



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**PARTICIPACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LA SECRECIÓN DE IL-1 β Y LA
REPLICACIÓN VIRAL DE VDV B CITOPÁTICO Y NO CITOPÁTICO DURANTE LA
INFECCIÓN EN MACRÓFAGOS BOVINOS.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

CLAUDIA PATRICIA GALLEGOS RODARTE

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ALEJANDRO BENÍTEZ GUZMÁN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

COMITÉ TUTOR

**DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DRA. LOURDES ARRIAGA PIZANO
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XX1**

Ciudad Universitaria, Cd. MX.

Julio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi mamá y hermana, por todo el apoyo brindado.

A mi abue y papá, que siempre están en mi memoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas para realizar mis estudios de posgrado. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme crecimiento en mi formación académica.

Al proyecto PAPIIT IN215718 y PAPIIT IN214121, por el financiamiento para que este proyecto pudiera llevarse a cabo. A CONACyT por la beca proporcionada durante mi maestría.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán por todo su apoyo, enseñanzas, paciencia y compromiso que me brindo durante mi estancia en la maestría.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y a la Dra. Lourdes Arriaga Pizano, por su apoyo para llevar a cabo el proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Claudia Gonzáles Espinosa, Dr. Salvador Fonseca Coronado y Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por la aportación de sus comentarios, que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi mamá y mi hermana por su amor y cariño incondicional.

A Tatiana, por siempre estar ahí para apoyarme e impulsarme a salir adelante.

A mis amigos de laboratorio: Miros, Omar E. C., Monsi, Itzel, Hectorin, Brendita, Omar H., Erika, por su compañía y apoyo incondicional.

RESUMEN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina es un virus de distribución mundial que afecta económicamente a las producciones ganaderas. El virus muestra un tropismo por células presentadoras de antígeno, siendo los macrófagos susceptibles a la infección y en los cuales, se han observado alteración en la secreción de diversas citocinas. Entre ellas, la interleucina (IL)-1 β es una citocina de gran importancia para desencadenar una respuesta inmune eficiente. La secreción de la citocina madura necesita de la participación de complejos multiproteicos conocidos como inflamomas, que generan la activación de caspasa 1. Previamente se reportó la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1 durante la infección con VDVB biotipo citopático en macrófagos bovinos y se observó una relación entre la replicación del virus y caspasa 1. Debido a lo anterior, en este estudio analizamos la participación del inflamoma NLRP3 en la secreción de IL-1 β durante la infección con VDVB citopático y no citopático. Los resultados mostraron que, para el caso del biotipo citopático, la secreción de IL-1 β fue dependiente de NLRP3, y, además, detectamos un efecto en la replicación viral, al observar una disminución en el título viral de los sobrenadantes obtenidos de macrófagos bovinos tratados con CRID3. Por otro lado, para el caso del biotipo no citopático no se encontró la participación de NLRP3, pero sí se observó por primera vez la participación de caspasa 1 para la secreción de IL-1 β durante la infección en macrófagos bovinos. Nuestros datos permiten concluir que la secreción de IL-1 β en macrófagos bovinos infectados con el VDVB biotipo citopático es dependiente de la activación del inflamoma NLRP3 y a su vez, esta activación se encuentra relacionada con la replicación viral. En el caso de los macrófagos infectados con VDVB biotipo no citopático son los primeros en probar la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1 con esta infección.

Palabras clave: Diarrea Viral Bovina, VDVB, inflamoma, caspasa 1, IL-1 β , macrófagos.

ABSTRACT

The Bovine Viral Diarrhea Virus is a virus with worldwide distribution that economically affects livestock production. The virus shows a tropism for antigen-presenting cells, with macrophages being susceptible to infection and in which alterations in the secretion of various cytokines have been observed. Among them, interleukin (IL)-1 β is a cytokine of great importance to trigger an efficient immune response. The secretion of the mature cytokine requires the participation of multiprotein complexes known as inflammasomes, which generate the activation of caspase 1. Previously, the secretion of IL-1 β dependent on caspase 1 was reported during infection with BVDV cytopathic biotype in bovine macrophages and observed a relationship between virus replication and caspase 1. Due to the above, in this study we analyzed the participation of the NLRP3 inflammasome in IL-1 β secretion during infection with cytopathic and non-cytopathic BVDV. The results showed that, in the case of the cytopathic biotype, the secretion of IL-1 β was dependent on NLRP3, and, in addition, we detected an effect on viral replication, by observing a decrease in the viral titer of the supernatants obtained from bovine macrophages. treated with CRID3. On the other hand, in the case of the noncytopathic biotype, the participation of NLRP3 was not found, but the participation of caspase 1 for the secretion of IL-1 β during infection in bovine macrophages was observed for the first time. Our data allow us to conclude that the secretion of IL-1 β in bovine macrophages infected with the BVDV cytopathic biotype is dependent on the activation of the NLRP3 inflammasome and, in turn, this activation is related to viral replication. In the case of BVDV-infected macrophages of the non-cytopathic biotype, they are the first to show caspase 1-dependent secretion of IL-1 β .

Key words: Bovine Viral Diarrhea, BVDV, inflammasome, caspase 1, IL-1 β , macrophages.

CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE BVDV	- 2 -
1.1.1 EXTREMO 5' UTR.....	- 3 -
1.1.2 EXTREMO 3'UTR	- 3 -
1.1.3 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES.....	- 4 -
1.1.4 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES.....	- 5 -
1.2 REPLICACION VIRAL	- 7 -
1.3 VDVB Y SU INTERACCIÓN CON LA RESPUESTA INMUNE	- 8 -
1.4 INFLAMASOMA NLRP3 Y SECRECIÓN DE IL-1 β	- 11 -
1.4.1 INFLAMASOMA NLRP3 E IL-1 β DURANTE INFECCIONES VIRALES	- 14 -
2. JUSTIFICACIÓN	- 16 -
3. OBJETIVOS.....	- 17 -
4. HIPÓTESIS	- 17 -
5. MATERIALES Y MÉTODOS	- 17 -
6. RESULTADOS	- 20 -
6.1 OBTENCION DEL LOTE VIRAL	- 20 -
6.2 TITULACIÓN VIRAL.....	- 21 -
6.3. CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1 β EN MACRÓFAGOS BOVINOS. -	23
-	
6.4. EFECTO DEL INHIBIDOR CRID3 SOBRE LA REPLICACION VIRAL	- 27 -
7. DISCUSIÓN	- 31 -
8. CONCLUSIONES	- 35 -
9. PERSPECTIVAS.....	- 36 -
10. REFERENCIAS.....	- 38 -
ANEXO 1	- 50 -

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Fig 1. Organización del genoma de BVDV.	3
Fig 2. Activación y ensamblaje de los inflamomas.	13
Fig 3. Señales de activación del inflamoma NLRP3.	14
Fig 4. RT-PCR de la porción 5'UTR de BVDV en la línea celular MDBK.	21
Fig 5. Fotografía de un cultivo de células MDBK.	21
Fig 6. RT-PCR de la porción 5'UTR de BVDV en la línea celular BT.	22
Fig 7. Ensayo de unidades formadoras de foco fluorescente (UFF) con diluciones décuples seriadas.	23
Fig 8. Secreción de IL-1 β en macrófagos bovinos infectados con BVDV citopático (NADL) y no citopático (NY).	24
Fig 9. Secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1.	25
Fig 10. Secreción de IL-1 β dependiente de NLRP3.	27
Fig 11. Efecto del inhibidor CRID3 sobre la replicación viral en BVDV biotipo citopático NADL.	28
Fig 12. Título viral DICCC 50% de los sobrenadantes del ensayo de infección con macrófagos bovinos infectados con BVDV citopático cepa NADL.	29
Fig 13. Efecto del inhibidor CRID3 sobre la replicación viral en BVDV biotipo no citopático NY.	30
Fig 14. Esquema propuesto de la actividad del inflamoma NLRP3 en la secreción de IL-1 β durante la infección con BVDVc NADL y BVDVncp NY-1 en macrófagos bovinos.	31

ABREVIATURAS

ASC	Proteína tipo punto asociada a apoptosis
AP-1	Proteína activadora 1
BVDV-1	Virus de diarrea viral bovina genotipo 1
BVDV-2	Virus de diarrea virla bovina genotipo 2
BDV	Virus de la enfermedad de las fronteras
CRID3	Fármaco inhibidor de la liberación de citocinas 3
CSFV	Virus de fiebre porcina clásica
CXCR4	Receptor de quimiocinas c-x-c de tipo 4
DAMP's	Patrones moleculares asociados a daño
DDIT3	Transcrito inducible por daño en el DNA 3
DICC 50%	Dosis infectiva cultivo celular 50%
eIF2	Factor de inicio eucariota 2
eIF3	Factor de inicio eucariota 3
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosín trifosfato
IFN-1	Interferón de tipo 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
IRF-3	Factor regulador de interferón 3
IKK2	Inhibidor kappa B cinasa 2

IRAK	Cinasas asociadas al receptor de IL-1
ISG's	Genes estimulados por interferón
LPS	Lipopolisacarido
MDBK	Linea celular riñón de bovino Madin-Darby
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MYD88	Respuesta primaria de diferenciación mieloide
MOI	Multiplicidad de infección
NIK	Cinasa inductora de NFκB
NIBP	Proteína de unión a NIK e IKK2
NLRP3	Receptor tipo Nod con dominio de pirina 3
PAMP's	Patrones moleculares asociados a patógenos
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
TLR	Receptores tipo toll
TCR	Receptor de linfocitos T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
UTR	Región no traducible
VRSB	Virus Respiratorio Sincitial Bovino
Y-VAD	N-acetil-tirosil-valil-alanil-aspartil clorometil ketona
Z-VAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por el virus de la diarrea viral bovina (BVDV, por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en 1940 en Canadá, donde se presentaron animales con signología como pirexia, diarrea, deshidratación, tenesmo, taquicardia, taquipnea, anorexia, descarga nasal, hipersalivación y úlceras en la mucosa de la cavidad oral. Originalmente la enfermedad fue llamada “enfermedad X” hasta que se describió su agente etiológico, el cual fue nombrado virus de la diarrea viral bovina y fue relacionado con el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) y con el virus de la enfermedad de las fronteras (BDV) (Goens, 2002). Actualmente, esta enfermedad se encuentra diseminada a nivel mundial, afectando principalmente al ganado bovino, sin embargo, también puede afectar a borregos, cerdos, alpacas, venados cola blanca y cabras (Brodersen, 2014).

El padecimiento tiene un impacto económico significativo debido a sus diferentes manifestaciones en el aparato reproductor, digestivo y respiratorio. Dependiendo del tercio de la gestación en que la hembra gestante sea infectada, se presentarán diversas signologías; si la hembra gestante es infectada en el primer tercio de la gestación con un biotipo no citopático dará lugar a animales persistentemente infectados (PI), los cuales presentan inmunotolerancia al virus, y son los animales que lo excretan en mayores cantidades, siendo éstos la principal fuente de diseminación; si estos animales PI se reinfectan con el biotipo citopático presentarán la enfermedad de las mucosas, la cual se caracteriza principalmente por la presencia de úlceras en todo el tracto digestivo y es letal en los bovinos. Si la hembra gestante se infecta después del primer tercio de la gestación se podrían presentar abortos y efectos teratogénicos en el feto (Lanyon et al., 2014). Asimismo, puede causar inmunosupresión permitiendo la entrada de otros agentes patógenos como aquellos relacionados con el complejo respiratorio bovino (Ridpath, 2010).

En el estudio realizado por Houe 2003, en el cual se reportaron pérdidas económicas ocasionadas por el virus desde \$2655 dólares hasta \$6351 dólares por hato y de \$40 a \$95 dólares por vaca, también se menciona que estas pérdidas incrementan significativamente cuando se relaciona con infecciones secundarias. Richter *et al.*, 2017, realizaron una búsqueda literaria sobre estudios que notificaron las pérdidas

monetarias ocasionadas por la infección incluyendo a quince países dentro de su estudio y en el cual se reportan pérdidas directas por BVDV de 2.40 dólares hasta 687.805 dólares por animal, estas pérdidas son ocasionadas principalmente por la disminución en la tasa de concepción, muerte embrionaria temprana, abortos, aumento en la mortalidad y morbilidad subsecuente a la inmunosupresión y disminución en la producción láctea.

En México, diversos estudios han reportado la seroprevalencia del virus en distintas regiones del país, Suzan *et al.*, 1983, reportaron en su estudio seroprevalencias del 63%-71% en 11 regiones del país. Rosete *et al.*, 2018, reportaron seroprevalencias para BVDV en Puebla (31.1%), Tabasco (54.6%), y Veracruz (76%). En Yucatán Solis *et al.*, 2005, reportaron una seroprevalencia del 14% en el ganado.

El comité internacional de taxonomía de virus reconoce cuatro especies de *Pestivirus*: BVDV-1, BVDV-2, CSFV y BDV, los cuales pertenecen a la familia *Flaviviridae* (Knipe *et al.*, 2013). En cuanto a los genotipos presentes en el país, Gómez *et al.*, 2017 reportaron la presencia en seis regiones del país de dos genotipos de BVDV que han sido reconocidos a nivel mundial, de las muestras procesadas en su estudio el genotipo 1 resultó ser más predominante que el genotipo 2.

Además de los genotipos mencionados, el BVDV presenta dos biotipos dependiendo de las lesiones que produce en cultivos *in vitro*: el biotipo citopático (cp) causa apoptosis celular y el biotipo no citopático (ncp) no presenta efectos aparentes (Iqbal *et al.*, 2000), por lo tanto, para cada uno de los genotipos existen cepas con biotipo cp y ncp.

1.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE BVDV

El BVDV es un virus de RNA de sentido positivo de una sola cadena que posee un solo marco abierto de lectura (ORF) flanqueado por dos regiones no codificantes o no traducibles (NCR o UTR) 5' y 3'. La región 5' UTR es la más conservada dentro de la familia *Flaviviridae* y en ella se basa la clasificación de los genotipos; el marco abierto de lectura codifica para una poliproteína de 4000 aminoácidos y tiene una longitud de 12.5Kb. Las proteínas codificadas se dividen en cuatro proteínas estructurales (C, Erns, E1 y E2) y en siete u ocho proteínas no estructurales (Npro, P7, NS2/NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Ridpath, 2005; Goens, 2002; Nagai *et al.*, 2004). La partícula viral posee envoltura y un tamaño de 40-60nm (Tautz *et al.*, 2015).

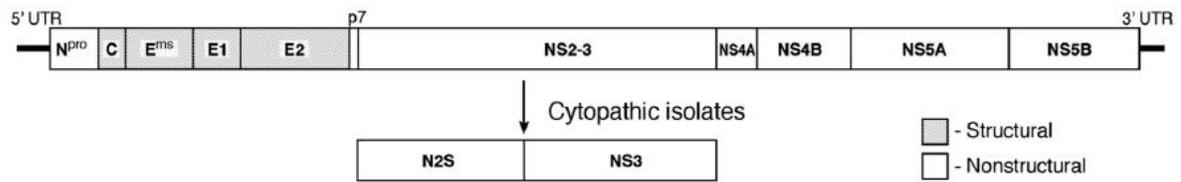


Figura 1. Organización del genoma de BVDV (Ridpath 2005).

1.1.1 EXTREMO 5' UTR

Los *Pestivirus* poseen una región no traducible 5' en forma de bucle que es utilizada para llevar a cabo su traducción en los ribosomas a través del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (Tautz *et al.*, 2015). Estas estructuras también se han descrito en el virus de hepatitis C con similitudes en el dominio II, IIIa, IIIc y IIIe (Fletcher *et al.*, 2002). Por lo que son de gran importancia para la replicación, genotipificación y virulencia (Deng *et al.*, 1993). El sitio de inicio se encuentra corriente abajo de un pseudonudo, establecido entre las secuencias AUG y un bucle del dominio III. El pseudonudo ayuda a posicionar el codón de inicio AUG en el sitio P del ribosoma. Para el inicio de la traducción participan dos componentes: el factor de inicio eucariota 3 (eIF3) y un complejo compuesto de eIF2, GTP, el iniciador tRNA Met y la subunidad 40S ribosomal (Tautz *et al.*, 2015).

