

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO E INTERLEUCINA 1 BETA EN
MACRÓFAGOS INFECTADOS CON LA CEPA NADL DEL VIRUS DE LA
DIARREA VIRAL BOVINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

PRESENTA

YAHIEL FRANCISCO LÓPEZ REYES

Asesores

MVZ Alejandro Benítez Guzmán

QFB, Rosa Elena Sarmiento Silva

Ciudad Universitaria, Cd Mx.

Mayo 2018



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 mis padres, Francisco y Olivia, por todo el esfuerzo invertido en la búsqueda por brindarnos las mejores condiciones para superarnos y realizar nuestras metas y deseos personales. Papá, gracias por todo el sacrificio físico que hoy pesa a modo de cansancio sobre tus hombros y arrugas en tu rostro para que nosotros solo nos preocupáramos por estudiar. Mamá, gracias por el amor que nos dedicas en cada gesto invaluable de tu labor del día a día, por cada una de esas noches de desvelo acompañando mi estudio y cada vez que te desmañanaste por asegurarte que no empezase tarde y en ayuno un nuevo día. Jamás podré pagarles todo lo que han hecho por nosotros.

A mis maestros, por todo el entusiasmo con el que me compartieron su conocimiento, la paciencia con la que siempre escucharon mis incansables preguntas y todo el aprecio demostrado. Ahora conozco las mañanas y tardes dedicadas, el trabajo y el cariño que pusieron a sus alumnos. Por la esperanza mantenida en germinar mejores personas de cada semillero de una juventud indiferente sabiendo que el fruto será cosechado por otras manos y por la noble labor que realizan, mejorando el mundo desde el anonimato me gustaría dedicarles parte de mi esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo del proyecto PAPIIT IA 205010 Detección del inflamasoma en la infección por el virus de la diarrea viral bovina en macrófagos bovinos.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y al Dr. Alejandro Benítez Guzmán por su guía en la elaboración de este trabajo, en el inicio de mi formación científica y por su amistad.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y la Dra. Lourdes Arriaga Pizano por las facilidades para poder realizar los experimentos en los laboratorios de investigación en tuberculosis y brucelosis de la FMVZ, UNAM; laboratorio de virología, FMVZ, UNAM y la Unidad de Inmunobioquímica, Centro médico siglo XXI, respectivamente.

A los MVZ Ma. Grisel Anaya Santillán, Pablo Hernández Peralta, Marion Galindo Castañeda y Naomi Gutiérrez Santiago por contribuir de manera indirecta pero muy significativa a mi formación en este proceso.

Al personal del área de bovinos del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ, UNAM, en especial al Dr. Julio, a Jesús y a Luis por las facilidades prestadas durante la toma de muestras sanguíneas a los bovinos.

A mis amigos Gabriel, Debra, Dalia, Alicia, Amílcar, Rolón, Lucia, Colín, Charly, Regina, Fany, Nico, Marco, Erick, Pablo, Carlos y Joaquín “Chispa” por acompañarme en las más increíbles historias hasta un momento significativo en mi vida. A Lalo “Lobito”, Alex, Andrés, Ley, Daniel y Brizna por su apoyo y amistad dentro y fuera de los entrenamientos.

A las personas que me ofrecieron su valiosa amistad durante este proceso (Tere, Aldo, Omar, Adriana, Itzel, Montse, Tzayhri, Osman, Ninnet, Silvia, Azaf, Itzel Nallely, Belem, Lázaro, Alicia, Lalo, Laurita, Moni, Erika, Adrián, Ángel, Jonathan, Adriana Marcela y Skarlet) por su amistad, consejo y apoyo.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Características generales del virus de la diarrea viral bovina	2
2.2 Enfermedad de las mucosas	3
2.3 Cuadros clínicos	4
2.4 Importancia reproductiva del virus de la diarrea viral bovina	5
2.5 Importancia del virus a nivel mundial y nacional	6
2.6 BVDV y el sistema inmune	8
2.7 Óxido nítrico e IL-1 β	10
2.8 Justificación	12
2.9 Objetivo	13
2.10 Hipótesis	13
3. MATERIAL Y METODOS	13
3.1 Animales	13
3.2 Aislamiento de monocitos	14
3.3 Cosecha de macrófagos	15
3.4 Fenotipificación	16
3.5 Propagación y titulación viral	16
3.6 Infección de macrófagos	17
3.7 Producción de óxido nítrico	18
3.8 Interleucina 1 beta secretada	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Propagación viral	19
4.2 Titulación viral	22
4.3 Fenotipificación	24
4.4 Producción de óxido nítrico	25
4.5 Secreción de interleucina 1 beta	26
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	30
7. REFERENCIAS	30
8. ANEXOS	36
ANEXO I Procedimiento para la determinación del título viral del lote 1 a través del método de Reed & Muench	36
ANEXO II Procedimiento para la determinación del título viral del lote 2 a través del método de Reed & Muench	37

FIGURAS

Fig.1 Características generales y genoma del virus de la diarrea viral bovina.	3
Fig. 2 Diferentes cuadros clínicos y dinámica de infección del virus de la diarrea viral bovina.	5
Fig. 3 RT-PCR de BVDV realizada al modelo experimental.	20
Fig. 4 Propagación de la cepa NADL del virus de la Diarrea Viral Bovina en células MDBK.	21
Fig. 5 Titulación viral.	23
Fig. 6 Expresión de CD14 en el cultivo primario de células mononucleares.	24
Fig. 7 Producción de óxido nítrico en macrófagos infectados con diferentes MOI de BVDV.	25
Fig. 8 Secreción de IL-1 β en macrófagos infectados con diferentes MOI de BVDV.	26

1. RESUMEN

LÓPEZ REYES YAHIEL FRANCISCO. Producción de óxido nítrico e interleucina 1 beta en macrófagos infectados con la cepa NADL del virus de la diarrea viral bovina (bajo la dirección de: MVZ Alejandro Benítez Guzmán y QFB Rosa Elena Sarmiento Silva).

El virus de la diarrea viral bovina afecta la salud del ganado bovino y provoca pérdidas millonarias a la producción pecuaria e industria lechera poniendo en riesgo la seguridad alimentaria en todo el mundo. La capacidad del virus para infectar células presentadoras de antígeno que producen moléculas microbidas como el óxido nítrico y la IL-1 β y que participan en la inflamación, representa un elemento clave en la infección. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad del virus para inducir en macrófagos, la producción de óxido nítrico e IL-1 β como elementos inflamatorios de la inmunidad innata. Se infectaron macrófagos derivados del cultivo de monocitos fenotipificados como CD14 (+) con la cepa NADL del virus de la diarrea viral bovina con 3 multiplicidades de infección (0.001, 0.1 y 10), se evaluó la producción de óxido nítrico por medio de la reacción de Griess, así como, la concentración de IL-1 β con la prueba de ELISA. Nuestros resultados no mostraron cambios en la producción de óxido nítrico en las condiciones evaluadas, mientras que la producción de IL-1 β mostró un aumento solo a una multiplicidad de infección de 10. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de la modulación de la respuesta inmune innata por el virus, al mostrar en macrófagos infectados la falta de inducción de óxido nítrico, con las multiplicidades de infección estudiadas, mientras que la producción de IL-1 β fue inducida únicamente con una alta dosis viral.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características generales del virus de la diarrea viral bovina

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV por sus siglas en inglés), pertenece al género *pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, junto con los virus causantes de la enfermedad de las fronteras en los ovinos y la fiebre porcina clásica o cólera porcino. Los miembros de este género poseen morfología icosaédrica y están rodeados por una envoltura viral; su genoma es de una longitud aproximada de 12.5Kb y está conformado por ARN de una sola cadena de sentido positivo (Figura1) (1,2). Por su efecto en cultivo celular, se distinguen 2 biotipos del virus (3,4): uno citopático (Cp); que provoca la destrucción y vacuolización celular y uno no citopático (nCp); el cual no induce cambios visibles en los cultivos. Los principales cuadros clínicos asociados a la infección por el virus se relacionan con el sistema reproductivo, digestivo y respiratorio, el virus puede infectar como agente primario o formando parte de complejos con otros patógenos, como en el caso del complejo respiratorio. Ambos biotipos del virus pueden provocar un amplio espectro de presentaciones que varían desde infecciones subclínicas, agudas y crónicas, hasta formas hiperagudas de la enfermedad, en función principalmente del estatus inmune del animal (5). Un rasgo importante de los pestivirus es que no guardan especificidad por su hospedero, por lo que el BVDV además de bovinos, puede afectar a borregos, así como a otros rumiantes domésticos y silvestres; además puede ser aislado de cerdos. Debido a la estrecha relación antigénica que guardan los pestivirus, se pueden detectar resultados falsos positivos entre sus miembros, como en el caso de cerdos positivos para fiebre porcina clásica, en realidad infectados con el virus de la diarrea viral bovina(3).

