0.1	0
6	0.4	0.1	5.5	0	0	0
5.5	0.6	0	4.6	0.2	0.1	0
4.9	0.6	0.1	4	0.1	0.1	0

6.4	1.3	0	4.9	0.2	0.2	0
6.1	0.9	0	0.2	0	0	0
4.7	0.6	0	0.2	0	0	0
5.4	0.7	0	4.7	0	0	0
5.9	0.9	0	4.8	0.1	0.1	0
6.1	0.4	0	5.4	0.2	0	0.1
3.6	0.5	0	3	0.1	0	0
5	0.8	0	3.9	0.2	0.1	0
5.9	0.7	0	4.9	0.3	0	0
4.6	0.5	0	4	0.1	0	0
3.9	0.2	0	3.6	0.1	0	0
2.6	0.9	0	1.5	0.1	0.1	0
4.9	0.9	0	3.9	0.1	0	0
3.9	0.4	0	3.3	0.2	0	0
4.7	0.9	0	3.3	0.2	0.3	0
4.8	0.3	0	4.4	0.1	0	0
7.3	4.2	0	2.3	0.5	0.2	0.1
3.8	0.8	0	2.8	0.1	0.1	0
5.2	1	0	4.1	0.1	0	0
4.9	0.4	0	4.4	0.1	0	0

## ANEXO II METODOLOGÍAS

### EXTRACCIÓN

El procedimiento de extracción de ARN se llevó a cabo en un gabinete de seguridad marca NUAIRE, el cual fue desinfectado previamente con etanol al 70% y esterilizado con luz ultravioleta durante 15 min antes de empezar a trabajar.

Todos los materiales que se utilizaron en dicho procedimiento fueron desinfectados con etanol al 70% antes de ser introducidos en el gabinete. Se trabajó con bata y guantes, y se desinfectaron las manos con etanol al 70% antes de manipular los objetos dentro del gabinete de seguridad.

Se descongeló la muestra de tejido, la cual se encontraba a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizó el macerado de la misma a temperatura de refrigeración ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 min. Se añadió 1 mL de solución de Trizol en tubos de microcentrifuga con capacidad de 2 mL y se transfirieron  $<0.5\text{ cm}^3/\text{mL}$  de la muestra en los microtubos con la solución desnaturalizante (Trizol). Se homogeneizó por agitación durante 10 s y se incubó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min; posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se homogeneizó por agitación durante 10 s, se incubó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se centrifugó a 12 000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El sobrenadante (ARN) se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol al 100%, se homogeneizó por agitación durante 10 s, se incubó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se centrifugó a 17 000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. El sobrenadante fue eliminado y los tubos se colocaron en posición invertida para eliminar el excedente de etanol. Se resuspendió el sedimento (ARN) en 40  $\mu\text{L}$  de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) libre de nucleasas. Finalmente, se almacenó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

La cuantificación de ARN se llevó a cabo con el uso del equipo Nanodrop siguiendo las instrucciones del fabricante y las unidades en las que se recuperó la información fueron  $\text{mg}/\mu\text{L}$ .

### ANEXO III CUADROS COMPARATIVOS

**Cuadro 18.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica por las vías OG e IP en dosis baja y alta

UNIDADES	ANALITO	DOSIS BAJA			DOSIS ALTA		
		OG	IP	NEGATIVO	OG	IP	NEGATIVO
L/L	HEMATOCRITO	0.59*	0.64**	0.55	0.59	0.58	0.57
x10 <sup>9</sup> /L	LEUCOCITOS	13.2	12	12.3	12.7	4.1**	12.7
x10 <sup>9</sup> /L	NEUTRÓFILOS	4.8	4.1	3.1	2.2	1.6**	3.8
x10 <sup>9</sup> /L	MONOCITOS	0.4	0.4	0.4	0.3	0.6	0.2
x10 <sup>9</sup> /L	LINFOCITOS	7.4	7.5	8.7	10	4.5**	8.3
mmol/L	UREA	8.8	10.1	7.6	10.2	11	9.9
mmol/L	CREATININA	55	50	52	31	30	27
U/L	ALT	97	70	49	72	57	72
U/L	AST	223	226	222	214	181	174
g/L	ALBÚMINA	30	39*	32	39	37*	32