1.1.2 EXTREMO 3'UTR

Es la primera región en contacto con la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). Posee la capacidad de plegarse en tres estructuras tipo bucle conocidas como SLI que se encuentra cerca de la región terminal 3', SLII se encuentra en la mitad y SLIII es la región que sigue después del codón de paro. Es de 188-273 nucleótidos de largo y se une a proteínas de unión a RNA (RBP) para regular la expresión génica a través del reclutamiento de proteínas efectoras. (Mayr 2017; Tautz *et al.*, 2015; Vilcek *et al.*, 1999)

1.1.3 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

1.1.3.1 PROTEÍNA C (CÁPSIDE)

La proteína C forma la nucleocápside del virión y se sugiere que posee una secuencia señal interna involucrada en la translocación de las glicoproteínas al retículo endoplásmico (Ridpath *et al.*, 2005). En todos los miembros de la familia *Flaviviridae* es una proteína pequeña rica en aminoácidos básicos y se encuentra cerca del extremo N terminal de la poliproteína. Está ubicada entre la proteína no estructural Npro y entre la glicoproteína estructural Erns, Npro por su actividad autoproteolítica genera el extremo N terminal de la proteína core (Heimann *et al.*, 2006).

1.1.3.2 Erns

Esta proteína es la primera glicoproteína de envoltura, la cual solo se encuentra en el género *Pestivirus* sin homología con los géneros cercanos. Forma homodímeros estabilizados por puentes disulfuro y se encuentra en conjunto con las proteínas E1 y E2. Erns tiene un peso molecular de 42-48 kDa y se encuentra altamente glicosilada, contiene una hélice anfipática que permite su unión a la membrana, posee una actividad RNasa, la cual degrada parte del dsRNA viral en endosomas (para no ser reconocido por los TLR), con lo cual disminuye la inducción de IFN tipo I (Hilton *et al.*, 2006; Aberle *et al.*, 2014; Tautz *et al.*, 2015).

1.1.3.3 E1

Después de la proteína Erns, se escinde la proteína E1 por medio de una señal peptidasa del hospedero. Interactúa transitoriamente con calnexina para formar complejos por enlaces disulfuro con E2 formando heterodímeros, ambas proteínas son necesarias para la unión y entrada del virus a la célula. E1 tiene un peso molecular de 25-33 kDa con un dominio transmembrana al igual que E2 y posee varios residuos cisteína conservados entre los *Pestivirus* (Wang *et al.*, 2015; Tautz *et al.*, 2015).

1.1.3.4 E2

Al igual que Erns y E1, E2 es una glicoproteína (peso molecular 53-55 kDa) ubicada en la envoltura que puede formar homodímeros (E2-E2) o heterodímeros (E2-E1). Posee cuatro dominios: DA, DB, DC y DD que se encuentran de manera lineal desde el

extremo N al extremo C; los dominios DA y DB se encuentran distantes a la membrana viral por lo que se encuentran en la superficie del virus, E2 es una proteína inmunodominante por lo que se ha utilizado para el desarrollo de vacunas contra BVDV (El Omari *et al.*, 2013). Es una proteína esencial para que el virus pueda interactuar con su receptor CD46 y LDL-r (receptor de lipoproteínas de baja densidad), así mismo ha sido reportado por Ostachuck 2016 la capacidad de E2 para inhibir la lisis celular y fragmentación del DNA mediada por el complemento actuando como un regulador del complemento.

1.1.4 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

1.1.4.1 Npro

Es la primera proteína en ser codificada por los *Pestivirus* sin tener una contraparte en los *Flavivirus* o en el Virus de Hepatitis C (HCV), posee una actividad de autoproteasa de cisteína, con la cual escinde el enlace entre Cys 168 y Ser 169 de la poliproteína viral, dando como resultado una proteína de 168 aminoácidos de longitud. Varios autores han reportado su actividad para degradar IRF3 induciendo su ubiquitinación y degradación dependiente de proteosoma, suprimiendo así la activación transcripcional para IFN α/β (Gottipati *et al.*, 2016; Hilton *et al.*, 2006; Szymanski *et al.*, 2009; Gottipati *et al.*, 2014).

1.1.4.2 P7

Es una proteína con peso molecular de 6 a 7 kDa que contiene principalmente aminoácidos hidrofóbicos. Se ha observado que los perfiles de hidrofobicidad se conservan en diferentes *Pestivirus*. En el caso del virus de hepatitis C (HCV) se ha estudiado su actividad como viroporina y se ha propuesto a la proteína p7 de los *Pestivirus* como modelo para estudiar su actividad (Haranda *et al.*, 2000; Largo *et al.*, 2014), las viroporinas tienen un dominio hidrofóbico transmembranal que interactúa y expande la bicapa lipídica, la oligomerización de las viroporinas puede formar poros hidrofílicos en la membrana de la célula infectada afectando la permeabilidad para iones y moléculas pequeñas (Gonzales & Carrasco 2003).

1.1.4.3 NS2/3

NS2 (peso molecular 54kDa) es una proteína hidrofóbica que contiene dos péptidos de señal para ser translocada al retículo endoplásmico (Neill *et al.*, 2013; Agapov *et al.*, 2004). El biotipo no citopático de BVDV se caracteriza por la síntesis de la proteína NS2/3 (peso molecular 125 kDa), esta proteína puede ser escindida por una autoproteasa de cisteína ubicada en la proteína NS2 (evento similar a la escisión de la proteína NS2/3 en los *Hepacivirus*), dando lugar a NS3 la cual se encuentra escindida en el biotipo citopático (Lackner *et al.*, 2005; Klemens *et al.*, 2015; Vilcek *et al.*, 2000). Lackner *et al.*, 2004 reportaron en su estudio la presencia de la proteína NS2/3 escindida en las primeras horas de infección en el biotipo ncp, sin embargo, esta escisión disminuye, predominando la proteína NS2/3 relacionada con la capacidad del biotipo no citopático de generar infecciones persistentes, así mismo, menciona la importancia de la proteína chaperona celular Jiv para formar un complejo con NS2 y ser escindida de NS3.

1.1.4.4 NS3

Es una proteína con actividad proteasa, NTPasa/ RNA helicasa de 80 kDa que posee una alta inmunogenicidad, sus funciones se expresan en dos dominios: en el tercio N-terminal con el dominio serina proteasa y el dominio helicasa en la región C-terminal. La proteína NS4A funciona como cofactor para NS3 interactuando con el extremo N-terminal de NS3 (Deregt *et al.*, 2005; Tautz *et al.*, 2000; Warrener & Collett 1995; Gu *et al.*, 2000; Grassmann *et al.*, 1999). En el estudio realizado por St-Louis *et al.*, 2005 se reportó la relación de la proteína NS3 (clonada en un vector adenoviral) con caspasa 8 y 9 para inducir apoptosis y con ello causar un efecto citopático en las células, fragmentación de DNA y la escisión del sustrato celular PARP.

1.1.4.5 NS4A

Es una proteína hidrofóbica de 10kDa que interactúa en la región N-terminal de NS3 para actuar como cofactor para su actividad serina proteasa y también se le ha atribuido un rol importante en la morfogénesis del virión (Tautz *et al.*, 2015; Neil 2013).

1.1.4.6 NS4B

Es una proteína integral de membrana de aproximadamente 38 kDa hidrofóbica, con topología similar a la proteína NS4B de HCV, en los resultados obtenidos por

Weiskircher *et al.*, 2009 reportan la interacción de la proteína con compartimentos de Golgi y mitocondria, la inducción en la remodelación de la membrana del hospedero y la colocalización con la proteína NS5A y NS5B sugiriendo que pudiera estar implicada en complejos de replicación para BVDV. Suda *et al.*, 2019 reporta la inducción de autofagia en células de riñón de bovino por la proteína NS4B para estimular la replicación viral de BVDV.

1.1.4.7 NS5A

Es una fosfoproteína hidrofóbica de 56 a 58 kDa la cual posee muchas similitudes con la proteína NS5A de HCV presenta también un sitio de unión a zinc que puede ser necesaria para la replicación viral, como se observa en el estudio realizado por Tellinguisen *et al.*, 2006, ambas proteínas son fosforiladas por serina/treonina cinasas similares. En el estudio realizado por Zahoor *et al.*, 2010 se reportó la interacción de la región N-terminal de la proteína con la proteína celular NIBP la cual estimula la activación de NF κ B inducida por TNF- α a través de interacciones con NIK e IKK β , observando así un efecto inhibitorio de la proteína NS5A en la actividad de NF κ B similar al efecto ocasionado por la proteína NS5A de HCV.

1.1.4.8 NS5B

Está localizada en la región carboxilo terminal de la poliproteína (peso molecular de 77 kDa), se encuentra altamente conservada en los *Pestivirus* y posee actividad RNA polimerasa- dependiente de RNA, por lo que también se ha considerado como blanco para el desarrollo de fármacos antivirales (Duan *et al.*, 2020; Zhong *et al.*, 1998; Tautz *et al.*, 2015).

1.2 REPLICACION VIRAL

Para iniciar la internalización del virión a la célula, éste interactúa con receptores celulares como el receptor CD46 y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-r) (Krey *et al.*, 2006, Krey *et al.*, 2006). El virión posee glicoproteínas en su envoltura como Erns, E1 y E2 que forman heterodímeros y homodímeros para interactuar con los receptores. La internalización del virión es por medio de endocitosis dependiente de clatrina y necesita de la disminución de pH para llevar a cabo los cambios

conformacionales en su envoltura (Grummer *et al.*, 2004). Una vez que es liberado su material genético, este es traducido por IRES (Sitio Interno de Entrada al Ribosoma) en la región 5'UTR que se une a la subunidad 40S del ribosoma. Las proteínas no estructurales sintetizadas formarán un complejo de replicación con el cual se realizará la síntesis de RNA de sentido negativo complementario para la formación de RNA de sentido positivo necesaria para el virión (Pestova *et al.*, 1999; Ridpath, 2005). Posteriormente, el plegamiento y glicosilación de las proteínas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico lo que genera estrés y activación de la caspasa 12 (en el caso del biotipo citopático). Después, las partículas virales son transportadas a través de la vía secretoria para llegar al aparato de Golgi, donde también se realiza el procesamiento de la glicoproteína de envoltura E2 y, una vez madurado el virión, es liberado por medio de exocitosis (Jordan *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2008; Grummer *et al.*, 2001).

1.3 VDVB Y SU INTERACCIÓN CON LA RESPUESTA INMUNE

BVDV muestra tropismo por células del sistema inmune, siendo el tejido linfoide un sitio de replicación en el cual infecta a células como granulocitos, células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos, ocasionando linfopenia, leucopenia, trombocitopenia y consecuentemente inmunosupresión en los individuos infectados (Lanyon *et al.*, 2014, Jensen *et al.*, 1991). La interacción del virus con células de la respuesta inmune puede desencadenar alteraciones en la secreción de citocinas y a su vez la modulación de factores implicados en la respuesta inmune. Los macrófagos, por ser células presentadoras de antígeno, son importantes para montar una respuesta inmune eficiente. Entre sus principales funciones está la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8, que van a ser secretadas al activarse los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se encargan de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP's). Entre los PRR, se encuentran los receptores tipo toll (TLR) los receptores tipo (NOD) y los receptores tipo (RIG), que van a detectar el reconocimiento de componentes conservados entre los patógenos y una vez activados por unión a su ligando desencadenan una cascada de señalización para estimular la transcripción génica de factores implicados en la respuesta inmune (Abbas *et al.*, 2015).

Diversos estudios sobre la infección de macrófagos por BVDV han reportado la disminución del anión superóxido y disminución en la producción de TNF- α en respuesta a lipopolisacárido (LPS) (Chase *et al.*, 2004). En células mononucleares de sangre periférica Peterhans *et al.*, 2003, han reportado una disminución de la proliferación de linfocitos, un incremento en la producción de prostaglandina E, disminución de quimiocinas e inhibición de la formación de leucotrienos. Lee *et al.*, 2008, reportaron en monocitos de bovino infectados por BVDV biotipo citopático y no citopático un aumento en la expresión del gen que codifica el TLR 3 durante la infección temprana, siendo reemplazada por el aumento en la expresión del gen que codifica el TLR7 a las 24 horas. En cuanto al biotipo citopático, se observó la expresión de genes de IFN α y β durante la infección y el aumento en la expresión génica de TNF α . En cambio, con el biotipo no citopático no se reportó la expresión génica para tales citocinas; en el caso de la IL-1 β e IL-6 su expresión génica se vió disminuida a las 24 horas post infección con ambos biotipos. En cambio, Schaut *et al.*, 2016 observaron una sobreexpresión génica de IL-1 β , IL-6, IL12P40 en macrófagos inoculados con el biotipo citopático, indicando una posible inducción de citocinas proinflamatorias con el biotipo citopático en comparación con el no citopático. También se sabe que los macrófagos tienen una mayor susceptibilidad durante la infección, obserándose una mayor replicación viral, así como alteración en su capacidad para estimular linfocitos T CD4, en comparación con las células dendríticas (Glew *et al.*, 2003).

En el estudio realizado por Alkheraif *et al.*, 2017 se observó la capacidad que tiene BVDVncp tipo 2 para inhibir la inducción de IFN-1, efecto que se contrarrestó cuando se mutó la proteína Npro en la región amino terminal, sugiriendo su papel durante la degradación del factor regulador de interferón tipo 3 (IRF-3) que ha sido reportado anteriormente en BVDV tipo 1. Otro efecto que también fue reportado en este estudio fue el aumento en la replicación del Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) durante la coinfección con BVDVncp tipo 2, lo cual se relacionó con la capacidad de ambos virus para inhibir la producción de IFN-1.

Se ha observado que los mecanismos celulares pueden ser modulados de diversas maneras dependiendo de la variedad del virus, como es el caso con BVDVncp tipo 2 de baja y alta virulencia. En el estudio realizado por Bendfeldt *et al.*, 2007, se comparó el mecanismo de inducción de muerte celular en células linfoides (BL3) con BVDV tipo 2 citopático y no citopático de baja y alta virulencia. Ese estudio mostró que BVDVncp de

alta virulencia tiene la capacidad de inducir la muerte celular con la activación de caspasas, así como alteración en el potencial de membrana mitocondrial a partir de los 4-5 días post infección.

En otro estudio (Schaut *et al.*, 2016) se reportó una mayor expresión génica de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-8 con BVDVncp tipo 2 de alta virulencia en comparación con el de baja virulencia. En cuanto a la secreción de citocinas, sólo con la cepa citopática se observó la secreción de citocinas IL-1 β y TNF α y un aumento significativo de IL-6 en comparación de las cepas no citopáticas. También se reportó una disminución significativa de TNF α 48 horas post-infección al utilizar análogos de receptores TLR 2/1, TLR 4, TLR 3 y TLR 8 menos con el TLR-7, siendo un resultado similar al obtenido por Adler *et al.*, 1996, que reportó una disminución significativa de TNF α al infectar macrófagos derivados de sangre periférica con BVDVc y ncp y enfrentarlos con *Salmonella dublin*.

Una característica que ha sido reportada en varios estudios durante la infección con BVDV es su capacidad para generar inmunosupresión. Con el biotipo no citopático, si la infección se presenta en una hembra gestante durante el primer tercio de gestación dará lugar a un animal persistentemente infectado el cual es inmunotolerante al virus. Dos proteínas que se han caracterizado para inhibir la inducción de IFN tipo 1 es Npro y Erns. Por otro lado, también se ha reportado la disminución de CXCR4, TCR y de células CD8⁺ en la sangre materna, y en el caso de las infecciones *in vitro* en monocitos con el biotipo citopático, se ha observado la disminución de proteínas relacionadas con endocitosis y procesamiento de antígeno, así como de MHC (Kelling y Topliff, 2013). Durante la infección con BVDV biotipo citopático se ha observado un aumento en la expresión génica de DDIT3, la cual se ha relacionado con el aumento de la proteína deubiquitinasa OTUD1 y con la E3 ligasa Smurf1, que induce la ubiquitinación de la proteína MAVS (proteína mitocondrial de señalización antiviral) promoviendo su degradación, dando como resultado una disminución en IFN- β , Mix1 e ISG56, suprimiendo la respuesta inmune antiviral (Wang *et al.*, 2021). Se ha observado que durante la infección con BVDV biotipo citopático en macrófagos bovinos se activa NF κ B y la secreción de IL-1 β es dependiente de caspasa 1 y la inhibición de esta proteasa está asociada con la disminución de la replicación viral (Morales *et al.*, 2020, Fredericksen *et al.*, 2015).