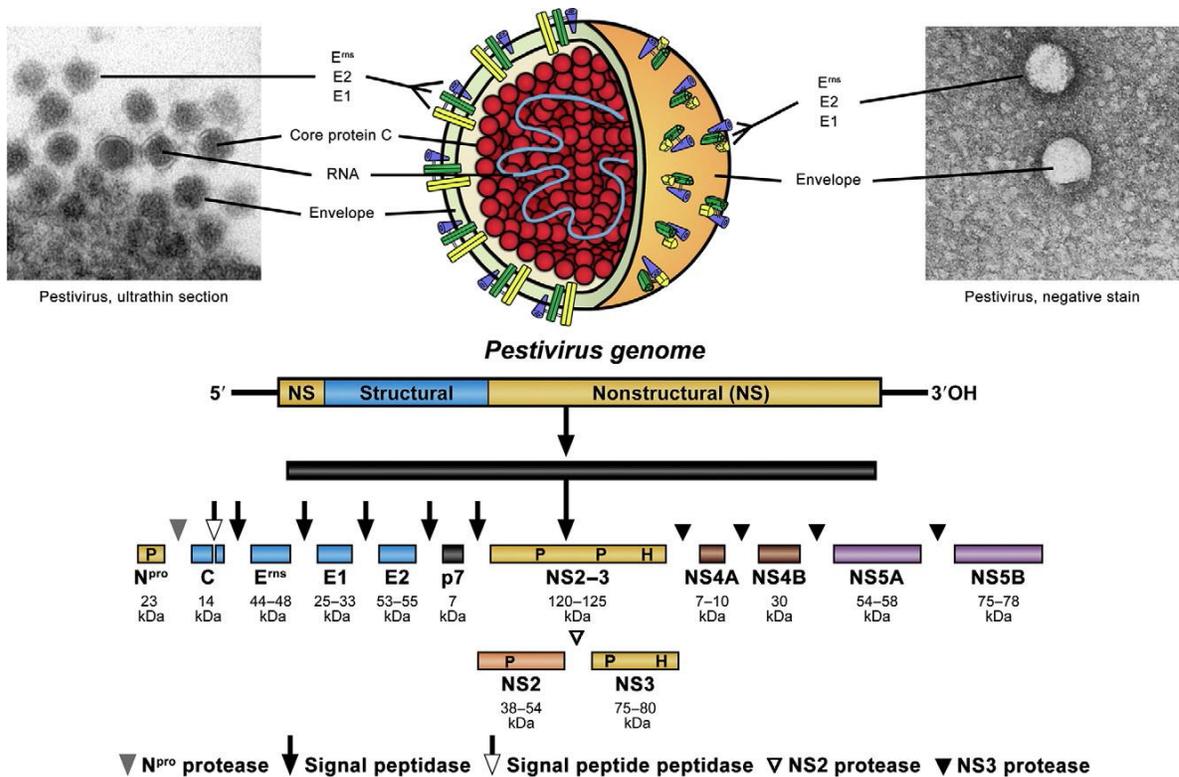


Figura 1. Características generales y genoma del virus de la diarrea viral bovina. Tomado de Tautz N, Tews BA, Gregor M. The molecular biology of pestiviruses. En: Advances in virus research. 2015. p. 47–160.

2.2 Enfermedad de las mucosas

Tanto el biotipo citopático como el no citopático, tienen la capacidad de infectar a vacas gestantes y transmitirse verticalmente. Sin embargo, cuando la infección se presenta entre el día 90 y 120 de la gestación por el biotipo no citopático, ésta puede provocar en el feto tolerancia inmunológica hacia el virus. Los becerros inmunotolerantes pueden presentar retraso en el crecimiento o mostrarse clínicamente sanos, pero en realidad presentan una infección persistente y eliminan al virus durante toda su vida; constituyéndose de este modo como los principales reservorios y diseminadores del virus (6)(5)(7). Debido a la tolerancia hacia el virus, cuando los animales persistentemente infectados (PI) presentan una superinfección con otro BVDV antigénicamente similar pero perteneciente a un biotipo

citopático, son incapaces de montar una adecuada respuesta adaptativa y desarrollan el cuadro conocido como “enfermedad de las mucosas”, caracterizado por hemorragias en diferentes puntos del tracto gastrointestinal, diarrea y mortalidad del 100% (3)(6)(5).

2.3 Cuadros clínicos

La capacidad del virus de causar efectos en múltiples sistemas, ocasiona diferentes manifestaciones clínicas y hallazgos a la necropsia. Los signos que se observen son el resultado de una compleja interacción entre factores del hospedero (animales inmunocompetentes o tolerantes al virus, estado gestacional, etapa del desarrollo embrionario, prácticas de inmunización pasiva o activa previas a la infección), y las características del virus (variabilidad antigénica y genómica). En este sentido, se conocen las lesiones en el feto abortado (atrofia de la retina, hipoplasia cerebelar y pulmonar) y existen cuadros descritos para diferentes etapas: becerros no calostrados (fiebre en 2 etapas, leucopenia, anorexia y diarrea de severidad variable), becerros seronegativos de 6 meses de edad (descarga nasal serosa y leucopenia), bovinos adultos inmunocompetentes seronegativos (infección aguda subclínica o con fiebre ligera, leucopenia y disminución en la producción láctea), infección aguda clínica de bovinos adultos inmunocompetentes seronegativos (lesiones erosivas y ulcerativas en la cavidad oral, disminución en la producción láctea, diarrea, fiebre, anorexia, letargo, leucopenia, descarga nasal y ocular), infección severa aguda (fiebre, neumonía y muerte repentina afectando a todos los grupos de edad con hallazgos a la necropsia similares a la enfermedad de las mucosas), un síndrome hemorrágico (una variante de la infección aguda severa con trombocitopenia, petequias y equimosis en mucosas, epistaxis, diarrea sanguinolenta, sangrado de sitios de inyección o

trauma, fiebre, leucopenia y muerte) e inclusive los escasos sobrevivientes a la enfermedad de las mucosas pueden desarrollar la forma crónica de ésta con diarrea intermitente, debilidad, anorexia y lesiones cutáneas no cicatrizantes (Figura 2) (8).

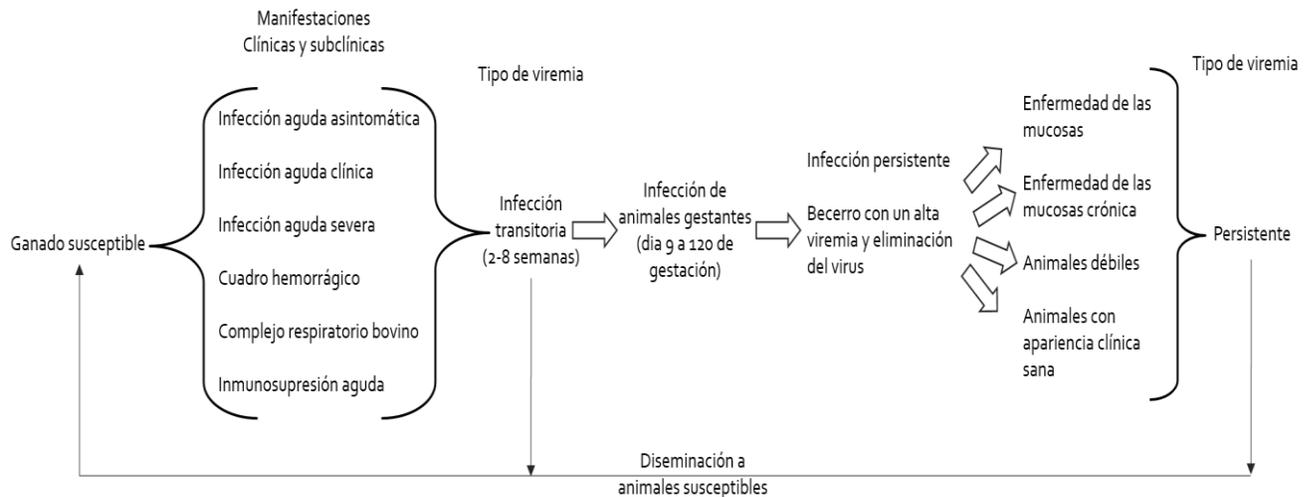


Figura 2. Diferentes cuadros clínicos y dinámica de infección del virus de la diarrea viral bovina. Traducido de Evermann JF, Barrington GM. Clinical features. En: Goyal SM, Ridpath JF, editores. Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, Management and control.

2.4 Importancia reproductiva del virus de la diarrea viral bovina

Los efectos reproductivos del BVDV incluyen disminución de la fertilidad, infección y muerte embrionaria, malformaciones en el feto y aborto, (6), mortinatos y disminución en la producción láctea. A diferencia de los animales persistentemente infectados, los fetos expuestos al virus en el último tercio de la gestación desarrollan una infección de carácter transitorio y son capaces de eliminar al virus. Éstos animales presentan anticuerpos contra el virus antes del consumo de calostro, como consecuencia de la seroconversión que realizan en vida intrauterina(6). Las novillas pueden infectarse por monta natural o inseminación artificial a partir del semen proveniente de toros infectados, así como por embriones provenientes de hembras persistentemente infectadas. Durante el proceso de transferencia de

embriones, estos pueden ser infectados como consecuencia del uso de semen o suero fetal bovino contaminados. (9–11). El virus, además de provocar disminución en la calidad del semen, puede mantenerse activo en él hasta 2.75 años, después de la infección aguda (5). En Europa se han reportado brotes con cuadros hiperagudos, asociados a vacunas contra herpes virus bovino tipo-1 (BHV-1), contaminadas con BVDV (3,12), así mismo, se conoce la transmisión por el reuso de agujas, narigueros y guantes de palpación, así como por vectores mecánicos como moscas (11).

2.5 Importancia del virus a nivel mundial y nacional

El BVDV tiene una distribución mundial, ocasionando importantes pérdidas económicas. En un estudio de revisión realizado entre los años 1970 y 2000 en Europa, establecieron que el 50% de los hatos poseían animales persistentemente infectados (PI) (13). Se pueden alcanzar niveles máximos de 0.5 a 2% de estos animales y de un 60 a un 85% del hato seropositivo en función de determinantes epidemiológicos particulares como la estructura y densidad de la población animal, el comercio de animales, sistemas de manejo y alojamiento, así como prácticas de pastoreo común (11). En 1999 Houe reportó que la detección de anticuerpos contra BVDV mostraba una prevalencia de hatos infectados entre 70 y 100% (11). Al nacimiento de un animal PI, la infección secundaria a animales susceptibles comienza rápidamente y en condiciones de confinamiento cercano puede infectar más del 90% del hato entre los 3 y 6 meses de edad (11). El impacto del virus y las pérdidas económicas varían en función de la duración de la infección, la inmunidad del hato, el estado gestacional de las vacas al momento de la infección, la virulencia de la cepa, así como la prevalencia de la enfermedad y las condiciones de manejo.