**Cuadro 19.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica a los días 7 y 15 post infección en dosis baja y alta

UNIDADES	ANALITO	DOSIS BAJA			DOSIS ALTA		
		DÍA 7	DÍA 15	NEGATIVO	DÍA 7	DÍA 15	NEGATIVO
L/L	HEMATOCRITO	0.6	0.63*	0.55	0.58	0.59	0.57
x10 <sup>9</sup> /L	LEUCOCITOS	13	12.2	12.3	9.2	10.2	12.7
x10 <sup>9</sup> /L	NEUTRÓFILOS	6.1	2.9	3.1	1.7*	2.1	3.8
x10 <sup>9</sup> /L	MONOCITOS	0.6	0.2	0.4	0.7	0.2	0.2
x10 <sup>9</sup> /L	LINFOCITOS	5.6*	9.1	8.7	6.8	7.7	8.3
mmol/L	UREA	11.4**	7.5	7.6	11.9	8.9	9.9
mmol/L	CREATININA	64*	41	52	35	27	27
U/L	ALT	87	64	50	79	51	72
U/L	AST	264	185	222	227*	169	174
g/L	ALBÚMINA	38	31	32	38	38	32

**Cuadro 20.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica de los infectados y centinela en dosis baja y alta

UNIDADES	ANALITO	DOSIS BAJA			DOSIS ALTA		
		INFECTADOS	CENTINELA	NEGATIVO	INFECTADOS	CENTINELA	NEGATIVO
L/L	HEMATOCRITO	0.61	0.6	0.55	0.59	0.58	0.57
x10 <sup>9</sup> /L	LEUCOCITOS	9.3	15.2	12	9.9	9.5	12.7
x10 <sup>9</sup> /L	NEUTRÓFILOS	3.3	4.9	3.1	2.1	1.7	3.8
x10 <sup>9</sup> /L	MONOCITOS	0.3	0.5	0.4	0.6	0.3	0.2
x10 <sup>9</sup> /L	LINFOCITOS	5.6**	9.3	8.7	6.9	7.4	8.3
mmol/L	UREA	10.3	8.5	7.6	10.1	10.7	9.9
mmol/L	CREATININA	54	50	52	31	30	27
U/L	ALT	75	91	49	57	72	72
U/L	AST	221	227	222	184	211	174
g/L	ALBÚMINA	35	33	32	37	39	32

**Cuadro 21.** Cuadro comparativo de hematología y bioquímica clínica basal y post infección en dosis baja y alta

UNIDADES	ANALITO	DOSIS BAJA			DOSIS ALTA		
		BASAL	PI	NEGATIVO	BASAL	PI	NEGATIVO
L/L	HEMATOCRITO	0.49**	0.6*	0.55	0.47**	0.58	0.57
x10 <sup>9</sup> /L	LEUCOCITOS	5**	12	12	5.1**	9.7	12.7
x10 <sup>9</sup> /L	NEUTRÓFILOS	0.8**	4.3*	3.1	0.7**	1.9*	3.8
x10 <sup>9</sup> /L	MONOCITOS	0.1	0.4	0.4	0.1	0.5	0.2
x10 <sup>9</sup> /L	LINFOCITOS	4.2**	7.2	8.7	3.9**	7.1	8.3
mmol/L	UREA	5.8**	9.5*	7.6	7.0*	10.3	9.9
mmol/L	CREATININA	62	52	52	66**	31	27
U/L	ALT	51*	78*	49	77	64	72
U/L	AST	111**	224*	222	126*	197	174
g/L	ALBÚMINA	38	35	32	36	38*	32