1.4 INFLAMASOMA NLRP3 Y SECRECIÓN DE IL-1 β

La familia de las citocinas IL-1 está compuesta por 11 moléculas solubles y 10 receptores. Las citocinas relacionadas a esta familia necesitan de procesos postraduccionales para ser secretadas de manera bioactiva. Dentro del citoplasma se encuentran sus precursores, los cuales, poseen una secuencia consenso llamada AXD que se ubica nueve aminoácidos después del sitio de escisión. En el caso de IL-1 β es el sitio de escisión para la caspasa 1. Los receptores de la familia de las citocinas IL-1 poseen un dominio intracelular similar al dominio que poseen los TLR's que es conocido como dominio TIR y poseen un dominio extracelular tipo inmunoglobulina; una vez que reconocen su ligando, los dominios TIR (Toll/IL-1 receptor) se dimerizan y generan una cascada de señalización a través de MYD88, IRAK y TRAF6, lo cual genera la activación de factores transcripcionales como NF κ B, AP1 e IRF (Mantovani *et al.*, 2019).

IL-1 β e IL-18 son citocinas proinflamatorias secretadas principalmente por macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos y hepatocitos que van a estimular la expresión de selectinas e integrinas, inducción de ciclooxigenasa 2, producción de múltiples citocinas y quimiocinas y la síntesis de óxido nítrico (Dinarello *et al.*, 2018). Para su producción, necesitan de dos señales: una para su transcripción génica por medio de los TLR's y RLR's que activan a NF κ B para la producción de los precursores pro-IL-1 β y pro-IL-18, la segunda señal se encuentra relacionada con el procesamiento postraduccionales con la participación del inflammasoma NLRP3 por medio de la activación de caspasas involucradas en la inflamación (1, 4, 5, 11 y 12) realizarán la escisión de los precursores de las citocinas para ser secretadas de forma activa. (Shrivastava *et al.*, 2016).

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que cuentan con PRR's como la familia de los NLR's, la cual, se puede dividir en 5 tipos dependiendo del dominio N-terminal (figura 2.). Dentro de la familia de los NLR's se encuentran los NLRA's (con un dominio de transactivación), NLRB's (con un dominio baculovirus IAP, BIR), NLRC's (con un dominio de reclutamiento de caspasas), NLRP's (con un dominio PYD) y NLRX's (del cual se desconoce su dominio N-terminal) (Gram *et al.*, 2012).

La activación de los inflamasomas se ha descrito por medio de dos señales (figura 3), la primera señal, se ha descrito por medio de la activación de PRR's (TLR's y TNFR) la cual dará lugar a la traslocación del factor de transcripción NF κ B, que estimula una

regulación positiva en la expresión génica de NLRP3, pro-caspasa1, pro-IL-1 β y pro-IL-18. Esta primera señal también induce la desubiquitinación (por medio de la enzima desubiquitinizante BRCC3) de NLRP3, la cual, se encuentra ubiquitinizada en su dominio LRR (dominio rico en leucinas por sus siglas en inglés). La segunda señal se encuentra relacionada con el censado de PAMP's y DAMP's, entre ellos, la presencia de flagelina, ácido lipoteicoico, RNA viral, agregados de proteínas, desbalance de flujo de iones, ruptura de endosomas, así como la presencia de especies reactivas de oxígeno (Kelley *et al.*, 2019)

La presencia de ambas señales generará la formación de los complejos multiproteicos mediante interacciones homotípicas entre los dominios de NLRP3, ASC y pro-caspasa 1, que, como resultado, generarán la activación de caspasa 1, la cual, puede realizar los cortes proteolíticos en los precursores de IL-1 β e IL-18, así como de gasdermina D que se encuentra relacionada con la formación de poros en la membrana celular y el tipo de muerte celular por piroptosis. Existen otras vías no canónicas en las cuales participan las caspasas 4, 5 y 12 en humanos y las caspasas 11 y 12 en ratones (Gram *et al.*, 2012; Zhao & Zhao 2020).

Durante las infecciones virales, también se ha reportado la activación del inflamasoma AIM 2 (ausente de melanoma 2), el cual reconoce por medio de su dominio HIN DNA de doble cadena, este receptor también es capaz de reclutar a la molécula ASC para la activación de caspasa 1 y posterior secreción de IL-1 β . También se ha reportado su relación con otros receptores celulares como NLRP3 y cGAS (GMP-AMP sintasa cíclica) (Sharma *et al.*, 2019; Swanson *et al.*, 2017).

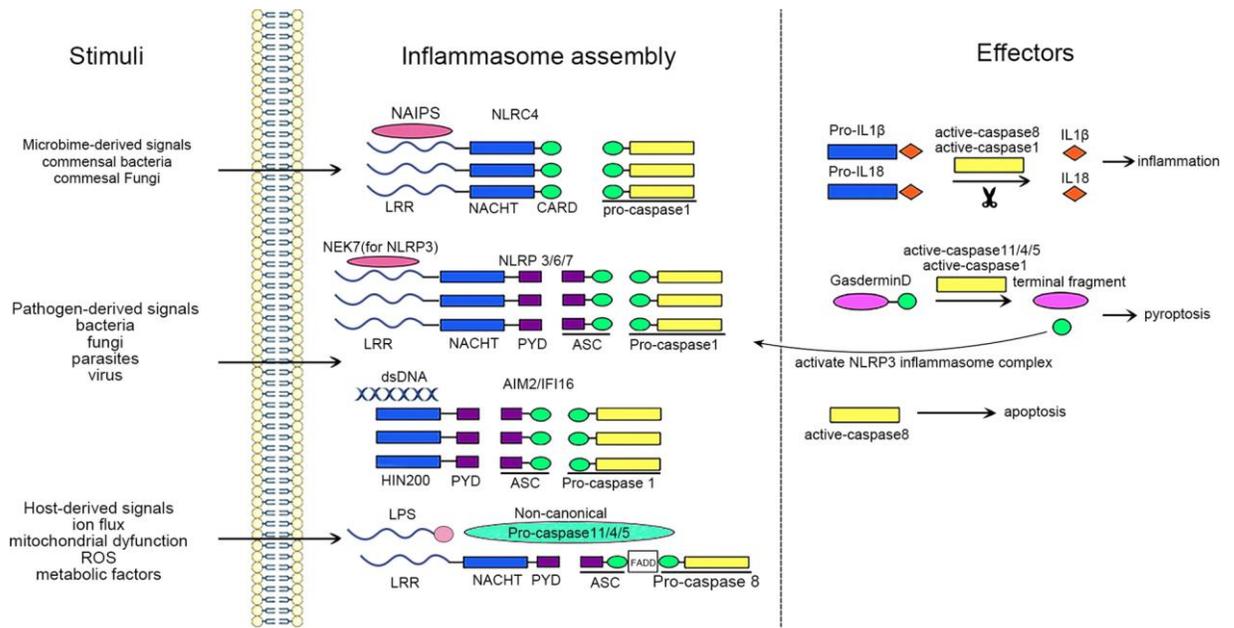


Figura 2. Activación y ensamblaje de los inflammasomas. Se puede observar la diversidad de PAMP's y DAMP's que fungirán con estímulo para la activación de los inflammasomas por medio de sus dominios de reconocimiento, dando lugar al reclutamiento de caspasas (1, 4, 5, 8, 11) para la maduración de citocinas como IL-1 β e IL-18, así como la activación de mecanismos de muerte celular involucrados durante su secreción (Zheng *et al*; 2020).

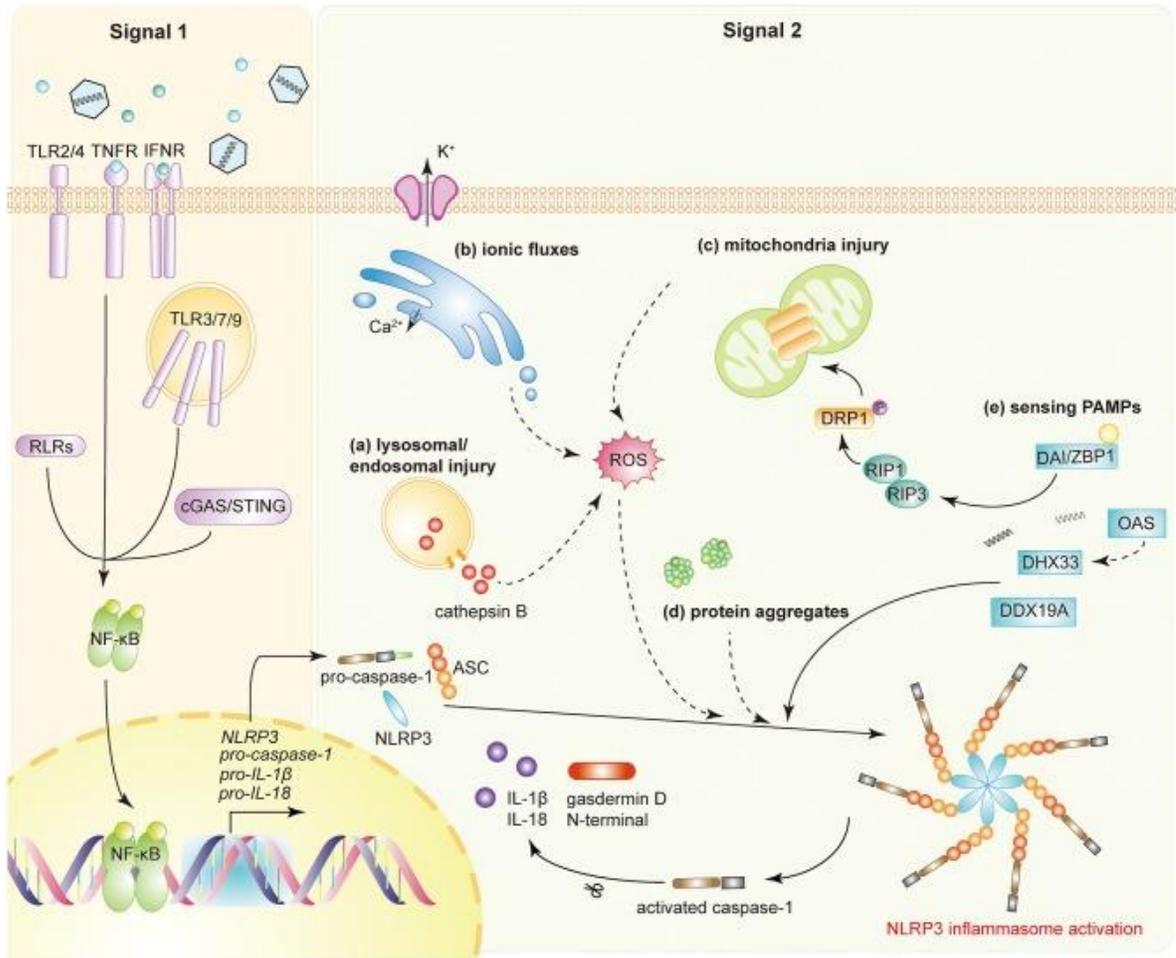


Figura 3. Señales de activación del inflammasoma NLRP3 (Zhao & Zhao 2020).

1.4.1 INFLAMASOMA NLRP3 E IL-1β DURANTE INFECCIONES VIRALES

La activación del inflammasoma puede ser estimulada por componentes virales, así como por componentes celulares conocidos como DAMP's que pueden ser producidos durante las infecciones virales y alterar la concentración de iones en la célula, generar daño a la mitocondria o la acumulación de agregados proteicos, sin embargo, no hay una interacción directa con estructuras virales que se conozca hasta el momento, diversos receptores interactúan con la activación del inflammasoma como algunos miembros de la familia RNA helicasa DExD/Hbox, como DHX33 al censar algunos RNA virales e interactuar con la activación de NLRP3 (Zhao *et al.*, 2020). Otros componentes virales que se han estudiado durante la activación del inflammasoma son las viroporinas,

las cuales son proteínas virales que forman poros en la membrana celular lo que genera alteraciones en el flujo de iones, como es en el caso de la proteína P7 del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV, por sus siglas en inglés) que, en el estudio realizado por Lin *et al.*, 2014 observaron su relación con la secreción de IL-1 β y la activación de NLRP3. Así mismo, se ha estudiado para diversas viroporinas y proteínas virales que generan una alteración en el flujo de iones y con ello la activación del inflamasoma, como también fue reportado en el estudio realizado por Negash *et al.*, 2019 en el cual observan la activación del inflamasoma por medio de la proteína de cápside del virus de hepatitis C (HCV) a través de la alteración del flujo de iones, así mismo, se menciona la importancia de la proteína P7 como segunda señal de activación; Chen *et al.*, 2019 reporta para el caso de SARS-CoV la activación de NLRP3 y posterior secreción de IL-1 β por medio de la proteínas virales 3a y E las cuales alteran el flujo de iones siendo este un estímulo para la activación de NLRP3.

En el estudio realizado por Fan *et al.*, 2018, los autores confirmaron la secreción de IL-1 β dependiente del inflamasoma NLRP3, el cual juega un papel positivo en el control de la replicación viral, observando que al inhibir el inflamasoma NLRP3 hay un aumento en la replicación viral de CSFV (virus de fiebre porcina clásica), así mismo, confirmaron la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1. En otro estudio realizado por Lei *et al.*, 2017 reportaron la capacidad del Enterovirus 71 de inhibir la piroptosis por medio de la escisión de la gasdermina D mediante la actividad proteolítica de su proteína 3C, favoreciendo, con ello, su replicación. En el caso de la infección por el virus de dengue se ha reportado que tiene la capacidad de infectar macrófagos, células dendríticas y plaquetas estimulando la activación del inflamasoma NLRP3 con la subsecuente activación de caspasa 1 y la secreción de IL-1 β , lo cual se ha relacionado con la severidad de la enfermedad (Shrivastava *et al.*, 2020). Durante la infección con el virus de influenza también ha sido reportada la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa-1 y NLRP3 siendo los receptores como los TLR's y RLR's encargados del reconocimiento de componentes virales durante la infección y fungiendo como la primer señal durante la activación del inflamasoma NLRP3, sin embargo, se ha observado tanto un papel positivo en estudios realizados en ratones, así como un papel negativo al presentarse una inflamación exacerbada en la cual se ha reportado tener efectos adversos en las lesiones pulmonares durante la infección (Kuriakose y Kannegati, 2017).

Sin embargo, algunos virus estimulan la activación de NLRP3 para su beneficio, como en el estudio realizado por Zheng *et al.*, 2018, donde se observó que durante la infección con el virus de Zika, la activación del inflamasoma NLRP3 y de la caspasa 1 es estimulada por el virus a través de su proteína NS1, la cual estimula la desubiquitinación de la procaspasa 1 evitando así su degradación por el proteosoma y ésta, a su vez, escinde a cGAS, con lo cual interviene en la estimulación de IFN- tipo 1 y de ISG's, favoreciendo su replicación.

2. JUSTIFICACIÓN

El virus de la diarrea viral bovina tiene la capacidad de causar inmunosupresión subsecuente a la infección en células inmunes en las cuales puede llegar a alterar componentes involucrados en su actividad. Los macrófagos son células que participan activamente durante el reconocimiento de diversos agentes patógenos que estimularán la secreción de componentes de la respuesta inmune, como la IL-1 β , la cual posee diversas actividades implicadas en el proceso inflamatorio y que puede verse estimulada durante la infección por el virus. Esto ha sido reportado en macrófagos infectados con el biotipo citopático, donde se observó una secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1 que, al ser inhibida, ocasionó una disminución en el título viral. Esos resultados sugirieron la participación de la citocina durante la infección.