En Dinamarca, Houe (1992), elaboró un modelo para estimar las pérdidas económicas en donde, tomando una incidencia anual de infecciones agudas del 34%, encontró pérdidas anuales totales de 20 millones de USD por millón de partos cuando utilizó un virus de baja virulencia, y de 57 millones de USD por millón de partos con un virus de alta virulencia. Con este mismo modelo, estimó que las máximas pérdidas económicas se producían al utilizar incidencias de 65% para los virus de alta virulencia y de 45% (correspondiente a una prevalencia de 3.4% de animales nacidos PI), para los virus de baja virulencia (11).

En un estudio que analizó las publicaciones de todo el mundo referentes a pérdidas económicas por diarrea viral bovina, de 30 años previos al 2015, se encontró que 36 de las 44 evaluaciones fueron hechas en Europa y que el promedio de pérdidas directas por animal al año varió desde 2.4 a 687.80 dólares (ajustados a USD de 2015). El promedio de pérdidas directas por vaca lechera susceptible o “naive” fue 199.050 USD, en los bovinos de carne 174.60 USD, y en hatos que no han tenido contacto con el virus las pérdidas económicas son 3 veces mayores que en hatos con la infección (14).

Por otra parte, en una revisión de la situación en Europa de los años 70's a 2000's, las pérdidas a nivel de nación en condiciones endémicas fueron estimadas en 8.5-34 euros por parto y 48 euros con cepas virulentas. En “brotes clásicos”, donde la mayoría de las infecciones transitorias son desapercibidas, los daños económicos se atribuyen a desordenes reproductivos y animales PI, éstas son estimadas entre 21 y 135 euros por vaca mientras que las pérdidas con infecciones concomitantes o con cepas virulentas son superiores a 340 euros por vaca de hato en brote. En el mismo estudio se calcularon erogaciones de 54 euros por cada bovino de carne (13).

A pesar de la cantidad de estudios realizados a la fecha, la situación general de esta enfermedad en el mundo aún no ha sido completamente determinada debido a que, en muchos países, hay carencia de datos cuantitativos o existe dificultad para evaluar las pérdidas económicas directas atribuibles a la infección viral. Dado que hay factores que influyen en los modelos descriptivos o predictivos como la mortalidad, morbilidad, eliminación de animales, cantidad de mortinatos, abortos, valores estimados de incidencia o de la probabilidad de que ocurran ciertas erogaciones y no otras en función de los diferentes resultados de la infección, la variación descrita en el impacto económico está relacionada con los factores que son considerados por los estudios y los diferentes efectos del virus, por lo que la comparación entre países es difícil y se sugiere sea interpretada con precaución (14).

En el caso de México, esta enfermedad se encuentra presente en la mayor parte del territorio nacional. Las prevalencias van desde 55% para el estado de Sinaloa hasta 98% en el caso de Aguascalientes. A través de estudios serológicos, la prevalencia nacional se ha estimado en un 79%, sin embargo, no se considera la interferencia por anticuerpos vacunales para la determinación de dicho valor (15).

2.5 BVDV y el sistema inmune

El BVDV es un virus pantotrópico que destaca por su papel inmunosupresor, puesto que, infecta a granulocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8 (16). El receptor de superficie CD46, comúnmente conocido por regular la activación del complemento y actuar como factor coestimulante que induce la diferenciación de los

linfocitos T CD4⁺ a linfocitos T reguladores es reconocido como el receptor del virus en el hospedero (17). Sin embargo, de acuerdo a la base de datos UNIPROT, esta molécula está presente en todas las células con excepción de los eritrocitos (18). Se suele aceptar de manera general que el biotipo citopático induce la producción interferón tipo I (IFN I), aunque existe evidencia de que el biotipo citopático de la cepa NADL es incapaz de tal efecto (19). Se ha observado que el biotipo no citopático inhibe la expresión de IFN I y la apoptosis inducida con Poly(IC), un ARN sintético de doble cadena (20), al parecer provocando la poliubiquitinización y degradación del factor regulador del interferón 3 (IRF-3, por sus siglas en inglés interferón regulatory factor)(19). Se presume que esta aparente capacidad para modular la expresión de un mecanismo de la inmunidad innata de aparición temprana en vida embrionaria, por parte del biotipo no citopático del BVDV, es en parte la responsable de la tolerancia hacia el virus (21).

En el caso particular de las células presentadoras de antígeno, se han encontrado resultados diversos, Rajput y col. (2014), observaron que los monocitos son más susceptibles a la infección con el virus en comparación con células dendríticas generadas a partir de monocitos. En el mismo estudio se observó , un incremento en la expresión de MHC I, MHC II y CD86 en la superficie de las células dendríticas infectadas con el biotipo citopático, mientras que la expresión de estas proteínas disminuyó cuando utilizaron cepas del biotipo no citopático (22). Por otro lado, en un estudio semejante con monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos infectadas con un biotipo citopático o uno no citopático, pero de la misma cepa (par citopático/no citopático), no encontraron diferencias en la expresión de las moléculas de superficie analizadas, que incluyeron al MHC I, MHC II, CD14, CD11a, CD11b y al receptor de manosa (23). En el caso de macrófagos, al infectarse con un aislado

del biotipo citopático, se observó disminución en la expresión de FcR y C3R, así como en su actividad microbicida y fagocítica (24). Los macrófagos y dendríticas son células consideradas orquestadoras de la respuesta inmune, puesto que pueden secretar citocinas que favorecen la inflamación como IL1 β y moléculas microbicidas como el óxido nítrico.

2.4 Óxido nítrico e IL-1 β

En 1989 se demostró al aminoácido L-arginina el precursor del óxido nítrico, un gas que cumple una función microbicida dentro del sistema inmune, para la síntesis de éste, una molécula de L-Arginina es trasladada al interior celular por medio de un transportador para aminoácidos catiónicos y sumada a una molécula de oxígeno, para producir N-hidroxi-L-Arginina y posteriormente pasar a óxido nítrico y L-Citrulina (25). La reacción es catalizada por la sintasa del óxido nítrico que, además de requerir a la L-Arginina como sustrato, necesita de calmodulina y 4 cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavin adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) y dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH)(26). Se reconocen 3 isoenzimas de la enzima óxido nítrico sintasa: 2 constitutivas (cNOS) dependientes de calcio, y una inducible (del inglés inducible nitric oxide synthase NOS2 o iNOS) independiente de calcio. Las isoformas con expresión constitutiva son la endotelial (eNOS o NOS3) y la neuronal (nNOS o NOS1)(26). Entre diversos tipos celulares, la iNOS se encuentra en macrófagos, ésta isoforma es generada de *Novo* en respuesta a estímulos como el lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS), el interferón gama (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), y cataliza la producción de grandes cantidades de óxido nítrico (27,28).

A temperatura ambiente y presión atmosférica, el óxido nítrico es un gas tóxico, sin embargo, en condiciones fisiológicas desempeña importantes funciones dentro del organismo como síntesis del músculo liso vascular, vasodilatación y neurotransmisión (29). En el sistema inmune interviene en la diferenciación, proliferación y apoptosis de células inmunes, producción de citocinas, expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, inhibe la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio, impide el “Rolling”, adhesión firme y diapédesis de monocitos y granulocitos, disminuye la expresión de moléculas de adhesión e integrinas en neutrófilos y puede modular la expresión de quimiocinas, participa en procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes (25); su efecto en procesos tumorales varía de acuerdo a la estirpe tumoral y el microambiente (30), sin embargo, el papel más conocido de óxido nítrico es en la inmunidad innata, como parte del estallido respiratorio a través del cual, las células fagocíticas desempeñan un efecto antimicrobiano importante por la producción de especies reactivas de nitrógeno o RNI (del inglés reactive nitrogen intermediates), y especies reactivas de oxígeno o ROI (del inglés reactive oxygen intermediates) (27). Debido a su naturaleza gaseosa, el óxido nítrico no puede ser almacenado en vesículas ni ser exocitado, en consecuencia, puede difundir desde cualquier punto donde se encuentre la enzima y actuar sin la necesidad de receptores de superficie. Al tener un electrón desapareado, puede reaccionar con otros radicales libres (RNI y ROI como: peroxinitritos, oxígeno, anión superóxido), unirse a metales de transición, bases pirimídicas en el DNA o covalentemente al grupo prostético heme, inactivar enzimas, añadir grupos nitroxilo a una proteína y ser transportado por grupos thiol así como unirse a factores de transcripción y componentes de cascadas de señalización(25).

Como resultado del proceso inflamatorio y de la interacción de un agente infeccioso con neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, éstas células, pueden secretar interleucinas pertenecientes a la familia de la interleucina 1, entre estas se encuentran la IL-1 β e IL-18 (31). Se cree que las citocinas de esta familia, evolucionaron como un mecanismo para amplificar o transmitir un mensaje de daño hacia células que no pueden reconocer estas señales de manera directa. Neutrófilos, monocitos y macrófagos son fuentes importantes de este tipo de citocinas (32). La producción de IL-1 β requiere del ensamblaje y activación de un complejo multiprotéico denominado inflammasoma (31). Al igual que el óxido nítrico, es un elemento ampliamente reconocido de la respuesta inmune innata y alteraciones en su producción han sido relacionadas con la forma en que se desarrollan diversas enfermedades (33,34).