En el caso del biotipo no citopático resulta de interés por su capacidad para generar infecciones persistentes en los animales infectados y de no generar efectos aparentes *in vitro*, lo cual nos sugiere que puede poseer mecanismos para evadir o modular los componentes involucrados en su reconocimiento. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se tuvo como objetivo el identificar la participación del inflamasoma NLRP3 en la secreción de la IL-1 β durante la infección por el virus de la diarrea viral bovina biotipo citopático y no citopático.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la secreción de IL-1 β dependiente del inflamasoma NLRP3 en cultivos de macrófagos bovinos aislados de sangre periférica infectados con el virus de la diarrea viral bovina biotipo citopático y no citopático, y buscar una posible asociación con la replicación viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Cuantificar al VDVB para asociar el título viral con la inhibición y activación de NLRP3 y caspasa 1.

Aislar macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica para realizar ensayos de infección con el biotipo citopático y no citopático, utilizando como control positivo LPS (300ng/ μ L).

Utilizar inhibidor de caspasa 1 (Y-VAD) y de NLRP3 (CRID3), para asociar su inhibición con la secreción de IL-1 β y replicación viral.

4. HIPÓTESIS

La replicación del virus de la diarrea viral bovina biotipo citopático y no citopático induce la secreción de IL-1 β dependiente del inflamasoma NLRP3 en macrófagos bovinos aislados de sangre periférica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES

Los bovinos utilizados para la obtención de las muestras sanguíneas por venopunción pertenecen al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Aprobación del proyecto por SICUAE.MC-2020/3-1.

5.2 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

La sangre se obtuvo por medio de punción yugular en jeringas de 60mL con 7mL de anticoagulante Ácido Cítrico Dextrosa (ACD) pH 5. En el laboratorio la sangre fue centrifugada en tubos de polipropileno de 50mL a 1800 xg durante 30 minutos para obtener la placa leucoplaquetaria la cual se pasó a otro tubo y se agregaron 15 mL de PBS citrato (Cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio monobásico 1.25 mM, fosfato de sodio dibásico 9.15 mM, ácido cítrico trisódico 17.7 mM; pH 7.4). Posteriormente se depositó la placa leucoplaquetaria con PBS en un tubo con Histopaque y se centrifugó a 1200 xg 15 minutos. Se recolectaron las células mononucleares de sangre periférica y se les hicieron lavados con PBS citrato. Los leucocitos recuperados fueron resuspendidos en medio RPMI sembrados en placa de 6 pozos de ultrabaja adherencia y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Los monocitos recuperados fueron diferenciados a macrófagos en un periodo aproximado de 13 días y fueron cosechados incubando la placa en hielo durante 15 minutos con solución de PBS1X- 2mM EDTA, posteriormente fueron desprendidos y sembrados en placas de 24 pozos con medio RPMI suplementado con 10% SFB, para realizar los ensayos de infección.

5.3 PROPAGACIÓN DEL VIRUS

La línea celular utilizada fueron células MDBK de riñón de bovino las cuales fueron infectadas con la cepa de BVDV biotipo no citopático (NY-1) y citopático (NADL-1). Las células fueron expandidas en botellas de cultivo celular e incubadas a 37°C con 5% de CO₂, fueron suplementadas con medio DMEM a 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de virus, una vez que estas alcanzaron una confluencia del 70% se les reemplazó el medio a 2% de SFB con el virus diluido y se mantuvieron en agitación durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se les agrego más medio al 2% de SFB para su mantenimiento y fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂, se revisaron diariamente con un microscopio invertido. A las 96 horas postinfección con el biotipo no citopático y 72 horas postinfección para el biotipo citopático fueron sometidas a un proceso de congelación y descongelación para obtener los sobrenadantes, los cuales se almacenaron en un ultracongelador a -72°C.

5.4 TITULACIÓN VIRAL

Para la titulación del biotipo no citopático se utilizaron monocapas de células BT (*Bos Taurus turbinata*, ATCC® CRL-1390) sembradas en laminillas de vidrio en placas de

24 pozos a una confluencia de 60% para posteriormente infectarlas con diluciones décuples e incubarlas durante 2 horas en agitación a 37°C, transcurrido el tiempo se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO₂ durante 72h. Después del tiempo de incubación, las laminillas fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con PFA 4% PBS1X durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se realizaron nuevamente lavados con PBS 1X, se procedió a incubarlas con solución de bloqueo (PBS1X/ 5% Suero/ 0.3% tritonX100) durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda una vez transcurrido el tiempo se incubaron durante 16h con anticuerpo policlonal anti BVDV conjugado con FITC (VMRD® BVDV FITC, USA). Se lavaron las laminillas con PBS1X y se colocaron en 10µL de medio de montaje Vetashield® con DAPI y fueron observados al microscopio de fluorescencia para realizar el conteo de focos fluorescentes y determinar las unidades formadoras de foco por mililitro (UFF/mL) con la siguiente fórmula descrita por Brien *et al.*, 2013.

$$\text{UFF/mL} = (\text{media de focos/pozo}) \times (\text{Factor de dilución}) / (\text{mL de inóculo}).$$

La titulación viral del biotipo citopático se llevó a cabo en monocapas de células MDBK a una confluencia del 85-90% en placas de 96 pozos, realizando diluciones decuples seriadas con medio al 2% de SFB, a las 72 hpi, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta observando el ECP (efecto citopático) para realizar el cálculo por medio del método Reed and Muench.

5.5 INFECCIÓN DE MAGROFAGOS

Después de haber cosechado y sembrado los macrófagos, se realizaron ensayos de infección a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 y 10, como control negativo fueron utilizados macrófagos solo con medio RPMI con 10% SFB y como control positivo se utilizó LPS (300ng/µL), la placa fue incubada durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂, en el caso de los pozos en los cuales se utilizó inhibidor, se pre incubaron 2 horas con inhibidor CRID3 (50µM), Y-VAD (50µM) y Z-VAD (50µM), los sobrenadantes fueron recolectados para realizar la cuantificación de IL-1β por ELISA.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE IL-1β

A partir de los sobrenadantes de las células infectadas, se realizaron ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial siguiendo las

especificaciones del productor (IL-1 β Bovine Uncoated ELISA Kit, Thermo Fisher ESS0027, Austria). Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda 450nm, los resultados fueron procesados y graficados con el software GraphPAD Prism® para su interpretación.

5.6 EFECTO SOBRE LA REPLICACION VIRAL

Los sobrenadantes de los ensayos de infección fueron utilizados para realizar ensayos de titulación viral por unidades formadoras de foco (UFF) por inmunofluorescencia con la metodología mencionada anteriormente con diluciones quíntuples seriadas para el biotipo no citopático y para el biotipo citopático el título viral se determinó por medio de Reed and Muench, para relacionar el efecto de la inhibición de NLRP3 y caspasa 1 en la replicación viral.

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCION DEL LOTE VIRAL.

Para comenzar con la expansión del virus en la línea celular MDBK, primero se verificó que fuera libre de diarrea viral bovina. Para tal fin, se extrajo RNA de las células MDBK y del suero fetal bovino con el cual fueron cultivadas y se realizó una RT-PCR con iniciadores para la región 5' UTR. En esos ensayos se obtuvo un producto de 293 pares de bases. Como control positivo se utilizaron tres cepas de BVDV: a) NADL; b) NY; y c) cepa de campo BVDVncp. Como resultado, se obtuvo la amplificación en los controles positivos y ausencia de la amplificación en las células MDBK y en el suero fetal bovino (figura 4).

Una vez confirmada la ausencia de una posible contaminación de BVDV en nuestra línea celular, se obtuvo un stock viral con el cual se realizaron los ensayos de infección. Se utilizaron monocapas de células MDBK suplementadas con medio DMEM 2% de suero fetal bovino, las cuales fueron inoculadas con BVDVncp cepa New York para obtener el sobrenadante a las 96 horas post-infección (hpi) (figura 5 A) el cual fue almacenado para su posterior titulación viral, se utilizaron células MDBK sin infectar como control negativo (figura 5 B).

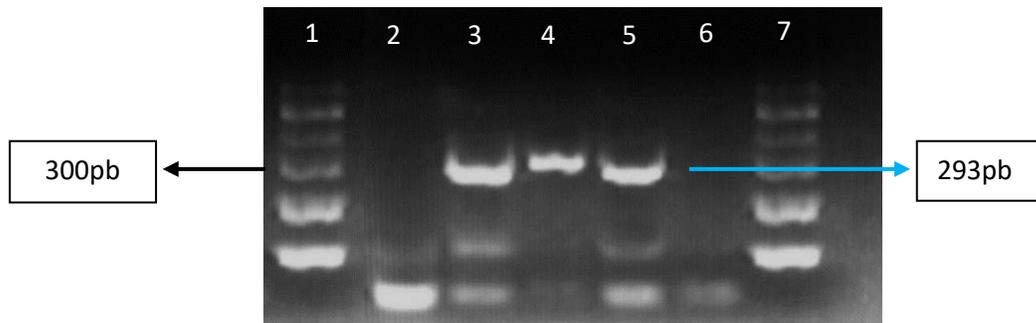


Figura 4. RT-PCR de la porción 5'UTR de BVDV en la línea celular MDBK. Carril 1: MW, Carril 2: MDBK, Carril 3: NADL, Carril 4: NY, Carril 5: cepa de campo BVDVncp, Carril 6: SFB, Carril 7: MW. Los controles positivos amplificaron un producto de 293pb.

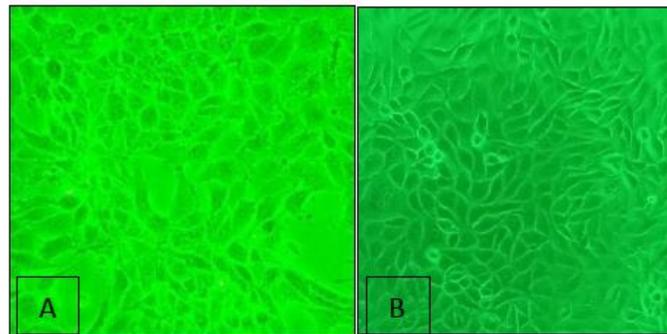


Figura 5. Fotografía de un cultivo de células MDBK (objetivo 20X). A. Cultivo de células MDBK con medio DMEM 2%SFB 96 horas después de la infección con cepa New York de BVDV, B. Cultivo de células MDBK con medio DMEM 2%SFB control negativo

6.2 TITULACIÓN VIRAL

Para realizar la titulación viral por unidades formadoras de foco, se utilizó un anticuerpo anti-BVDV conjugado con FITC de la marca VRMD® por inmunofluorescencia directa, el ensayo se realizó en una línea celular de cornete nasal de bovino (*Bos taurus turbinata*, ATCC® CRL-1390) y se confirmó la ausencia de una posible contaminación por BVDV por medio de RT-PCR (figura 6). Una vez confirmada la ausencia de BVDV en la línea celular,

se prosiguió a determinar las condiciones para realizar el ensayo de titulación por unidades formadoras de foco fluorescente (UFF), los resultados de las diluciones decuples por triplicado mostraron un título en la dilución 10^{-4} (figura 7) un promedio de 56 focos fluorescentes dando como resultado 5.6×10^6 UFF/mL como título viral de nuestro stock.

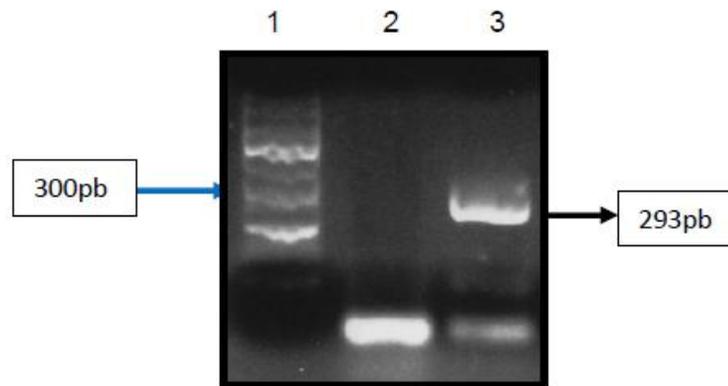


Figura 6. RT-PCR de la porción 5'UTR de BVDV en la línea celular BT. Carril 1. MW, Carril 2. Células BT, Carril 3. BVDVncp NY.

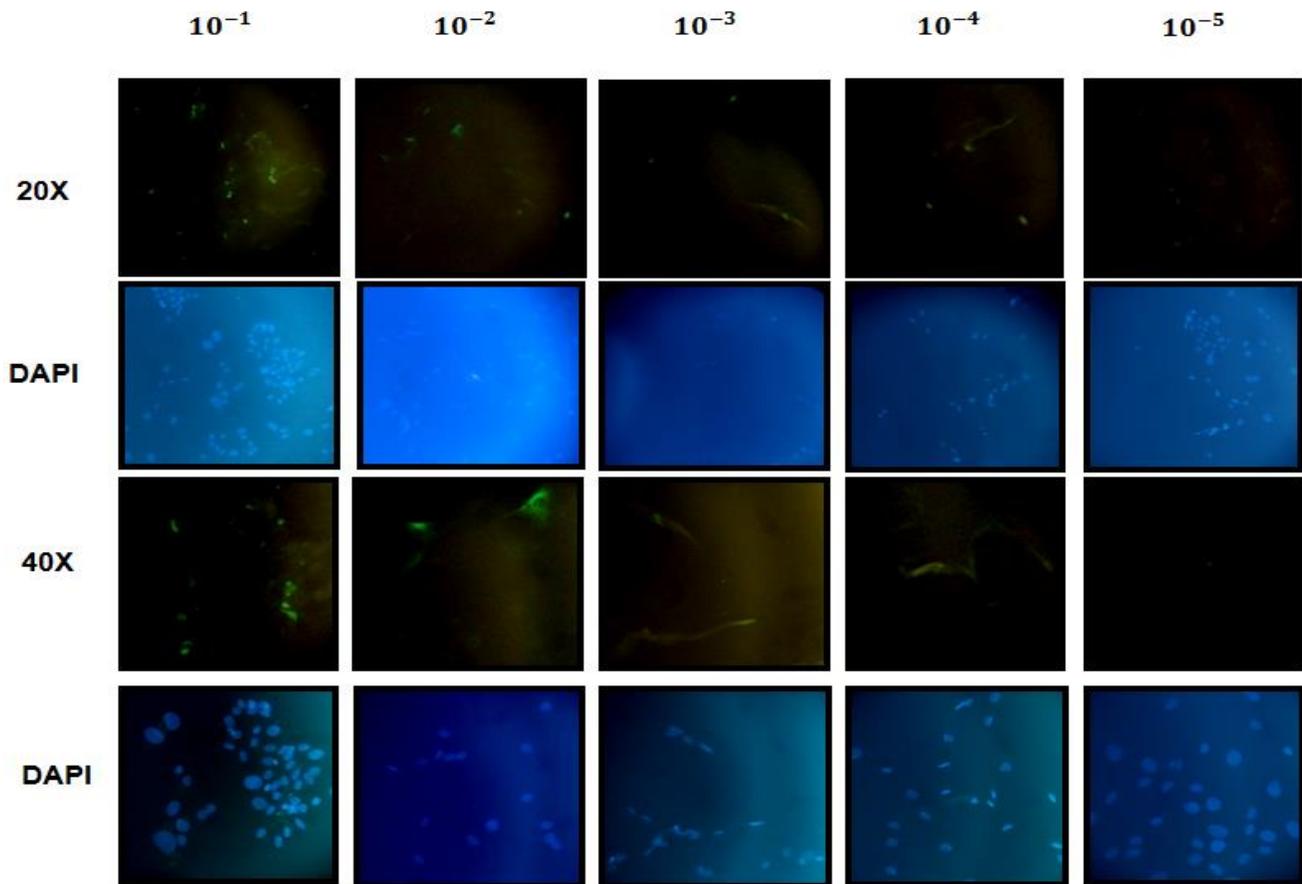


Figura 7. Ensayo de unidades formadoras de foco fluorescente (UFF) con diluciones décuples seriadas. Imagen representativa de un ensayo independiente por triplicado (objetivos 20X y 40X). En cada dilución se muestra un campo representativo de una laminilla de cultivo celular de 12mm.

6.3. CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IL-1 β EN MACRÓFAGOS BOVINOS.

Con el conocimiento del título viral de nuestro stock se realizaron ensayos de infección en macrófagos bovinos a una MOI 2:1 con el biotipo citopático y con el biotipo no citopático se utilizó una MOI 2:1 y una MOI 10:1, recuperando los sobrenadantes a las 24hpi. En el caso del biotipo citopático se obtuvo una secreción de 4629.31 pg/mL (figura 8A), y en el caso del biotipo no citopático la secreción de 252.9 pg/mL para la MOI 2:1 y de 306.5 pg/mL para la MOI 10:1 (figura 8B), se utilizó como control positivo LPS 300ng/ μ L (el cual se ha reportado como activador del inflammasoma NLRP3 con la posterior secreción de IL-1 β) con

el cual se obtuvo una secreción de 3863.2 pg/mL, como se puede observar la secreción con el biotipo no citopático fue hasta 18 veces menor en comparación con la secreción de IL-1 β con el biotipo citopático y de hasta 15 veces menor en comparación con la secreción de IL-1 β con LPS. Estos resultados sugieren que en el caso del biotipo citopático hay una secreción significativa de IL-1 β , la cual es menor con el biotipo no citopático.

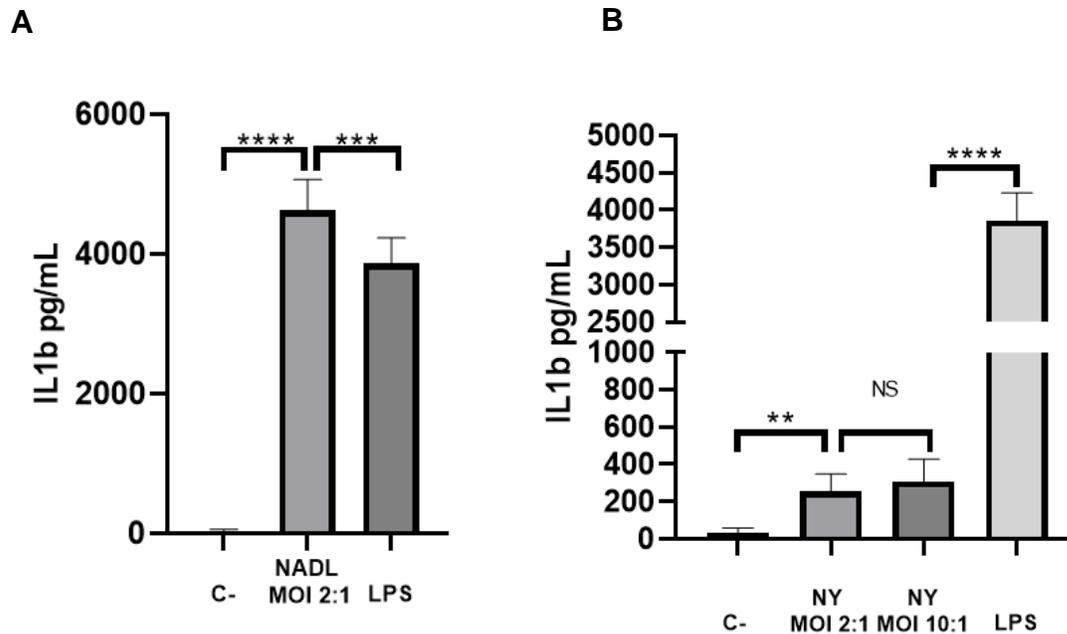


Figura 8. Secreción de IL-1 β en macrófagos bovinos infectados con BVDV citopático (NADL) y no citopático (NY). A. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV citopático (NADL) 24hpi (MOI 2:1), control negativo (C-): sobrenadante de macrófagos sin infectar con medio RPMI 10% SFB, LPS (300ng/ μ L). B. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV no citopático (NY) 24hpi (MOI 2:1 y MOI 10:1), Control negativo(C-): sobrenadante de macrófagos sin infectar con medio RPMI 10% SFB, LPS 300ng/ μ L. Graficas representativas de tres ensayos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, se muestra significancia estadística (**** P<0.0001; *** P<0.001)

La activación del inflammasoma da lugar a la activación de la caspasa 1, la cual posee una actividad proteasa de cisteína que interactúa con la pro-IL-1 β para dar lugar a su forma bioactiva. Debido a lo anterior, para asociar la actividad proteasa de la caspasa 1 durante la infección con BVDV y la posterior secreción de IL-1 β , se utilizó el inhibidor irreversible de caspasa 1 Y-VAD (50 μ M) y el inhibidor general de caspasas Z-VAD (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone) (50 μ M). Como puede observarse en la figura 9, cuando se usó el inhibidor de caspasa 1 Y-VAD, se observó una secreción de

1294.29 pg/mL (figura 9 A) en los macrófagos infectados con el biotipo citopático y de 63.5 pg/mL (figura 9 B) en los macrófagos infectados con el biotipo no citopático, con una disminución de 2.5 veces y de 2.7 veces respectivamente en comparación con la secreción de los macrófagos que no fueron inhibidos e infectados con cada uno de los biotipos, estos resultados nos sugieren que para ambos biotipos la secreción de IL-1 β es dependiente de la actividad proteasa de caspasa 1, resultados similares a los previamente obtenidos por nuestro equipo de investigación para el biotipo citopático. Sin embargo, los resultados obtenidos para el biotipo no citopático, son de gran relevancia debido a que no se había reportado previamente la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1 en macrófagos infectados con BVDVncp, por lo cual, es de gran importancia realizar posteriormente los ensayos de titulación viral de los sobrenadantes de los ensayos de infección y conocer si en el caso del biotipo no citopático la inhibición de la caspasa 1 podría estar involucrada durante la replicación viral. En el caso de la inhibición con Z-VAD en los macrófagos infectados con el biotipo citopático, se observó una menor secreción de la citocina IL-1 β (550.1 pg/mL) a diferencia de la inhibición con Y-VAD (figura 9 A), lo cual nos sugiere que podrían estar involucradas otras caspasas de la vía no canónica en la secreción de la citocina, resultados similares a los observados previamente para este biotipo, por otro lado, los macrófagos inhibidos con Z-VAD e infectados con el biotipo no citopático no mostraron diferencia estadísticamente significativa en la secreción de IL-1 β en comparación con la inhibición con Y-VAD.

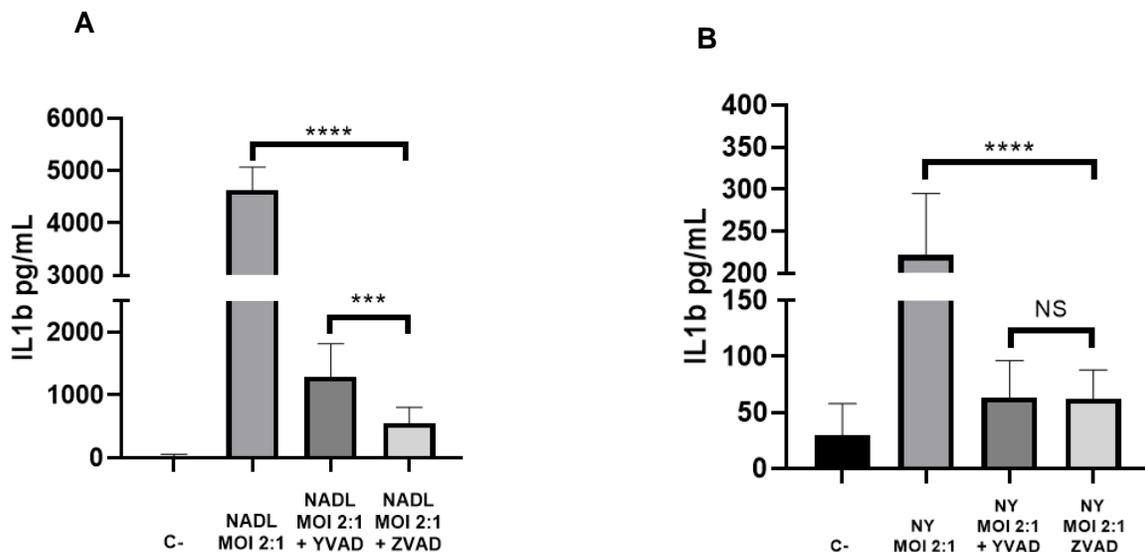


Figura 9. Secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1. A. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV citopático (NADL) 24hpi (MOI 2:1), control negativo (C-): sobrenadante de macrófagos sin infectar, únicamente con medio RPMI 10% SFB, NADL MOI 2:1 + YVAD: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo citopático (NADL) (MOI2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor Y-VAD (50 μ M, 2h), NADL MOI 2:1 + ZVAD: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo citopático (NADL) (MOI 2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor Z-VAD (50 μ M, 2h) B. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV no citopático (NY) 24hpi (MOI 2:1), NY MOI 2:1 + YVAD: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo no citopático (NY) (MOI 2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor Y-VAD (50 μ M, 2h), NY MOI 2:1 + ZVAD: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo no citopático (NY) (MOI2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor Z-VAD (50 μ M, 2h). Gráficas representativas de tres ensayos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, se muestra significancia estadística (**** P<0.0001; *** P<0.001)

Posteriormente, para observar si la secreción de IL-1 β es dependiente del inflamasoma NLRP3 se utilizó un inhibidor de NLRP3 (CRID3 50 μ M) con el cual se observó una disminución significativa de la secreción de IL-1 β (897.09 pg/mL) (figura 10 A) con el biotipo citopático de hasta 4.1 veces en comparación con la secreción sin el inhibidor, resultado similar al control positivo LPS en el cual la secreción de IL-1 β (686.15 pg/mL) disminuyó con el inhibidor CRID3, en el caso del biotipo no citopático no se observó diferencia significativa en cuanto a la secreción con el inhibidor (271.6 pg/mL) (figura 10 B), estos resultados nos sugieren que para la infección con el biotipo citopático la secreción de IL-1 β es dependiente de NLRP3 y que en el caso de la infección con el biotipo no citopático, los resultados nos podrían sugerir que la secreción de IL-1 β no se encuentra relacionada con la actividad del inflamasoma NLRP3, lo cual podría encontrarse relacionado con la posible participación de otro inflamasoma o vía no canónica para la activación de caspasa 1 y su posterior actividad sobre los precursores de IL-1 β en el caso del biotipo no citopático cepa NY-1.

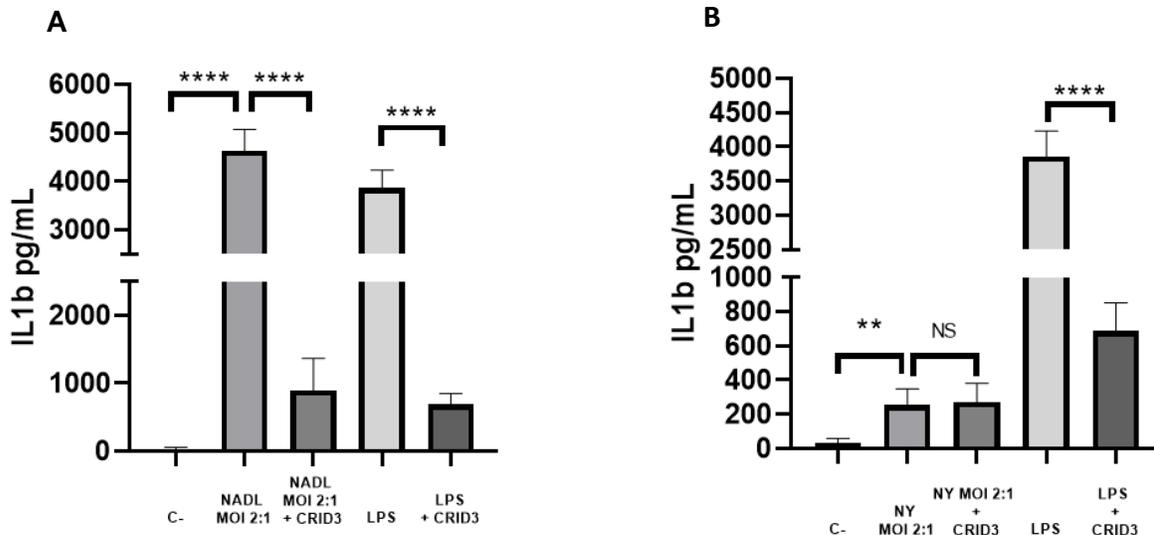


Figura 10. Secreción de IL-1 β dependiente de NLRP3. A. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV citopático (NADL) 24hpi (MOI 2:1), control negativo (C-): sobrenadante de macrófagos sin infectar, únicamente con medio RPMI 10% SFB, NADL MOI 2:1 + CRID3: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo citopático (NADL) (MOI2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor CRID3 (50 μ M, 2h), LPS: sobrenadantes de macrófagos estimulados con LPS (300ng/ μ L), LPS + CRID3: sobrenadante de macrófagos pre-incubados con CRID3 (50 μ M, 2h) estimulados con LPS (300ng/ μ L), B. ELISA de los sobrenadantes de macrófagos infectados con BVDV no citopático (NY) 24hpi (MOI 2:1), NY MOI 2:1 + CRID3: sobrenadante de macrófagos infectados con BVDV biotipo no citopático (NY) (MOI 2:1) 24hpi pre-incubados con inhibidor CRID3 (50 μ M, 2h). ANOVA de una vía, se muestra significancia estadística (**** P<0.0001; ** P<0.01). No se observó significancia estadística en el caso del biotipo no citopático (p<0.05).

6.4. EFECTO DEL INHIBIDOR CRID3 SOBRE LA REPLICACION VIRAL

A partir de los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de infección con los macrófagos bovinos utilizando el inhibidor de NLRP3 (CRID3 50 μ M), se realizaron ensayos de titulación viral por Reed and Muench para el biotipo citopático, mientras que para el biotipo no citopático se realizó por medio de UFF para relacionar el efecto de la inhibición de NLRP3 sobre la replicación viral. En la figura 11 se muestra el efecto citopático (vacuolas en el citoplasma de las células y desprendimiento de la monocapa celular) de los sobrenadantes con NADL MOI2:1. Puede observarse que hay un mayor desprendimiento de la monocapa en las primeras diluciones, donde el virus se encuentra más concentrado, y se logra

observar la presencia de vacuolización sin presencia de desprendimiento de la monocapa celular en la dilución 3^{-6} . Sin embargo, con los sobrenadantes de los macrófagos que fueron preincubados con el inhibidor CRID3, la presencia de vacuolas se observó en la dilución 3^{-4} y en las diluciones posteriores se observaron similares al control negativo. El título viral (figura 12) para los sobrenadantes sin inhibidor NADL MOI2:1 fue de 1.7×10^4 DICC 50% y en el caso de los sobrenadantes con inhibidor CRID3 fue de 2.1×10^3 DICC 50% con la disminución de un logaritmo, lo que nos sugiere que puede existir una relación entre la activación de NLRP3 y la replicación viral de BVDV biotipo citopático cepa NADL.