2.5 Justificación

La infección con el BVDV, se ha asociado con inmunosupresión predisposición a infecciones secundarias, leucopenia, linfopenia y trombocitopenia. Debido al impacto que tienen los diferentes cuadros agudos, así como su contribución al desarrollo de animales persistentemente infectados, es importante el estudio de la estrecha relación entre los mecanismos de la respuesta inmune innata y los mecanismos evasores o moduladores de la respuesta inmune por parte del virus.

En la patogenia de la Diarrea Viral Bovina, un elemento clave es la capacidad del virus de replicarse en tejido linfoide y células presentadoras de antígeno; cuando éstas células son infectadas, pueden verse mermadas en número y alteradas en sus funciones, por lo que es

necesario conocer si el virus induce moléculas clave de la respuesta inmune innata, como son el óxido nítrico y la interleucina 1 beta, debido al papel que por su efecto inflamatorio o antimicrobiano pueden desempeñar en la patogenia de la enfermedad y la diseminación del virus.

2.6 Objetivo

Identificar la capacidad del biotipo citopático de la cepa NADL del virus de la diarrea viral bovina para inducir óxido nítrico e IL-1 β , en un cultivo de macrófagos bovinos, para asociarlo con la activación del inflammasoma.

2.7 Hipótesis

La infección por el biotipo citopático de la cepa NADL del virus de la diarrea viral bovina, inducirá la producción de óxido nítrico e interleucina-1 β en macrófagos bovinos.

3. Material y métodos

3.1 Animales

Se emplearon muestras sanguíneas de bovinos clínicamente sanos, alojados en las instalaciones del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2 Aislamiento de monocitos

La obtención de monocitos bovinos, se llevó a cabo con base en una modificación de los protocolos de Campbell y Adams en 1992 (35), y Adler (36). Se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular, de manera aséptica, se utilizó Ácido Cítrico Dextrosa o “ACD” (Citrato trisódico 75mM, ácido cítrico 38mM y dextrosa 142mM; pH5) como anticoagulante, a una proporción de 10mL de ACD por cada 50mL de sangre; estas muestras fueron procesadas antes de las 4 horas posteriores a su colección. La sangre se centrifugó dentro de tubos de polipropileno de 50 ml, a 1000 xg durante 30 min para obtener las capas leucoplaquetaria, que se depositaron un tubo nuevo y resuspendidas con plasma autólogo, hasta alcanzar un volumen de 30 mL. La suspensión fue transferida a un tubo con 15mL de una solución comercial, conformada por polisucrosa y diatrizoato de sodio a una densidad de 1.077g/ml (Histopaque-1077, Sigma Aldrich #ref 10771), a una relación 2:1, posteriormente se centrifugó a 1000 xg durante 30 min. Se colectó la interfase de células mononucleares libre de eritrocitos y se realizaron lavados de 15 minutos con PBS Citrato (Cloruro de sodio 150mM, fosfato de sodio monobásico 1.25mM, fosfato de sodio dibásico 9.15mM, ácido cítrico trisódico 17.7mM; pH 7.4), a 500 G. Los leucocitos fueron resuspendidos en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (con L-glutamina y 25mM HEPES, Sigma Aldrich R4130), sembrados en una placa de 6 pozos de ultrabaja adherencia (Corning No. Cat. 3471) e incubados a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda, durante 2 horas, al término de este tiempo, el sobrenadante se transfirió a otro pozo y se reemplazó por medio (RPMI 1640) suplementado con 12% de suero autólogo, para su incubación definitiva en las mismas condiciones de temperatura, humedad y CO₂. Los monocitos obtenidos de esta manera, fueron mantenidos en dichas condiciones con cambios totales de medio de cultivo

celular, a intervalos de 3 días y observados diariamente hasta su diferenciación a macrófagos, lo cual ocurrió después de un periodo de 13 días. Para todos los experimentos, se utilizaron medios y reactivos estériles y libres de lipopolisacárido (LPS). El medio RPMI utilizado, fue suplementado hasta obtener una concentración 1mM de L-glutamina, 0.5mM de piruvato de sodio y con 5ml de aminoácidos no esenciales 100X por litro.

3.3 Cosecha de Macrófagos

Después de 13 días de cultivo, se reservó el sobrenadante en un tubo de polipropileno de 50ml y las células adheridas se despegaron con EDTA 2mM en PBS 1X (EDTA 2mM, cloruro de sodio 150mM, fosfato de sodio monobásico 1.25mM, fosfato de sodio dibásico 9.15mM). Posteriormente, la placa se incubó 15 minutos sobre una superficie de hielo, mientras el sobrenadante fue centrifugado a 500 G y 4°C durante 5 minutos. Terminada la incubación en frío y por medio de una pipeta de transferencia, las células fueron despegadas gentilmente y depositadas con las células recuperadas del sobrenadante, el desprendimiento celular en la placa se confirmó observándola en un microscopio invertido. Se tomó una muestra de la suspensión para realizar el conteo celular por medio de una cámara de Neubauer (hemocitómetro) y se centrifugó el tubo a 500 G durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó la cantidad necesaria de RPMI con 12% de suero autólogo, para ajustar la suspensión a una densidad de 1000 células por μL . Los macrófagos fueron sembrados en una placa de cultivo de 24 pozos, a una densidad de 3×10^5 macrófagos por pozo y se agregaron 500 μl más de medio, para evitar estrés celular por evaporación del mismo. Los macrófagos cosechados fueron incubados a 37°C con 5% de CO₂ en una atmosfera húmeda, durante 48 horas antes de realizar los ensayos de infección.

3.4 Fenotipificación

Para confirmar la diferenciación a macrófagos, se analizó la expresión del marcador de superficie CD14, el cual está presente en macrófagos. Para lo cual, se utilizó un conjugado murino elaborado con anticuerpos contra CD14 marcados con isotiocianato de fluoresceína “FITC” (CD14-FITC antibodies human, MACS Miltenyi Biotec No. Ref. 130-080-701), su uso se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se realizó una suspensión con las células en 100µL de buffer (EDTA 2mM EDTA en PBS 1X), a la cual se agregaron 10µL del anticuerpo, obteniéndose una dilución 1:11, que se incubó 10 minutos en oscuridad, a 4°C. Se realizaron lavados de 5 minutos a 500 G con el buffer y las células se resuspendieron en el mismo, antes de su procesamiento en un citómetro FACS ARIA.

3.5 Propagación y titulación viral

Para propagar el virus, se utilizó la línea celular MDBK, correspondiente a células renales bovinas (ATCC® CCL-22) y la cepa NADL (ATCC® VR-1422), perteneciente al biotipo citopático del BVDV. Debido a la problemática asociada a la contaminación de líneas celulares con el BVDV y previo a su uso, las células fueron analizadas a través de la técnica de RT-PCR utilizando primers en proceso de patente, utilizados para el diagnóstico molecular de la enfermedad, facilitados amablemente por la QFB Rosa Elena Sarmiento Silva. Durante su expansión y hasta el momento de realizar la propagación viral, las células MDBK fueron cultivadas en atmosfera húmeda, a 37°C con 5% CO₂, y medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) libre del virus. Posteriormente, el porcentaje de SFB en el medio se reemplazó por un 2% y se agregó la cepa NADL del virus en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, después se agregó más medio de mantenimiento sin eliminar el

sobrenadante. Las células infectadas fueron observadas diariamente durante 4 días, para detectar la presencia de efecto citopático. Posteriormente, las células fueron sometidas a un proceso de sonicación, generándose 2 lotes del virus. Para la titulación viral se prepararon placas de cultivo celular de 96 pozos, con células MDBK a una confluencia aproximada de 95%, y se expusieron a diluciones seriadas de los 2 lotes de virus. El título viral se determinó por el método de Reed and Muench.

3.6 Infección de Macrófagos

A las 48 horas de haber realizado la cosecha y siembra de los macrófagos derivados de monocitos bovinos (MDMB), se llevaron a cabo los ensayos de infección a diferentes multiplicidades de infección (MOI) (0.001, 0.1 y 10). Las MOI empleadas se seleccionaron con base en los resultados (sin efecto, vacuolización y destrucción celular discreta o destrucción celular evidente, respectivamente) observados previamente. Se eliminó el sobrenadante, se realizaron 3 lavados con 500 μ L de PBS 1X y se agregaron 200 μ L de RPMI reemplazando el suero autólogo por 10% de SFB (Gibco #ref: 16000-044). Se utilizaron macrófagos cultivados solamente con RPMI 10% SFB a manera de controles negativos, mientras que a los controles positivos se les agregaron 200ng de extracto puro de LPS de *E. coli* O26:B26, cepa lisa (Sigma, #ref: L8274). La incubación de los MDMB, se realizó en cámara húmeda para evitar la evaporación y concentración de los analitos a evaluar. Después de las 24 horas post-infección (p.i), se recolectaron los sobrenadantes y se lisaron las células usando un buffer con inhibidores de proteasas para obtener el extracto celular. Los sobrenadantes y lisados celulares fueron almacenados a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

3.7 Producción de óxido nítrico

A diferencia de otros neurotransmisores y moléculas del sistema inmune el óxido nítrico no se almacena, por su naturaleza gaseosa éste difunde y reacciona rápidamente con otros elementos, por lo que su vida media es de segundos. Debido a esto su cuantificación directa es difícil, prefiriéndose el uso de métodos indirectos (29). La activación de los macrófagos y producción de óxido nítrico, se evaluó a partir de la acumulación de nitritos en el sobrenadante de los cultivos, utilizando para ello la reacción de Griess (28,37,38), por medio de un kit comercial (Griess Reagent System, PROMEGA, #ref G2930). Este ensayo se fundamenta en la reacción de disociación de sulfonamida y diclorhidrato de naftiléndiamina o NED (N-1-naphthylethylendiamine dihydrochloride) bajo condiciones ácidas proporcionadas por el ácido fosfórico, descrita por primera vez por Griess en 1879. Con base en las especificaciones del fabricante, se realizaron diluciones seriadas para generar una curva de nitrito de sodio que se usó como referencia para interpolar los valores de absorbancia de las muestras y determinar los nitritos presentes. La coloración de la reacción se midió con un espectrofotómetro Multiskan Go Thermo Scientific®, a absorbancia de 550 nm.