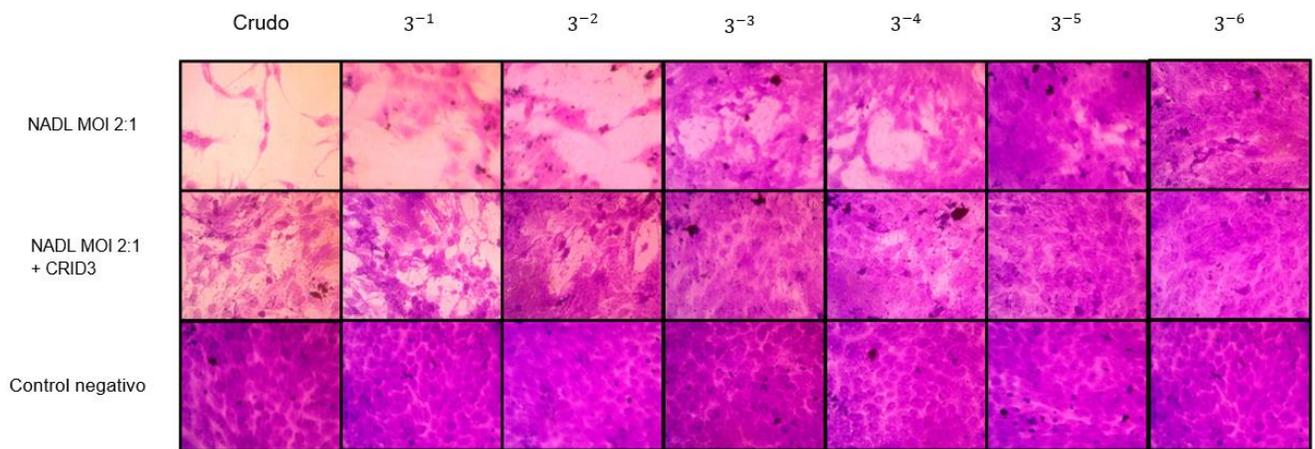


Figura 11. Efecto del inhibidor CRID3 sobre la replicación viral en BVDV biotipo citopático NADL. Reed and Muench en células MDBK con diluciones triples seriadas de los sobrenadantes del ensayo de infección con macrófagos bovinos infectados con BVDV citopático cepa NADL MOI 2:1 (24hpi) sin inhibidor y con preincubación (2h) del inhibidor CRID3 (50 μ M). Fotografía representativa de tres ensayos independientes.

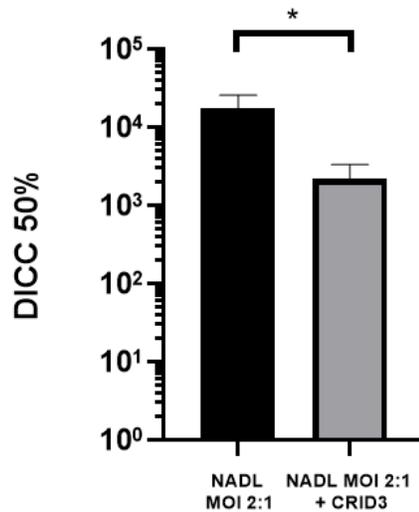


Figura 12. Titulo viral DICC 50% de los sobrenadantes del ensayo de infecci3n con macr3fagos bovinos infectados con BVDV citop3tico cepa NADL MOI 2:1 (24hpi) sin inhibidor y con preincubaci3n (2h) del inhibidor CRID3 (50µM). Grafica representativa de tres ensayos independientes. T de student se muestra significancia estadística (* P<0.05).

En el caso del biotipo no citop3tico no se observ3 diferencia en el titulo viral en los sobrenadantes de la infecci3n en macr3fagos sin inhibidor y con inhibidor CRID3 como podemos observar en la figura 13 con la cual se obtuvo un t3tulo viral de 1.3×10^5 UFF / mL con el sobrenadante sin inhibidor CRID3 y un t3tulo viral de 1.5×10^5 UFF / mL con el sobrenadante de los macr3fagos con inhibidor, estos resultados nos sugieren que en el caso del biotipo no citop3tico la inhibici3n de NLRP3 no tiene una repercusi3n en la replicaci3n viral.

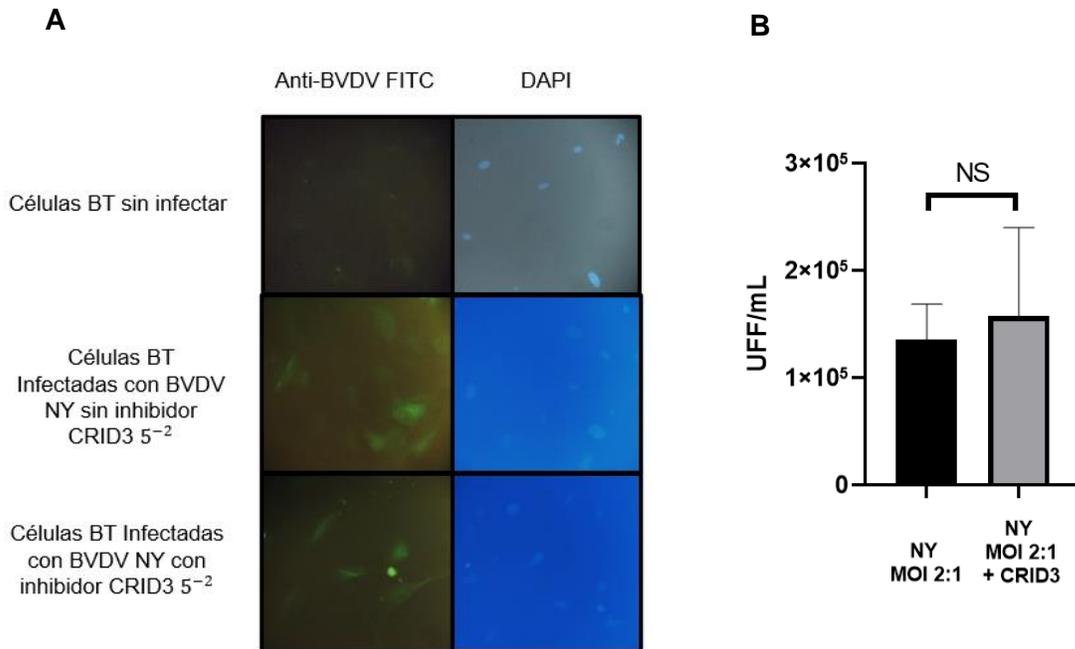


Figura 13. Efecto del inhibidor CRID3 sobre la replicación viral en BVDV biotipo no citopático NY. A. ensayo de unidades formadoras de foco fluorescente en células BT (diluciones quíntuples seriadas) con los sobrenadantes del ensayo de infección con macrófagos bovinos con BVDV no citopático cepa NY MOI 2:1 (24hpi) sin inhibidor y con preincubación (2h) del inhibidor CRID3 (50µM) fotografía representativa de tres ensayos independientes (objetivo 40X), B. Título viral por UFF de los sobrenadantes de los ensayos de infección con macrófagos bovinos infectados con BVDV NY MOI2:1 (24hpi) sin inhibidor y con preincubacion (2h) de inhibidor CRID3 (50µM). Gráfica representativa de tres ensayos independientes. T de student, no se observó diferencia estadística ($p < 0.05$).

En conjunto estos resultados nos sugieren que durante la infección con BVDV biotipo citopático en macrófagos bovinos la activación del inflammasoma NLRP3 se encuentra relacionada con la secreción de IL-1 β y que esta activación podría estar relacionada durante la replicación viral, en el caso del biotipo no citopático no se encontró relacionado el inflammasoma NLRP3 durante la secreción de IL-1 β , pero si se observó la participación de caspasa 1 durante la secreción de la citocina, lo cual nos puede sugerir que corriente arriba de caspasa 1 se puede encontrar otro PRR generando el reclutamiento y activación de la proteasa activa. (figura 14).

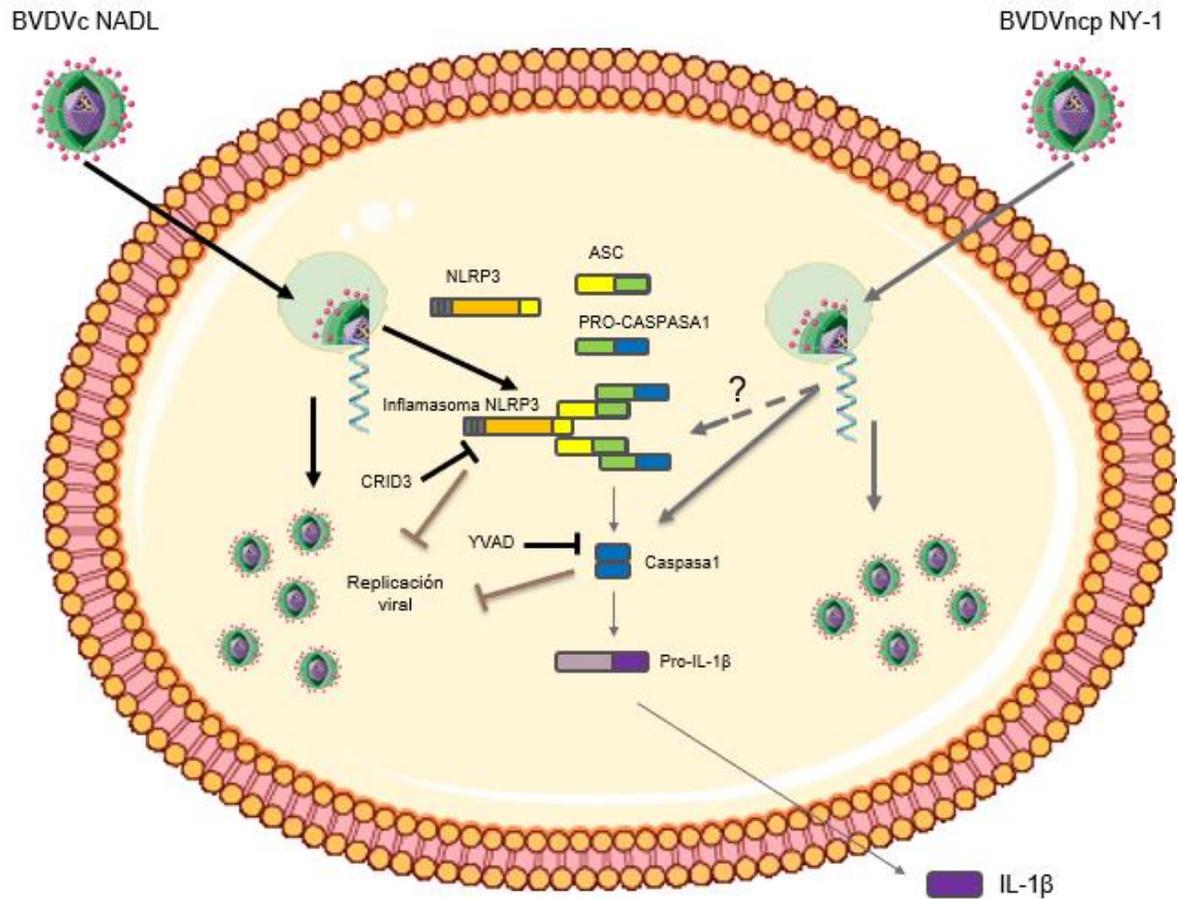


Figura 14. Esquema propuesto de la actividad del inflammasoma NLRP3 en la secreción de IL-1 β durante la infección con BVDVc NADL y BVDVncp NY-1 en macrófagos bovinos. La infección con BVDVc cepa NADL da lugar a la activación del inflammasoma NLRP3 generando la maduración de caspasa 1 y con ello la secreción de IL-1 β . La inhibición de NLRP3 y caspasa 1 disminuye la replicación viral. Por otro lado, la infección con BVDVncp da lugar a la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1.

7. DISCUSIÓN

IL-1 β es una citocina que, para su maduración, necesita de la escisión de sus precursores por medio de la caspasa 1, la cual, para su activación, necesita de la formación de complejos multiproteicos conocidos como inflammasomas. Los inflammasomas pueden censar diversos componentes que se presentan durante las infecciones virales, por esta razón, se ha estudiado la activación e inhibición de los inflammasomas para conocer si esta vía de

señalización se encuentra relacionada durante la replicación viral, como se ha descrito previamente durante la infección con el virus de fiebre porcina clásica (CSFV) y con el virus de hepatitis C (HCV), que ambos virus, pueden estimular la activación de los inflammasomas por medio de sus proteínas virales durante la replicación, por lo cual, estas interacciones han sido estudiadas para el conocimiento de posibles blancos terapéuticos (Lin *et al.*, 2014; Negash *et al.*, 2019 Gram *et al.*, 2012).

La secreción de IL-1 β durante la infección con BVDV biotipo citopático se encuentra estimulada a las 24 hpi y se encontró relacionada con la actividad de caspasa 1 para su maduración, resultado que fue similar a lo que obtuvimos en nuestro estudio. (Morales *et al.*, 2020). En el caso del biotipo no citopático reportamos por primera vez la participación de la caspasa 1 para la secreción de IL-1 β durante la infección en macrófagos bovinos, al encontrar una disminución en la secreción de la citocina cuando se utilizó el inhibidor de caspasa 1 (Y-VAD).

Al analizar estos resultados consideramos de gran interés conocer si el inflammasoma NLRP3 se encontraba participando para la maduración de IL-1 β como se ha reportado durante diversas infecciones virales y debido a que corriente arriba de caspasa 1 se encuentra la activación de inflammasomas como NLRP3 y AIM2 (Zhao y Zhao, 2020).

El fármaco inhibidor de la liberación de citocinas 3 (CRID3, por sus siglas en inglés o también conocido como MCC950) es un inhibidor selectivo del inflammasoma NLRP3, el cual ejerce su efecto en el dominio NATCH interfiriendo con su activación, se ha reportado la disminución en la secreción de IL-1 β en macrófagos derivados de medula ósea de ratones wild type tratados con CRID3 y estimulados con LPS (Vande *et al.*, 2019). La inhibición de NLRP3 por medio de CRID3 ha sido ampliamente estudiada en enfermedades autoinmunes y como posible tratamiento para el síndrome asociado a criopirina (CAPS, por sus siglas en inglés). También ha sido estudiado el efecto de la inhibición de NLRP3 con CRID3 durante infecciones virales, como se reportó en el estudio de Coates *et al.*, 2017 en el cual se observó la disminución en la activación de caspasa 1 y secreción de IL-1 β en células THP-1 infectadas con el virus de influenza A y en ratones jóvenes tratados con CRID3, resultado similar a lo que se observó en nuestro estudio, donde, para el caso del biotipo citopático, la inhibición de NLRP3 ocasionó la disminución de la secreción de IL-1 β . También observamos una disminución en la replicación viral, al encontrar, en nuestros resultados de Reed and Muench de los sobrenadantes de los macrófagos que fueron inhibidos con CRID3

e infectados con el biotipo citopático, una disminución en el título viral. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en el estudio de Zheng *et al.*, 2018 al analizar la infección con el virus de Zika en células THP-1 knockout de NLRP3. Esos autores encontraron que la replicación viral fue menor que en las células wild type. Nuestros resultados podrían sugerir que durante la infección con BVDV biotipo citopático en macrófagos bovinos, la activación del inflamasoma NLRP3 beneficia su replicación y la maduración de IL-1 β . En el caso del biotipo no citopático, la inhibición de NLRP3 no tuvo impacto en la replicación viral ni en la secreción de IL-1 β , sin embargo, al encontrar la participación de caspasa 1 esto nos podría estar sugiriendo la posible activación de otro inflamasoma, como el AIM2 o RIG-I, que, también tienen la capacidad de interactuar con la proteína ASC para la posterior escisión y activación de caspasa 1. Otro evento que también podría estar involucrado es la activación de vías no canónicas independientes de inflamasomas, en las cuales, se ha evaluado la actividad de caspasa 8 para la activación de caspasa 1 y secreción de IL-1 β (Poeck *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2019; Monie y Bryant, 2015).

Un aspecto de gran interés durante la infección con BVDV es la diferencia en la respuesta inmune que se ha reportado para ambos biotipos. Como podemos observar en los resultados obtenidos en este estudio, durante la infección con el virus de la diarrea viral bovina biotipo citopático, la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β se encuentra aumentada significativamente en comparación con la observada con el biotipo no citopático (donde fue menor). Relacionado a lo anterior, se ha reportado previamente durante la infección con el biotipo no citopático una menor expresión génica de pro-IL-1 β , lo cual, podría estar relacionado en la menor secreción de la citocina madura por este biotipo. Nuestros resultados fueron similares a los resultados obtenidos durante la infección con cepas del genotipo 2, en las cuales, la secreción de IL-1 β fue menor en las cepas no citopáticas en comparación con la cepa citopática. Además de observar en estos estudios que, la secreción de IL-1 β en macrófagos infectados con el biotipo no citopático y estimulados con LPS post-infección fue menor que la secreción de IL-1 β en los macrófagos que solo fueron estimulados con LPS, lo cual, nos puede sugerir que el biotipo no citopático posee estrategias para interferir con la secreción de IL-1 β (Lee *et al.*, 2008; Schaut *et al.*, 2016; Schaut *et al.*, 2015). En el caso de nuestros resultados con la cepa NY-1 se observó una diferencia en la secreción de IL-1 β con el control negativo, pero a pesar de ello la secreción fue mínima a diferencia de la infección con el biotipo citopático y con la estimulación con LPS. Para el caso del biotipo citopático estos resultados se encuentran

relacionados con su perfil pro-inflamatorio presente durante la infección como se ha observado previamente al haber una estimulación de citocinas pro-inflamatorias por medio de la activación de NFκB dando lugar a la expresión génica de IL-1β e IL-8 a partir de las 2hpi (horas post-infección) y observando un incremento a las 24hpi (Fredericksen *et al.*, 2015).

Existen diversos mecanismos por los cuales los virus pueden llegar a modular la respuesta inmune. Entre ellos se encuentran, la inhibición de respuestas humorales, la interferencia con la secreción de interferones, la inhibición de la apoptosis, la evasión de CTL (linfocitos citotóxicos) y NK (células natural killer), la modulación de la función del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) y la inhibición de citocinas y quimiocinas. Que, en conjunto, todos estos mecanismos han sido desarrollados evolutivamente para el beneficio en la replicación viral (Alcami y Koszinowski, 2000). Relacionado a lo anterior, una característica interesante para el biotipo no citopático es su capacidad para establecer infecciones persistentes, lo cual se asocia tanto a factores virales (diversidad genética y antigénica) como a factores del hospedador (estado inmune, etapa gestacional, vacunación e inmunotolerancia). Entre los factores virales, se ha observado que, el biotipo no citopático estimula una menor expresión génica y secreción de citocinas pro-inflamatorias (como pudimos confirmar en nuestros resultados) (Evermann y Barrington, 2005; Peterhans *et al.*, 2003). La menor expresión de citocinas proinflamatorias se encuentra relacionada con la modulación de factores de transcripción, como se ha reportado con el virus de fiebre porcina africana (ASFV por sus siglas en inglés). El cual, contiene una secuencia que codifica una proteína homóloga de IκB, dando lugar a una menor expresión de citocinas por medio de la modulación de los factores de transcripción NFκB y NFAT (factor nuclear de células T activadas) (Dixon *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha reportado (en el VDVB) la capacidad de inhibir a IRF (factor regulador de interferón) por medio de la proteína Npro, resultando en una menor secreción de IFN-α, similar a este mecanismo el biotipo no citopático podría estar interfiriendo con vías de señalización transcripcional dando lugar a la menor expresión génica y secreción de citocinas como IL-1β. En diversas infecciones virales se ha observado la relación que existe entre las proteínas que son codificadas durante la replicación y las proteínas celulares. Por ejemplo, en un estudio realizado por Shan *et al.*, 2021 se mostró la capacidad de la proteína NS4B de VDVB de interactuar con el dominio CARD de la proteína MDA5, interfiriendo con la producción de IFN-β. Este efecto fue benéfico para la replicación viral.

De la misma manera, durante la replicación viral, las proteínas virales se encuentran interactuando con diversas moléculas que forman parte de vías de señalización llegando a modificar su expresión o activación. Un ejemplo de lo mencionado anteriormente son la producción de proteínas homólogas que pueden interactuar con los dominios de las moléculas para interferir con su activación generando la disminución de componentes antivirales. Otro mecanismo, es por medio del aumento en la expresión de ubiquitinas o deubiquitinas modificando la degradación o estabilidad de proteínas celulares, el conocimiento de estas interacciones puede brindar mayor conocimiento de las moléculas que se encuentran participando durante la replicación viral y poder desarrollar posibles tratamientos antivirales (Alcami 2021, Wang *et al.*, 2021, Johnston *et al.*, 2005).

A pesar de que nuestros resultados mostraron una disminución en la replicación viral al inhibir NLRP3 (con CRID3), resulta de gran importancia realizar un mayor número de ensayos que sustenten el efecto observado. Es necesario, evaluar si la inhibición de NLRP3 pudiera tener un efecto antiviral en un modelo *in vivo*, debido a que el efecto que se observa en un modelo *in vitro* podría ser diferente al esperado en un modelo *in vivo*, como ha sido reportado con el tratamiento con IFN- α durante la infección con VDVB. Además, es importante incluir en futuros ensayos otras cepas del VDVB que permitan comparar y evaluar otros mecanismos que podrían estar implicados durante la patogenia de la enfermedad (Quintana *et al.*, 2020; Peek *et al.*, 2004).

8. CONCLUSIONES

En este estudio se confirmó la secreción de IL-1 β durante la replicación viral con VDVB biotipo citopático y no citopático del genotipo 1 en macrófagos bovinos. Los resultados muestran, una secreción mayor de IL-1 β en células infectadas con el biotipo citopático y confirman (con base en nuestros resultados con el tratamiento de inhibición con CRID3) la participación del inflamasoma NLRP3 durante la secreción de la citocina. Además, se encontró una posible relación de la activación del inflamasoma NLRP3 en la replicación con el biotipo citopático. Al observar, que la inhibición del inflamasoma NLRP3 (por medio de CRID3) generó una disminución en el título viral en los sobrenadantes de los macrófagos infectados con este biotipo. Estos resultados nos generan el interés por evaluar el posible

mecanismo que se encuentra relacionado durante la infección con este biotipo y la activación del inflamasoma NLRP3, lo cual no ha sido reportado hasta el momento.

En el caso del biotipo no citopático cepa NY-1 no se encontró relacionada la actividad del inflamasoma NLRP3 con la secreción de la citocina. Sin embargo, se observó por primera vez, la relación de la actividad de caspasa 1 en la maduración de IL-1 β durante su replicación en macrófagos bovinos. El análisis de estos resultados nos sugiere la posible participación de otro receptor corriente arriba involucrado para el reclutamiento de la caspasa 1, generando con ello, la posibilidad de evaluar que otro mecanismo podría estar implicado durante la replicación con este biotipo, el cual resulta de gran interés debido a su capacidad para generar inmunotolerancia en los individuos infectados.

En conjunto estos resultados validan la hipótesis establecida para el biotipo citopático, sin embargo, para el biotipo no citopático los resultados no sustentan la hipótesis establecida. Aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos del sistema inmune que se encuentran involucrados durante la infección con el virus de diarrea viral bovina biotipo citopático y no citopático, abriendo la posibilidad de evaluar su relación dentro de la patogenia de la enfermedad, para que sean estudiados en un modelo *in vivo* con el objetivo del desarrollo de posibles tratamientos antivirales.

9. PERSPECTIVAS

El análisis de los resultados obtenidos nos genera el interés sobre la posible interacción entre el inflamasoma y VDVB durante su replicación. En específico, conocer que proteínas del virus podrían estar participando directa o indirectamente en la activación del inflamasoma durante su replicación, ya que, nuestros resultados sugieren de manera importante la posible relación de la actividad del inflamasoma durante la replicación viral. Otro aspecto relevante es la participación de caspasa 1 en la secreción de IL-1 β con el biotipo no citopático, resultado que nos genera cuestionarnos si existe la participación de otro inflamasoma para su maduración, ya que, a pesar de la menor expresión génica y secreción de IL-1 β que se ha observado con este biotipo, estos resultados no excluyen que no se esté generando la activación del inflamasoma. Por lo mencionado anteriormente, resulta importante conocer, si se está modulando una vía de señalización corriente arriba del inflamasoma o si hay una menor expresión génica de los componentes del inflamasoma

durante la infección con este biotipo. También otro aspecto importante a evaluar es la participación de vías no canónicas independientes de inflammasomas que pueden generar la activación de caspasa 1, así como la maduración de IL-1 β , lo cual, proporcionaría una mayor comprensión para la capacidad del biotipo no citopático de generar infecciones persistentes, así como de generar nuevos conocimientos sobre la patogenia de la enfermedad.

10. REFERENCIAS

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2015), *Inmunología celular y molecular*, Octava Edición, Editorial Elsevier, pp. 51-84.

Aberle D., Muhle-Goll C., Bürck J., Wolf M., Reißer S., Luy B., Meyers G. (2014). Structure of the Membrane Anchor of Pestivirus Glycoprotein Erns, a Long Tilted Amphipathic Helix. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1003973. doi:10.1371/journal.ppat.1003973.

Adler H., Jungi T. W., Pfister H., Strasser M., Sileghem M., Peterhans H. (1996), Cytokine Regulation by Virus Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus, a Flavivirus, Downregulates Production of Tumor Necrosis Factor Alpha in Macrophages In Vitro.

Agapov E. V., Murray C. L., Frolov I., Qu L., Myers T. M., Rice C. M. (2004). Uncleaved NS2-3 Is Required for Production of Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus, *Journal of Virology*, Vol. 78, DOI: 10.1128/JVI.78.5.2414–2425.2004.

Alkheraif A. A., Topliff C. L., Reddy J., Massilamany C., Donis R. O., Meyers G., Eskridge K. M., Kelling C. L., (2017), Type 2 BVDV Npro suppresses IFN-1 pathway signaling in bovine cells and augments BRSV replication, *Virology*, Vol. 507, pp. 123-134.

Bendfeldt S., Ridpath J. F., Neill J. D. (2007), Activation of cell signaling pathways is dependant on the biotype of bovine viral diarrhea viruses type 2, *Virus Research*, Vol. 126, pp. 96-105.

Brodersen B. W. (2014), Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control, *Veterinary Pathology*, Vol. 51, pp.3-5.

Brien J.D., Lazear H.M, Dimond M. S. (2013), Propagation, Quantification, Detection, and Storage of West Nile Virus, *Current Protocols in Microbiology*, DOI: 10.1002/9780471729259.mc15d03s31.

Chase Christopher C.L., Elmowalid G., Yousif A. (2004), The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture, *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, Vol.20, pp.2-5.

Chen I-Y. Moriyama M. Chang M-F. Ichinohe T. (2019), Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10:50.

Coates B.M., Staricha K.L., Ravindran N., Koch C.M., Cheng Y., Davis J.M., Shumaker D.K., Ridge K.M. (2017), Inhibition of the NOD-Like Receptor Protein 3 Inflammasome Is Protective in Juvenile Influenza A Virus Infection, *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2017.00782.

Couillin I., Pétrilli V., Martinon F. (2011), *The inflammasomes*, Springer.

Deng, R., & Brock, K. V. (1993). *5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. Nucleic Acids Research, 21(8), 1949–1957.* doi:10.1093/nar/21.8.1949.

Deregt D., Dubovi E. J., Jolley M. E., Nguyen P., Burton K. M., Gilbert S. A. (2005). Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus, *Veterinary Microbiology*, Vol. 108, DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.02.010.

Dinarello Charles A. (2018), Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity, *Immunological Reviews*, Vol. 281, pp. 2-6.

Dixon L.K. Islam M. Nash R. Reis A. L. (2019). African swine fever virus evasion of host defences, *Virus Research*, Vol. 266, pp. 25-33.

Duan H., Ma Z., Xu L., Zhang A., Li Z., Xiao S. (2020). A novel intracellularly expressed NS5B-specific nanobody suppresses bovine viral diarrhoea virus replication, *Veterinary Microbiology*, Vol. 240, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108449>.

El Omari, Lourin O., Harlos K., Grimes J.M., Stuart D. I. (2013). Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry, *Cell Reports*, 3, 30–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.001>

Fan S., Yuan J., Deng S., Chen Y., Xie B., Wu K., Zhu M., Xu H., Huang Y., Yang J., Zhang Y., Chen J., Zhao M. (2018) Activation of Interleukin-1 β Release by the Classical Swine Fever Virus Is Dependent on the NLRP3 Inflammasome, Which Affects Virus Growth in Monocytes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:225.

Fletcher, S. P., Ali, I. K., Kaminski, A., Digard, P. & Jackson, R. J. (2002). The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes. *RNA* 8, 1558–1571

Fredericksen F., Carrasco G., Villalba M., Olavarría V. (2015), Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF- κ B signaling pathway, *Molecular Immunology*, pp. 3-5.

Grassmann C. W., Isken O., Behrens S. E. (1999). Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study, *Journal of Virology*, Vol. 73, doi: 10.1128/JVI.73.11.9196-9205.1999.

Gram A. M., Frenkel J., Rensing M. E. (2012), Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence, *Journal of General Virology*, 93, 2063–2075.

Glew E. J., Carr B.V., Brackenbury L. S., Hope J. C., Charleston B., Howard C. J. (2003), Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells, *Journal of General Virology*, Vol. 84, pp 1771-1780.

Grummer B., Beer M., Liebler-Tenorio E., Greiser-Wilke I. (2001)., Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus, *Journal of General Virology* Vol. 82, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-11-2597>.

Grummer B., Grotha S., Wilke Greiser (2004), Bovine Viral Diarrhoea Virus is Internalized by Clathrin-dependent Receptor-mediated Endocytosis, *Journal of Veterinary medicine*, Vol. 51, pp.1-4.

Goens S. Denise (2002), The evolution of bovine viral diarrhoea: a review, *The Canadian Veterinary Journal*, Vol. 43, pp. 1-4.

Gómez-Romero Ninnet, Basurto-Alcántara Francisco J., Verdugo-Rodríguez Antonio, Bauermann Fernando V., Ridpath Julia F. (2017), Genetic diversity of bovine viral

diarrhea virus in cattle from Mexico, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 29, pp. 3-4.

Gonzales M. E., Carrasco L. (2003). Viroporins, *FEBS Letters*, 552 (2003) 28-34, doi:10.1016/S0014-5793(03)00780-4.

Gottipati K., Acholi S., Ruggli N., Choi K. H. (2014). Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro, *Virology*, 452-453, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.026>.

Gottipati K., Holthauzen L. M. F., Ruggli N., Choi K. H. (2016). Pestivirus Npro Directly Interacts with Interferon Regulatory Factor 3 Monomer and Dimer, *Journal of Virology*, Vol. 90, doi:10.1128/JVI.00318-16.

Gu B., Lui C., Goerke J. L., Maley D. R., Gutshall L. L., Feltenberger C. A., Del Vecchio A. M. (2000). The RNA Helicase and Nucleotide Triphosphatase Activities of the Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Protein Are Essential for Viral Replication, *Journal of Virology*, Vol. 74, doi: 10.1128/jvi.74.4.1794-1800.2000.

Haranda T., Tautz N., Thiel J-H. (2000). E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies, *Journal of Virology*, Vol. 74.

Heimann, M., Sosa, G. R., Martoglio, B., Thiel, H.-J., & Rumenapf, T. (2006). Core Protein of Pestiviruses Is Processed at the C Terminus by Signal Peptide Peptidase. *Journal of Virology*, 80(4), 1915–1921. doi:10.1128/jvi.80.4.1915-1921.2006.

Hilton, L., Moganeradj, K., Zhang, G., Chen, Y.-H., Randall, R. E., McCauley, J. W., & Goodbourn, S. (2006). The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. *Journal of Virology*, 80(23), 11723–11732. doi:10.1128/jvi.01145-06

Houe Hans (2003), Economic impact of BVDV infection in dairies, *Biologicals*, Vol. 31, pp. 4-6.

Iqbal M., Poole E., Goodbourn S., McCauley John W. (2000), Role for Bovine Viral Diarrhea Virus Erns Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA, *Journal of Virology*, Vol. 78, pp. 1-3.