3.8 Interleucina 1 beta secretada

La secreción de interleucina 1 beta se evaluó del sobrenadante del cultivo de macrófagos, utilizando la técnica de inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich (Bovine IL-1beta ELISA kit, ThermoFisher #ref ESS0027). Siguiendo las indicaciones del fabricante, se estableció una curva estándar de interleucina-1 beta de la siguiente forma: se midió la densidad óptica a 550 nm y los valores fueron restados de las mediciones resultantes a una longitud de onda de 450 nm, finalmente fueron sustraídos los valores correspondientes

a una concentración de 0 pg de IL-1 (blancos). A partir de la curva estándar se determinó la concentración de interleucina 1 beta en las muestras. La medición de absorbancia a las longitudes de onda mencionadas fue realizada con un lector Multiskan Go Thermo Scientific®.

4. Resultados

4.1 Propagación viral

Antes de comenzar los estudios, se verificó que las muestras de sangre a partir de las cuales se extrajeron los monocitos, las células MDBK utilizadas para propagar la cepa NADL del virus y el SFB que se emplearon en los ensayos estuvieran libres del VDVB, por lo que se extrajo RNA de cada componente y fue sometido a una RT-PCR para verificar la ausencia de virus contaminante. En todos los casos, el resultado fue negativo, con respecto a los controles negativo y positivo utilizados (vacuna comercial Bovimune Protector, LAPISA SA de CV) (Figura 3).

Una vez confirmada la ausencia de una posible contaminación, se infectaron a las células MDBK con la cepa NADL conservándose células sin infectar a manera de control negativo de infección. El efecto citopático apareció a partir de las 48 horas post infección, se observó la degeneración espumosa de las células ocasionada por la presencia de vacuolas, mismas que fueron en aumento a las 72 y 96 horas de manera concomitante a un incremento progresivo en espacios libres de células en la monocapa (Figura 4). Una vez propagada la cepa NADL, se procedió a cuantificar el virus generado.

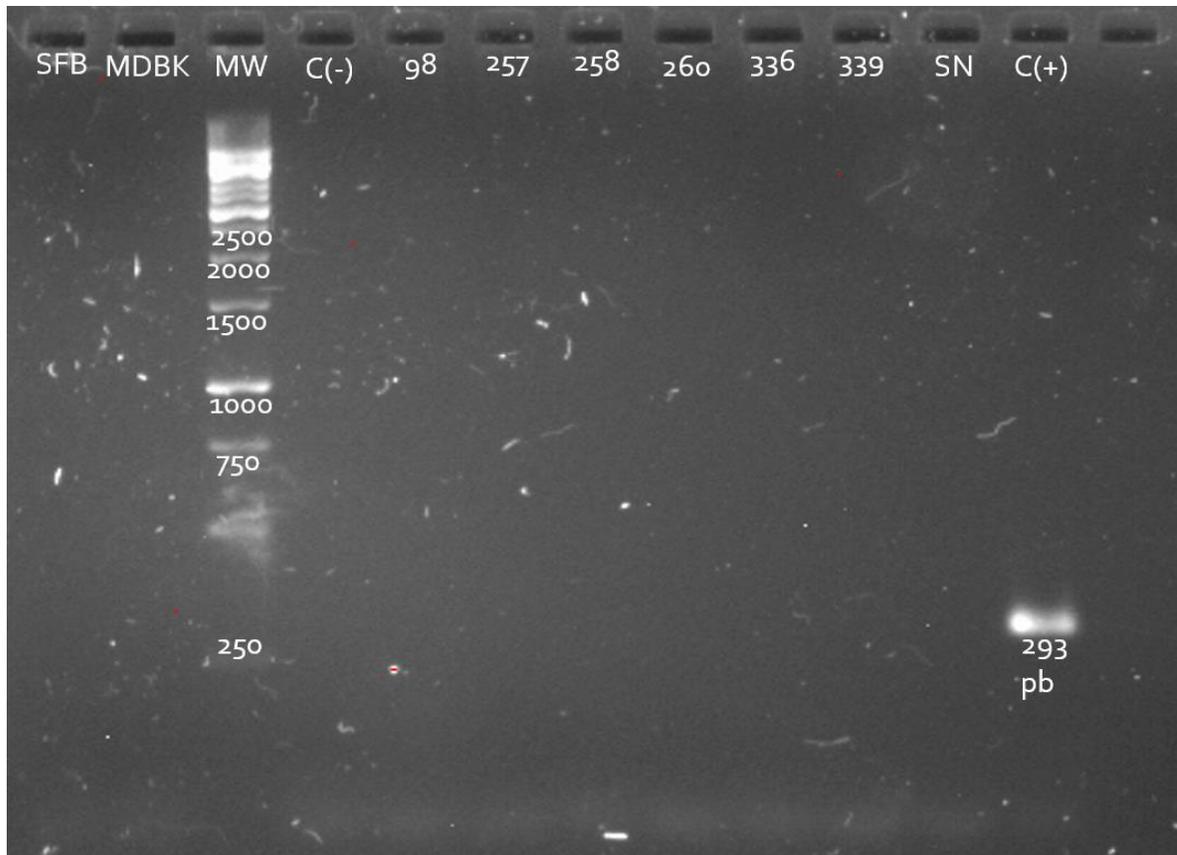


Figura 3. RT-PCR de BVDV realizada al modelo experimental.

Resultados de la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa de la región UTR 5' del virus de la diarrea viral bovina. MW, marcador de peso molecular. C(-), control negativo (PBS). C(+) control positivo (vacuna comercial Bovimune Protector5, LAPISA S.A. de C.V.). SFB, suero fetal bovino irradiado. MDBK, línea celular Madin Darby Bovine Kidney. SN y los números 98, 257, 258, 260, 336 y 339 corresponden a las identificaciones de los bovinos a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de sangre para realizar el aislamiento de monocitos.

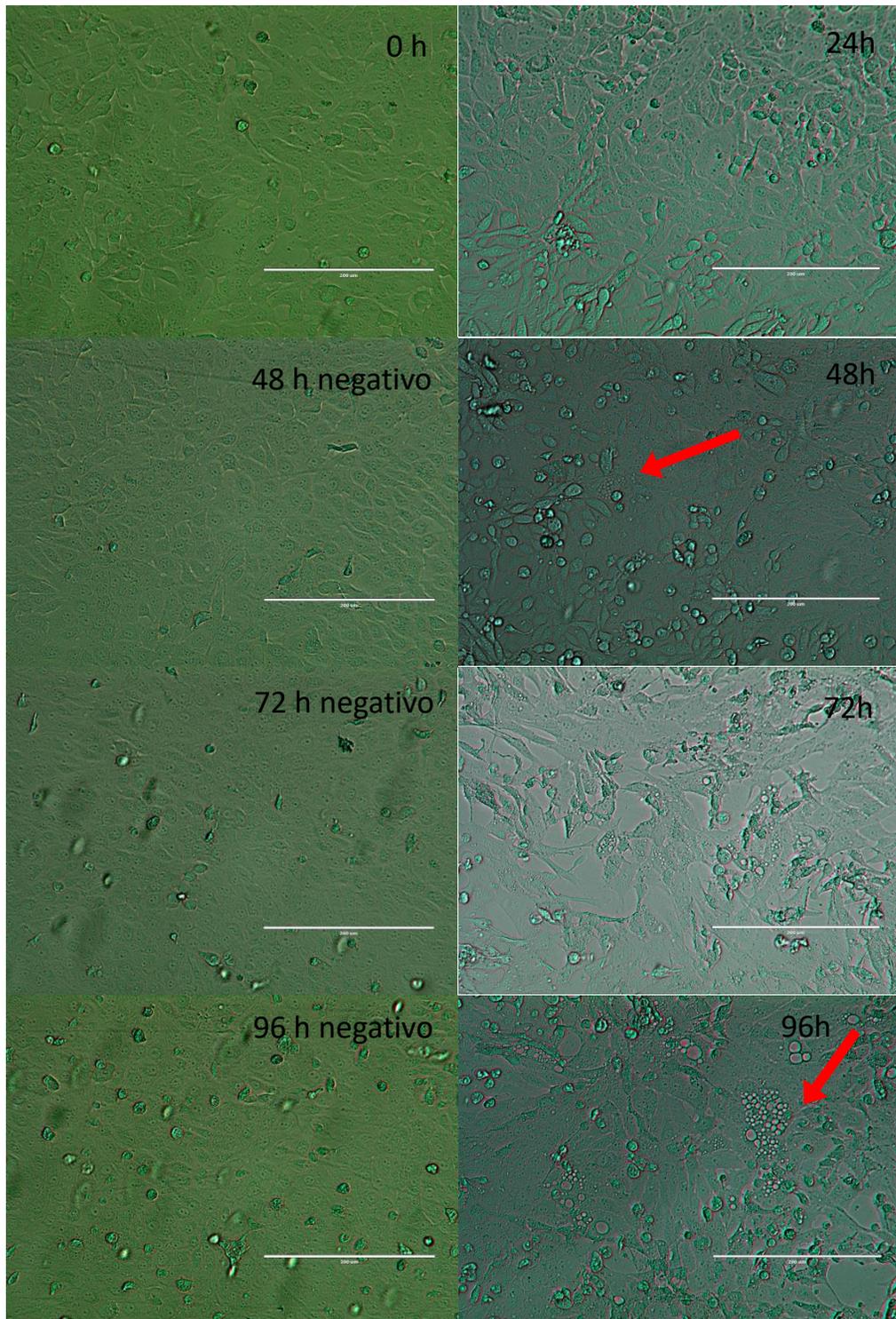


Figura 4. Propagación de la cepa NADL del virus de la Diarrea Viral Bovina en células MDBK. Se muestran imágenes representativas de las células a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas post-infección (h.p.i), comparadas con el control negativo (células sin infectar). Se puede apreciar la aparición de vacuolas (flechas) a las 48 h.p.i. y de espacios libres de células (destrucción) a las 72 h.p.i. En ambos casos, los cambios incrementaron progresivamente hasta realizar el lisado de las células y la colecta del virus (96 h.p.i.).