Jensen J., Schultz R.D. (1991), Effect of infection by bovine viral diarrhea virus (BVDV) in vitro on interleukin- 1 activity of bovine monocytes, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 29, pp. 2-4.

Jordan R., Nikolaeva O.V., Wang L., Conyers B., Mehta A., Dwek R. A., Block T. M., (2002), Inhibition of Host ER Glucosidase Activity Prevents Golgi Processing of Virion-Associated Bovine Viral Diarrhea Virus E2 Glycoproteins and Reduces Infectivity of Secreted Virions, *Virology*, Vol. 295, DOI:10.1006/viro.2002.1370.

Jordan R., Wang L., Graczyk T. M., Block T. M., Romano P. R. (2002), Replication of a Cytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Activates PERK and Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis of MDBK Cells, *Journal of Virology*, Vol. 76, DOI: 10.1128/JVI.76.19.9588-9599.2002.

Johnston J. B., Barret J. W., Nazarian S. H., Goodwin M., Ricuttio D., Wang G., McFadden G. (2005), A Poxvirus-Encoded Pysin Domain Protein Interacts with ASC-1 to Inhibit Host Inflammatory and Apoptotic Responses to Infection, *Immunity*, Vol. 23.

Kelling C.L. Topliff C.L. (2013), Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhea virus infections, *Biologicals*, Vol.41, pp. 20-25.

Kelley N., Jeltema D., Duan Y., He Y. (2019), The NLRP3 inflammasome: An overview of Mechanisms of Activation and Regulation, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, 3328.

Klemens O., Dubrau D., Tautz N. (2015). Characterization of the Determinants of NS2 3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses, *Journal of Virology*, Vol. 89, doi:10.1128/JVI.01646-15.

Knipe David M., Howley Peter M. (2013), *Fields Virology*, Sexta Edición, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 735-740.

Krey T., Himmelreich A., Heimann M., Menge C., Thiel Heinz-Juergen, Maurer K., Rumenapf T. (2006), Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1, *Journal of virology*, Vol. 80, pp.1-3.

Krey T., Moussay E., Thiel Heinz-Jurgen, Rumenapf Till (2006), Role of the Low-Density Lipoprotein Receptor in Entry of Bovine Viral Diarrhea Virus, *Journal of Virology*, Vol.80, pp. 1-3.

Kuriakose T. y Kanneganti T-D. (2017). Regulation and functions of NLRP3 inflammasome during influenza virus infection, *Molecular Immunology*, Vol. 86. pp. 56-64.

Lackner T., Muller A., Pankraz A., Becher P., Thiel H. J., Gorbalenya A. E., Tautz N. (2004). Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus, *Journal of Virology*, Vol. 78, DOI: 10.1128/JVI.78.19.10765–10775.2004.

Lackner T., Muller A., Konig M., Thiel H. J., Tautz N. (2005). Persistence of Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by a Cellular Cofactor of a Viral Autoprotease, *Journal of Virology*, Vol. 79, doi:10.1128/JVI.79.15.9746–9755.2005.

Lanyon Sasha R., Hill Fraser I., Reichel Michael P., Brownlie Joe (2014), Bovine Viral Diarrhoea: Pathogenesis and Diagnosis, *The Veterinary Journal*, Vol.199, pp.1-7.

Largo E., Gladue D. P., Huarte N., Borca M. V., Nieva J. L. (2014). Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function, *Antiviral Research*, Vol. 101, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.015>.

Lee S.-R, Pharr G. T., Boyd B.L., Pinchuk L.M. (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*, Vol. 31. pp.

Lei X, Zhang Z, Xiao X, Qi J, He B, Wang J. (2017). Enterovirus 71 Inhibits Pyroptosis through Cleavage of Gasdermin D, *Journal of Virology*, Vol. 91:18.

Lin Z., Liang W., Kang K., Li H., Cao Z., Zhang Y. (2014), Classical Swine Fever Virus and p7 protein induce secretion of IL-1 β in macrophages, *Journal of General Virology*, 95, 2693–2699.

Mantovani A., Dinarello C. A., Molgora M., Garlanda C. (2019), IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease, Europe PMC, Vol. 50: 778-795.

Mätzner Philippe, Magkouras Ioannis, Rümenapf Till , Peterhans Ernst , Schweizer Matthias (2009), The viral RNase Erns prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs, Virus Research, Vol. 140, pp. 2-5.

Mayr C. (2017). Regulation by 3'-Untranslated regions, Annual Reviews of Genetics, Vol. 51:171-94.

Morales Aguilar Aldo, Lopez Reyes Yahel, Regalado Huitron Montserrat, Sarmiento Silva Rosa Elena, Arriaga Pizano Lourdes, Benitez Guzman Alejandro (2020), The NADL strain of bovine viral diarrhea virus induces the secretion of IL-1 β through caspase 1 in bovine macrophages, Research in Veterinary Science Vol. 131, pp. 3-5.

Monie T. P. y Bryant C. E. (2015), Caspase 8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways, Immunological Reviews, 265(1), 181-193.

Murray C. L., Jones C. T., Rice C. M. (2008), Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis, Nature Reviews Microbiology, doi:10.1038/nrmicro1928.

Nagai M., Hayashi M., Sugita S., Sakoda Y., Mori M., Murakami T., Ozawa T., Yamada N., Akashi H. (2004), Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions, Virus Research, Vol.99, pp.1-3.

Negash A. A., Olson R. M., Griffin S., Gale M. (2019), Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation, PLOS pathogens, 15(2): e1007593.

Neill J. D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhea virus, Biologicals, Vol. 41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>.

Ostachuck A. (2016). Bovine viral diarrhoea virus structural protein E2 as a complement regulatory protein, *Archives of Virology*, 161(7), 1769-1782, DOI 10.1007/s00705-016-2835-6

Pankraz Alexander, Preis Simone, Thiel Heinz-Jürgen, Gallei Andreas, Becher Paul (2009), A Single Point Mutation in Nonstructural Protein NS2 of Bovine Viral Diarrhoea Virus Results in Temperature-Sensitive Attenuation of Viral Cytopathogenicity, *Journal of Virology*, Vol.83, pp. 3-5.

Peterhans Ernst, Jungi Thomas W, Schweizer Matthias (2003), BVDV and innate immunity, *Biologicals*, Vol. 31, pp.2-4.

Peek S. F., Bonds M. D., Schaele P., Weber S., Friedrichs K., Schultz R. D. (2004), Evaluation of antiviral activity and toxicity of recombinant human interferon alfa-2a in calves persistently infected with type 1 bovine viral diarrhoea virus, *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 65.

Poock H. Bscheider M. Gross O. Finger K. Roth S. Rebsamen M. Hanneschläger N. Schlee M. Rothenfusser S. Barchet W. Kato H. Akira S. Inoue S. Endres S. Peschel C. Hartmann G. Hornung V. Ruland J. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1b production, *Nature Immunology*, Vol. 11.

Quintana M. E., Cardoso N. P., Pereyra R., Barone L. J., Barrionuevo F. M., Mancilla F. C., Turco C. S., Capozzo A. V. (2020). Interferon lambda protects cattle against bovine viral diarrhoea virus infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 230.

Richter Veronika, Lebl Karin, Baumgartner Walter, Obritzhauser Walter, Käsbohrer Annemarie, Pinior Beate (2017), A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection, *The Veterinary Journal*, Vol. 220, pp.2-6.

Ridpath J. F. (2005), *Classification and Molecular Biology*. En S. M. Goyal, J.F. Ridpath (Ed.), *Bovine Viral Diarrhoea Virus Diagnosis, Management, and Control* (pp. 70-79), USA: Blackwell Publishing.

Ridpath J. (2010), The Contribution of Infections with Bovine Viral Diarrhea Viruses to Bovine Respiratory Disease, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Vol. 26, pp. 3-5.

Rosete J. V., Ríos A., Zarate J.P., Olazarán S., Granados L., Fragoso A., Banda V. M., Socci G. A. (2018), Prevalencia de anticuerpos contra diarrea viral bovina en vacas no vacunadas en los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, México., *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 9, pp. 5-7.

Schaut R. G., Ridpath J. F., Sacco R. E. (2016), Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 Impairs Macrophage Responsiveness to Toll-Like Receptor Ligation with the Exception of Toll-Like Receptor 7, *Plos One*, pp. 5.

Schaut R. G. McGill J. L. Neill J.D. Ridpath J. F. Sacco R. E. (2015) Bovine viral diarrhea virus type 2 in vivo infection modulates TLR4 responsiveness in differentiated myeloid cells which is associated with decreased MyD88 expression, *Virus Research*, Vol. 208, pp. 44-55.

Sharma BR, Karki R, Kanneganti TD. (2019). Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection, *European Journal of Immunology*, Vol. 49, pp. 1998-2011.

Shan Y., Tong Z., Jinzhu M., Yu L., Zecai Z., Chenhua W., Wenjing H., Siyu L., Nannan C., Siyu S., Tongtong B., Jiang H., Biaohui B., Xin J., Yulong Z., Zhanbo Z. (2021), Bovine viral diarrhea virus NS4B protein interacts with 2CARD of MDA5 domain and negatively regulates the RLR-mediated IFN- β production, *Virus Research*, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198471>.

Shrivastava G., León Juárez M., García Cordero J., Meza Sánchez D. E., Cedillo Barrón L. (2016), Inflammasomes and its importance in viral infections, *Immunologic Research Springer*, 64:1101–1117.

Shrivastava G. Valenzuela P.C. Calvo E. (2020) Inflammasome Fuels Dengue Severity, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 10:489.

Solis-Calderon J.J., Segura-Correa V.M., Segura-Correa J.C. (2005), Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors, *Preventive Veterinary Medicine*, Vol. 72, pp. 6-9.

Suda Yuto, Murakami Shin, Horimoto Taisuke (2019), Bovine viral diarrhoea virus non-structural protein NS4B induces autophagosomes in bovine kidney cells, *Archives of Virology*, Vol.164, pp. 2-5.

Suzan Victor M, Unuma Misao, Aguilar Romero E., Murakami Yosuke (1983), Prevalence of Bovine Herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico, *Japanese Journal of Veterinary Research*, Vol. 31, pp. 4-7.

St-Louis M. C., Massie B., Archambault D. (2005). The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation, *Veterinary Research*, Vol. 36. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004059>

Swanson KV, Junkins RD, Kurkjian CJ, Holley-Guthrie E, Pendse AA, El Morabiti R, Petrucelli A, Barber GN, Benedict CA, Ting JP. (2017). A noncanonical function of cGAMP in inflammasome priming and activation, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 214. pp. 3611-3626.

Szymanski M. R., Fiebach A. R., Tratschin J. D., Gut M., Sadafopa Ramanujam V. M., Gottipati K., Patel P., Ye M., Ruggli N., Choi K. H. (2009). Zinc Binding in Pestivirus Npro Is Required for Interferon Regulatory Factor 3 Interaction and Degradation, *Journal of Molecular Biology*, 391, 438-449.

Tautz, N., Tews, B. A., & Meyers, G. (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. *Advances in Virus Research*, 47–160. doi:10.1016/bs.aivir.2015.03.002

Tautz Norbert, Kaiser Astrid, Thiel Heinz-Jürgen (2000), NS3 Serine Protease of Bovine Viral Diarrhoea Virus: Characterization of Active Site Residues, NS4A Cofactor Domain, and Protease–Cofactor Interactions, *Virology*, Vol. 273, pp. 2-4.

Tellinguisen T. L., Paulson M. S., Rise C. M. (2006). The NS5A Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus Contains an Essential Zinc-Binding Site Similar to That of the Hepatitis C Virus NS5A Protein, *Journal of Virology*, Vol. 80, doi:10.1128/JVI.00358-06.

Vande W.L., Stowe I.B., Sacha P., Lee B.L., Demon D., Fossoul A., Hauwermeiren F.V., Saavedra P.H.V., Simon P., Subrt V., Kostka L., Stivala C.E., Pham V.C., Staben S.T., Yamazoe S., Konvalinka J., Kayagaki N., Lamkanfi M. (2019), MCC950/CRID3 potentially targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease associated mutants for inflammasome inhibition, *PLOS biology*, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000354>.

Vilcek S., Paton D., Lowings P., Björklund H., Nettleton P., Belak S. (1999). *Virus Genes*, 18(2), 107–114. doi:10.1023/a:1008000231604

Vilcek S., Greiser-Wilke I., Nettleton P., Paton D. J. (2000). Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates, *Veterinary Microbiology*, Vol. 77, doi: 10.1016/s0378-1135(00)00269-8.

Wang F.I, Deng M.C., Huang Y. L., Chang C. Y. (2015). Structures and Functions of *Pestivirus* Glycoproteins: Not Simply Surface Matters, *Viruses*, 7, 3506-3529; doi:10.3390/v7072783.

Wang S., Hou P., Pan W., He W., He D. C., Wang H., He H. (2021), DDIT3 targets innate immunity via the DDIT3-OTUD1-MAVS pathway to promote bovine viral diarrhea virus replication, *Journal of Virology*, 95:e02351-20.

Warrener P. and Collett M. S. (1995). *Pestivirus* NS3 (p80) Protein Possesses RNA Helicase Activity, *Journal of Virology*, Vol. 69, doi: 10.1128/JVI.69.3.1720-1726.1995.

Weiskircher E., Aligo J., Ning G., Konan K. V. (2009). Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes, *Virology Journal*, 6:185, doi:10.1186/1743-422X-6-185.

Yu Junyang, Wu Yuzhang, Wang Jingxue (2017), Activation and Role of NACHT, LRR, and PYD Domains-Containing Protein 3 Inflammasome in RNA Viral Infection, *Frontiers in Immunology*, Vol. 8, pp. 4-7.

Zahoor M. A., Yamane D., Mohamed Y. M., Suda Y., Kobayashi K., Kato K., Tohya Y., Akashi H. (2010). Bovine viral diarrhea virus non-structural protein 5A interacts with NIK- and IKKb-binding protein, 91, 1939–1948, DOI 10.1099/vir.0.020990-0.

Zhao C y Zhao W. (2020), NLRP3 inflammasome, a key player in antiviral responses, *Frontiers in Immunology*, 11:211.

Zheng Y., Liu Q., Wu Y., Ma L., Zhang Z., Liu T., Jin S., She Y., Li Y., Cui J. (2018), Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1 - caspase-1 axis, *The EMBO Journal*, 37: e99347.

Zheng D., Liwinski T., Elinav E. (2020), Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms, *Cell Discovery*, 6:36.

Zhong W., Gutshall L. L., Del Vecchio A. M. (1998). Identification and Characterization of an RNA-Dependent RNA Polymerase Activity within the Nonstructural Protein 5B Region of Bovine Viral Diarrhea Virus, *Journal of Virology*, Vol. 72, doi: 10.1128/JVI.72.11.9365-9369.1998.

ANEXO 1

PBS 10 X

Cloruro de sodio (NaCl)	87.7 gs
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	1.5 gs
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	13.0 gs
Agua destilada dH ₂ O c.b.p	1000 ml

Esterilizar por filtrado en poro 22µm.

PBS 1 X

PBS 10 X	100 ml
Agua destilada dH ₂ O c.b.p.	1000 ml

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22µm

PBS-CITRATO

PBS 10X	100 ml
Ácido cítrico trisódico (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ .2H ₂ O)	3.72 gs
Agua destilada dH ₂ O c.b.p.	1000 ml

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22µm

C-RPMI

RPMI medium 1640	16.4 gs
L-glutamina	10 ml
MEM- no aminoácidos esenciales	10 ml
Piruvato Na al 7.5%	10 ml
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	2 gs

Agua destilada d H2O c.b.p 1000 ml

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22µm

DMEM 10% SFB

Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) 6.75 gs

HEPES 2.97 gs

Bicarbonado de sodio (NaHCO3) 1.85 gs

Suero Fetal Bovino 50 ml

Agua destilada dH2O c.b.p 500 ml

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22µm