4.2 Titulación viral

Se realizó la titulación de los 2 lotes generados de la cepa NADL. Para esto, se prepararon microplacas con células MDBK a una confluencia aproximada del 95% y se incubaron con diluciones triples del virus. Las células se observaron diariamente para detectar la presencia de efecto citopático y se determinaron los títulos virales por el método de Reed & Muench. El título obtenido al día 7 fue de $3^{10.58}$ o $10^{5.048}$ DICC_{50%}MDBK/mL para el lote 1 (Anexo I). Para el segundo lote del virus fue necesario realizar diluciones quintuples seriadas que permitieron establecer un título viral de $5^{9.887}$ o $10^{6.90}$ al día 7 (Anexo II). En la figura 5 se pueden apreciar imágenes representativas de la titulación del virus. Los lotes titulados del virus, fueron almacenados a -196°C hasta su uso en los ensayos de infección de macrófagos, posteriores a la fenotipificación.

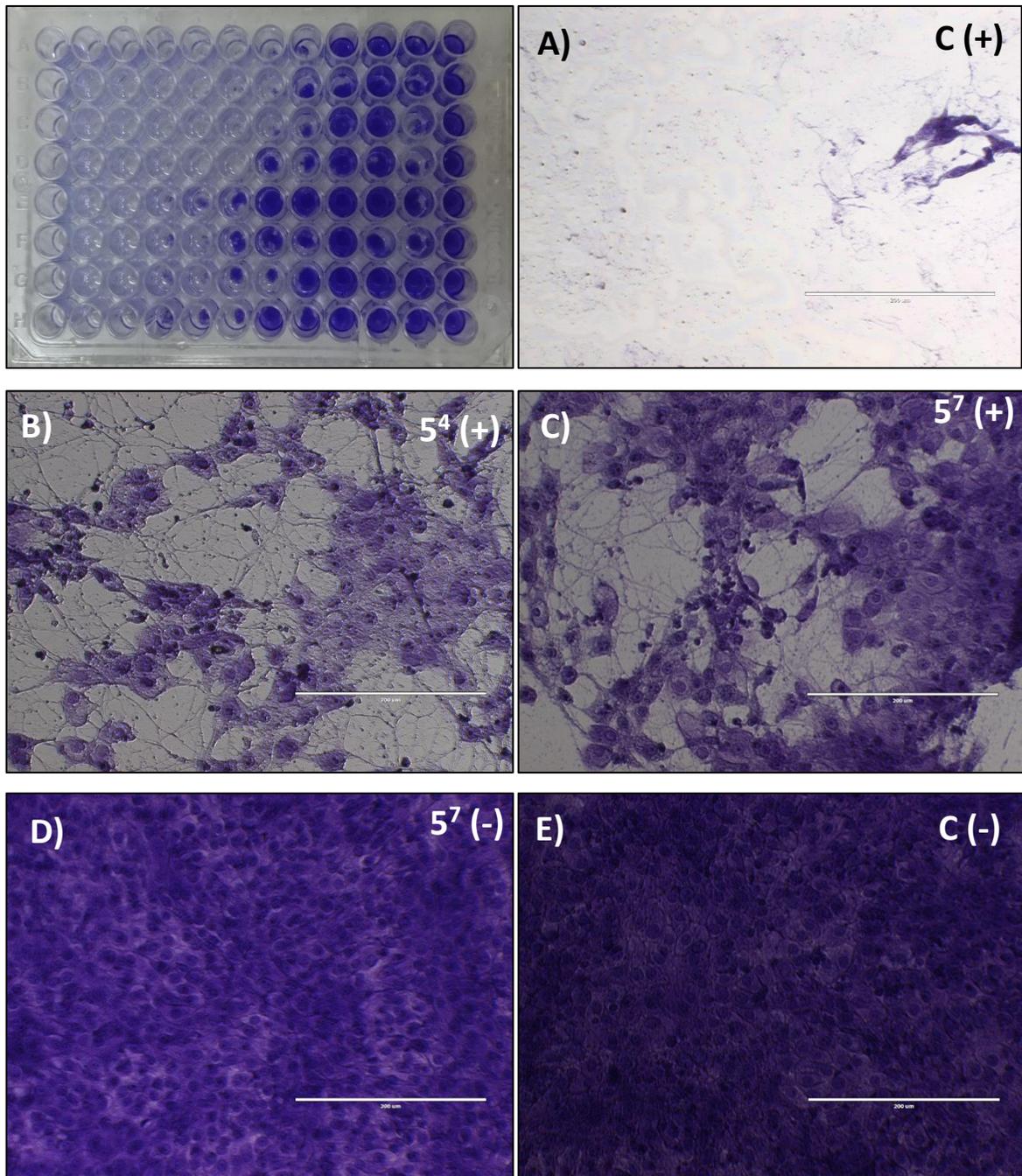


Figura 5 Titulación viral. Se muestra una imagen del proceso de titulación por el método de Reed & Muench, así como imágenes de: A) el virus concentrado usado a modo de control positivo, B) ejemplo de una dilución 5^4 con un resultado positivo, C) ejemplo de una dilución 5^7 con un resultado positivo, D) ejemplo de una dilución 5^7 con un resultado negativo y E) medio de cultivo DMEM con 10% SFB empleado como control negativo.

4.3 Fenotipificación

Los monocitos aislados de sangre periférica e incubados durante 13 días con RPMI con suero autólogo fueron fenotipificados, mediante la presencia del receptor CD14 mediante citometría. Los resultados, analizados con el software FlowJow, mostraron la emisión de fluorescencia verde (FITC) por la población celular, posterior a la incubación con el anticuerpo. Una vez que se observó que las células obtenidas de manera posterior a los procedimientos de aislamiento y cosecha expresaban CD14 (Figura 4), se destinaron células resultantes de los mismos para conducir los ensayos de infección y evaluar la producción de óxido nítrico e interleucina 1 β .

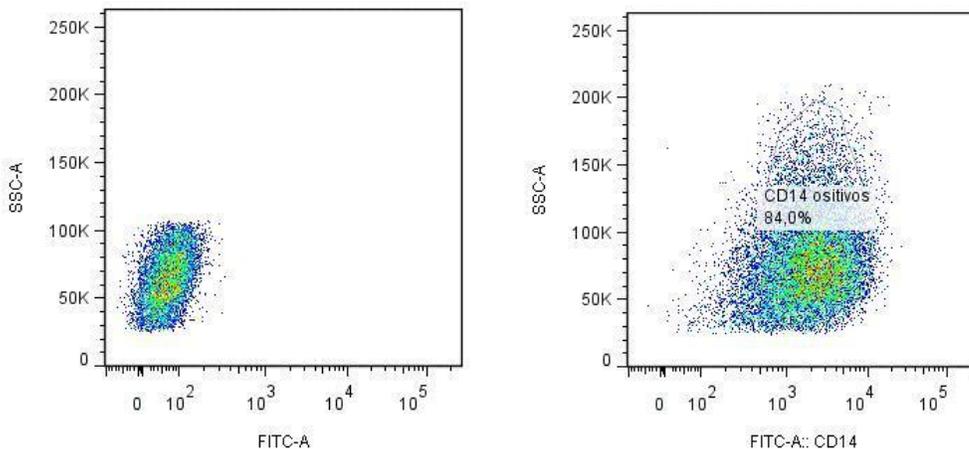


Figura 6 Expresión de CD14 en el cultivo primario de células mononucleares. Se muestran gráficas de tipo “dot plot” de granularidad contra emisión de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Izquierda, fluorescencia emitida por células no marcadas (auto-fluorescencia). Derecha, fluorescencia emitida por células unidas al conjugado CD14-FITC.

4.4 Producción de óxido nítrico

Una vez que las células fueron infectadas, se midieron los nitritos del sobrenadante a las 24 horas post-infección de 4 ensayos independientes con la reacción de Griess, los valores resultantes de densidad óptica de los MDMB cultivados con la cepa NADL del BVDV no mostraron diferencias respecto a los controles negativos con ninguna de las multiplicidades de infección empleadas (Figura 5).

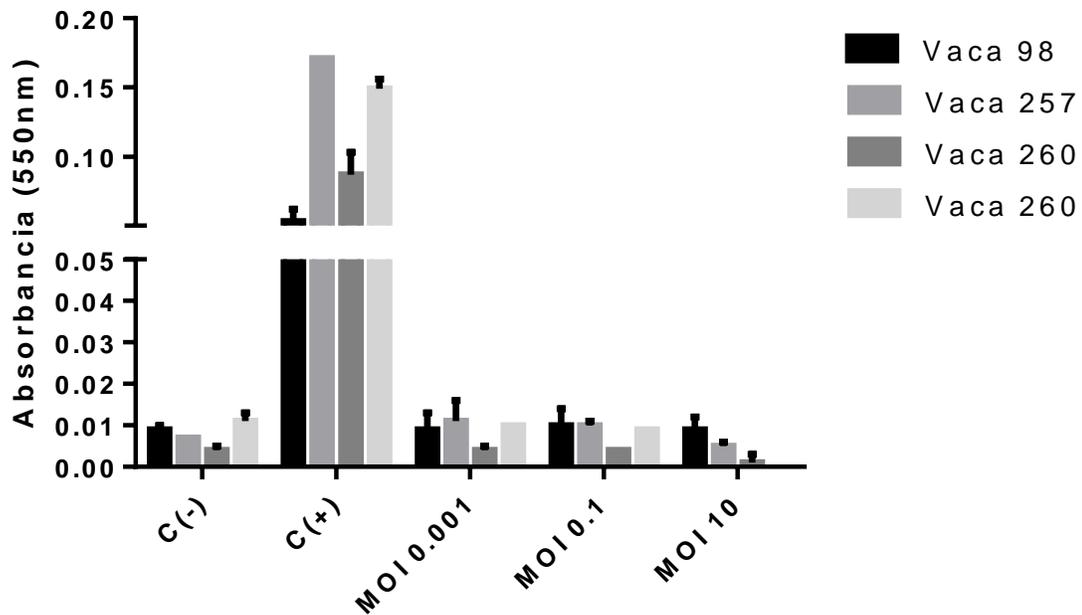


Figura 7. Producción de óxido nítrico en macrófagos infectados con diferentes MOI de BVDV. En la gráfica se muestran los resultados de la medición de nitritos (reacción de Griess) del sobrenadante de macrófagos (3×10^5) infectados con diferentes multiplicidades de infección (0.001, 0.1 y 10) de la cepa NADL, control positivo (200ng extracto puro de *E. coli* O:26 B:26) y control negativo (RPMI con 10% SFB). La absorbancia de la reacción se evaluó a una longitud de onda de 550nm.

4.5 Secreción de interleucina 1 beta

Una vez cuantificado el inóculo se infectaron a los macrófagos maduros con tres multiplicidades de infección. Los resultados de la ELISA tipo sándwich para IL-1 β a las 24 h.p.i de 4 ensayos independientes se muestran en la figura 8. Con las MOI's de 0.001 y 0.1 no se encontraron diferencias en la producción de la citocina, sin embargo, usando una MOI de 10, se observó un incremento entre 402 y 1140 pg/ml.

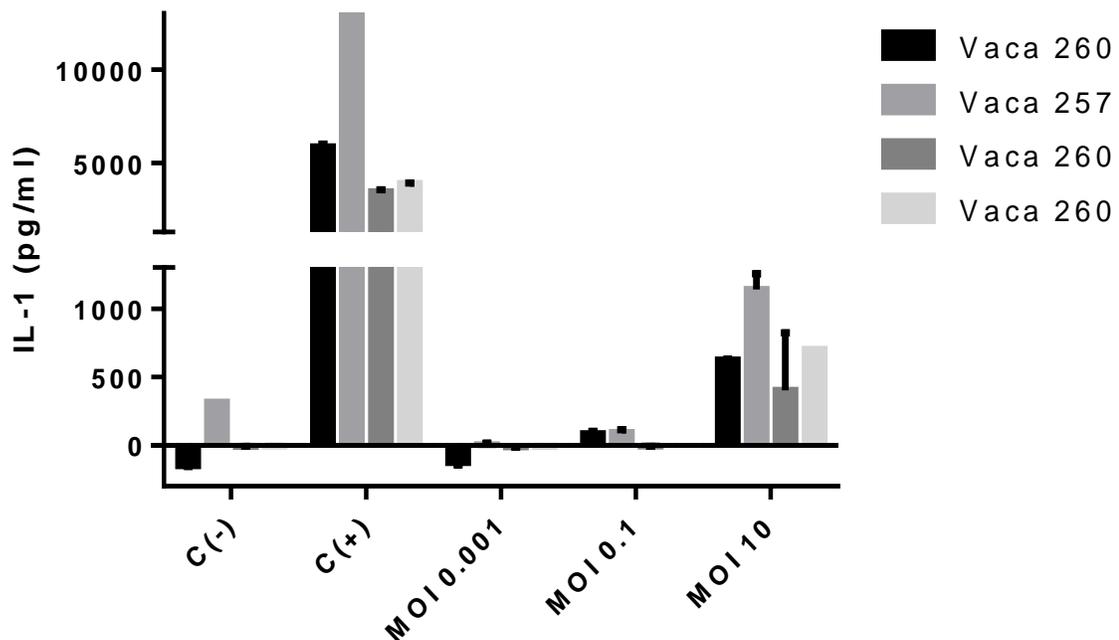


Figura 8. Secreción de IL-1 β en macrófagos infectados con diferentes MOI de BVDV. Concentración de IL-1 β en el sobrenadante de macrófagos infectados con diferentes multiplicidades de infección (0.001, 0.1 y 10) de la cepa NADL, en el sobrenadante del control positivo (200ng de extracto puro de E. Coli O:26 B:26) y del control negativo (RPMI con 10% SFB).

5. Discusión

En el presente trabajo se evidenció la secreción de IL-1 β por los macrófagos bovinos a una MOI alta a las 24 horas p. i., en datos no mostrados, se evidenció que ésta secreción de IL-1 β no se observa antes de las 12 horas, por lo que pensamos que el virus induce la salida de la citocina una vez que se replica. Respecto a los antecedentes del presente trabajo, en relación a la producción de IL-1 β con el uso de las cepas NADL, NY y variantes aisladas de animales persistentemente infectados, Jensen observó que el sobrenadante de macrófagos infectados suprimía la actividad proliferativa de IL-1 β ; sin embargo, no encontró diferencias en la síntesis de ARNm para IL-1 (39). Por el contrario, utilizando el biotipo no citopático del virus, Palomares (2014), encontró la sobreexpresión de ARNm de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias incluyendo IL-1 β , en los linfonodos traqueobronquiales de bovinos infectados con la cepa 1373 del genotipo 2 de BVDV, en contraste con los resultados que obtuvo con la cepa SD-1 del subgenotipo 1a, cabe mencionar de manera interesante que notaron una mayor expresión de IL-12 en ambos genotipos, lo que les sugirió activación de macrófagos y células dendríticas (40), observación contrapuesta a los resultados obtenidos en la evaluación de óxido nítrico que el presente estudio sugiere. En un estudio que se realizó con otro género (*flavivirus*) de la misma familia, ninguno de los virus involucrados aumentó o disminuyó la producción de IL-1 β , aunque 2 de ellos disminuyeron la producción de IL- β en respuesta a LPS(37). En contraste, las mediciones de IL-1 β que encontramos, mostraron un incremento entre 402 y 1140 pg/ml, con una dosis alta del virus. Esta respuesta en la producción de moléculas de la inmunidad innata por parte de células con función fagocítica y presentadora de antígenos, podría jugar un papel en el éxito del mantenimiento de la infección del virus durante la patogenia de la enfermedad, sin embargo,

la respuesta inmune inducida por otros miembros dentro de la familia *Flaviviridae* es muy diversa, inclusive entre genotipos y biotipos del BVDV, lo que demuestra que los resultados obtenidos en este trabajo no son concluyentes, y sugiere la importancia de realizar estudios relacionados (41). La respuesta de producción de IL-1 β observada con una MOI elevada, podría estar relacionada en primera instancia con una capacidad del virus de regular la plataforma responsable de la producción de IL-1 β , sin embargo, no sería prudente descartar una respuesta diferente con el resto de cepas virales, incluyendo la capacidad de pre-estimular la producción de óxido nítrico observada con el biotipo no citopático del virus (42).

En la reacción de Griess, no se encontró que alguna de las multiplicidades empleadas haya tenido un efecto en la producción de óxido nítrico. En el estudio previamente mencionado con 4 virus del género *flavivirus*, Barros (2009) observó que 2 de ellos aumentaron la producción de óxido nítrico en respuesta a LPS, mientras uno la disminuyó. Además, después de inhibir la iNOS e inocular los virus a ratones, generaron dosis en cultivo celular similares a sus controles demostrando que el óxido nítrico no tuvo efecto en la replicación viral (37); de manera semejante, otro *flavivirus* (virus de la encefalitis transmitida por garrapatas), no indujo la producción de NO (38). Nosotros pensamos que el virus podría tener la capacidad de modular la respuesta de liberación de óxido nítrico al igual que otros miembros de su familia, sin embargo, necesitamos realizar más experimentos para probar el efecto supresor. En un estudio realizado en 1884 por Adler y col., reportaron que la infección de macrófagos con el biotipo citopático de BVDV en presencia de *Salmonella spp*, induce un incremento en la producción de óxido nítrico, sin embargo, estos estudios no determinaron la inducción del óxido nítrico solo por la infección viral (43).

Las células mononucleares adherentes aisladas, manifestaron durante su mantenimiento en cultivo características morfológicas de macrófagos como las descritas previamente en condiciones similares (28,35). El análisis por citometría de flujo de estas células reveló un fenotipo positivo para el receptor CD14, marcador presente en macrófagos y ausente en células dendríticas derivadas de monocitos, sugiriendo una diferenciación a macrófagos. Después de descartar la contaminación de la línea celular MDBK con el virus, esta línea se usó para la propagación de la cepa NADL del BVDV, durante la cual se observó el efecto citopático característico, la presencia de vacuolas a partir de las 48 horas post-infección y de espacios en la monocapa libres de células a partir de las 72 h post-infección, que corresponde a destrucción celular, manifestada por el desprendimiento de las mismas. La ausencia de estos cambios en el control negativo permitió asociarlos a la replicación del virus y acorde con esta, observar un aumento progresivo de dichos cambios hasta las 96 horas, los títulos virales determinados en los diferentes lotes fueron de $10^{5.048}$ y $10^{6.90}$ DICC_{50%}/mL. Los resultados de la titulación permitieron realizar los ensayos de infección (4 repeticiones independientes) a 3 diferentes MOI (0.001, 0.1 y 10) y posteriormente realizar las evaluaciones de óxido nítrico e IL-1 β .

En experimentos realizados en condiciones semejantes a las del presente estudio se ha demostrado que la infección de las células con el BVDV a través de inmunofluorescencia o citometría de flujo usando a la proteína NS3 del virus como blanco (44,45), sería conveniente demostrar la infección en nuestro modelo experimental de una manera similar.

6. CONCLUSIONES

La cepa NADL perteneciente al biotipo citopático del virus de Diarrea Viral Bovina no induce la producción de óxido nítrico con multiplicidades de infección, tanto bajas (0.001 y 0.1) como altas (10).

La cepa NADL perteneciente al biotipo citopático del virus de Diarrea Viral Bovina induce la secreción de IL-1 β a las 24h con una MOI de 10:1.

7. REFERENCIAS

1. Neill JD. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals* [Internet]. 2013;41(1):2–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.002>
2. Tautz N, Tews BA, Gregor M. The molecular biology of pestiviruses. In: *Advances in virus research* [Internet]. 2015. p. 47–160. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733861903000963>
3. Hamers C, Dehan P, Couvreur B, Letellier C, Kerkhofs P, Pastoret P. Diversity Among Bovine Pestiviruses. 2001;112–22.
4. Ridpath JF. BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control 1. 2003;31:127–31.
5. Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet J* [Internet]. 2013;199(2):201–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.024> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053990>
6. Kelling CL, Topliff CL. Bovine maternal, Fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhea virus infections. *Biologicals* [Internet]. 2013;41(1):20–5. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.006>

7. Brock K V. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*. 2003;31(2):133–5.
8. Evermann JF, Barrington GM. Clinical features. In: Goyal SM, Ridpath JF, editors. *Bovine viral diarrhoea virus: Diagnosis, Management and control* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2005. p. 105–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444873125500370>
9. Gard JA, Givens MD, Stringfellow DA. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*. 2007;68(3):434–42.
10. Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One*. 2011;6(12):2–4.
11. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections (vol 64, pg 89, 1999). *Vet Microbiol* Jan 1999; 64 (2 3) 89 107. 2003;93(3):275–6.
12. Falcone E, Tollis M, Conti G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine* [Internet]. 1999 Oct 14 [cited 2017 Sep 7];18(5–6):387–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636817>
13. Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, Houe H, Moennig V. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe : today and in the future. 2006;25(3):961–79.
14. Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet J*. 2017;220(June 2016):80–7.

15. Alvarado A, Millan F, Hernández L, Barradas F, Mejía F, Cámara MA. Diarrea Viral Bovina en las Cuencas Lecheras Mexicanas. In: Situación Epidemiológica de la Ganadería Lechera en México. 1st ed. Ciudad de México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias; 2015. p. 165–76.
16. Chase CC., Elmowalid G, Yousif AA. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 2004;20(1):95–114. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072003000768>
17. Maurer K, Krey T, Moennig V. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *J Virol*. 2004;78(4):1792–9.
18. UNIPROT [Internet]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P15529>
19. Chen Z, Rijnbrand R, Jangra RK, Devaraj SG, Qu L, Ma Y, et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology*. 2007;366(2):277–92.
20. Schweizer M, Peterhans E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *J Virol*. 2001;75(10):4692–8.
21. Chase CCL, Elmowalid G, Yousif AAA. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: A constantly changing picture. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 2004;20(1):95–114.
22. Rajput MKS, Darweesh MF, Park K, Braun LJ, Mwangi W, Young AJ, et al. The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains on bovine monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) phenotype and capacity to produce BVDV. *Virol J*.

- 2014;11(1):44.
23. Glew EJ, Carr B V., Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol.* 2003;84(7):1771–80.
 24. Welsh M, Adair B, Foster J. Effect of Bvd Virus-Infection on Alveolar Macrophage Functions. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;46(3–4):195–210.
 25. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* [Internet]. 2001;2(10):907–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577346>
 26. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. 1999;1411.
 27. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):64–76.
 28. Adler H, Frech B, Thony M, Pfister H, Peterhans E, Jungi TW. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J Immunol* [Internet]. 1995;154(9):4710–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7536776
 29. Alfieri AB, Nítrico EÓ. Óxido Nítrico : estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas Introducción.
 30. Vanini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* 2015;6:334–43.
 31. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease

- Pathogenesis. *Nat Immun.* 2009;10(3):241.
32. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(2):89–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081871>
33. Lupfer C, Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome control of viral infection. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2015;12:38–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.02.007>
34. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N, et al. IL-1?? Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):1–13.
35. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;34(3–4):291–305.
36. Heiko Adler- Inducible L-Arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow derived macrophages.pdf.
37. Barros VED, Ferreira BR, Livonesi M, Figueiredo LTM. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with brazilian flaviviruses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(3):141–7.
38. Kreil T, Eibl M. Nitric oxide and viral infection: NO antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection. *Virology* [Internet]. 1996;219(1):304–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623546>
39. Jensen J, Schultz R.. Effect of Infection By Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)

- Invitro on Interleukin-1 Activity of Bovine Monocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;29(3–4):251–65.
40. Roberto A. Palomares_ Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during experimental infection with low or high virulence bovine viral diarrhoea virus in beef calves.pdf.
41. Ammari M, Mccarthy FM, Nanduri B, Pinchuk LM. Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Viruses-infected monocytes : identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. 2010;11(Suppl 6):1–13.
42. Adler H, Frech B, Meier P, Jungi TW, Peterhans E. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Vol. 202, Biochemical and biophysical research communications.* 1994. p. 1562–8.
43. Adler H, French B, Meier P, Jungi TW, Peterhans E. Noncytopathic strains of Bovine Viral Diarrhoea Virus prime bovine bone marrow derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;202(3):1562–8.
44. Glew EJ, Carr B V., Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol.* 2003;84(7):1771–80.
45. Rajput MK, Darweesh MF, Park K, Braun LJ, Mwangi W, Young AJ, et al. The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains on bovine monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) phenotype and capacity to produce BVDV. *Virol J* [Internet]. 2014;11(1):44. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-11-44>

Anexo I. Procedimiento para la determinación del título viral del lote 1 a través del método de Reed & Muench

Resultados												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Reed & Muench												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	Virus Concentrado	3 ⁻¹	3 ⁻²	3 ⁻³	3 ⁻⁴	3 ⁻⁵	3 ⁻⁶	3 ⁻⁷	3 ⁻⁸	3 ⁻⁹	3 ⁻¹⁰	Control negativo
+/n	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	7/8	6/8	1/8	
+	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6	1	
-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	
Σ+ <--	74	66	58	50	42	38	30	22	14	7	1	
Σ- -->	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	10	
Total Acumulado	74	66	58	50	42	38	30	22	15	10	11	
Σ+/Total A.	74/74	66/66	58/58	50/50	42/42	36/38	30/30	22/22	14/15	7/10	1/11	
%	100	100	100	100	100	100	100	100	93.3	70	10	

$$\text{Distancia Proporcional (DP)} = \frac{70 - 50}{70 - 10} = \frac{20}{60} = \frac{1}{3} = 0.333$$

$$\begin{aligned} \text{Punto final 50\% (PF50\%)} &= -9 + \underset{\text{base 3}}{(-0.437)} \underset{\text{Log de 3}}{(0.333)} \\ &= -9 - 0.159 = -9.159 \end{aligned}$$

$$3^{9.159} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/210\mu\text{l}$$

$$\begin{aligned} 3^{9.159} &- 210\mu\text{l} \\ 111,618 &- 1000\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$\log_3(111,618) = 10.58$$

$$\log_{10}(111,618) = 5.048$$

$$\text{Título} = 3^{10.58} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/\text{ml}$$

$$\text{Título} = 10^{5.048} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/\text{ml}$$

Anexo II. Procedimiento para la determinación del título viral del lote 2 a través del método de Reed & Muench.

Resultados												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Reed & Muench (Base 5)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	Virus Concentrado	5 ⁻¹	5 ⁻²	5 ⁻³	5 ⁻⁴	5 ⁻⁵	5 ⁻⁶	5 ⁻⁷	5 ⁻⁸	5 ⁻⁹	5 ⁻¹⁰	Control Negativo
+/n	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	2/4	
+	4	4	4	4	4	4	4	4	3	1	2	
-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	
Σ+ <--	38	34	30	26	22	18	14	10	6	3	2	
Σ- -->	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6	
Total Acumulado	38	34	30	26	22	18	14	10	7	7	8	
Σ+/Total A.	38/38	34/34	30/30	26/26	22/22	18/18	14/14	10/10	6/7	3/7	2/8	
%	100	100	100	100	100	100	100	100	85.71	42.86	25	

$$\text{Distancia Proporcional (DP)} = \frac{85.71 - 50}{85.71 - 42.86} = \frac{35.71}{42.80} = 0.833$$

$$\begin{aligned} \text{Punto final 50\% (PF50\%)} &= -8 + (-0.69) \left(\frac{0.833}{\log de 5} \right) \\ &= -8 - 0.57 = -8.57 \end{aligned}$$

$$5^{8.57} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/210\mu\text{l}$$

$$\begin{aligned} 5^{8.57} &- 210\mu\text{l} \\ 8'146,886 &- 1000\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$\log_5(8'146,886) = 9.887$$

$$\log_{10}(8'146,886) = 6.9$$

$$\text{Título} = 5^{9.887} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/\text{ml}$$

$$\text{Título} = 10^{6.9} \text{DICC } 50\%_{\text{MDBK}}/\text{ml}$$